



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline : Microbiologie

Présentée et soutenue par **Alexandre Gouzy**
Le 13/12/2013

**Etude de l'utilisation des acides aminés aspartate et asparagine
dans la virulence de *Mycobacterium tuberculosis***

JURY

Pr. Olivier Dussurget, Institut Pasteur (Paris) - Rapporteur
Dr. Alain Charbit, Université Paris Descartes (Paris) - Rapporteur
Dr. Priscille Brodin, Institut Pasteur (Lille) - Examinatrice
Dr. Nic Lindley, INSA (Toulouse) - Examineur
Dr. Ludovic Tailleux, Institut Pasteur (Paris) - Examineur
Pr. Claude Gutierrez, IPBS/CNRS/UPS (Toulouse) - Président
Dr. Yannick Poquet, IPBS/CNRS/UPS (Toulouse) - Directeur de thèse
Dr. Olivier Neyrolles, IPBS/CNRS/UPS (Toulouse) - Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Biologie - Santé - Biotechnologies*
Unité de recherche : *Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (UMR5089, CNRS)*
Directeurs de Thèse : *Olivier Neyrolles et Yannick Poquet*

Etude et utilisation des acides aminés aspartate et asparagine de la virulence de *Mycobacterium tuberculosis*

L'agent étiologique de la tuberculose est *Mycobacterium tuberculosis*, un pathogène intracellulaire facultatif se développant à l'intérieur de cellules phagocytaires, notamment les macrophages alvéolaires. Une meilleure compréhension de l'interaction entre le bacille tuberculeux et son hôte est nécessaire pour permettre l'élaboration d'un vaccin plus protecteur que le vaccin actuel ainsi que l'identification d'antituberculeux plus efficaces que ceux existant.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes d'acquisition de nutriments utilisés par la bactérie pour assurer sa croissance et résister aux mécanismes bactéricides de l'hôte. De nombreuses études ont pu mettre en évidence que le bacille tuberculeux utilise des lipides de l'hôte tels que les triglycérides et le cholestérol ou des glucides tel que le glucose pour se multiplier et/ou se maintenir à l'intérieur des tissus infectés. Alors que ces substrats servent principalement de source de carbone et d'énergie, peu de choses sont connues en ce qui concerne la nature des molécules azotées utilisées par le bacille durant l'infection. En effet, l'azote, tout comme le carbone, est un élément essentiel chez les êtres vivants entrant dans la composition de biomolécules d'importance majeure telles que les acides aminés et les acides nucléiques. Mon projet de thèse consistait donc à identifier la nature de molécules azotées acquises par le bacille durant l'infection et dont l'utilisation serait impliquée dans la croissance du pathogène au sein des tissus.

Nous avons pu mettre en évidence que *M. tuberculosis* possède un transporteur unique pour importer l'aspartate, nommé AnsP1, et que ce transporteur est requis par le pathogène pour se multiplier *in vivo* chez la souris. Par des techniques de métabolomique, nous avons pu montrer que cet acide aminé sert principalement de source d'azote à la bactérie lors de sa croissance *in vitro*. Ces résultats démontrent, pour la première fois, que les acides aminés, et en particulier ici l'aspartate, constituent une source importante d'azote permettant la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* durant l'infection (Gouzy *et al*, *Nature Chemical Biology*, publié). En parallèle de cette découverte, nous avons pu démontrer qu'un autre transporteur homologue à AnsP1, appelé AnsP2, est quant à lui impliqué dans l'import d'un autre acide aminé, l'asparagine. AnsP2, contrairement à AnsP1, n'est

pas requis pour la croissance de la bactérie chez l'animal, probablement du fait de la présence d'autres transporteurs d'asparagine chez la bactérie. Cela dit, nous avons pu montrer que l'asparaginase AnsA, un enzyme nécessaire à l'utilisation de l'asparagine est requis par le bacille tuberculeux pour la colonisation de l'hôte. De façon intéressante, nous avons pu montrer que l'asparaginase AnsA, en plus de son implication dans l'assimilation de l'azote de l'asparagine chez la bactérie, est impliquée dans un mécanisme de résistance au stress acide, un environnement rencontré à l'intérieur des macrophages. Cette seconde étude souligne à nouveau le lien étroit qui existe entre le métabolisme du pathogène et ses capacités à résister aux mécanismes antimicrobiens de l'hôte (Gouzy *et al*, *PLOS Pathogens*, en révision). Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, le rôle des acides aminés dans la nutrition et la virulence de *Mycobacterium tuberculosis* et ouvrent la voie pour la recherche de nouveaux antituberculeux permettant d'inhiber l'assimilation de ces nutriments par le pathogène au cours de l'infection.

ABREVIATIONS

ABC: ATP-binding-cassette
atgs : Autophagy-related genes
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
CFP-10 : 10 kDa culture filtrate protein
CHO : Cholestérol
CE : Esters de cholestérol
CXCL1 : C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL10 : C-X-C motif chemokine ligand 10
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DIM : Phytocérol dimycosérosates
DOTS : Directly observed therapy short course
EBP50 : Ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50
EEA1 : Early endosome antigen 1
ESAT-6 : 6 kDa early secretory antigenic target
ESX-1 : ESAT-6 secretion system 1
Fcγ : Immunoglobulin Fc receptor
GABA : acide γ-aminobutyrique
GROα : Growth regulated oncogene-alpha
HLA class II : Human leucocyte antigen class II
IL : Interleukine
INFγ : gamma interferon
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
IRGM : Immunity-related GTPase M
Icd1/2 : Isocitrate lyase 1/2
LAM : lipoarabinomannane
LM : lipomannane
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
MDR : Multi-drug resistant
MR : Mannose receptor
NBD : nucleotide binding domain
Ndk : nucleoside diphosphate kinase
NLR : NOD-like receptor
NRAMP1 : Natural resistance-associated macrophage protein 1
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORPL1 : Oxysterol-binding protein-related protein1
PAMPs : Pathogen associated molecular pattern
PE : Phosphatidylethanolamines
PI3K : Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase
PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PIM : Phosphatidylinositol mannoside
PRRs : Pattern recognition receptors
RD1 : Region of différence 1
Rpf : Resuscitation-promoting factor
RILP : Rab7-interacting lysosomal protein
RNI : Reactive nitrogen intermediates
ROS : Reactive oxygen species
SCID : Severe combined immunodeficiency
SK1 : Sphingosine kinase 1
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SR : Scavenger receptor
SL : Sulfolipid
TDM : Trehalose dimycolate
TDR : Totally-drug-resistant
TG : triglycérides
TfR : Transferrin receptor
TLR : Toll-like receptors
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
Tgs1 : triglycéride sythase1
VDR: Vitamin D receptor
VIH : Virus de l'immunodéficiency humaine
XDR : Extensively-drug-resistant

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	9
A. LA TUBERCULOSE	9
I. Epidémiologie.....	9
1. Définition.....	9
2. Facteurs d'incidence	9
a) Les facteurs environnementaux.....	9
b) Les facteurs de l'hôte	11
II. Prophylaxie et traitement.....	12
1. Le diagnostic.....	12
2. La vaccination.....	13
a) Le vaccin BCG.....	13
i. Variabilité génétique du BCG	13
ii. Durée de protection du BCG	14
iii. Mycobactéries environnementales.....	14
b) Vers un nouveau vaccin.....	15
iv. Les vaccins vivants.....	15
v. Les vaccins « booster »	16
vi. Les vaccins thérapeutiques	16
3. L'antibiothérapie	17
a) Le traitement actuel.....	17
b) Vers un nouveau traitement.....	18
4. Les stratégies de lutte (OMS 2012).....	20
B. LE CYCLE INFECTIEUX.....	21
I. La cellule hôte : le macrophage.....	22
II. Reconnaissance de <i>M.tuberculosis</i> par le macrophage	22

III.	La réponse immunitaire adaptative : la formation du granulome	23
IV.	De la latence vers la réactivation.....	25
C.	INTERACTION HOTE-PATHOGENE.....	26
I.	Conditions de vie intracellulaire de <i>M. tuberculosis</i>	26
1.	La maturation du phagosome	27
a)	Le phagosome précoce.....	27
b)	Le phagosome tardif.....	28
c)	Le phagolysosome.....	28
2.	Inhibition de la fusion phagosome-lysosome par <i>M. tuberculosis</i>	28
3.	L'échappement du phagosome	30
II.	Mécanismes bactéricides du macrophage et résistance de <i>M. tuberculosis</i>	31
1.	Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	32
a)	Les radicaux oxygénés	32
b)	Les radicaux azotés	33
2.	Les peptides antimicrobiens	34
3.	L'autophagie.....	35
4.	L'apoptose	36
5.	L'intoxication métallique	37
6.	La restriction en nutriments : l'exemple du fer.....	38
III.	Environnement bactérien et adaptation	41
1.	Le stress acide	41
a)	La résistance passive	41
b)	La résistance active	42
2.	Le stress hypoxique.....	44
a)	L'entrée en dormance : le rôle clé du système DosRST	45
b)	La respiration des nitrates	46
3.	Le stress nutritionnel	48

D.	NUTRITION DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> AU SEIN DE L'HOTE.....	50
I.	Sources de carbone et d'énergie	51
1.	Environnement nutritionnel : La formation des macrophages spumeux	51
2.	Sources de carbone et d'énergie utilisés.....	52
a)	Le cholestérol	52
b)	Les triglycérides	53
c)	Les carbohydrates	54
3.	Le métabolisme central du carbone durant l'infection.....	55
II.	Sources d'azote.....	57
1.	Régulation du métabolisme central de l'azote	57
2.	Sources potentielles d'azote durant le cycle infectieux.....	59
a)	Les nitrates.....	59
b)	L'urée.....	60
3.	Systèmes d'acquisition des molécules azotées.....	61
4.	Les sources préférentielles d'azote <i>in vitro</i>	64
III.	L'asparagine : une source préférentielle d'azote	64
1.	L'asparagine : une source préférentielle d'azote à pH acide.....	65
2.	Les systèmes de transport de l'asparagine : AnsP1 et AnsP2.....	66
3.	L'utilisation de l'asparagine : l'asparaginase AnsA.....	67
	RESULTATS	69
A.	L'aspartate : un acide aminé requis pour l'acquisition de l'azote et la virulence de <i>M. tuberculosis</i>	69
B.	L'asparagine : un acide aminé impliqué dans l'acquisition de l'azote et la résistance au stress acide chez <i>M. tuberculosis</i>	71
	DISCUSSION.....	73
A.	L'aspartate : une source d'azote requise pour la croissance de <i>M. tuberculosis in vivo</i>	73

B.	L'asparagine : un acide aminé essentiel à l'acquisition de l'azote et à la résistance au stress acide au cours du cycle infectieux de <i>M. tuberculosis</i>	74
C.	L'utilisation de l'aspartate et de l'asparagine chez <i>M. tuberculosis</i> : un mécanisme couplé ? .	76
	Conclusion.....	80
	REFERENCES	83

INTRODUCTION

A. LA TUBERCULOSE

I. Epidémiologie

1. Définition

La tuberculose est la maladie humaine la plus meurtrière due à un pathogène bactérien unique. En 2011, 1,4 millions de décès et 8,7 millions de nouveaux cas de tuberculose ont été recensés à travers le monde (Rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2012, http://www.who.int/tb/publications/global_report/2012/en/index.html). L'agent étiologique de la tuberculose est *Mycobacterium tuberculosis*, aussi appelé bacille tuberculeux, une bactérie pathogène se multipliant à l'intérieur des cellules humaines, notamment les macrophages. Ce pathogène n'est pas une bactérie retrouvée à l'état libre dans l'environnement mais est un microorganisme hautement adapté à son hôte humain avec lequel il aurait pu co-évoluer [1]. On estime que près d'un tiers de la population mondiale pourrait être infecté par le bacille tuberculeux. Ce nombre conséquent s'explique par le fait que la tuberculose est avant tout une maladie latente dont les symptômes ne se déclarent que chez 5 à 10% des individus [2]. Le passage de la forme latente vers la forme active et potentiellement mortelle de la maladie peut provenir d'origines diverses conduisant toutes généralement à une diminution des défenses immunitaires de l'hôte. Bien que pouvant présenter des formes disséminées, la forme la plus fréquente (et transmissible) de la maladie est pulmonaire et induit la mort de près de la moitié des personnes, en l'absence de traitement, par destruction de leurs poumons.

2. Facteurs d'incidence

a) *Les facteurs environnementaux*

La tuberculose est une maladie de la pauvreté et son incidence est étroitement associée à la malnutrition, au surpeuplement, à une mauvaise hygiène et à un accès limité aux soins. La

malnutrition est une cause majeure d'abaissement des défenses immunitaire, rendant les individus plus susceptibles aux agressions par des pathogènes tel que *M. tuberculosis* [3]. Ceci est dû au fait que certains nutriments, notamment certaines classes de vitamines et des oligo-éléments, tels que le fer et le zinc, jouent un rôle important pour le fonctionnement du système immunitaire [3, 4]. Associé à la malnutrition, le surpeuplement est quant à lui un facteur accroissant la transmission de la maladie.

L'Asie et l'Afrique sont les continents le plus durement touchés, dénombant respectivement 59% et 26% des nouveaux cas de tuberculoses déclarés durant l'année 2011 (OMS 2012). Plus précisément, la Chine, l'Inde, l'Indonésie, le Pakistan et l'Afrique du Sud sont parmi les pays comptant le plus grand nombre de cas de tuberculose. L'Afrique du Sud compte l'incidence la plus élevée avec 993 cas pour 100 000 habitants (OMS 2012). La France est quant à elle considérée comme un pays de faible incidence, avec un recensement de 9 cas de tuberculose pour 100 000 habitants durant l'année 2011 en France métropolitaine (Institut de Veille Sanitaire, 2013). Dans les pays de faible incidence comme la France, les populations les plus touchées correspondent aux personnes immigrées provenant de pays à forte incidence de tuberculose, mais également à des personnes natives de France, essentiellement les personnes âgées et les sans domiciles fixes.

La pandémie due au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a un impact conséquent sur l'incidence de la tuberculose [5-9]. A l'échelle mondiale, 13% des nouveaux cas de tuberculose concernés des personnes VIH positives durant l'année 2011 (OMS 2012). L'état d'immunodéficience induit par le VIH provoque une augmentation des cas de tuberculose notamment en Afrique subsaharienne qui est une région de forte co-incidence tuberculose/VIH[9]. Chez les individus co-infectés, il est estimé que la probabilité de déclarer une forme active de tuberculose est augmentée par un facteur de 20 [5].

On peut également noter qu'il existe d'autres facteurs, plus mineurs que la malnutrition et le VIH, augmentant l'incidence de la tuberculose comme l'âge, le diabète, la pollution de l'air et l'abus de drogues diverses tel que le tabac et l'alcool [10-13]. Parmi eux, le diabète semble être le facteur le plus aggravant, augmentant par 3 le risque des individus à développer une tuberculose active [10]. Il a même été montré au Mexique que l'incidence de la tuberculose est augmentée plus fortement par le diabète que par le VIH [14].

b) Les facteurs de l'hôte

En plus des facteurs environnementaux, l'incidence de la tuberculose varie au sein des populations selon le patrimoine génétique des individus. En premier lieu, l'incidence de la tuberculose varie selon le genre. En effet, des études globales de populations ont pu révéler qu'en moyenne, les hommes sont deux fois plus nombreux à être affectés par la tuberculose (OMS 2012). Bien que les raisons de cette susceptibilité ne soient pas encore clairement établies à ce jour, l'interconnexion entre le système endocrinien et immunitaire semblerait jouer un rôle prédominant dans cette différence de susceptibilité.

Un lien concret existe entre les hormones sexuelles femelles comme les œstrogènes ou mâles telle que la testostérone, et l'immunité anti-infectieuse [15]. En effet, il a pu être montré que les œstrogènes jouent un rôle protecteur en induisant la production d'Interféron gamma (IFN γ), une cytokine produite par les lymphocytes T et qui potentialise l'activité microbicide des macrophages [16]. A l'inverse, la testostérone est une hormone qui limite l'expansion des lymphocytes et diminue leur production en cytokines [15].

De manière intéressante, les souris mâles ont un taux de mortalité plus élevé que les souris femelles suite à une infection par la bactérie *Mycobacterium marinum*, une espèce bactérienne proche de *Mycobacterium tuberculosis*. Dans ce modèle d'infection, la castration des souris mâles ou l'administration de testostérone aux souris femelles abroge la susceptibilité liée au genre, renforçant l'intérêt à porter à ces hormones sexuelles dans le cadre de l'étude de la tuberculose chez l'homme [17]. On peut noter que cette susceptibilité supérieure observée chez les hommes existe également dans d'autres affections que la tuberculose telle que la coxiellose et la leishmaniose [16]. Une implication plus globale du système endocrinien dans la susceptibilité aux maladies infectieuses pourrait donc exister.

Le polymorphisme génétique est également à l'origine d'une différence de susceptibilité des individus à la tuberculose. Ces polymorphismes ont un effet délétère sur l'expression de gènes ayant un rôle important dans la reconnaissance du bacille (ex : gènes DC-SIGN, MR, TLR2, TLR8 et TLR9), la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (ex : gènes HLA class II et MCP-1) ou encore l'activité microbicide des macrophages (ex : gènes NRAMP1 ; VDR ; IFNG ; IRGM) [16, 18-20].

II. Prophylaxie et traitement

La tuberculose est une maladie ancienne et malgré l'existence d'un vaccin, le BCG (Bacille de Calmette et Guérin), et d'une antibiothérapie, cette maladie n'a pu être éradiquée et constitue encore de nos jours un problème majeur de santé publique.

1. Le diagnostic

Les symptômes de la maladie incluent un amaigrissement important des individus associé à une fièvre et une forte toux consécutive à la destruction des tissus pulmonaires. Le diagnostic précoce est un prérequis pour favoriser la survie des individus d'une part et pour limiter la propagation de la maladie d'autre part. Le test tuberculinique (intradermoréaction) est fréquemment utilisé et permet de déterminer si un individu a été en contact avec une espèce mycobactérienne. Cependant, ce test se révèle le plus souvent positif chez un individu vacciné par le BCG et ne peut donc pas servir de test fiable pour la détection de la maladie [21].

Généralement, le diagnostic de la tuberculose repose sur l'observation microscopique du germe contenu dans les crachats. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et peu coûteuse mais sa sensibilité est limitée et donne lieu à de faux négatifs (OMS 2012)[22]. La mise en culture de la bactérie à partir des crachats est également couramment réalisée et a l'avantage d'être plus sensible que l'analyse microscopique. Cependant, *M. tuberculosis* étant une bactérie à croissance lente (temps de génération de 20h), cette seconde méthode de diagnostic n'offre un résultat qu'après une quinzaine de jours [23]. De plus, ces deux techniques présentent le désavantage d'être difficilement applicables aux enfants les plus jeunes qui sont incapables d'expectorer [24].

Des avancées considérables ont été réalisées ces dernières années pour faciliter, accélérer et rendre plus fiables le diagnostic de la tuberculose. Des tests basés sur l'amplification de l'ADN bactérien permettent aujourd'hui d'identifier les souches mycobactériennes ainsi que d'anticiper leur capacité de résistance à certains antibiotiques par la détection de sites spécifiques de mutation [25]. Également, des tests comme l'IGRA (interferon gamma release assay), basé sur la détection de l'IFN γ produit par les lymphocytes T du sang après leur stimulation par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*, permettent de détecter des cas de tuberculose active et même latente chez les individus [26]. Cependant, ces nouvelles méthodes de diagnostic restent peu utilisées en routine du

fait principalement de leur coût et de leur difficulté de mise en place dans les zones de forte incidence pouvant être dépourvues d'eau courante et d'électricité [22].

2. La vaccination

a) Le vaccin BCG

Depuis le début des années 1920, il existe un vaccin pour lutter contre la tuberculose appelé BCG. Il s'agit d'un vaccin vivant, administré par voie sous-cutanée, qui a été élaboré à partir d'une mycobactérie responsable de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*. Bien qu'initialement développé par les docteurs Calmette et Guérin pour la vaccination des bovins, il a rapidement pu être démontré que ce vaccin protégeait l'homme. Le séquençage des génomes de *M. bovis* et *M. tuberculosis* révélera des années plus tard que ces deux espèces sont très proches génétiquement [27, 28]. L'obtention du vaccin s'est faite par passages répétés de la souche bovine pathogène sur milieu empirique ayant conduit à son atténuation. Cette atténuation a été provoquée par les nombreuses modifications du génome subit au cours de différentes étapes de la culture et plus particulièrement la perte de matériel génétique, notamment la région RD1 (région de différence 1) importante pour la virulence du bacille. Dès 1924, le BCG a été distribué à travers le monde et constitue le vaccin le plus administré chez l'homme [29].

Cependant, bien que le BCG protège efficacement l'enfant contre les formes disséminées graves de la maladie, ce vaccin a une efficacité très variable allant de 0 à 80% de protection contre la forme pulmonaire et transmissible de la maladie chez l'adulte [30]. Les raisons de cette variabilité de protection ne sont pas clairement établies à ce jour et pourraient être multiples:

i. Variabilité génétique du BCG

Après sa distribution mondiale et suivant le même procédé que celui observé pour son obtention à partir de *M. bovis*, la culture *in vitro* de la souche vaccinale a donné lieu à de nouveaux événements de mutations et de délétion de matériel génétique. Ainsi, le BCG comprend 12 variants génétiques, chacun utilisés indépendamment à travers le monde, et la diversité des souches de BCG pourrait en partie expliquer la variabilité de protection du vaccin. En effet, il est clairement établi que ces

variants possèdent des phénotypes morphologiques, biochimiques et immunogéniques différents [29, 31]. De plus, des études réalisées chez le modèle murin et l'homme ont pu démontrer que certains variants du BCG étaient moins aptes à induire l'apparition de corrélats de protection tel que la production d'IFN γ ou l'expansion des cellules T [32-34]. Cependant, l'absence de protocoles standardisés, permettant une compilation des résultats de l'ensemble des études réalisées, rend difficile l'évaluation du degré d'implication de la variabilité génétique du BCG dans son efficacité de protection [32].

ii. Durée de protection du BCG

La faible efficacité de protection du BCG chez l'adulte suggère fortement que cette protection pourrait être limitée dans le temps. En effet, l'administration du BCG se fait chez les nouveau-nés et confère un haut niveau de protection qui décroît dès l'âge de 14 ans [30]. La durée du temps de vie du vaccin chez l'homme pourrait également jouer un rôle sur le niveau de protection qu'il confère. Des études réalisées chez la souris ont démontré que le niveau de protection induit par le BCG était corrélé positivement avec la viabilité et la persistance du vaccin au sein des tissus [35, 36].

iii. Mycobactéries environnementales

L'une des raisons largement débattue quant à la variabilité de protection du BCG repose sur le contact préexistant entre l'homme et des mycobactéries de l'environnement. En effet, des mycobactéries non pathogènes ou pathogènes opportunistes existent à l'état libre dans l'environnement et partagent des phénotypes communs avec *M. tuberculosis* comme notamment l'expression de protéines fortement immunogènes tel que l'antigène Ag85 [30]. Ainsi, l'exposition à ces mycobactéries pourrait conférer un certain niveau de protection des individus masquant l'effet protecteur du vaccin BCG. Cependant, cette hypothèse suggérerait que l'incidence de la tuberculose soit plus faible dans les pays tropicaux où les mycobactéries environnementales sont le plus largement présentes, ce qui n'est pas le cas. Une autre hypothèse propose qu'un contact préalable à la vaccination avec ces mycobactéries empêche la réplique du BCG et la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire forte. Dans le modèle murin, il a d'ailleurs été montré que la pré-exposition des animaux à la mycobactérie saprophyte *M. avium* provoque une clairance du BCG associée à une absence de protection [37, 38].

Nom	Type de vaccin	Phase clinique	Description
Vaccins vivants			
rBCG30	BCG recombinant	I	BCG exprimant l'antigène Ag85B
MTBVAC01	<i>M. tuberculosis</i> atténué	I	<i>M. tuberculosis</i> muté dans les gènes <i>phoP</i> et <i>fadD26</i>
VMP1002	BCG recombinant	II	BCG délété pour <i>ureC</i> et exprimant la Lysteriolysine O
Vaccins protéiques			
Aeras-404 (h4)	Protéine recombinante	I	Fusion des antigènes Rv0288-Ag85B
Hybrid56	Protéine recombinante	I	Fusion des antigènes Rv2660- ESAT6-Ag85B
ID93/GLA-SE	Protéine recombinante	I	Fusion des antigènes Rv3619-Rv1813c-Rv3620c-Rv2608
Mtb72F	Protéine recombinante	II	Antigène PPE18
Hybrid1 (H1)	Protéine recombinante	II	Fusion des antigènes ESAT6-Ag85B
Vaccins viraux			
Ad5Ag85A	Adénovirus recombinant	I	Expression de l'antigène Ag85A
MVA85A/AERAS-485	Virus vaccinal Ankara modifié	II	Expression des antigènes Ag85A et Mtb32a
CruCell/AERAS-402	Adénovirus 35 modifié	II	Expression des antigènes Ag85A-Ag85B-Rv0288
Vaccins thérapeutiques			
RUTI	Fragments bactériens	II	Fragments de <i>M. tuberculosis</i> délivrés dans des liposomes
MIP	Bactéries inactivées	III	<i>Mycobacterium indicus pranii</i> tué par la chaleur

Tableau 1: Les candidats vaccins en développement pour lutter contre la tuberculose. Nom, type et description des candidats vaccins en phase clinique (I), (II) ou (III). D'après Cayabyad *et al*, 2012 et le rapport de l'OMS 2012.

Quelques qu'en soient les causes, la variabilité de protection du BCG chez l'adulte nécessite une amélioration du vaccin déjà existant et/ou la mise en place de nouvelles stratégies de vaccination.

b) Vers un nouveau vaccin

Un nombre considérable d'études ont abordé la problématique de vaccination contre la tuberculose. Des candidats vaccins ont pu voir le jour dont 13 sont en essai clinique et se différencient selon leur nature, leur fonctionnement ainsi que leur mode d'utilisation (**Tableau 1**) [39].

iv. Les vaccins vivants

Des manipulations génétiques ont été réalisées afin de modifier le vaccin BCG déjà existant pour augmenter son immunogénicité et ainsi améliorer son pouvoir protecteur. Deux études ont permis d'élaborer des candidats vaccins testés aujourd'hui en clinique (**Tableau 1**). Le premier est le rBCG30 correspondant à un BCG recombinant sur-exprimant l'antigène Ag85B de *M. tuberculosis*. Ce candidat induit une meilleure protection que le BCG chez le cochon d'Inde, un modèle animal très sensible à la tuberculose [40]. Il a également été montré que cette souche recombinante induit, de façon plus efficace que le BCG, la production de lymphocyte T CD4⁺ spécifiques de l'antigène Ag85B chez l'homme. Ce candidat constitue à ce jour l'un des candidats vaccin vivant les plus prometteurs [41]. Le deuxième candidat est le VPM 1002, un BCG recombinant exprimant la listériolysine O de *Listeria monocytogenes* [42]. Cette protéine a la capacité de former des pores dans les membranes biologiques et permet une meilleure présentation antigénique du BCG associé à une meilleure stimulation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ chez la souris [43]. Ce candidat vaccin a également été muté dans le gène *ureC* codant pour une sous-unité de l'uréase UreABCDEFGF pour potentialiser l'action de la listériolysine O (**Voir partie C.III.1.b**). Des études préliminaires réalisées très récemment chez l'homme montrent que ce candidat vaccin est non-nocif et immunogène chez l'homme [44].

On peut noter qu'il existe également des candidats vaccins élaborés à partir de souches atténuées de *M. tuberculosis* dont la majorité est toujours en essai pré-clinique [45]. L'un d'entre eux, appelé MTBVAC01 est entré très récemment en phase clinique de niveau I [46]. Il s'agit d'une souche atténuée par double mutation, l'une dans le gène *phoP* codant un facteur de transcription et l'autre dans le gène *fadD26* codant pour un enzyme impliqué dans la synthèse d'un lipide de la paroi bactérienne. Ces deux gènes sont connus pour leur implication majeure dans la pathogénie du bacille

et les capacités de protection de ce candidat chez l'animal se sont révélées très prometteuses [47, 48].

v. Les vaccins « booster »

Il apparaît délicat de remplacer le vaccin BCG chez l'homme par un organisme génétiquement modifié pouvant se révéler moins efficace voir virulent notamment chez les individus immunodéprimés. Pour ces raisons, il a été développé des vaccins « booster » n'ayant pas pour but de remplacer la vaccination par le BCG mais de permettre une amélioration de son effet au cours du temps. Deux types principaux de vaccins « booster » sont utilisés, ceux consistant à l'administration directe d'antigènes de *M. tuberculosis* (vaccins protéiques) et ceux étant administrés à l'aide de vecteurs viraux permettant l'expression des antigènes (vaccins viraux, **Tableau 1**). Les vaccins sous-unitaires viraux sont les plus immunogènes et parmi eux, Crucell est celui dont l'étude donne les résultats les plus prometteurs [49]. A l'inverse, le vaccin MVA85A a montré très récemment son inefficacité à augmenter la protection induite par le BCG chez l'homme dans un essai clinique de phase III [50].

vi. Les vaccins thérapeutiques

Par définition, les vaccins thérapeutiques ne sont pas prophylactiques mais sont administrés chez des individus présentant une tuberculose active. Le but de ces vaccins est de stimuler le système immunitaire pour potentialiser l'efficacité des traitements antibiotiques. Deux vaccins thérapeutiques sont actuellement en phase d'essai clinique (**Tableau 1**). Le premier d'entre eux est le vaccin RUTI correspondant à l'administration de fragments de *M. tuberculosis* à l'aide de liposomes pour augmenter leur effet immunostimulant [51]. Bien que sa non-nocivité ait été démontrée, son efficacité thérapeutique chez l'homme reste à déterminer [52]. Le deuxième vaccin thérapeutique en étude clinique est le MIP, correspondant à l'administration d'une mycobactérie environnementale inactivée par la chaleur appelée *Mycobacterium indicus pranii*. Ce vaccin a montré un effet thérapeutique important en association avec une antibiothérapie chez le cochon d'Inde [53]. Il est à noter que ce vaccin possède également des propriétés prophylactiques [54].

Nom (famille)	Cible	Mode d'action
Antibiotiques de 1^{ère} ligne		
Isoniazide	Enoyl-reductase	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques
Rifampicine (rifamycine)	ARN polymérase	Inhibition de la transcription
Pyrazinamide	Sous-unité 30S ribosomale	Inhibition de la synthèse protéique et acidification du cytoplasme
Ethambutol	Arabinosyl transférase	Inhibition de la synthèse d'arabinogalactane
Antibiotiques de 2^{ème} ligne		
Acide para-amino salicylique	Dihydropteroate synthase	Inhibition de la synthèse des folates
Ethionamide (nicotinamide)	Enoyl-reductase	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques
Ofloxacin (fluoroquinolone)	ADN gyrase	Inhibition de l'enroulement de l'ADN
Streptomycine (aminoglycoside)	Sous-unité 30S ribosomale	Inhibition de la synthèse protéique
Capreomycine (aminoglycoside)	Sous-unités ribosomales	Inhibition de la synthèse protéique
Kanamycine (aminoglycoside)	Sous-unité 30S ribosomale	Inhibition de la synthèse protéique
Amikacine (aminoglycoside)	Sous-unité 30S ribosomale	Inhibition de la synthèse protéique
Cyclosérine	D-alanine racemase et ligase	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane

Tableau 2: Les antibiotiques utilisés pour le traitement contre la tuberculose. Noms, (famille), cibles et effets des molécules sur la physiologie du bacille tuberculeux. D'après Zumla *et al*, 2013.

En effet, l'étude de l'ensemble des candidats vaccins n'est pas cloisonnée. Ainsi, nombre des candidats vaccins cités précédemment sont évalués indépendamment pour leur effet « booster » aussi bien que prophylactiques ou thérapeutiques afin d'en évaluer leur meilleure application.

Quel que soit la nature des candidats vaccins élaborés, une meilleure compréhension des mécanismes de l'immunité anti-mycobactérienne apparaît comme un prérequis pour l'élaboration d'un nouveau vaccin sûr et efficace [46].

3. L'antibiothérapie

a) Le traitement actuel

Depuis une quarantaine d'année, il existe un traitement antibiotique pour lutter contre la tuberculose. Il s'agit d'une quadrithérapie s'effectuant sur une durée de 6 mois. Le traitement consiste en la prise pendant 2 mois d'isoniazide (INH), de rifampicine (RIF), de pyrazinamide (PZA) et d'ethambutol (EMB) suivie de 4 mois de traitement avec seulement l'INH et la RIF. S'il est correctement suivi, ce traitement permet une guérison de 95% des individus [55].

Malheureusement, l'utilisation de ce traitement s'est accompagnée de l'apparition de souches résistantes à ces antibiotiques. Dans ces cas précis, une deuxième ligne d'antituberculeux est alors utilisée pour curer les patients (**Tableau 2**).

Les souches résistantes aux antibiotiques se classent en trois catégories :

- Les souches multi-résistantes aux antibiotiques ou MDR (Multi-drug-resistant) qui sont caractérisées par leur résistance à l'action de INH et de la RIF. L'OMS a récemment recensé que 3.9% des nouveaux cas de tuberculoses dans le monde étaient dus à des souches MDR, 60% de ces cas étant recensés en Chine, en Russie et en Inde (OMS 2012).

- Les souches extrêmement résistantes aux antibiotiques ou XDR (Extensively-drug-resistant) qui sont résistantes à l'INH, à la RIF mais également aux fluoroquinolones comme l'ofloxacine et à un

Nom (famille)	Phase clinique	Mode d'action
Composés préexistant et redirigés comme antituberculeux		
Linezolide (Oxazolidinone)	II	Inhibition de la synthèse protéique
Rifapentine (Rifamicine)	III	Inhibition de de l'ARN polymérase
Moxifloxacin (Fluoroquinolone)	III	Inhibition de l'ADN gyrase
Gatifloxacin (Fluoroquinolone)	III	Inhibition de l'ADN gyrase
Nouveaux composés antituberculeux		
TMC-207 (Diarylquinolone)	II	Inhibition de l'ATP synthase
SQ109 (Diamine)	II	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques
AZD5847 (Oxazolidinone)	II	Inhibition de la synthèse protéique
PNU-100480 (Oxazolidinone)	II	Inhibition de la synthèse protéique
PA-824 (Nitroimidazoles)	II	Création d'espèces réactives nitrogénées
OPC-67683 (Nitroimidazoles)	III	Création d'espèces réactives nitrogénées

Tableau 3: Liste de composés à l'étude pour le traitement antibiotique de la tuberculose. Noms, (famille) et mode d'action des composés en phase clinique de niveau (I), (II) ou (III). D'après Zumla *et al*, 2013.

autre antibiotique de 2^{ème} ligne. Ces souches extrêmement résistantes à l'antibiothérapie représentent 9% des cas de MDR (OMS 2012).

- Les souches totalement résistantes aux antibiotiques ou TDR (Totally-drug-resistant) sont quant à elles résistantes à l'ensemble des antibiotiques de 1^{ère} et de 2^{ème} ligne. Heureusement, les cas reportés de tuberculose dues à des souches TDR sont rares mais demeurent particulièrement inquiétants [56].

Malgré l'efficacité du traitement déjà existant, l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques utilisés nécessite l'identification de nouveaux antituberculeux. De plus le traitement existant est parfois mal toléré et peut être à l'origine d'atteintes neurologiques et hépatiques graves [57]. Egalement, la longueur du traitement actuel incite à son arrêt prématuré et cause la rechute des patients tout en favorisant l'apparition des souches résistantes. Des antituberculeux dont l'activité bactéricide serait plus forte devraient permettre de raccourcir la durée du traitement. Enfin, le traitement existant interfère négativement avec d'autres traitements tel que les traitements antirétroviraux et peut avoir un effet délétère chez les patients co-infectés par le VIH [57, 58].

b) Vers un nouveau traitement

De nombreuses études ont permis de proposer de nouveaux composés ayant une activité antituberculeuse. On peut les regrouper en deux catégories. Le premier groupe correspond à des composés déjà existant et dont l'utilisation a été redirigée vers le traitement de la tuberculose. Le second groupe correspond à des composés nouveaux, identifiés par crible pour l'identification de nouveaux antituberculeux. Dix composés sont actuellement testés en phase clinique (**Tableau 3**) [55].

Les fluoroquinolones : La gatifloxacin et la moxifloxacin sont en phase clinique de niveau III. Ces composés ont montré leur efficacité en permettant notamment de réduire de 2 mois le traitement de la tuberculose en se substituant à l'EMB.

Les rifamycines : La rifapentine est un analogue de la rifampicine en phase clinique de niveau II. Cet analogue est mieux toléré que la rifampicine et possède une demi-vie plus longue permettant de limiter le nombre de prises médicamenteuses.

Les oxazolidinones : Le linezolide est un oxazolidinone de première génération qui a montré récemment son efficacité pour le traitement des patients infectés par une souche XDR. Cependant, la toxicité de ce composé est élevée et engendre des neuropathies et des névrites oculaires. L'AZD5847 et le PNU-100480 sont deux dérivés du linezolide en cours d'étude possédant une activité bactéricide plus forte que le linezolide.

TMC-207 : Aussi appelé Bedaquiline, le TMC-207 est un inhibiteur de l'ATP synthase bactérienne. Il s'agit d'un composé très prometteur car ayant une activité *in vitro* contre les bacilles réplicatifs mais également ceux dit en phase de « dormance » (**Voir partie C.III.2**) retrouvés notamment chez les patients atteints de tuberculose latente.

Nitroimidazoles : Le PA-824 et le OPC-67683 sont deux pro-drogues activées par une même enzyme appelée F420-deazaflavin-dépendant nitroreductase (Ddn) présente chez *M. tuberculosis*. La réduction de ces composés donne naissance à des espèces réactives de l'azote comme le NO à l'origine de leur pouvoir bactéricide. L'étude de l'OPC-67683 est la plus avancée et a pu montrer son efficacité pour le traitement de patients infectés par des souches MDR.

SQ109 : Il s'agit d'un inhibiteur de MmpL3, un transporteur assurant l'accès du tréhalose monomycolate à l'enveloppe bactérienne. L'action du SQ109 inhibe la synthèse des acides mycoliques qui sont des acides gras nécessaires à la viabilité du bacille et synthétisés à partir de tréhalose monomycolate au niveau de la paroi. De façon intéressante, une synergie entre le SQ109 et le TMC-207 a été observée diminuant leur concentration minimale inhibitrice par un facteur 4. L'action de SQ109 pourrait fragiliser la paroi bactérienne et faciliter l'accès du TMC-207 à l'ATP synthase.

On peut noter qu'il existe d'autres composés qui pourraient entrer en phase clinique très prochainement. Notamment le benzothiazinone BTZ043 qui est un inhibiteur de la synthèse de l'arabinogalactane, un composé pariétal nécessaire à la viabilité du bacille. Ce composé est très

prometteur car il possède à lui seul une activité antituberculeuse équivalente à celle du couple RIF + INH chez l'animal. Egalement la clofazimine, utilisée pour traiter la lèpre causée par la mycobactérie *M. leprae*, est actuellement testée pour ses activités antituberculeuses [59]. Enfin, de façon intéressante, la conjugaison de deux composés, le méropénème et le clavulanate a très récemment montré son efficacité pour le traitement de patients infectés par des souches MDR et XDR [60]. *M. tuberculosis* est normalement résistant aux Bêta-lactames comme le méropénème via l'expression de la Bêta-lactamase BlaC qui les hydrolyse. L'addition de clavulanate, un inhibiteur des Beta-lactamases, permet au méropénème de conserver son activité bactéricide sur le bacille. Cette stratégie ouvre la voie à l'utilisation des Beta-lactames pour le traitement de la tuberculose.

On peut noter qu'en parallèle de l'identification de composés bactéricides, des études sont réalisées pour identifier des molécules dont l'action serait dirigée sur l'hôte lui-même. En effet, contrairement aux antibiotiques, de tels composés potentialisant le système immunitaire et/ou l'antibiothérapie présenteraient l'avantage de diminuer le risque d'apparition de souches résistantes à ces traitements puisque n'agissant pas directement contre les bactéries. Parmi eux, la supplémentation en nutriments tel que les vitamines A et D connus pour potentialiser l'immunité antimycobactérienne et l'administration d'inhibiteurs de phosphodiésterases induisant une diminution du niveau d'inflammation des poumons [61-63]. Egalement, un inhibiteur de la kinase AKT-1 de l'hôte montre une grande efficacité pour réduire la multiplication du bacille à l'intérieur des macrophages et pourrait servir d'adjuvant aux traitements antibiotiques classiques [64].

4. Les stratégies de lutte (OMS 2012)

Dès 1993, la tuberculose est considérée comme une urgence de santé mondiale par l'OMS qui met en place en 1995 la stratégie « DOTS » (directly observed therapy short course) comprenant les points suivants :

- Volonté politique accompagnée d'une augmentation et d'une pérennisation des financements pour la lutte contre la tuberculose.
- Dépistage des cas par des examens bactériologiques de qualité assurée.
- Traitement normalisé avec surveillance et soutien des patients.
- Système efficace d'approvisionnement en médicaments.

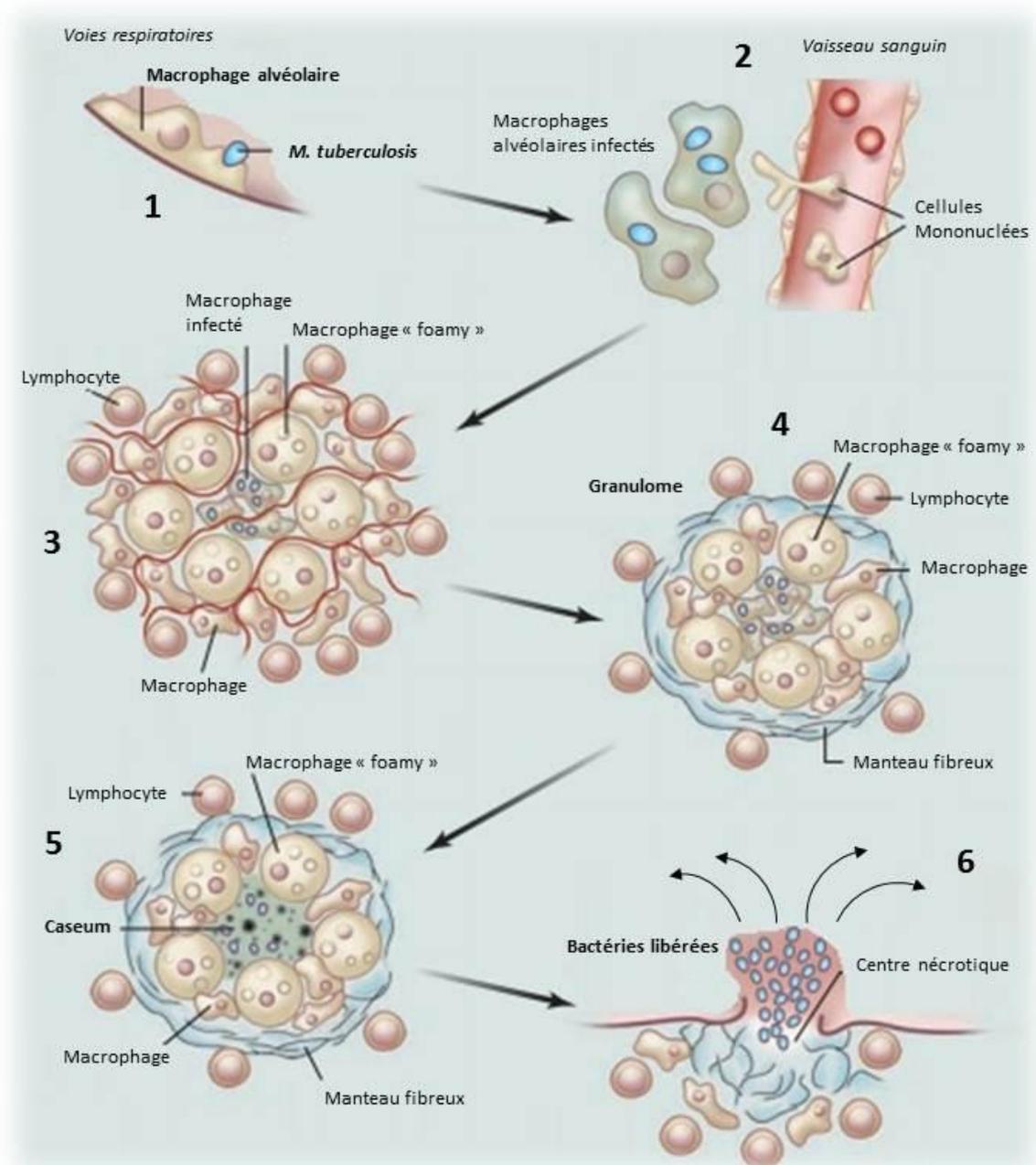


Figure 1: Le cycle infectieux de *M. tuberculosis*. 1. L'infection débute par la phagocytose du bacille au niveau des poumons par les macrophages alvéolaires. 2. Les macrophages infectés sécrètent alors des cytokines permettant l'arrivée de cellules issues du sang vers le site de l'infection. 3. Les macrophages infectés sont alors entourés par d'autres macrophages dont certains se différencient en macrophages de type « foamy », riches en lipides. Des lymphocytes sont ensuite recrutés à la périphérie de la structure et sécrètent des cytokines qui potentialisent le pouvoir bactéricide des macrophages. 4. Un manteau fibreux se forme autour des macrophages et permet de contenir l'infection, c'est la formation du granulome. L'infection est stoppée et le bacille ne se réplique plus, on parle de tuberculose latente. 5. Suite à une diminution des défenses immunitaires de l'individu, les bactéries se répliquent à nouveau à l'intérieur des macrophages et entraînent leur lyse, c'est l'étape de réactivation. Les bactéries se multiplient alors à l'état extracellulaire à l'intérieur du granulome et l'hyper-inflammation entraîne la formation d'un granulome caséux. 6. La rupture de ce granulome engendre la libération des bactéries au niveau des voies respiratoires, le bacille peut alors sortir de l'organisme par expectoration et infecter un autre individu. D'après Russel *et al*, 2010.

- Notification systématique des cas de tuberculose et évaluation de l'effet des mesures entreprises.

Grâce à cette stratégie, on considère en 2005 que 70% des cas estimés de tuberculose active sont diagnostiqués et que 85% de ces cas sont traités avec succès.

Compte-tenu, entre autres, des cas de co-infection tuberculose/VIH et de l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques, l'OMS lance en 2006 le plan « Stop TB strategy » (2006-2015) comprenant 5 points supplémentaires :

- Prise en compte des souches résistantes (MDR) et extrêmement résistantes (XDR) aux antibiotiques ainsi que des risques liés à la co-infection tuberculose/VIH dans le traitement des patients.
- Amélioration des systèmes de santé pour la lutte contre la tuberculose.
- Engagement de l'ensemble des acteurs du système de santé.
- Sensibilisation générale des individus à la lutte contre la tuberculose (communication).
- Promotion et financement de la recherche scientifique pour l'amélioration du diagnostic, de la vaccination et du traitement de la tuberculose.

Grâce à ces plans, la mortalité liée à la tuberculose a chuté de 40% entre 1990 et 2010, une baisse qui pourrait atteindre 50% d'ici 2015 [65].

B. LE CYCLE INFECTIEUX

La transmission de la tuberculose se fait d'homme à homme suite à un contact restreint avec un individu présentant une tuberculose active. Elle se fait par voie aérienne suite à l'inhalation du bacille contenu dans des microgouttelettes expectorées par un individu malade. Dans les poumons, la bactérie est reconnue par le système immunitaire et prise en charge par les cellules de défense de l'organisme, notamment les macrophages alvéolaires. Se développe alors une structure particulière appelée le « granulome » résultant de la formation d'un d'amas cellulaire organisé autour du site infectieux (**Figure 1**). Ce granulome permet de contenir l'infection, sans symptôme apparent pour l'individu contaminé, on parle de tuberculose latente. Cet état correspond à un équilibre dynamique entre le système immunitaire de l'hôte et la bactérie qui peut perdurer tout au long de la vie de

l'individu. Suite à un abaissement des défenses immunitaires, cet équilibre peut-être rompu au profit du pathogène. Les cellules infectées entrent alors en nécrose et les bactéries se multiplient à l'état extracellulaire à l'intérieur du granulome devenu caséeux. Cet état évolue jusqu'à provoquer la rupture du granulome et la libération des bactéries dans les voies respiratoires. Les bacilles peuvent alors sortir de l'organisme par expectoration et contaminer un nouvel individu [66] (**Figure 1**).

I. La cellule hôte : le macrophage

Une fois dans les poumons, le bacille tuberculeux est reconnu et phagocyté par les cellules de défense de l'organisme que sont les cellules phagocytaires dont les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Il a également été montré que le bacille pouvait pénétrer à l'intérieur d'autres types cellulaires tel que les pneumocytes de type I et II, constituant l'épithélium pulmonaire, et également les adipocytes constitutif des tissus adipeux. Les neutrophiles sont des cellules à durée de vie courte ne permettant pas la réplication de la bactérie et les pneumocytes et cellules dendritiques sont quant à eux des types cellulaires réfractaires à la réplication du pathogène [67-69]. Enfin dans les adipocytes, le pathogène est retrouvé à l'état non répliatif dit de « dormance » [70]. Bien que l'ensemble de ces types cellulaires joue un rôle important dans l'issue de l'infection, ce sont les macrophages qui constituent le site privilégié pour la réplication du pathogène.

II. Reconnaissance de *M.tuberculosis* par le macrophage

La reconnaissance du pathogène constitue la première étape de l'infection et cette étape est déterminante pour le devenir de la réponse immunitaire [19, 71]. Le système immunitaire inné permet la détection d'éléments étrangers à l'organisme, telles que les bactéries pathogènes reconnues grâce aux différentes structures qu'elles possèdent à leur surface appelées PAMPs (Pathogen associated molecular patterns). Ces PAMPs correspondent à des molécules de natures très variées, pouvant être protéique, glucide ou lipidique. De nombreux PAMPs ont été décrits pour jouer un rôle important dans la virulence de *M. tuberculosis* tel que le lipomannane (LM), le lipoarabinomannane (LAM), le lipoarabinomannane mannosylé (ManLAM), le thréalose dimycolate (TDM), le phtiocérol dimycosérosates (DIM) ou encore les sulfolipides (SL) [72-76].

La reconnaissance des PAMPs par les macrophages se fait par des récepteurs appelés PRRs (Pattern recognition receptors) exprimés à leur surface et leur permettant de fixer et internaliser les pathogènes. Ces PRRs diffèrent selon leur nature, les PAMPs qu'ils reconnaissent et leur localisation dans la cellule. Un certain nombre de PRRs sont connus pour jouer un rôle important dans l'interaction avec *M. tuberculosis*, parmi lesquels les toll-like receptors (ex : TLR2,4 et 9), les lectines de type C (ex : DC-SIGN, Dectin-1 et MR), les récepteurs à la partie constante des immunoglobulines (FcR), les récepteurs scavenger (SR) et les récepteurs NOD-like (ex : NOD2) [18, 71, 77].

La stimulation des PRRs engendre une réponse inflammatoire protectrice entraînant l'activation du macrophage, la synthèse de molécules microbicides et la sécrétion de cytokines. Par exemple, la fixation du LAM au récepteur TLR2 entraîne la synthèse d'un peptide antimicrobien, la cathélicidine LL-37, et la sécrétion de TNF α (Tumor necrosis factor alpha) [78, 79]. De façon intéressante, certains PRRs sont utilisés par le bacille pour lui permettre une entrée « silencieuse » dans la cellule comme par exemple le MR qui, après sa fixation au ManLAM, peut promouvoir la survie du bacille [80].

Bien que l'étude isolée de chacun de ces PRRs soit très informative, il est important de noter que l'entrée de *M. tuberculosis* dans les macrophages est un processus complexe faisant appel à des mécanismes de reconnaissance multiples induisant simultanément l'activation de voies de signalisation, pouvant être redondantes ou antagonistes, à l'intérieur des cellules.

III. La réponse immunitaire adaptative : la formation du granulome

Les mécanismes de reconnaissance de *M. tuberculosis* aboutissent à l'induction de l'expression de gènes de l'immunité pour, dans un premier temps, potentialiser le pouvoir microbicide du macrophage. Elle permet notamment l'expression et la sécrétion de TNF α permettant au macrophage de s'auto-activer.

La sécrétion de cytokines comme le TNF α et également de chimiokines, cytokines ayant des propriétés attractantes sur les cellules telles que CXCL10, CXCL1, MCP-1 et l'interleukine (IL) 8, permet le recrutement de neutrophiles et de monocytes issus du sang vers le site de l'infection [81, 82]. L'environnement pro-inflammatoire induit par la sécrétion des cytokines permet l'activation des neutrophiles et la différenciation des monocytes arrivant en macrophages qui participent à la défense de l'organisme. Ce mécanisme de la réponse immunitaire innée permet l'élimination de la plupart des bactéries « non adaptées » à l'environnement intracellulaire mais ne suffit généralement pas à la destruction de *M. tuberculosis*. De façon intéressante, une proportion non

négligeable d'individus présents dans des régions où la tuberculose est endémique, sont capables d'éliminer le pathogène sans le recours de l'immunité adaptative [83].

Les cellules dendritiques jouent un rôle prépondérant dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules peuvent phagocyter *M. tuberculosis* mais également des neutrophiles morts contenant la bactérie ou encore des vésicules apoptotiques suite à la mort de macrophages infectés [84, 85]. Ces cellules migrent vers les organes lymphoïdes les plus proches tels que les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes mycobactériens aux lymphocytes T. La présentation des antigènes se fait par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et II et permet la différenciation des lymphocytes T naïfs en LT CD4⁺ et LT CD8⁺ effecteurs [77]. Ces cellules constituent les médiateurs de l'immunité adaptative et migrent, via un gradient de chimiokines, vers le site infectieux. Les LT CD4⁺ soutiennent l'action des macrophages infectés par la sécrétion d'IFN γ , une cytokine majeure qui agit en synergie avec le TNF α pour maintenir l'état d'activation des macrophages. L'IFN γ permet notamment l'induction de l'iNOS (inducible nitric oxide synthase), un enzyme présent dans les macrophages et permettant la génération de radicaux azotés bactéricides [86]. Les LT CD8⁺ contribuent aussi à la sécrétion d'IFN γ , dans une moindre proportion, et sécrètent des toxines, la perforine et la granulysine qui agissent en synergie pour détruire *M. tuberculosis* à l'intérieur des macrophages [87, 88].

La réponse cellulaire des lymphocytes T est considérée comme le socle de l'immunité antituberculeuse. En effet, des souris déficientes en LT CD4⁺, LTCD8⁺ ou rendues déficientes pour la production d'IFN γ sont fortement affectées dans leur capacité à contrôler une infection à *M. tuberculosis* [87, 89-92]. En revanche, la réponse humorale médiée par les lymphocytes B est généralement considérée comme secondaire dans le cadre d'une infection par des pathogènes intracellulaires qui sont hors de portée de l'action des anticorps. Des études récentes révisent ce dogme et ont pu montrer que les lymphocytes B jouent un rôle non négligeable en permettant la régulation de l'activité des lymphocytes T à proximité du site infectieux via la sécrétion de cytokines [93].

La cascade inflammatoire engendrée par l'arrivée des cellules T sur le site de l'infection induit le recrutement de fibroblastes permettant la formation d'un manteau fibreux de collagène autour des macrophages. Le granulome est alors formé. Au centre du granulome, certains macrophages se différencient en macrophage spumeux caractérisés par l'abondance de vésicules lipidiques dans leur cytoplasme [94]. L'infection est contenue mais *M. tuberculosis* n'est pas détruit. La formation du

granulome induit alors un environnement hypoxique et pauvre en nutriments à l'origine de l'entrée en « dormance » du bacille.

IV. De la latence vers la réactivation

La latence n'est pas un état inerte du point de vue de l'hôte comme du point de vue du pathogène. Après sa formation, le maintien de l'intégrité du granulome nécessite une immunité locale soutenue. En effet, des techniques d'imagerie ont montré que les granulomes sont des structures hétérogènes et très dynamiques, nécessitant l'afflux constant de lymphocytes CD4⁺ pour maintenir leur intégrité [95]. Ces observations expliquent le fait que la réactivation de la tuberculose soit induite par un affaiblissement du système immunitaire qui, en l'état des choses, est requis de façon permanente.

Il a pu être montré que le TNF α joue un rôle critique dans le maintien de l'intégrité des granulomes et l'inhibition de la réactivation [96]. Egalement, l'infection de primates tuberculeux latent par le VIS (virus de l'immunodéficience simienne) induit la réactivation de la tuberculose par la diminution du nombre de lymphocytes T effecteurs, notamment les LT-CD4⁺ [97]. L'importance de ce type cellulaire dans le maintien de la latence explique l'augmentation dramatique des cas de tuberculose active observés chez les individus VIH⁺.

L'entrée du pathogène en dormance lui permet d'éviter la mort induite par la pauvreté en oxygène et en nutriments en diminuant drastiquement son métabolisme global et sa réplication. Cette entrée en dormance est notamment promue par le système à deux composant DosRST qui permet à la bactérie de percevoir la diminution en oxygène de son environnement et de répondre à ce stress via la régulation de l'expression de gènes spécifiques (**Voir partie C.III.2.a**) [98]. Bien que le système DosRST ait été relativement bien caractérisé *in vitro*, son implication dans le cycle infectieux reste cependant controversée [99, 100].

De façon intéressante, le TMC207, un antituberculeux de nouvelle génération qui inhibe la synthèse d'ATP, est actif contre le bacille à l'état dormant. Ceci démontre que le métabolisme du bacille, bien que restreint, est toujours actif et que des voies métaboliques comme l'homéostasie de l'ATP sont conservées pour le maintien de sa viabilité [101].

Un groupe de protéines appelées Rpf (resuscitation-promoting factor) sont impliquées dans la « resuscitation » du pathogène permettant sa sortie de l'état de dormance. Ces protéines ont une activité hydrolase sur le peptidoglycane qui permettrait de diminuer l'imperméabilité de la bactérie et ainsi favoriser son retour à une phase de croissance [102, 103]. De façon intéressante, des

mutants de *M. tuberculosis* pour des gènes *rpf* sont déficients pour induire une réactivation de la tuberculose et ce même lors d'un traitement immunosuppresseur telle que la déplétion des cellules T CD4⁺ [103].

Pour finir, il est important de noter que l'étude du cycle infectieux de *M. tuberculosis* est limitée par les moyens expérimentaux mis à disposition et notamment par le choix des animaux modèles utilisés. En effet, même si la souris reste le modèle le plus couramment utilisé du fait de sa praticité, le modèle murin ne déclare pas de phase de latence et les granulomes formés après infection apparaissent moins structurés et non hypoxiques [104-106]. Ceci peut limiter la compréhension du rôle de certains facteurs bactériens ou de l'hôte dans le processus infectieux. Néanmoins, des modèles murins génétiquement modifiés permettent aujourd'hui de se rapprocher des conditions retrouvées chez l'homme [107, 108]. D'autres modèles animaux tels que le cochon d'Inde, le lapin ou le macaque développent une pathologie plus proche de celle observée chez l'homme et permettent une meilleure appréciation de la physiopathologie de la maladie [106].

Enfin, il est intéressant de noter que l'idée que le granulome constitue une structure protectrice, mise en place par l'hôte pour contenir l'infection, a été remise en cause par des travaux récents menés chez le poisson zèbre dans un modèle d'infection à *M. marinum*. En effet dans ce modèle, il a pu être montré que la formation du granulome était activement induite par le pathogène lui-même, promouvant l'arrivée de macrophages infectables et le protégeant du système immunitaire et favorisant sa dissémination [109, 110].

C. INTERACTION HOTE-PATHOGENE

I. Conditions de vie intracellulaire de *M. tuberculosis*

Après sa reconnaissance par le macrophage, *M. tuberculosis* est internalisé par phagocytose dans une vacuole appelée phagosome. Le bacille est alors capable d'inhiber la maturation du phagosome et de se multiplier dans l'environnement intracellulaire. Cette inhibition de la fusion phagosome - lysosome est considérée comme l'un des mécanismes principaux de virulence de *M. tuberculosis* qui permet à la bactérie de créer une niche spécifique répondant à ses besoins métaboliques.

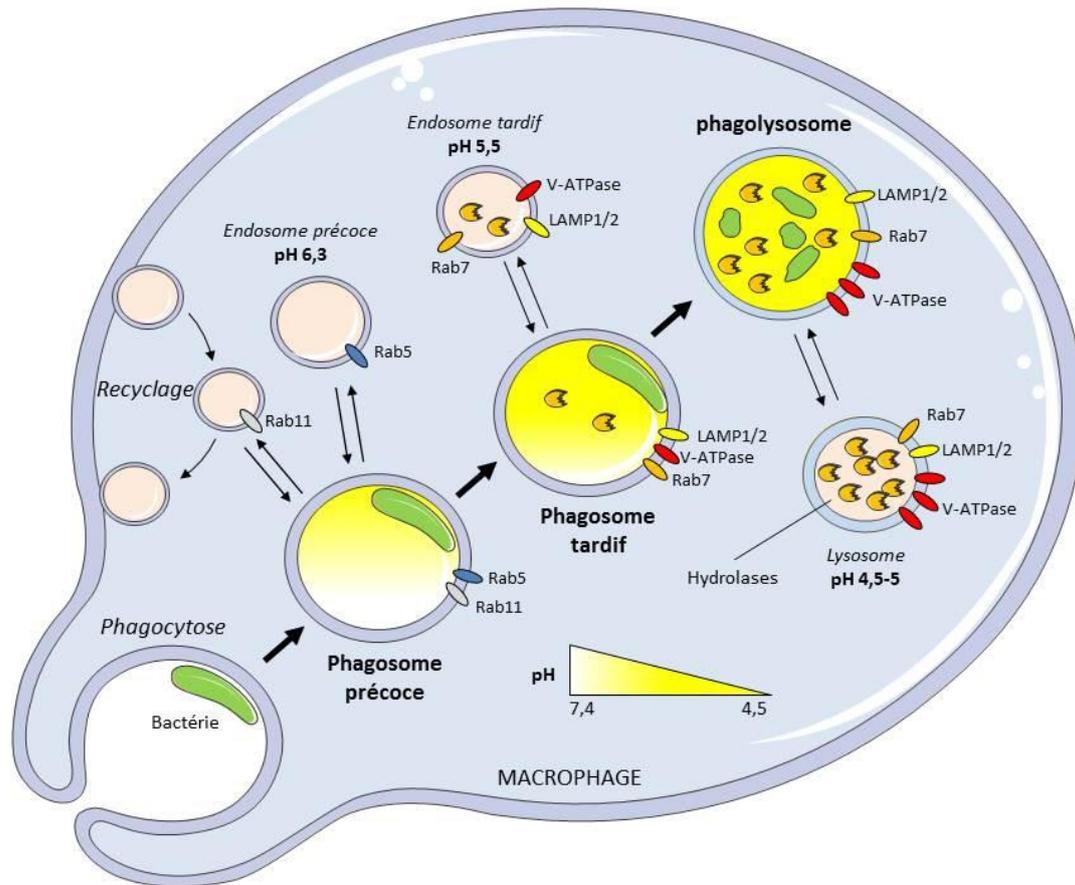


Figure 2: La maturation du phagosome dans les macrophages. Après sa reconnaissance par le macrophage, la bactérie est phagocytée et compartimentalisée dans un phagosome. Ce phagosome précoce possède un pH légèrement acide (pH 6,1-6,5) et interagit avec les endosomes précoces et de recyclages caractérisés par la présence sur leur membrane des protéines Rab5 et Rab11, respectivement. Le phagosome mature puis fusionne avec les endosomes tardifs pour former en phagosome tardif caractérisé par l'acquisition de Rab7, des marqueurs LAMP1 et LAMP2, d'hydrolases et de la pompe V-ATPase permettant de réduire le pH du phagosome (pH 5,5-6). Enfin, la maturation du phagosome tardif permet la formation du phagolysosome via sa fusion avec les lysosomes. L'acquisition de V-ATPases supplémentaires entraîne une diminution du pH intra-vésiculaire (pH 4,5-5) qui, associé à l'action de nombreuses hydrolases, permet la destruction de la bactérie phagocytée.

1. La maturation du phagosome

Suite à leur reconnaissance via les PRRs, les bactéries sont internalisées par phagocytose à l'intérieur des macrophages. Le phagosome nouvellement formé acquiert progressivement des propriétés bactéricides par fusion séquentielle avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs puis les lysosomes. Une fois formé, le phagolysosome permet la destruction des particules phagocytées via principalement un abaissement du pH et l'action d'enzymes hydrolytiques (**Figure 2**).

Les événements de fusion sont des événements transitoires permettant l'échange de membrane et de contenu intra-vésiculaires selon le modèle « Kiss and run » découvert grâce à la vidéo microscopie [111]. Ces interactions sont dépendantes de protéines membranaires parmi lesquelles les GTPases Rab jouent un rôle central. Sous leur forme active, liée au GTP, ces protéines orchestrent les événements de fusion entre le compartiment endosomal, les phagosomes et les lysosomes en permettant leur discrimination [112]. Rab5 est principalement présent sur les endosomes précoces, Rab11 sur les endosomes de recyclage alors que Rab7 est retrouvé essentiellement sur les endosomes tardifs et les lysosomes [112]. Les protéines SNARES jouent également un rôle important dans le trafic vésiculaire en induisant la fusion des membranes des vésicules lors de leur rencontre [113]. Enfin, le pH de ces différents compartiments ainsi que la concentration en calcium dans la cellule influent aussi le trafic vésiculaire [114].

a) Le phagosome précoce

La GTPase Rab5 est recrutée sur le phagosome lors de sa formation pour former un phagosome précoce. Les mécanismes de son recrutement ne sont pas connus et il est possible que Rab5 soit déjà présent sur la membrane plasmique du macrophage avant la phagocytose [115]. Le phagosome précoce possède un pH situé entre 6,1 et 6,5 légèrement inférieur au pH extracellulaire de 7,4 et interagit avec les endosomes de recyclages permettant le recyclage des membranes et de protéines tel que le récepteur à la transferrine TfR [116, 117]. Rab5 permet le recrutement de protéines effectrices telles que Vps34, qui est une PI3K (phosphatidylinositol-3-phosphate kinase), et EEA1 (Early endosome antigen 1) qui induisent la maturation du phagosome [118]. Vps34 permet la phosphorylation des PI (phosphatidylinositol), des phospholipides impliqués dans la maturation du phagosome en permettant notamment le recrutement d'EEA1 [119]. Après le recrutement de Vps34 et EEA1, Rab5 est dissocié et remplacé par la GTPase Rab7 ce qui permet la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs. Le mécanisme de transition Rab5-Rab7 n'est pas établi mais ferait très probablement intervenir les complexes HOPS et/ou Mon1/Ccz-1 [120, 121].

b) *Le phagosome tardif*

Ce compartiment est caractérisé par l'acquisition de la GTPase Rab7 [122]. Le phagosome tardif possède un pH de 5,5–6 inférieur à celui du phagosome précoce suite à l'acquisition de la pompe V-ATPase, une protéine enzymatique transmembranaire permettant l'entrée de proton H⁺ par l'hydrolyse de l'ATP [123]. Le phagosome tardif acquiert des marqueurs comme les protéines membranaires LAMP1 et LAMP2 qui facilitent sa fusion avec les lysosomes et contient certaines hydrolases comme la cathepsine S [124-126]. Rab7 permet ensuite le recrutement des protéines effectrices RILP (Rab7-interacting lysosomal protein) et ORPL1 (oxysterol-binding protein-related protein1) entraînant la fusion du phagosome tardif avec les lysosomes pour former le phagolysosome [127].

c) *Le phagolysosome*

Le phagolysosome correspond à l'étape ultime de la maturation du phagosome et contient un arsenal de composés microbicides. Plus de 50 hydrolases de types protéases, phosphatases, lipases, nucléases et glycosidases permettent la dégradation complète des particules ingérées telles que les bactéries [123]. L'accumulation de pompes V-ATPases supplémentaires permet de réduire le pH à une valeur de 4,5-5 s'opposant à la multiplication des bactéries phagocytées et potentialisant l'action des hydrolases acides comme les cathepsines D et L [123, 128, 129]. D'autres composés toxiques interviennent également au sein du phagolysosome tels que les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, les peptides antimicrobiens et les concentrations élevées en ions métalliques. La synergie des composés microbicides détruit la majorité des bactéries « non adaptées » à l'environnement intracellulaire et permet ainsi aux macrophages de défendre l'organisme lors d'une infection.

2. Inhibition de la fusion phagosome-lysosome par *M. tuberculosis*

Il a été montré qu'après phagocytose par les macrophages, *M. tuberculosis* réside dans un phagosome « immature » possédant les caractéristiques d'un phagosome précoce retenant la GTPase Rab5 et possédant un pH légèrement acide situé entre 6,3 et 6,5 [130-132]. Ce blocage est caractérisé par l'absence de recrutement des protéines effectrices EEA1 et Vps34, nécessaires à la maturation du phagosome. Il interagit avec les endosomes précoces mais également avec les endosomes de recyclage (révélé par la présence du récepteur à la transferrine TfR à la surface du

phagosome) [133, 134]. Les mécanismes bactériens à l'origine de cette inhibition de maturation sont multiples.

Des molécules de surface de *M. tuberculosis* tel que les DIMs, le TDM et le ManLAM jouent un rôle important dans le blocage de la maturation du phagosome. Le mécanisme d'action des DIMs reste obscur mais il semblerait que, dès la phagocytose, ces lipides interagissent avec des régions riches en cholestérol de la membrane plasmique du macrophage induisant une désorganisation locale des lipides [72]. Le TDM quant à lui, servirait de barrière physique en s'insérant dans la membrane du phagosome et en diminuant sa capacité à fusionner avec d'autres vésicules [76, 135]. Contrairement au TDM et aux DIMs, le mécanisme d'action du ManLAM a été caractérisé plus en détails et cette molécule semble agir à différents niveaux. Le ManLAM est capable d'inhiber l'influx calcique déclenché dans le macrophage lors de la phagocytose. Cet influx calcique est à l'origine de l'activation de deux protéines : la calmoduline et la calmoduline kinase II qui, après liaison avec le calcium se fixent au phagosome et induisent sa maturation en promouvant le recrutement de la phosphatidylinositol-3-phosphate kinase Vps34. L'inhibition du flux calcique induite par le ManLAM provoque ainsi un défaut de recrutement de Vps34 entraînant une diminution la quantité de PI3 phosphorylés à la surface du phagosome conduisant à une diminution du recrutement d'EEA1 [136-139]. Le mécanisme par lequel le ManLAM inhibe l'influx calcique n'a pas été déterminé mais pourrait potentiellement faire intervenir l'inhibition de la sphingosine kinase 1 (SK1)[140, 141]. En effet, il a été montré que le bacille est capable d'inhiber l'influx calcique en inhibant SK1, une protéine assurant la synthèse d'un lipide messager, le sphingolipide 1, permettant le relargage de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique. Cependant, l'implication directe du ManLAM dans l'inhibition de la SK1 n'a jamais été démontrée à ce jour. Il a également été démontré que la fixation du ManLAM au MR lors de la phagocytose est nécessaire à son action inhibitrice sur la maturation du phagosome [80]. Enfin, d'autres molécules de la paroi de *M. tuberculosis*, les PIM (phosphatidylinositol mannoside), jouent également un rôle dans le maintien de l'état immature du phagosome en favorisant son interaction avec les endosomes précoces [142].

Deux protéines sécrétées par le bacille tuberculeux ont également été mises en cause dans l'inhibition de la maturation du phagosome. SapM, une phosphatase sécrétée permet de déphosphoryler le PI3P présent sur la membrane du phagosome, potentialisant ainsi le rôle du ManLAM dans l'inhibition de leur phosphorylation et la diminution du recrutement d'EEA1 [143]. L'autre protéine sécrétée est PknG, une sérine/théonine kinase dont le mécanisme d'action n'est pas établi mais est dépendant de son activité kinase. Cette kinase pourrait être sécrétée dans le

cytoplasme du macrophage pour phosphoryler des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire [144, 145]. Enfin, de façon intéressante, il a pu être montré que l'ammonium, un métabolite excrété par *M. tuberculosis*, était à lui seul capable d'inhiber la fusion phagosome-lysosome tout en préservant l'interaction des phagosomes avec les endosomes précoces [146, 147]. L'ammonium sécrété pourrait provenir notamment de l'hydrolyse de l'urée via l'uréase ABCDEFG [148]. Bien que le bacille possède de multiples mécanismes de résistance à la maturation du phagosome, il semble que cette inhibition de fusion soit un état d'équilibre fragile puisque l'inactivation d'un seul des mécanismes suffit à diriger le bacille vers un compartiment acide, comme en attestent les cribles PAN-génomiques permettant d'identifier une multitude de gènes impliqués dans l'inhibition de la maturation du phagosome de *M. tuberculosis*. [74, 144, 149-152].

Enfin, il est important de noter que malgré l'existence de ces mécanismes de résistance, la maturation du phagosome de *M. tuberculosis* peut-être permise grâce à l'activation du macrophage par l'IFN γ . Le transfert du bacille dans un phagolysosome diminue alors considérablement sa croissance dans les cellules sans toutefois l'éliminer [153-155]. Ce mécanisme serait notamment assuré par le recrutement de la GTPase LRG-47 à la membrane du phagosome [156].

3. L'échappement du phagosome

Contrairement à la pensée généralement admise que *M. tuberculosis* réside exclusivement dans un phagosome à l'intérieur des macrophages, certaines observations du bacille à l'état libre dans le cytoplasme ont été faites depuis le début des années 1980 [157, 158]. Ces résultats ont été soumis à controverse car d'autres études n'ont pas réussi à mettre en évidence ce phénomène [159, 160]. Dans les années 2000, il a été démontré que *M. marinum* était capable de s'échapper du phagosome et que ce mécanisme était dépendant du système de sécrétion de type VII ESX-1 (ESAT-6 system 1) [161, 162]. Ces résultats ont relancé le débat sur le potentiel de *M. tuberculosis* à s'échapper du phagosome. En effet, *M. tuberculosis*, ainsi que *M. bovis*, possèdent également le système de sécrétion ESX-1. Ce système permet la sécrétion de la protéine ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target) sous forme d'hétérodimère 1:1 avec la protéine CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein). ESAT-6 est connu pour son activité lytique sur les membranes biologiques et pourrait ainsi promouvoir la rupture de la membrane phagosomale [162, 163]. De plus, ce système de sécrétion est très important pour le maintien de la virulence du bacille [164]. En effet, ESX-1 fait partie de la région RD1, une région délétée chez BCG et considérée comme responsable d'une

grande partie de son atténuation [163]. Ceci impliquerait que le phénomène d'échappement du phagosome constituerait un processus très important dans le cycle infectieux du bacille tuberculeux. En 2007, l'utilisation de la cryomicroscopie, une technique préservant l'intégrité originelle des échantillons, a montré que *M. tuberculosis* était retrouvé à l'état cytosolique, 48h après l'infection de macrophages, et que ce processus dépendait de ESX-1 [165]. Dans cette étude, la lyse du phagosome est observée après l'acquisition sur le phagosome des marqueurs LAMP1 et cathepsine D permettant d'émettre l'hypothèse que l'échappement du bacille est un processus déclenché après formation du phagolysosome. Malgré ces dernières études, l'échappement de *M. tuberculosis* reste cependant toujours controversé à ce jour et ceci pourrait être dû en partie au fait que l'observation de ce processus n'est pas systématique et dépendrait du type de cellule, des cytokines et du nombre de bactéries utilisées pour les expériences d'infection [166]. Enfin, il est proposé que la présence de *M. tuberculosis* à l'état libre dans cytoplasme soit la conséquence de la dégénérescence globale du macrophage qui serait en nécrose et donc soumis à la lyse de sa membrane plasmique ainsi que des membranes de l'ensemble de ses compartiments vésiculaires dont les phagosomes [167].

L'échappement du phagosome par *M. tuberculosis* serait donc un processus profitable au pathogène car lui permettant d'échapper aux conditions microbicides du phagolysosome et lui conférant un environnement nutritionnel plus favorable. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour en prouver définitivement l'existence.

II. Mécanismes bactéricides du macrophage et résistance de *M. tuberculosis*

Associé à la maturation du phagosome induisant un environnement acide et l'action d'hydrolases, le macrophage possède également un ensemble de mécanismes bactéricides auxquels le bacille doit faire face, tels que la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, l'action de peptides antimicrobiens, l'apoptose, l'autophagie, l'intoxication métallique ou encore la restriction en nutriments dont le fer.

1. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

a) Les radicaux oxygénés

Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive oxygen species) sont à l'origine d'un processus de stress oxydant conférant des propriétés antimicrobiennes aux macrophages [168]. Ces ROS sont synthétisées grâce à un enzyme, la NADPH phagocyte oxydase (NOX2) qui est un complexe multi-protéique formé d'un hétéro-dimère transmembranaire, le flavocytochrome b_{558} , constitué des protéines gp91^{phox} et p22^{phox} et de quatre unités cytoplasmiques : p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac qui s'assemblent à la membrane du phagosome dès sa formation [169]. Cette enzyme utilise le NADPH pour réduire l'oxygène présent dans la lumière du phagosome et le transformer en anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ toxique. De façon spontanée, l' $O_2^{\cdot-}$ est transformé en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui à son tour génère spontanément un autre radical toxique, le radical hydroxyle OH \cdot . Ces ROS provoquent un stress oxydant à l'origine de dommages multiples comme le détachement du fer contenu dans certains enzymes, la carbonylation de protéines, la peroxydation de lipides membranaires ou encore l'oxydation de résidus constitutif de l'ADN [170]. Cependant, ce stress oxydant semble avoir un impact modéré sur la survie du bacille dans les macrophages. En effet, la déficience des macrophages pour NOX2 n'influence pas la croissance de *M. tuberculosis* pouvant indiquer que les ROS ne restreignent pas la réplication du bacille [171]. Ceci pourrait être dû au fait que la bactérie possède des mécanismes efficaces de résistance aux ROS [172]. Tout d'abord, *M. tuberculosis* est capable d'empêcher l'assemblage de NOX2 à la membrane du phagosome par l'expression de la protéine NdK (nucleoside diphosphate kinase) permettant d'inhiber l'interaction entre les sous-unités Rac et p67^{phox} [173]. Egalement, le bacille est capable de résister à l'action des ROS par l'expression et la sécrétion de la superoxyde dismutase SodA transformant l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et de la catalase-peroxidase KatG convertissant l' H_2O_2 formé en eau. Bien que les ROS semblent avoir un pouvoir bactéricide limité sur le bacille dans le macrophage, la mutation des gènes *ndk*, *sodA* ou *katG* se traduit par une atténuation importante de la virulence de la bactérie révélant l'efficacité microbicide des ROS [173-175].

b) Les radicaux azotés

Les espèces réactives de l'azote ou RNI (reactive nitrogen intermediates) sont produites dans les macrophages via l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) suite à une activation par l'IFN γ . Grâce à la consommation d'arginine, l'iNOS génère du monoxyde d'azote ou NO qui est un composé toxique très réactif diffusant à travers les membranes lipidiques telle que celle du phagosome [117]. Le NO interagit avec l'oxygène et les ROS pour former de nombreux intermédiaires toxiques dont l'ion peroxydrite (ONOO^-) connu pour son fort pouvoir antibactérien [176]. Ces RNI peuvent endommager, de façon similaire aux ROS, un large panel de molécules essentielles telles que les protéines, les lipides ou les acides nucléiques [177]. Il a pu être montré que l'iNOS se fixait à la membrane des phagosomes afin de potentialiser l'action du NO sur les particules phagocytées et probablement limiter sa toxicité sur les composants de la cellule hôte [178]. *M. tuberculosis* est capable d'inhiber la fixation de l'iNOS au phagosome notamment en diminuant le recrutement de la protéine EBP50 (Ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50) nécessaire à son attachement [178, 179]. Malgré cela, contrairement aux ROS, les RNI constituent une arme majeure pour la résistance à *M. tuberculosis* car des souris $\text{iNOS}^{-/-}$ sont très sévèrement atténuées dans leur capacité à résister à l'infection et correspondent au modèle de souris les plus sensibles à la tuberculose après les souris $\text{IFN } \gamma^{-/-}$ [172, 180].

A noter que l'infection par *M. tuberculosis* ainsi que le NO lui-même induisent la génération de monoxyde de carbone (CO) à l'intérieur des macrophages. Le CO est produit par l'oxygénase héminique HO-1 et possède des propriétés microbicides sur de nombreux pathogènes [181]. De façon surprenante, ce composé n'affecte pas la survie de *M. tuberculosis* mais semblerait induire son entrée en dormance (**Voir partie C.III.2.a**) [182].

Pour finir, afin de résister à l'action des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, *M. tuberculosis* possède également des systèmes de réparation des molécules endommagées. Il a pu être montré qu'un mutant bactérien dans le gène *uvrB*, un gène codant pour un enzyme impliqué dans la réparation de l'ADN, était atténué chez la souris. De façon intéressante, ce mutant possède un niveau de virulence comparable à celui de la souche sauvage chez des souris mutées pour NOX2 et iNOS, révélant l'importance des mécanismes de réparation de l'ADN dans la résistance aux ROS et aux RNI [183]. Également, il a été montré que le protéasome, un complexe multi-protéique permettant la dégradation des protéines endommagées, permet à *M. tuberculosis* de résister à l'action des RNI chez la souris [184].

2. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens comprennent deux grandes familles : les défensines et les cathélicidines qui jouent toutes deux un rôle important dans l'immunité antimycobactérienne [185]. Ces peptides antimicrobiens sont des petits peptides cationiques à large spectre d'action induisant la lyse des bactéries par la formation de pore dans leur membrane et pouvant également endommager l'ADN bactérien [186, 187].

Chez l'homme, les défensines sont avant tout connues pour participer à la défense des cellules épithéliales pulmonaires contre *M. tuberculosis* [188, 189]. Dans le modèle murin, il a d'ailleurs pu être montré que les β -défensine 3 et 4, majoritairement exprimées par ces cellules épithéliales, participeraient au contrôle de l'infection [190]. De façon intéressante, il a récemment été montré que la β -défensine 2 est exprimée par les macrophages et participe à l'activité bactéricide contre *M. tuberculosis* en condition d'hypoxie, un environnement mimant celui présent au sein des granulomes [191]. L'expression de ce peptide antimicrobien en réponse à l'hypoxie pourrait jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* chez l'homme. Il a également été montré que la β -défensine 1 et l'isoniazide agissent en synergie pour tuer *M. tuberculosis in vitro*, ouvrant la voie à l'utilisation de ces peptides antimicrobiens dans le traitement de la tuberculose [192].

Contrairement aux défensines, un seul peptide antimicrobien appartenant à la famille des cathélicidines, appelé LL-37, est présent chez l'homme. Chez des patients infectés par *M. tuberculosis*, ce peptide est détecté dans de nombreux types cellulaires au niveau des poumons, tels que les neutrophiles, les cellules épithéliales et les monocytes mais est présent en quantité plus importante à l'intérieur des macrophages alvéolaires [193]. L'activité bactéricide de ce peptide sur *M. tuberculosis* a été démontré *in vitro* mais également directement à l'intérieur des macrophages [194]. De façon intéressante, l'expression de LL-37, tout comme celle de la β -défensine 2, est induite via la fixation de la vitamine D à son récepteur VDR présent à la surface du macrophage [79, 191, 195]. Cette observation explique en partie l'activité antimycobactérienne de la vitamine D et son rôle protecteur contre la tuberculose chez l'homme [196].

Enfin, il a été montré que ces peptides antimicrobiens ont également des propriétés pro-inflammatoires et/ou chimioattractantes jouant un rôle global dans l'établissement de la réponse immunitaire innée et adaptative [185, 197, 198].

3. L'autophagie

L'autophagie est un processus physiologique assurant l'homéostasie des cellules et leur permettant de recycler leur contenu cytoplasmique en le délivrant aux lysosomes. Elle permet par exemple l'élimination d'agrégats protéiques trop gros pour être pris en charge par le protéasome ou d'organites entiers défectueux [199]. Trente-cinq gènes appelés *atgs* (autophagy-related genes) sont essentiels pour l'autophagie [200]. Le processus d'autophagie débute par l'élongation d'une portion de membrane pouvant provenir d'origines diverses telle que la membrane plasmique, mais aussi les membranes du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ou encore des mitochondries [201]. Cette portion de membrane subit une élongation pour former une membrane d'isolement aussi appelée « phagophore ». Le phagophore se referme sur lui-même et forme ainsi un « autophagosome », lequel peut fusionner avec les lysosomes pour permettre la dégradation du matériel cytoplasmique séquestré [202].

La naissance du phagophore est induite par la présence de PI3P à la membrane via le recrutement de Vps34 sous forme d'un complexe comprenant des protéines dédiées à l'autophagie telles que ATG6 et ATG14L. L'élongation est promue par le recrutement d'autres partenaires tels que ATG5, ATG12, ATG16L et ATG8 aussi appelé LC3. La protéine LC3 est utilisée comme marqueur de l'autophagie et est recrutée à la membrane de l'autophagosome dès sa formation via une modification post-traductionnelle, médiée par la protéase ATG4, permettant son interaction avec les phosphatidylethanolamines (PE) présents sur la membrane [199]. La localisation membranaire de LC3 est nécessaire à l'autophagie et est dépendante de la GTPase IGRM (Immunity-related GTPase M)[203].Après formation, l'autophagosome est alors dirigé vers les lysosomes via un mécanisme Rab7-dépendant, de façon similaire aux phagosomes tardifs, pour former un autophago-lysosome [202].

En plus de son rôle dans la physiologie cellulaire, l'autophagie constitue également un mécanisme de lutte contre les agents pathogènes. En effet, il a été montré que le polymorphisme génétique de certains gènes de l'autophagie peut induire une susceptibilité aux maladies infectieuses. Il a d'ailleurs été reporté qu'un polymorphisme dans *irgm* était associé à une susceptibilité des individus à la tuberculose [20, 204]. Chez les macrophages, l'autophagie peut être déclenchée par différents stimuli tel que la privation en nutriments, l'ATP extracellulaire ou l'IFN γ [199, 205, 206]. L'induction de l'autophagie par l'IFN γ explicite le rôle de ce processus physiologique dans la défense de l'organisme et souligne une nouvelle fois le rôle important de l'IFN γ dans l'activation du pouvoir microbicide des macrophages.

Lors de l'infection des macrophages par BCG, il a été montré que l'induction de l'autophagie permet d'outre passer l'inhibition de la maturation du phagosome et de diminuer la viabilité du bacille. Dans cette étude, l'autophagie induite par une privation en nutriments augmente par deux la quantité de phagosomes acidifiés possédant des marqueurs lysosomaux tels que LAMP-1, la V-ATPase ou la cathépsine D [207]. Ces compartiments correspondent à des autophagolysosomes issus de la prise en charge des phagosomes contenant les bacilles par des autophagosomes comme le démontre la présence dans ces compartiments de la protéine LC3. De façon intéressante, l'autophagie pourrait également permettre la prise en charge de *M. tuberculosis* lors de son échappement du phagosome [208]. Aucun mécanisme de résistance à l'autophagie n'a été déterminé à ce jour concernant *M. tuberculosis*. Etant donné le rôle important des PI3P dans la mise en place de l'autophagie, on peut raisonnablement présager qu'un mécanisme de résistance à ce processus soit en certains points similaires à ceux de l'inhibition de maturation des phagosomes [139] (**Voir partie C.I.2**).

4. L'apoptose

Lors de l'infection des macrophages par *M. tuberculosis*, deux cas de figures peuvent être observés. Le macrophage survit à l'infection, ou le macrophage meurt suite aux dommages collatéraux induits par l'entrée et/ou la réplication du bacille. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée permettant de restreindre la dissémination des pathogènes et de potentialiser leur destruction au sein de l'organisme. Ce mécanisme est caractérisé par la segmentation de l'ADN et le maintien de l'intégrité membranaire de la cellule. Ce processus induit une mort par fragmentation de la cellule en vésicules appelées corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques contenant le pathogène sont alors facilement éliminés par d'autres macrophages et facilitent la présentation antigénique, après leur captation par les cellules dendritiques, pour promouvoir l'établissement de la réponse immunitaire adaptative [209, 210]. L'apoptose est assurée par des protéines appelées caspases qui sont activées par divers mécanismes comme la fixation du TNF α à son récepteur, la production de ROS ou des signaux provenant des mitochondries [211].

La proportion de macrophages apoptotiques est diminuée dans le cas d'une infection par *M. tuberculosis* en comparaison à une infection par une mycobactérie atténuée telle que BCG [212]. Le bacille tuberculeux posséderait donc des mécanismes d'inhibition de l'apoptose et/ou d'induction de la nécrose. La nécrose, contrairement à l'apoptose, est une mort cellulaire profitable au pathogène induisant la lyse du macrophage et la libération du bacille dans l'environnement extracellulaire favorisant ainsi sa dissémination. Un crible a permis d'identifier le gène *nuoG*, codant pour une sous-

unité de la NADH déshydrogénase, comme étant un facteur clé pour l'inhibition de l'apoptose chez *M. tuberculosis*. Il est pensé que la NADH déshydrogénase du bacille pourrait participer à la neutralisation de l'anion superoxyde O_2^- , un métabolite connu pour induire l'apoptose [213]. Dans ce sens, un mutant de *M. tuberculosis* pour le système SecA2 permettant la sécrétion de SodA et KatG, également impliqués dans la neutralisation de l' O_2^- , est atténué pour sa virulence et possède un phénotype pro-apoptotique [214].

Enfin, des lipides comme la prostaglandine éicosanoïdes 2 (PGE2) et la lipoxine A_4 (LXA4) jouent un rôle important dans la balance apoptose/nécrose chez le macrophage infecté. En effet, il a pu être montré que le bacille tuberculeux est capable d'induire la production de LXA4, un lipide pro-nécrotique, tout en diminuant celle du lipide pro-apoptotique PGE2 [210]. Dans ce sens, des souris mutées rendues incapables de produire de la LXA4 sont plus résistantes à la tuberculose alors que celles déficientes en PGE2 sont plus sensibles à l'infection [215, 216].

5. L'intoxication métallique

Il a été montré que les macrophages utilisent des métaux de transition pour intoxiquer les bactéries phagocytées afin d'inhiber leur prolifération [217]. Une étude protéomique de phagosomes « modèles » obtenus après phagocytose de bille de latex, a pu révéler que des transporteurs de métaux, notamment ZNT1 et ATP7A, étaient présents sur la membrane des phagosomes. Ces transporteurs permettent respectivement le transport du zinc et du cuivre et leur recrutement aux phagosomes est augmenté par l'activation des macrophages via l'IFN γ [218]. Bien que constituant des éléments essentiels à la nutrition des bactéries, les métaux en forte concentration ont un fort pouvoir antibactérien [219]. De façon intéressante, la mesure de la concentration en métaux dans la lumière du phagosome de *M. tuberculosis* a révélé que le zinc et le cuivre s'accumulent au cours du temps atteignant une concentration élevée de 0,5 mM pour le zinc après un jour d'infection [220]. Le bacille tuberculeux est capable de résister à cette intoxication métallique par l'expression de transporteurs spécifiques tels que l'exporteur de zinc CtpC et les exporteurs de cuivres CtpV et MctB [221-223]. La délétion de ces transporteurs induit une sensibilité accrue du bacille aux métaux qu'ils exportent et une diminution de sa virulence à l'intérieur des macrophages. L'utilisation d'autres métaux pour l'intoxication des bactéries par les macrophages est envisagée comme notamment celle du magnésium [217].

6. La restriction en nutriments : l'exemple du fer

Parallèlement à l'accumulation de composés toxiques, les macrophages vident le contenu des phagosomes en nutriments essentiels pour limiter la multiplication des bactéries phagocytées. En effet, de nombreuses études convergent pour attester que l'interaction hôte-pathogène est le siège d'une compétition nutritionnelle, notamment dans le cadre d'une infection par des pathogènes intracellulaires [224-227].

L'exemple de restriction en nutriments le plus étudié est la privation en fer, notamment permise par le transporteur Nramp1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1) présent sur la membrane des phagosomes [228, 229]. Ce transporteur permettrait l'extrusion du fer présent dans la lumière des phagosomes afin de limiter l'accès de ce nutriment essentiel aux bactéries phagocytées [230]. Il jouerait également un rôle dans l'extrusion d'autres cations divalents tel que le manganèse Mn^{2+} et le cobalt Co^{2+} et son expression est augmentée après activation des macrophages par l'IFN γ [229-231]. Un polymorphisme du gène *nramp1* est d'ailleurs responsable d'une susceptibilité des individus aux infections par des pathogènes intracellulaires tel que *M. tuberculosis* [232, 233] (**Voir partie C.I.b**). Cependant, le rôle exact de Nramp1 dans la résistance aux pathogènes est soumis à débat. Tout d'abord, des doutes persistent en ce qui concerne le sens du transport qu'il promeut. En effet, il a été proposé que Nramp1 permettait, non pas de vider, mais de faire pénétrer le fer à l'intérieur des phagosomes pour permettre l'intoxication des microorganismes [234]. Également, le rôle de Nramp1 dans la résistance aux pathogènes serait limité car la mutation du gène *nramp1* chez la souris n'entraîne pas de susceptibilité à la tuberculose [235].

Il a également été reporté qu'une modification du métabolisme du fer est opérée par les macrophages, lors de leur infection ou de leur activation par l'IFN γ , afin de restreindre la quantité en fer accessible aux pathogènes [226]. Par exemple, l'expression de la ferroportine, un exporteur de fer présent à la membrane plasmique, est augmentée et permettrait d'expulser le fer libre contenu dans le macrophage. De façon intéressante, ce transporteur est également localisé à la membrane du phagosome de *M. tuberculosis* et participerait, avec Nramp1, à l'extrusion du fer du phagosome [236]. En parallèle, l'expression de la ferritine, une protéine impliquée dans la séquestration du fer dans le cytosol, est augmentée [237, 238]. Enfin, l'expression du récepteur à la transferrine TfR, permettant la capture de la transferrine fixant le fer extracellulaire pour son internalisation, est quant à elle diminuée [239].

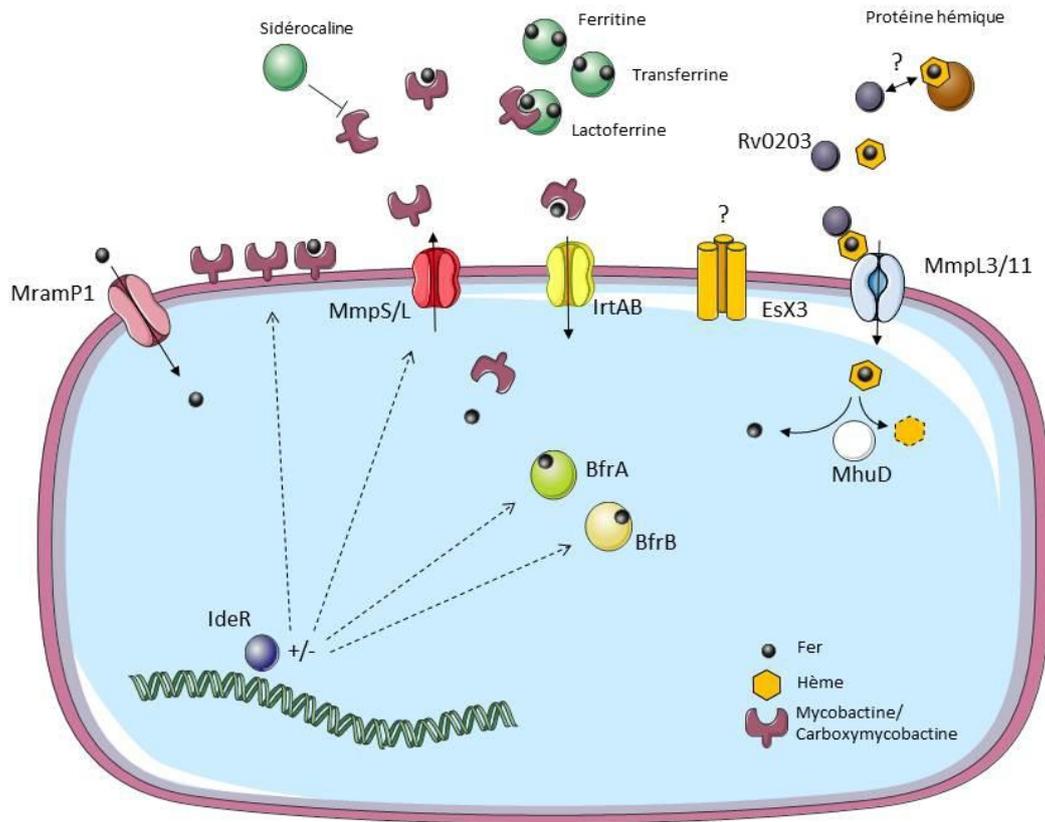


Figure 3: Les systèmes de capture du fer présents chez *M. tuberculosis*. Afin d'assurer sa croissance et sa survie à l'intérieur des macrophages, le bacille tuberculeux possède différents systèmes de capture du fer. La bactérie synthétise des sidérophores, molécules chélatant le fer, pouvant être accrochées à sa surface (mycobactines) ou sécrétées (carboxymycobactines). Ces mycobactines peuvent fixer le fer libre ainsi que celui déjà présent dans des protéines de l'hôte tel que la ferritine, la transferrine et la lactoferrine. L'export de la carboxymycobactine est assuré par le système MmpS/L et son import par le transporteur ABC IrtAB. La carboxymycobactine peut être neutralisée par fixation spécifique à une protéine produite par le macrophage : la sidérocaldine. Le bacille peut également utiliser le fer contenu dans les hèmes présent à l'état libre ou potentiellement déjà présent dans des protéines hémiques de l'hôte. Les hèmes contenant le fer sont capturés par la protéine Rv0203 et importés via les transporteurs MmpL3 et MmpL11. Une fois dans le cytoplasme, l'hème est alors dégradé par la protéine MhuD permettant la libération du fer capturé. Alternativement, le fer libre peut également être importé à l'intérieur du bacille via le transporteur Mramp. Le système de sécrétion de type VII Esx3 serait également impliqué dans l'acquisition du fer mais son rôle exact reste à déterminer. Le fer acquis par ces différents systèmes peut ensuite être stocké par les protéines BfrA et BfrB. Selon la concentration en fer disponible à la bactérie, la protéine IdeR régule l'expression de gènes du métabolisme du fer tel que les gènes impliqués dans la synthèse des mycobactines, du système MmpS/L ou des protéines de stockage BfrA et BfrB.

L'élément le plus probant révélant les mécanismes de restriction en fer mis en place par les macrophages est probablement la diversité des mécanismes d'acquisition du fer mis en jeu par les pathogènes pour promouvoir leur survie [227, 240, 241]. *M. tuberculosis* possède des sidérophores appelés mycobactines qui sont des molécules permettant de chélater le fer et de le capturer. Deux types de mycobactines sont synthétisées par le pathogène, une mycobactine soluble sécrétée (carboxymycobactine) et une mycobactine lipophile ancrée à sa surface (**Figure 3**) [242, 243]. De façon intéressante, il a été reporté que la carboxymycobactine est capable de capturer le fer originellement complexé aux protéines de l'hôte telles que la ferritine, la transferrine et la lactoferrine, une protéine de la famille des transferrines impliquée également dans la capture du fer extracellulaire [244-246]. Ces mycobactines sont exclusivement synthétisées par le bacille lors d'une privation en fer et sont requises pour sa multiplication à l'intérieur des macrophages [247, 248]. Les systèmes MmpS/L et le transporteur ABC IrtAB, permettant respectivement l'export et l'import de la carboxymycobactine, sont également requis pour la croissance du bacille en milieu pauvre en fer et pour sa virulence [249-251]. Le système de sécrétion de type VII ESX-3 serait également impliqué dans l'utilisation du fer chez *M. tuberculosis* mais son rôle exacte reste à déterminer [252].

Il a également été montré que *M. tuberculosis* était capable d'utiliser le fer contenu dans les hèmes pour sa croissance *in vitro* [253]. Le fer sous forme complexé aux hèmes constitue plus de 80% du fer présent chez l'homme alors que celui présent dans les transferrines (transferrine et lactotransferrine) n'en représente que moins de 1% [254]. Les protéines transmembranaires MmpL3 et MmpL11 ont été identifiées comme étant les uniques importeurs d'hème présent chez le bacille [254]. Ce système d'acquisition contient également Rv0203, une protéine sécrétée permettant la capture des hèmes et leur entrée dans le bacille via son interaction avec les transporteurs MmpL3/11 [255]. Dans le cytoplasme de la bactérie, l'hème est ensuite pris en charge par la protéine MhuD qui le dégrade et permet la libération du fer capturé [256]. La provenance des hèmes utilisés par la bactérie durant l'infection n'a pas été déterminée à ce jour mais il est pensé que Rv0203 pourrait détacher les hèmes directement présent dans les protéines hémiques de l'hôte (ex : hémoglobine, myoglobine, cytochrome) [257].

M. tuberculosis semble donc principalement acquérir le fer sous forme complexé à des molécules (hèmes et transferrine/ferritine) en accord avec le fait que le fer à l'état libre est toxique et donc peu présent dans les cellules [258]. Dans ce sens, *M. tuberculosis* possède un transporteur de fer nommé Mramp (homologue à Nramp1) dont la mutation n'affecte pas la virulence du bacille chez l'animal [259, 260]. Également, la protéine IdeR, un régulateur majeur du métabolisme du fer chez *M.*

tuberculosis, joue un rôle important dans la virulence du bacille. Il permet l'activation ou la répression de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du fer en réponse à la quantité en fer disponible à la bactérie. IdeR permet notamment de contrôler l'expression des gènes de synthèse de mmPS/L, des mycobactines ou encore des protéines de stockage du fer BfrA et BfrB jouant elle aussi un rôle important dans le métabolisme du fer et la virulence *M. tuberculosis* [261-263].

Pour finir, on peut noter qu'au cœur de cette compétition nutritionnelle pour l'acquisition du fer, la cellule hôte ne se contente pas de restreindre l'accès en fer mais combat activement les mécanismes d'acquisition mis en place par *M. tuberculosis*. En effet, il a été montré que lors de l'infection par le bacille tuberculeux, le macrophage sécrète une protéine appelée sidéocaline qui est capable de fixer spécifiquement les carboxymycobactines sécrétées et d'inhiber ainsi leur rôle dans l'approvisionnement en fer au bacille [264, 265]. L'ajout de sidéocaline a d'ailleurs un effet inhibiteur sur la croissance du pathogène *in vitro*. Dans les cellules, le bacille tuberculeux doit résister à l'action de cette protéine. De façon intéressante, il a pu être montré que *M. avium* était capable d'interagir avec les endosomes de recyclage riches en transferrine mais ne localisait pas avec les compartiments contenant la sidéocaline [266].

Il est important de noter que ces mécanismes bactéricides ne s'additionnent pas simplement mais peuvent se potentialiser. Par exemple, l'action des ROS et des RNI est potentialisée par le pH acide du phagosome. De plus, les ROS ont également été caractérisés pour induire l'apoptose et la production de la cathélicidine LL-37 par les macrophages. Egalement, l'activation des macrophages par l'IFN γ induit la production de RNI et de l'autophagie mais également de l'apoptose. Enfin, la vitamine D permettant d'induire la production de peptides antimicrobiens promeut également l'autophagie [123, 267-269]. L'ensemble de ces mécanismes bactéricides induisent l'apparition un environnement peut favorable auquel le bacille doit s'adapter.

III. Environnement bactérien et adaptation

1. Le stress acide

Malgré les mécanismes d'inhibition de la fusion phagosome-lysosome mis en place par le pathogène, il semble que la bactérie ait à résister à un stress acide durant son cycle infectieux. En effet, de nombreux mutants rendus sensibles au stress acide *in vitro* par l'inactivation de différents gènes, sont affectés pour leur virulence [152, 270-272]. Egalement, l'antibiotique de première intention PZA, n'est actif que dans un environnement acide ($\text{pH} < 6$) révélant que le pathogène fait effectivement face à ce stress chez l'homme [273]. Ceci serait notamment la conséquence de l'activation des macrophages permettant de réduire le pH du phagosome contenant *M. tuberculosis* ($\text{pH} \approx 6,4$) à une valeur située aux alentours de $\text{pH} \approx 5$ [156, 272].

M. tuberculosis possède différents mécanismes de lutte contre ce stress afin de survivre et de se multiplier au sein des tissus. Ils peuvent être découplés en deux : la résistance passive et la résistance active.

a) La résistance passive

Elle traduit un mécanisme de résistance à l'acidité présent chez le bacille ne nécessitant pas son induction suite à la perception du stress. Cette résistance est principalement permise par l'enveloppe atypique de *M. tuberculosis*. Cette enveloppe est constituée d'une membrane plasmique classique entourée d'une paroi constituée de peptidoglycane et d'arabinogalactane sur laquelle sont liés covalamment des acides gras à longue chaîne (pouvant posséder plus de 90 atomes de carbone), appelés acides mycoliques. Ces acides mycoliques forment la « mycomembrane » qui constitue une membrane externe sur laquelle sont ancrés d'autres lipides extractibles tels que les DIMs, les TDMs, les PIMs ou les SLs [274, 275]. Cette enveloppe particulièrement riche en lipides rend la bactérie peu perméable à l'entrée de petites molécules tels que les protons [276]. Ainsi, un grand nombre de mutants rendus sensibles aux pH acide *in vitro* sont altérés dans leur capacité de synthèse de constituants pariétaux [271]. Certains de ces constituants, tels que les DIMS, ont un rôle à la fois dans le maintien de la perméabilité membranaire et l'interaction avec la cellule hôte [72, 277].

M. tuberculosis croît de façon optimale à des valeurs de pH comprises entre 5,8 et 6,7 et stoppe sa croissance à des valeurs inférieures à 5,5 [272]. Placé à un pH de 4,5, il a pu être montré que le

bacille était capable de résister à l'entrée des protons présents en forte concentration dans son environnement et de maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité [278]. De façon intéressante, associée à l'imperméabilité globale de la membrane, la sérine protéase MarP participe pour beaucoup à la résistance intrinsèque du bacille au stress acide [278]. Bien que son mécanisme d'action soit encore mal compris, il semblerait qu'il soit dépendant de son activité protéase ainsi que de sa localisation périplasmique [279].

Cette résistance intrinsèque permet donc au bacille de survivre au stress acide, mais l'induction de mécanismes de résistance est nécessaire pour promouvoir sa croissance.

b) La résistance active

Lors de l'entrée du bacille à l'intérieur du macrophage, près de 50% des gènes dont l'expression est modulée par l'environnement intracellulaire correspond à des gènes de réponse au stress acide [280]. Ce stress acide serait perçu en partie par le système à deux composants PhoPR et serait étroitement lié à la réponse globale de la bactérie à l'environnement intracellulaire [281].

L'opéron *aprABC* a été identifié comme un locus majeur de réponse au stress acide chez *M. tuberculosis*. Cet opéron est sous le contrôle de PhoPR et est induit *in vitro* chez la bactérie placée à des pH inférieurs à 6,5 ainsi qu'à l'intérieur du macrophage. Ce locus joue un rôle dans la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes tels que ceux impliqués dans la synthèse de lipides pariétaux comme les DIMs [282].

Un autre déterminant de l'adaptation au stress acide chez *M. tuberculosis* est l'expression de la protéine OmpATb. Cette protéine possède les caractéristiques d'une porine, un transporteur de large spécificité, permettant le passage de molécules hydrophiles à travers la membrane externe du bacille [283]. Son rôle dans la résistance au stress acide ainsi que dans la nutrition et la virulence bactérienne est soumis à débat. Une étude a pu montrer qu'un mutant dans OmpATb était altéré pour sa croissance *in vitro* à pH 5,5, ainsi que chez l'animal, et était diminué pour sa capacité à importer des molécules hydrophiles comme la sérine, notamment en conditions acides [270]. Cette étude met donc en évidence le rôle important de cette porine dans la nutrition du bacille durant l'infection. Une autre étude, quant à elle, a montré qu'OmpATb permettait la croissance de la bactérie à pH acide en limitant au contraire l'entrée de molécules tels que les protons à l'intérieur de la bactérie [284]. Enfin, d'autres études ont montré qu'OmpATb ne possédait pas une structure compatible avec une activité porine et n'était impliquée ni dans l'import de molécules hydrophiles, telle que la sérine, ni dans la virulence du bacille [285, 286]. De façon intéressante, il a été montré

que cette protéine était en fait impliquée dans la sécrétion d'ammoniaque, une base faible qui permettrait au bacille de tamponner un environnement acide (**Voir partie D.III.1**) [286].

Enfin, un autre mécanisme permettant l'adaptation de la bactérie à ce stress est l'hydrolyse de l'urée via l'uréase UreABCDEFG. Il a été montré que l'hydrolyse de l'urée permettait à BCG de sécréter de l'ammoniaque à l'intérieur des macrophages et participait ainsi à l'alcalinisation du phagosome. La mutation de l'uréase chez BCG permet d'ailleurs au candidat vaccin VPM 1002 de promouvoir l'action de la lystériolysine O active uniquement à pH acide [42] (**Voir partie A.II.2.b.i**). Cependant, le rôle de cette uréase dans la résistance à l'acidité semble limité car l'enzyme n'est pas requis pour la multiplication de BCG à l'intérieur des macrophages activés [148]. Le rôle de la protéine OmpATb et de l'uréase UreABCDEFG dans la résistance du bacille au pH acide met donc en évidence l'importance de la sécrétion d'ammoniaque dans l'adaptation des mycobactéries au pH acide, cependant aucun lien fonctionnel n'a été établi entre ces deux acteurs.

D'autres mécanismes de résistance au stress acide pourraient exister chez le bacille tuberculeux. En effet, des mécanismes caractérisés chez d'autres bactéries n'ont pas été identifiés à ce jour chez *M. tuberculosis*. Parmi eux, l'utilisation de l'ATP synthase/hydrolase ATP F₀F₁. En conditions physiologiques, ce complexe enzymatique permet la synthèse de l'ATP via l'import de proton à travers la membrane plasmique. En cas de stress acide, il a été montré que ce complexe pouvait promouvoir, par un mécanisme inverse, l'extrusion de protons via l'hydrolyse d'ATP et ainsi limiter l'acidification du cytosol bactérien [287]. Bien que la structure de ce complexe ait été déterminée chez *M. tuberculosis* car constituant une cible thérapeutique, son rôle dans la résistance à l'acidité chez le bacille n'a pas été recherché (**Voir partie A.II.3.b**) [288].

Cependant, il a été montré que l'ATP F₀F₁ de BCG ne possède pas d'activité ATPase suggérant qu'elle ne puisse donc pas intervenir dans l'efflux de protons via l'hydrolyse de l'ATP [289]. De façon intéressante, il a récemment été montré chez *Salmonella enterica*, un pathogène intracellulaire des macrophages, que cette ATP synthase F₀F₁ participait à la résistance au stress acide par un mécanisme nouveau. Cette fois-ci, en conditions acides, l'activité de synthèse de l'ATP F₀F₁ est inhibée pour stopper l'entrée de protons à l'intérieur de la bactérie. Ce mécanisme permet à *S. enterica* de résister au pH acide du phagosome tout en maintenant la concentration en ATP dans son cytosol [290]. L'inhibition de l'ATP F₀F₁ chez *S. enterica* est permise par son interaction avec une protéine appelée MgtC. Un homologue de cette protéine, appelée également MgtC, a été mis en cause dans la virulence et la résistance de *M. tuberculosis* au stress acide par un mécanisme encore

mal défini [291]. Il est raisonnable d'envisager que le bacille tuberculeux puisse en partie résister au stress acide en inhibant l'ATP F_0F_1 de façon similaire aux salmonelles.

Enfin, l'un des derniers mécanismes de résistance à l'acidité présent chez les bactéries est la décarboxylation des acides aminés. Cette réaction enzymatique permet la consommation des protons présents dans le cytosol bactérien via leur incorporation dans les métabolites issus de la décarboxylation. Ces métabolites, appelés polyamines, sont ensuite évacués des bactéries via l'utilisation de transporteurs spécifiques [287]. Les décarboxylases les plus couramment retrouvées chez les bactéries sont Adi, Gad, Spe et Cad permettant respectivement la décarboxylation des acides aminés arginine, glutamate, ornithine et lysine. Ces enzymes sont généralement exprimés à pH acide et sont connus pour participer à la résistance au stress acide chez divers pathogènes intracellulaires tels que *S. enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* ou encore *Shigella flexneri* [292-295]. Deux décarboxylases putatives sont présentes chez *M. tuberculosis*, Rv2531c potentiellement impliquée dans la décarboxylation de l'ornithine, de la lysine ou de l'arginine et GadB qui est prédit pour permettre la décarboxylation du glutamate [27]. Aucun de ces deux gènes n'a fait l'objet d'étude à ce jour.

2. Le stress hypoxique

Le stress hypoxique correspond au stress induit par la diminution de la quantité en oxygène disponible à la bactérie. Par l'utilisation de sondes spécifiques et la mesure directe de la tension en oxygène, l'étude de biopsies de poumons infectés par *M. tuberculosis* provenant d'animaux modèles tels que le cochon d'Inde, le lapin et le singe, mais aussi de tissus humains, a pu montrer que les granulomes contenant la bactérie sont hypoxiques [296]. Un modèle de croissance *in vitro* induisant une privation progressive en oxygène, appelé modèle de Wayne, a pu confirmer la corrélation existant entre la déplétion en oxygène et l'entrée en dormance du bacille [297]. Soumis au stress hypoxique, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des protéines, des acides nucléiques, des acides aminés et des lipides est fortement diminuée, témoignant d'une diminution globale du métabolisme bactérien [298]. Le stress hypoxique induit donc l'entrée en dormance du bacille, un état métaboliquement ralenti et non répliatif, responsable de la forme latente et asymptomatique de la maladie chez l'homme [297, 299].

M. tuberculosis est une bactérie aérobie et l'oxygène est nécessaire à sa croissance [300]. Il participe au fonctionnement de sa chaîne respiratoire en permettant la synthèse d'ATP (via l'ATP synthase F_0F_1) et la régénération des coenzymes essentiels à son métabolisme. Cette chaîne respiratoire est constituée de protéines membranaires (comme les cytochromes et les ubiquinones) qui forment une chaîne de transport d'électrons provenant de l'oxydation des coenzymes réduits (comme le NADH, H^+ et le $FADH_2$) et aboutissant à l'utilisation de l'oxygène comme accepteur final d'électron [301]. L'entrée en dormance de la bactérie est un programme spécifique qui permet la modification de son métabolisme entraînant l'arrêt de sa croissance mais assurant sa survie en l'absence d'oxygène.

a) L'entrée en dormance : le rôle clé du système DosRST

L'entrée en dormance est un mécanisme de survie permis par le système à deux composants DosRST constitué de deux protéines senseurs (DosT et DosS) et d'une protéine régulatrice DosR [299, 302, 303]. DosS et DosT permettent à la bactérie de percevoir la diminution en oxygène dans l'environnement et de répondre également à d'autres stimuli tels que la présence de CO, de NO ainsi que la diminution du flux d'électrons de la chaîne respiratoire [304, 305]. En effet, en association avec la déplétion en oxygène, le NO et le CO produits par les macrophages participent à l'inhibition de la respiration du bacille et donc à son entrée en dormance [182, 306]. Alors que DosT joue un rôle précoce dans la perception du stress hypoxique, DosS permet quant à lui la pérennisation de la réponse à ce stress [302, 307].

Après stimulation, les senseurs DosS/T s'autophosphorylent et induisent la phosphorylation de la protéine régulatrice DosR promouvant ainsi son activation. DosR est une protéine régulatrice majeure pour la mise en place du programme de dormance et il a été montré que sa délétion chez BCG diminue drastiquement sa viabilité lors d'un stress hypoxique [303]. DosR est un facteur de transcription qui permet l'induction de près de 50 gènes dont *dosR* lui-même [308]. Les gènes dont l'expression est induite par DosR correspondent d'ailleurs à la majorité des gènes induit lors du stress hypoxique [298, 299]. Cependant, plus de la moitié des gènes du régulon DosR codent pour des protéines de fonction inconnue rendant difficile l'interprétation de leur rôle dans la résistance au stress hypoxique [308].

Un gène nommé *hspX* (ou *acr*) constitue l'un des gènes dont l'expression est la plus fortement induite par DosR. La protéine HspX est de ce fait l'une des protéines les plus massivement produite par *M. tuberculosis* lors d'un stress hypoxique [308-310]. La délétion de *hspX* a tout d'abord été corrélée avec une diminution de la virulence du bacille, puis ce phénotype a été révisé par deux études postérieures montrant qu'un mutant *hspX* possède en réalité un phénotype d'hypervirulence

chez l'animal [311-313]. Le rôle de HspX dans la physiopathologie de la tuberculose n'est pas clairement établi mais il semblerait que cette protéine possède une activité chaperonne et permette de diminuer la réponse immunitaire de l'hôte comme la production de cathepsines et la sécrétion d'IFN γ et de TNF α [312, 314].

Dans l'étude préliminaire démontrant une atténuation de la souche mutée pour *hspX*, il est proposé que ce phénotype soit induit par la diminution de l'expression d'un gène adjacent à *hspX* nommé *acg*. Tout comme *hspX*, l'expression de *acg* est sous le contrôle de DosR mais la délétion de ce gène induit une diminution de virulence chez *M. tuberculosis* [308, 315]. *Acg* posséderait une activité nitroréductase, sa structure a été établie mais son rôle physiologique reste indéterminé [316, 317]. Cependant, certains des gènes induits par DosR ont une fonction caractérisée, c'est le cas des gènes associés au métabolisme des nitrates tel que le gène *nark2* codant pour un transporteur de nitrates et le gène *narX* codant pour une nitrate réductase putative [308].

Bien que le rôle du système DosRST dans l'induction de la dormance du bacille soit établi, son rôle dans virulence est soumis à controverse [299, 318]. En effet, il a été montré qu'une souche délétée pour *dosR* possédait un phénotype d'hypervirulence chez la souris tout comme le mutant *hspX* [319]. Cependant, d'autres études ont pu mettre en évidence le rôle important de DosR dans la virulence du bacille chez la souris et d'autres modèles animaux tel que le cochon d'Inde et le lapin [320, 321]. Les résultats contradictoires chez la souris pourraient être la conséquence de différences pouvant exister entre les souches bactériennes utilisées, le mode de construction de la mutation employé et/ou le modèle de souris utilisé. L'atténuation du mutant *dosR* observée exclusivement chez le cochon d'Inde et le lapin pourraient quant à elle être attribuée au fait que le système DosRST est requis par le bacille uniquement chez ces animaux présentant des granulomes hypoxiques contrairement à la souris [99, 104, 296].

b) La respiration des nitrates

En l'absence d'oxygène, les bactéries sont capables d'utiliser d'autres molécules tel que le fer, les sulfures ou les nitrates pour maintenir le fonctionnement de leur chaîne respiratoire et ainsi assurer leur survie [322]. Il a pu être montré que l'entrée en dormance de *M. tuberculosis* était corrélée avec une forte induction de son activité de réduction des nitrates et que la présence de nitrates augmentait la survie du bacille en conditions d'hypoxie [323, 324]. Ces observations ont laissé présager que le bacille était capable de respirer les nitrates en l'absence d'oxygène. Chez les bactéries, les nitrates NO $_3^-$ peuvent être réduits en nitrites NO $_2^-$ via des nitrates réductases

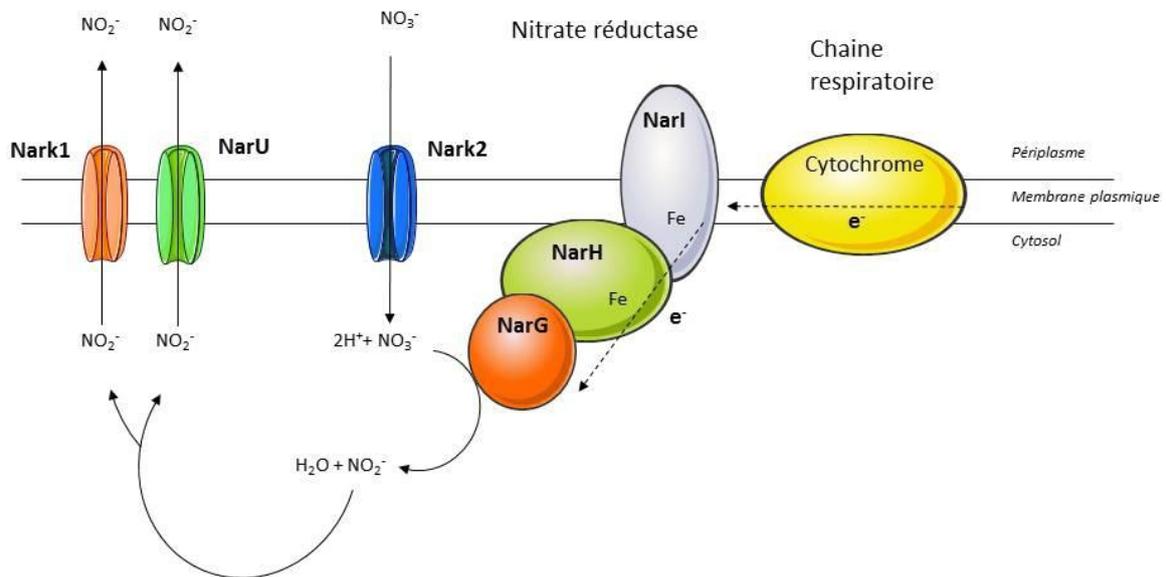


Figure 4: La respiration des nitrates chez *M. tuberculosis*. En condition d'hypoxie, l'expression du transporteur de nitrates Nark2 est augmentée et permet de potentialiser l'entrée de nitrates NO_3^- à l'intérieur de la bactérie. La nitrate réductase constituée des sous-unités NarI, NarH et NarG permet la réduction des nitrates importés en nitrites NO_2^- . La sous-unité NarI assure l'ancrage de la nitrate réductase à la membrane plasmique et, en association avec la sous-unité NarH, permet le passage d'un flux d'électron grâce au fer qu'elle contient. NarG est la sous-unité catalytique permettant la réduction des NO_3^- . Cette réaction enzymatique fait intervenir deux protons H^+ permettant la formation d' H_2O à l'origine de la consommation des électrons provenant du cytochrome de la chaîne respiratoire bactérienne. Les nitrites formés sont alors sécrétés par la bactérie, probablement par les exporteurs Nark1 et NarU. Par ce mécanisme, le fonctionnement de la chaîne respiratoire du bacille est préservé en l'absence d'oxygène et le bacille survit au stress hypoxique. D'après Moreno-Vivian *et al*, 1999 et Khan *et al*, 2012.

membranaires permettant ainsi de remplacer l'oxygène par les nitrates comme accepteur final d'électron au niveau des chaînes respiratoires [322, 325].

Le gène *narX* bien qu'induit en hypoxie par DosR et codant pour une nitrate réductase putative, n'intervient pas dans l'utilisation des nitrates chez *M. tuberculosis* puisque un mutant dans ce gène n'est pas affecté pour la réduction des nitrates [326]. Cependant, le bacille possède un locus constitué de 4 gènes en opéron nommé *narGHJI* codant pour une nitrate réductase effective. En effet, un mutant de *M. tuberculosis* pour le gène *narG* a une activité réductase nulle démontrant que NarGHJI est probablement l'unique nitrate réductase fonctionnelle chez le bacille tuberculeux [326]. De façon intéressante, cet enzyme possède les caractéristiques d'une nitrate réductase respiratoire pouvant s'insérer dans la membrane plasmique à proximité des complexes de transport d'électrons (**Figure 4**) [325, 327]. NarGHJI possède une unité catalytique NarG, et deux sous-unités riches en fer NarH et NarI permettant le transfert des électrons de la chaîne respiratoire vers NarG. NarI permet l'attachement de la nitrate réductase à la membrane plasmique. La sous-unité NarJ quant à elle ne fait pas partie intégrante de la nitrate réductase mais permettrait d'assurer son assemblage et/ou maintenir sa stabilité avant son attachement à la membrane [325].

Il a pu être montré que l'expression de cet enzyme n'est pas induite par un stress hypoxique. En effet, c'est l'induction de l'expression du transporteur Nark2 qui augmente l'activité nitrate réductase chez *M. tuberculosis*, en condition d'hypoxie, en permettant l'entrée des nitrates dans la bactérie [326]. L'expression du gène *narK2* est induite via DosR mais il est également pensé que ce transporteur pourrait directement percevoir l'environnement bactérien et potentialiser l'entrée des nitrates en conditions non oxydantes [328]. Bien que prédit pour être un transporteur de nitrates et de nitrites, l'étude d'un mutant de *M. tuberculosis* dans le gène *narK2* a permis de montrer que ce transporteur sert uniquement à l'import des nitrates chez le bacille [329].

Les nitrites formés après réduction des nitrates sont sécrétés par la bactérie probablement par l'intermédiaire des transporteurs NarK1 et NarU prédits pour assurer leur export [27]. La nitrite réductase NirBD de *M. tuberculosis* semble également jouer un rôle important dans la résistance à l'hypoxie. Il est proposé qu'elle participe, en association avec NarK1 et NarU, à la diminution de la concentration en nitrites à l'intérieur de la bactérie en permettant leur conversion en ammonium. En effet, les nitrites à concentration trop élevée peuvent être toxique pour les bactéries [330].

De façon intéressante, cette augmentation de l'activité nitrate réductase en hypoxie n'est pas observée chez *M. bovis* et BCG en raison de la présence d'une mutation au niveau du promoteur du gène *narK2* [331, 332]. Cette observation a ainsi permis de démontrer le rôle clé de ce transporteur

pour la respiration des nitrates chez les mycobactéries. Malgré cela, le rôle de NarK2 dans la virulence de *M. tuberculosis* n'a encore jamais été établi.

En revanche, le rôle de la nitrate réductase NarGHJI dans cycle infectieux du bacille a fait l'objet d'études dont les conclusions sont encore soumises à débat. En effet, il a été montré que la mutation du gène *narG* chez BCG induit une atténuation de la virulence de la souche vaccinale chez des souris immunodéficientes SCID (Severe combined immunodeficiency) ainsi qu'une diminution de sa persistance chez la souris immunocompétente [333, 334]. Cependant, cette bactérie a une activité nitrate réductase dérégulée qui, associée à son caractère atténué, rend difficile de conclure quant au rôle effectif de la respiration des nitrates sur la virulence mycobactérienne.

Une autre étude, réalisée cette fois avec le bacille tuberculeux, a révélé que la mutation du gène *narG* n'affectait pas la virulence du bacille chez la souris [104]. Une nouvelle fois, les souris ne possèdent pas de granulomes structurés et ne soumettent pas la bactérie à un environnement hypoxique. L'étude de mutants pour les gènes *narK2* et *narG* chez des animaux plus pertinents tels que le cochon d'Inde, le lapin ou les primates, s'avère cruciale pour déterminer de façon certaine le rôle de la respiration des nitrates dans le cycle infectieux *M. tuberculosis* [296, 327].

Il est important de noter que le bacille possède des voies alternatives pour assurer le fonctionnement de sa chaîne respiratoire. Par exemple, il a été montré que *M. tuberculosis* est capable de respirer le fumarate en l'absence d' O_2 et de NO_3^- [335, 336]. Ce mécanisme est assuré par des enzymes ayant une activité fumarate réductase permettant le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire vers le fumarate pour former du succinate conséquemment sécrété. Plusieurs enzymes semblent posséder une activité fumarate réductase chez le bacille tuberculeux, comme notamment ceux codés par les locus *frdABCD* ou *sdhCDAB*, mais aucun d'entre eux n'a été mis en évidence pour être majoritairement impliqué dans cette activité enzymatique [335]. Cependant, cette respiration alternative semble être secondaire par rapport à celle des nitrates car en condition d'hypoxie la présence de nitrates suffit à abroger la respiration du fumarate chez la bactérie [336].

3. Le stress nutritionnel

L'identification et la quantification des nutriments présents dans la lumière du phagosome de *M. tuberculosis* n'est pas une tâche aisée mais de nombreuses études attestent que le phagosome est vraisemblablement un environnement pauvre en nutriments [224, 337]. En effet, additionné à la privation en O_2 et en fer, il semblerait que le bacille est un accès limité en nutriments majeurs tel que les acides aminés, les vitamines ou les nucléotides au sein du phagosome. Ceci a été déterminé de

façon indirecte grâce l'utilisation de mutants rendus auxotrophes, c'est-à-dire incapables de synthétiser une molécule donnée. Ainsi, la mutation de gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés tels que la proline, la lysine, le tryptophane, l'arginine, l'histidine, la glutamine ou les acides aminés branchés leucine, isoleucine et valine induit une atténuation sévère de la virulence du bacille chez l'animal [338-344]. De plus, des mutants incapables de synthétiser la vitamine B5 ou les purines sont également sévèrement affectés pour leur croissance *in vivo* [345, 346]. Ces études suggèrent donc que le bacille n'a pas accès à ces nutriments chez l'animal ou du moins pas en quantité suffisante pour permettre sa croissance et/ou la résistance aux mécanismes microbicides de l'hôte. Il a également été montré que des transporteurs nommés PstS1 et PstS2, assurant tous deux l'import de phosphate, sont nécessaires à la multiplication du bacille chez la souris. Ces transporteurs étant requis pour la croissance bactérienne uniquement lorsque les phosphates sont en faible concentration, leur implication dans la virulence du bacille suggère que ces ions sont peu disponibles à la bactérie au cours de l'infection [347].

Suite à une privation en nutriments, les bactéries déclenchent la « réponse stringente », un processus permettant de limiter leur croissance et d'assurer leur survie. Cette réponse peut être déclenchée par différents stimuli comme l'accumulation d'ARNs de transfert non chargés en acides aminés témoignant d'une diminution de la synthèse protéique induite par la raréfaction des nutriments disponibles [348]. Chez les bactéries, cette réponse est initiée par deux protéines nommées RelA et SpoT. Ces protéines ont une activité 3'-pyrophosphoryltransferase permettant l'addition de pyrophosphates provenant de l'ATP sur les nucléotides GTP et GDP pour former du GTP hyperphosphorylé pouvant comporter 4 ou 5 résidus phosphates (p)ppGpp. Ce messager secondaire est responsable de l'arrêt de croissance des bactéries et agirait à des multiples niveaux du métabolisme bactérien dont le mieux établi est celui d'inhibiteur de la transcription via son interaction avec les ARN polymérases [348].

Le bacille tuberculeux possède un homologue de RelA, appelé RelA_{mtb} qui assure la mise en place de la réponse stringente [349]. Il a pu être montré que RelA_{mtb} est requis pour la survie du bacille en milieu dépourvu de source de carbone et pour sa répllication *in vivo* chez le cochon d'Inde [350, 351]. Ces études suggèrent donc que le bacille est confronté à un environnement nutritionnel défavorable *in vivo*. De façon intéressante, RelA_{mtb} n'est pas requis pour la multiplication du bacille dans des macrophages humain non activés suggérant que la bactérie n'a pas à faire face à une restriction en nutriments dans ces conditions [351]. Ceci pourrait être expliqué par les conditions riches en nutriments dans lesquelles les infections de macrophages sont réalisées pouvant permettre, de façon

artificielle, l'accès au bacille à des nutriments de qualité et de quantité supérieures à celles rencontrées en conditions physiologiques. Egalement, la pression du système immunitaire pourrait jouer un rôle important dans la disponibilité des nutriments à la bactérie comme par exemple via la formation du granulome, un processus absent lors de l'infection de cellules cultivées *in vitro*.

Pour finir, un facteur de transcription nommé CarD jouerait également un rôle important dans la réponse du bacille à de multiples stress dont la privation en nutriments, et est requis pour la persistance de la bactérie chez l'animal [352, 353]. Son rôle exact reste à déterminer mais il permettrait d'induire la transcription de gènes spécifiques en réponse au stress via sa fixation à l'ARN polymérase [354].

Le bacille tuberculeux semble donc confronté à un stress nutritionnel lors de l'infection, et est capable d'adapter son métabolisme à cette carence en nutriments. L'adaptation du bacille à l'environnement intracellulaire est permise par des mécanismes appropriés mis en place par la bactérie pour lui permettre d'exploiter les nutriments présents chez son hôte. D'ailleurs, *M. tuberculosis* est une bactérie prototrophe possédant un métabolisme plastique lui permettant de croître en milieu minimum car possédant les gènes pour la synthèse de l'ensemble des molécules nécessaires à sa survie [27].

D. NUTRITION DE *M.TUBERCULOSIS* AU SEIN DE L'HOTE

Déterminer les mécanismes mis en jeu par *M. tuberculosis* pour acquérir et assimiler les nutriments au sein de son hôte humain est d'un enjeu majeur. En effet, la nutrition du bacille est un processus indispensable à sa croissance au sein des tissus et à sa résistance aux mécanismes microbicides de l'hôte. La disponibilité et les besoins en nutriments du bacille peuvent varier selon que la bactérie est en phase active de croissance à l'intérieur des macrophages, à l'état extracellulaire à l'intérieur de granulomes caséux ou en phase de dormance, une étape probablement moins dépendante de la consommation de nutriments. A l'inverse, la disponibilité en nutriments pourrait modifier drastiquement le métabolisme du bacille et ainsi influencer sur le déroulement du cycle infectieux. De ce fait, la nutrition et la pathogénie de la bactérie apparaissent donc intimement dépendante l'une de l'autre. Une meilleure compréhension du métabolisme intracellulaire de *M. tuberculosis* permettrait l'identification des voies métaboliques nécessaires à sa survie pouvant faire l'objet d'une inhibition et aider à l'élaboration de nouveaux antituberculeux.

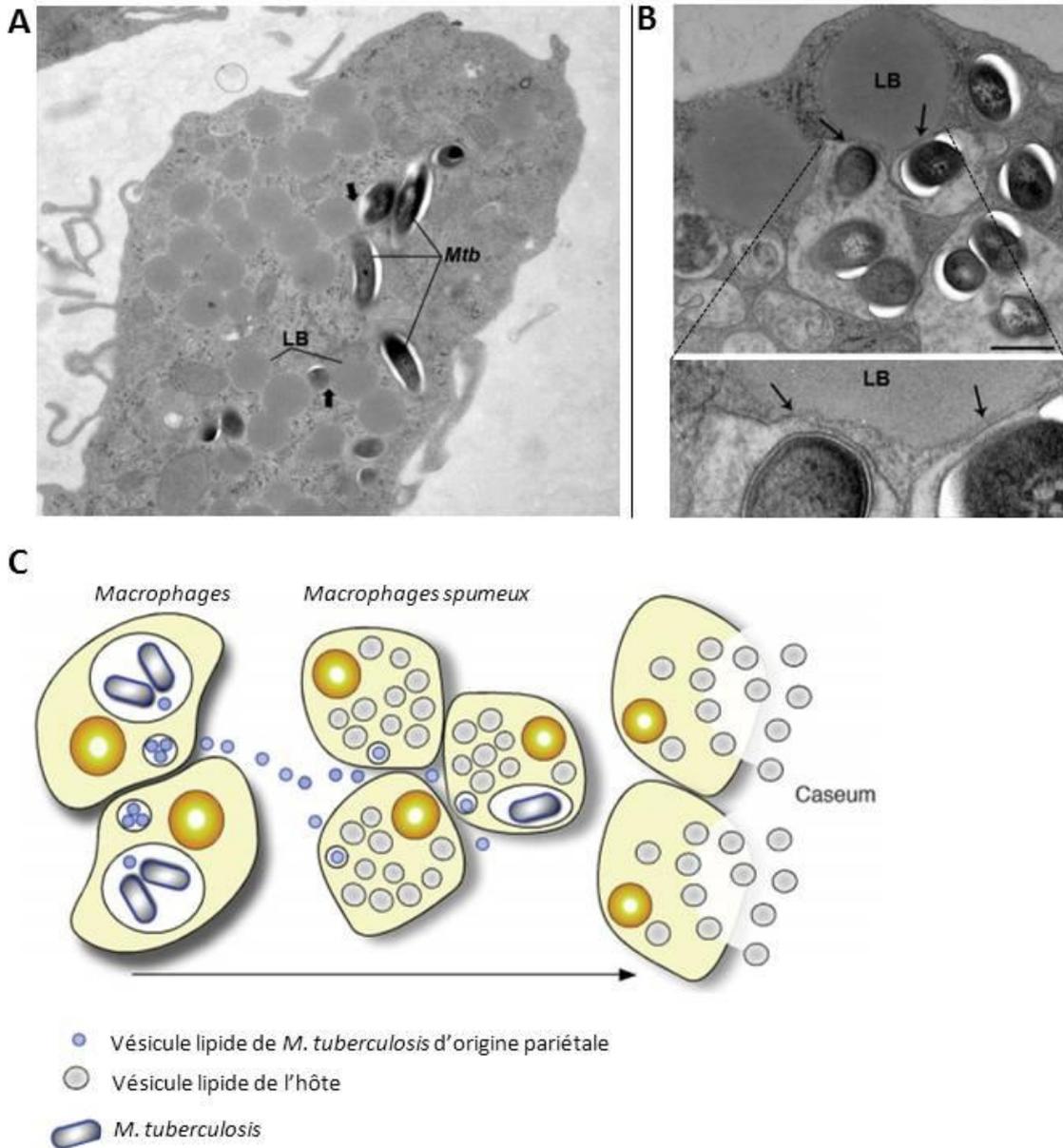


Figure 5: Formation des macrophages spumeux par *M. tuberculosis*. Au cours de l'infection, *M. tuberculosis* (*Mtb*) induit la différenciation des macrophages infectés et environnant en macrophages spumeux. Par microscopie électronique, (**A**) on distingue un nombre important de vésicules lipidiques (LB=Lipid Bodies) dans le cytoplasme des macrophages spumeux infectés. Ces LB peuvent être en contact étroit avec les phagosomes de *Mtb* et ainsi donner accès à la bactérie aux lipides présents dans ces vésicules (**B**) (→ Contact phagosome/LB). (**C**) Schématisation du modèle de Russell selon lequel des vésicules lipidiques de *M. tuberculosis* d'origine pariétale peuvent être sécrétées par la bactérie et délivrées dans l'environnement extracellulaire par les macrophages via exocytose. Ces vésicules pouvant contenir du TDM, sont capables d'induire la différenciation des macrophages environnant en macrophages spumeux. Eventuellement, la surcharge en lipides induit la nécrose des macrophages spumeux qui délivrent alors leur contenu lipidique dans la lumière du granulome. D'après Peyron *et al*, 2008 et Kim *et al*, 2010.

I. Sources de carbone et d'énergie

Le séquençage du génome de *M. tuberculosis* a révélé que le bacille possède un nombre remarquablement élevé de 250 gènes intervenant dans le métabolisme des lipides en comparaison à la bactérie modèle *Escherichia coli* qui n'en possède qu'une cinquantaine [27]. Au vu de la richesse et de la diversité des lipides présents au niveau l'enveloppe du bacille, il n'apparaît pas surprenant que la bactérie possède un nombre conséquent de gènes pour assurer leur synthèse. Cependant, certains de ces gènes semble être dédiés à une activité lipolytique laissant présager une adaptation du bacille à l'utilisation des lipides présent chez l'hôte [27].

1. Environnement nutritionnel : La formation des macrophages spumeux

Il a pu être montré que, suite à une infection par *M. tuberculosis*, les granulomes murins et humains contiennent en leur centre une proportion élevée de lipides tel que le cholestérol (CHO), les esters de cholestérol (CE) ou les triglycérides (TG) [355]. Cette observation est d'ailleurs corrélée avec l'abondance de protéines de l'hôte impliquées dans le métabolisme des lipides telles que ACSL1 (Acyl-CoA synthetase long chain fatty acid family member 1) permettant la synthèse *de novo* d'ester d'acides gras et l'adipophiline qui permet la séquestration des TAG et des EC à l'intérieur de vésicules lipidiques [355]. Cette quantité élevée de lipides au sein des granulomes est due à la présence des cellules ayant un contenu riche en lipides appelées macrophages spumeux (**Figure 5A et B**) [94, 356].

La transformation des macrophages en macrophages spumeux est un processus pouvant être induit en partie par l'environnement hypoxique [357]. Cependant, ce processus de différenciation apparaît clairement potentialisé par le pathogène lui-même lors de l'infection. En effet, *M. tuberculosis* est capable de déréguler le métabolisme lipidique des macrophages infectés, ainsi que de ceux environnant, pour leur imposer une surproduction en lipides. Plusieurs facteurs bactériens ont été mis en causes pour être, de façon isolé, capable d'induire cette différenciation nommément le TDM, les acides mycoliques oxygénés et la protéine ESAT-6 [94, 356, 358].

De façon intéressante, il a été montré que les lipides d'origine pariétale de *M. tuberculosis*, contenant du TDM, sont capables de s'assembler pour former des vésicules lipidiques pouvant être sécrétées des macrophages par exocytose [359, 360]. Ces vésicules pourraient ainsi permettre la différenciation des macrophages environnant en macrophages spumeux (**Figure 5C**). ESAT-6 permet quant à lui d'augmenter l'activation du récepteur GPR109A présent à la surface des macrophages induisant ainsi un signal antilipolytique protégeant les vésicules lipidiques formées contre l'action des

lipases [356]. Ultimentement, la surcharge des macrophages en vésicules lipidiques peut éventuellement induire leur mort par nécrose et ainsi provoquer l'accumulation des lipides dans la lumière des granulomes (**Figure 5C**) [94].

Certains phagosomes de *M. tuberculosis* sont retrouvés à proximité des vésicules lipidiques et peuvent même fusionner avec elles (**Figure 5B**) [358]. Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle ces vésicules pourraient servir de réservoir nutritif riche en source de carbone et d'énergie utilisables par la bactérie. Egalement, il a été montré que cet environnement riche en lipide, présent à l'intérieur des macrophages spumeux ainsi que des adipocytes, constitue le site de résidence privilégié pour la dormance du bacille [70, 358].

M. tuberculosis possèdent donc une capacité extraordinaire à modifier son environnement pour augmenter la quantité et faciliter son accès aux nutriments de l'hôte, notamment ici, les lipides.

2. Sources de carbone et d'énergie utilisés

a) Le cholestérol

Il a pu être démontré que le bacille tuberculeux est capable de croître *in vitro* en utilisant du CHO comme unique source de carbone et d'énergie [361]. Cette utilisation est permise, en partie, par le transporteur Mce4 permettant au bacille d'importer ce lipide. Un mutant dans le gène *mce4* est atténué pour sa capacité de multiplication à l'intérieur de macrophages activés et pour sa persistance chez la souris [362]. Ces résultats suggèrent que le CHO est une source de carbone et d'énergie utilisée par le bacille durant son cycle infectieux notamment dans les phases tardive de l'infection. De façon intéressante, le transporteur Mce4 n'est pas requis par le bacille pour sa multiplication dans le macrophage au repos. Cette observation établit un lien direct entre les mécanismes de nutrition de la bactérie et le statut immunitaire de l'hôte. Ainsi, le CHO pourrait être un nutriment majoritairement utilisé par le bacille pour résister aux stress induit par l'activation des macrophages. L'activation des macrophages pourrait également permettre la mise en place de mécanismes de restriction en nutriments, ici du CHO, rendant la mutation dans *mce4* plus délétère pour la bactérie. Enfin, d'autres transporteurs de CHO pourraient suffire à l'import de ce lipide dans l'environnement moins stressant du macrophage au repos alors que Mce4 serait requis uniquement chez le macrophage activé car exprimé majoritairement dans ces conditions par la bactérie. De façon intéressante, il a été montré que les enzymes PrpC et PrpD sont nécessaires au bacille pour

l'utilisation du CHO *in vitro* et également requis pour sa multiplication à l'intérieur de macrophages au repos. Cette étude atteste donc que le CHO est un nutriment utilisé par la bactérie indépendamment du statut d'activation des macrophages et qu'il semble être acquis à l'intérieur des macrophages au repos par un mécanisme Mce4-indépendant [363].

Un crible par mutation aléatoire a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans l'utilisation du CHO comme unique source de carbone et d'énergie chez la bactérie lors de sa croissance *in vitro* [364]. Certains mutant pour ces gènes ont d'ailleurs une virulence atténuée, attestant du rôle important du CHO dans la nutrition du bacille tuberculeux [365, 366]. De façon intéressante, une étude est en contradiction avec celles citées précédemment. En effet, il a été montré qu'un mutant pour le gène *hsd*, codant une hydroxy-stéroïde déshydrogénase essentielle à l'utilisation du CHO par la bactérie, n'est pas requis pour sa multiplication à l'intérieur des macrophages et chez le cochon d'Inde [367]. Cette observation peut être expliquée en partie par le fait que la mutation de certaines enzymes indispensables à l'assimilation du CHO peut provoquer une atténuation de la virulence du mutant *in vivo* résultant, non pas d'un défaut d'assimilation du lipide, mais de l'accumulation d'intermédiaires toxiques de son catabolisme [368]. Ces mécanismes d'intoxication induits par la mutation d'enzymes du catabolisme du CHO ont pu conduire à une surestimation du rôle de l'utilisation du CHO par la bactérie chez l'animal. De plus, il a été montré que le bacille tuberculeux est capable d'utiliser d'autres nutriments carbonés que le CHO pour assurer sa croissance au cours du cycle infectieux.

b) Les triglycérides

L'utilisation des TG semble jouer un rôle clé dans le cycle infectieux car elle est impliquée à la fois dans la nutrition et l'entrée en dormance du bacille. Grâce à l'utilisation de TG contenant des dérivés d'acides gras fluorescents, il a pu être montré que les TG contenus dans les vésicules lipidiques des macrophages spumeux étaient incorporés à l'intérieur des bactéries. Cette utilisation des TG de l'hôte par la bactérie requiert un enzyme de synthèse des TG bactériens nommé Tgs1 (triglycéride synthase 1) indiquant que le bacille est capable d'extraire les acides gras des TG de l'hôte pour la synthèse de ses propres TG [357].

Chez les bactéries, la synthèse des TG est réalisée via l'interaction des TGS au niveau des membranes plasmiques permettant la formation de vésicules lipidiques à l'intérieur des cytoplasmes bactériens [369]. L'accumulation de vésicules riches en TG chez le bacille tuberculeux a d'ailleurs pu être observé au sein de bactéries présentes à l'intérieur de macrophages spumeux cultivés *in vitro* mais

également chez des bactéries issues d'expectorations de patients atteints de tuberculose active [357, 370, 371]. Ce mécanisme de dégradation et de stockage des TG de l'hôte pourrait donc jouer un rôle important dans la nutrition du bacille chez l'homme.

Bien que *M. tuberculosis* possède 15 gènes prédit pour posséder une activité TGS, Tgs1 est l'enzyme majoritairement responsable de la synthèse des TG [372]. Cette synthèse peut être induite chez la bactérie cultivée *in vitro* et soumise à différents stress mimant des conditions *in vivo* telles que la privation en fer, l'acidité, l'hypoxie et la présence de NO [372-375]. Le gène *tgs1* fait d'ailleurs partie du régulon DosR permettant l'augmentation de son expression par un facteur de 25 en condition d'hypoxie [308, 376]. La synthèse des TG semble donc être un mécanisme global de résistance aux stress chez *M. tuberculosis*, qui lui permettrait notamment de provoquer l'arrêt de sa croissance en redirigeant le flux de molécules carbonés approvisionnant le cycle de Krebs vers la synthèse lipidique [373, 374].

De façon intéressante, parmi les 24 lipases présentes chez le bacille tuberculeux, seule une d'entre elles, nommée LipY, possède une activité hydrolase sur les TG. Il a d'ailleurs pu être montré que cette lipase était impliquée dans l'utilisation de TG par le bacille en condition d'hypoxie et de privation en nutriments [377].

Les TG semblent donc être des nutriments majeurs dans le cycle infectieux de *M. tuberculosis* car pouvant être captés au sein des cellules hôtes, stockés et utilisés lors d'une privation en nutriments. Curieusement, bien que des mutants de *M. tuberculosis* dans les gènes *tgs1* et *lipY* aient été générés, leur capacité de croissance à l'intérieur de macrophages cultivés *in vitro* ou chez l'animal n'a jamais été évaluée. Le rôle de l'utilisation des TG par le bacille dans la physiopathologie de la tuberculose reste donc à déterminer.

c) Les carbohydrates

L'analyse du génome de *M. tuberculosis* a révélé que le bacille possède un nombre restreint de gènes prédits pour coder des transporteurs de carbohydrates [27]. Une étude comparative a pu montrer que le bacille tuberculeux possède seulement 4 systèmes prédits pour l'import des sucres en comparaison à la mycobactérie saprophyte *M. smegmatis* qui en possède 28. Le transporteur LpqY-SugABC, prédit pour permettre l'import de disaccharides, constitue l'un des plus conservés entre ces deux espèces [378]. La mutation de ce transporteur chez le bacille tuberculeux induit une atténuation de la bactérie chez le macrophage ainsi que dans les phases précoces de l'infection chez la souris [379, 380]. Cette observation a conduit à l'hypothèse selon laquelle la bactérie utiliserait les

sucres comme source de carbone et d'énergie durant les phases précoces de l'infection. Cependant, une étude a permis de caractériser ce transporteur comme étant l'unique importeur de tréhalose présent chez la bactérie et comme servant au recyclage de ce sucre au niveau de la paroi bactérienne [381]. Le tréhalose n'étant pas un sucre présent chez l'hôte, cette étude a diminuée l'engouement porté à l'utilisation des sucres par la bactérie durant l'infection. Malgré cela, bien que ce transporteur ne semble pas impliqué dans l'import de maltose et de glucose, son rôle dans l'import de carbohydrates autres et présents chez l'hôte n'est pas exclu.

De façon intéressante, une délétion du gène *pckA*, codant pour la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), inhibe la croissance du bacille en présence de lipides comme unique source de carbone et d'énergie et a un effet drastique sur la virulence du pathogène rendant la bactérie incapable de survivre aux seins des tissus chez la souris [382]. PEPCK permet la néoglucogenèse, une voie réverse à la glycolyse assurant la synthèse des sucres bactériens via l'utilisation d'intermédiaires du cycle de Krebs. La nécessité de cette voie métabolique chez la bactérie durant l'infection souligne une nouvelle fois l'importance du rôle des lipides pour sa croissance *in vivo* chez l'animal et suggère fortement que les sucres sont peu disponibles à la bactérie car massivement néosynthétisés [382].

Cependant, une étude récente a montré qu'un mutant double pour les gènes *ppgK* et *glkA*, codant les deux seules glucose kinases identifiées dans le génome de la bactérie, était atténué dans sa persistance chez la souris. Ces deux enzymes sont indispensables à l'utilisation du glucose, via la glycolyse, en tant que source de carbone et d'énergie. Ainsi, bien que le métabolisme du bacille chez l'animal semble majoritairement permis par l'utilisation des lipides, les sucres pourraient donc également jouer un rôle non négligeable durant l'infection [383].

3. Le métabolisme central du carbone durant l'infection

L'analyse du profil d'expression des gènes bactériens durant l'infection a permis l'étude du métabolisme intracellulaire de *M. tuberculosis* [384, 385]. Ces études ont révélé qu'un changement drastique du métabolisme global du bacille s'opérait durant l'infection pour son adaptation aux différents stress rencontrés ainsi que l'utilisation des nutriments à sa disposition [131, 384, 386, 387]. Un gène nommé *icl1* codant pour l'isocitrate lyase 1 (Icl1) est l'un des gènes les plus induit par la bactérie à l'intérieur des macrophages [385]. Cet enzyme permet de réaliser le « court-circuit glyoxylique » permettant, au niveau du cycle de Krebs, la formation d'oxaloacétate sans perte de carbone sous forme de CO₂ (**Figure 6**). Le cycle de Krebs est un cycle énergétique permettant la

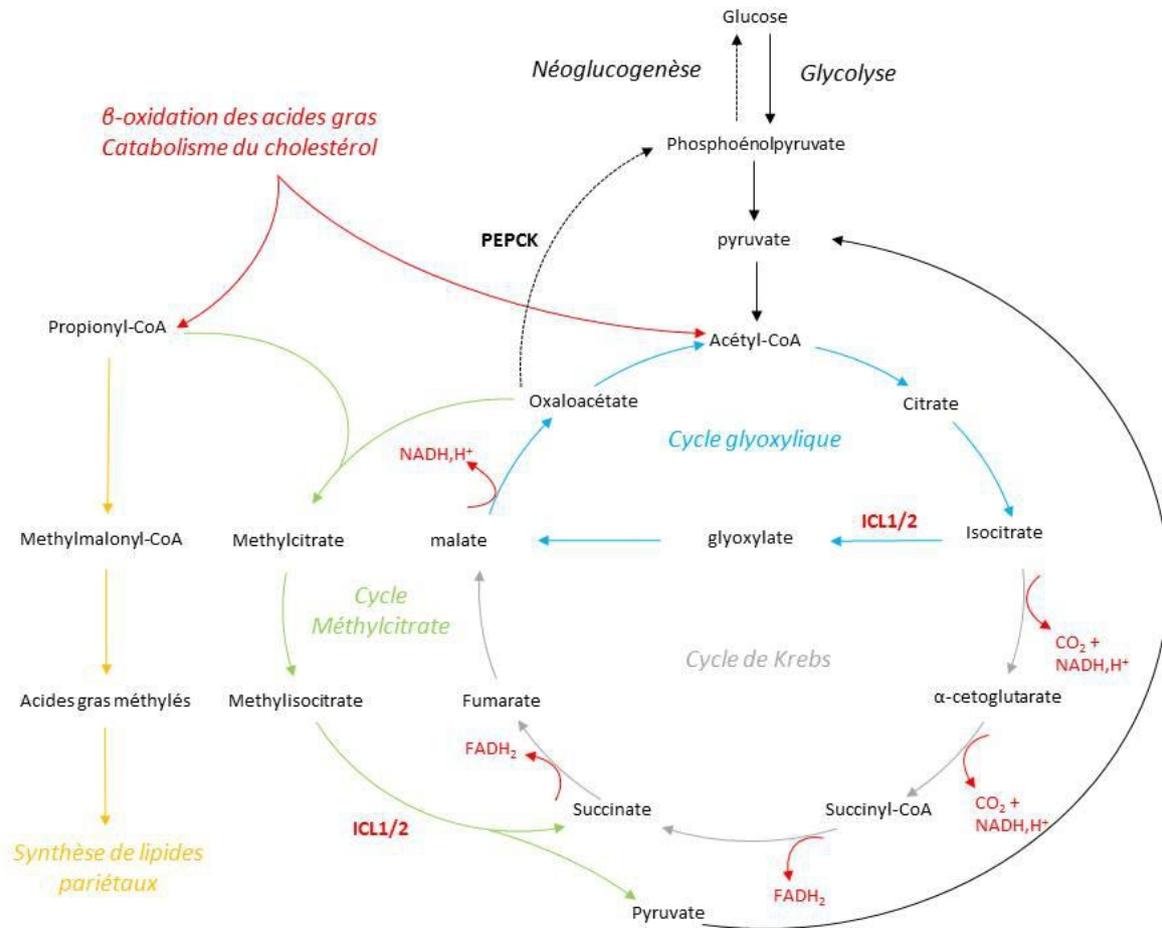


Figure 6: Métabolisme central du carbone de *M. tuberculosis*. La β -oxydation des acides gras et le catabolisme du cholestérol permettent la génération d'acétyl-CoA et de propionyl-CoA. L'acétyl CoA, pouvant être également issu de la glycolyse, entre alors dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est un cycle permettant de produire de l'énergie via la réduction de coenzymes réduits (NADH, H^+ et FADH_2) assurant le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la production d'ATP. Les enzymes isocitrate lyase ICL1 et ICL2 permettent le « court-circuit glyoxylique » assurant la synthèse d'oxaloacétate sans la perte de deux atomes de carbone sous forme de CO_2 et l'accumulation de coenzymes réduits pouvant être plus difficilement régénérés en conditions d'hypoxie. Ce cycle glyoxylique dérive alors le cycle de Krebs et permet de réaliser de l'anabolisme à partir de l'acétyl-CoA. L'oxaloacétate formé pourra participer par exemple à la synthèse des sucres via l'action de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et son entrée dans la néoglucogenèse. Afin d'être assimilé, le propionyl-CoA, quant à lui, doit entrer dans le cycle des méthylcitrates via l'action de ICL1/2 permettant sa transformation en pyruvate et succinate assimilables. En parallèle, le propionyl-CoA peut aussi être intégré dans les lipides pariétaux via sa transformation en méthylmalonyl-CoA puis en acide gras méthylé.

production de coenzymes réduits fournissant des électrons à la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP. Ce court-circuit métabolique, en évitant la perte de carbone, permet ainsi de détourner le cycle de Krebs et de l'employer à des fins anaboliques [388]. De plus, cette voie métabolique permet également de diminuer la formation de coenzymes réduits NADH, H⁺ et FADH₂ plus difficiles à régénérer en conditions d'hypoxie [336, 386].

Il a été montré que *Icl1* était requis pour la persistance du bacille chez la souris et sa survie à l'intérieur de macrophages activés de façon similaire au transporteur de cholestérol *Mce4* [362, 389]. Un autre gène appelé *icl2* codant pour l'isocitrate lyase 2 (*Icl2*) compense en partie l'absence d'activité isocitrate lyase chez le mutant *icl1*. En effet, un mutant de *M. tuberculosis* délété pour les gènes *icl1* et *icl2* a un profil d'atténuation sévère et ne survit pas chez l'animal ainsi qu'à l'intérieur de macrophages au repos [390]. De plus, ce double mutant *icl1/2* est incapable de croître *in vitro* en présence de lipides comme unique source de carbone et d'énergie attestant que le cycle glyoxylique est indispensable à l'assimilation des composés issus du catabolisme des lipides notamment le propionyl-CoA et l'acétyl-CoA.

La dégradation des acides gras via la β -oxydation permet de générer de l'acétyl-CoA qui va pouvoir entrer dans les cycles glyoxyliques et de de Krebs et servir ainsi de source de carbone et d'énergie. En revanche, le catabolisme du cholestérol ainsi que celui des acides gras à nombre impair de carbone, génèrent du propionyl-CoA ne pouvant pas entrer dans ces cycles. *Icl1/2*, en plus d'assurer le cycle glyoxylique, permettent également l'assimilation du propionyl-CoA via le cycle des méthylcitrates (**Figure 6**). Cette voie métabolique permet l'assimilation de propionyl-CoA via sa condensation avec l'oxaloacétate aboutissant à la formation de succinate et de pyruvate pouvant entrer dans les cycles glyoxylique et de Krebs [391, 392].

De plus, une voie indépendante de *Icl1/2*, permet l'incorporation du propionyl-CoA dans les lipides pariétaux via la formation d'acide gras méthylés. De façon intéressante, la croissance du bacille sur propionate permet, par l'intermédiaire de cette voie, d'augmenter l'abondance de lipides pariétaux impliqués dans la virulence bactérienne tels que les SL et les DIMs [393]. Cette observation reflète une nouvelle fois le lien étroit qu'il existe entre le métabolisme du bacille et ses mécanismes de virulence.

L'étude des mécanismes d'acquisition et d'assimilation des sources de carbone et d'énergie de *M. tuberculosis* révèle donc que le bacille utilise préférentiellement les lipides de l'hôte pour survivre et se multiplier durant son cycle infectieux. Ces études ont ainsi permis d'identifier des cibles

thérapeutiques, telles que Icl1 et Icl2 ainsi que des enzymes du catabolisme du cholestérol, pour l'élaboration de nouveaux antituberculeux [394, 395].

II. Sources d'azote

L'azote, tout comme le carbone, est un élément essentiel à la vie entrant dans la constitution de molécules biologiques majeures telles que les acides aminés constituant les protéines, les bases azotées à l'origine de la synthèse des acides nucléiques (ADN et d'ARN) et certains coenzymes. Les études du métabolisme intracellulaire de *M. tuberculosis* se sont initialement focalisées sur le métabolisme central du carbone et de l'énergie. De façon surprenante, aucun nutriment azoté n'a été identifié pour assurer la survie et la croissance du bacille durant son cycle infectieux. Par conséquent, les voies métaboliques d'assimilation de l'azote chez la bactérie durant l'infection sont également inconnues.

1. Régulation du métabolisme central de l'azote

Des études ont eu pour but de comprendre la régulation du métabolisme central de l'azote chez le bacille tuberculeux [396-398]. Ce métabolisme central permet aux bactéries de réguler leurs besoins en azote selon sa disponibilité dans l'environnement en agissant sur les activités de transport, de synthèse et de stockage des molécules azotées.

L'ammoniaque NH_3 , où sa forme protonnée à pH physiologique, l'ammonium NH_4^+ ($\text{pKa} = 9,3$), constitue l'unité de base du métabolisme de l'azote. En effet, l'ammonium est la forme assimilable de l'azote incorporée via la synthèse des acides aminés glutamate et glutamine. Ces deux acides aminés constituent les acteurs majeurs du métabolisme azoté car ils sont les principaux donneurs d'azote servant aux réactions de synthèse des bases azotées et des acides aminés [399]. De plus, la glutamine est également considérée comme une forme de stockage de l'azote car permettant l'assimilation de deux atomes d'azote.

Chez les bactéries, l'incorporation de l'ammonium pour la formation de glutamate et de glutamine fait intervenir les enzymes glutamate déshydrogénase (GDH) et glutamine synthase (GlnA), respectivement. Curieusement, *M. tuberculosis* ne présente pas d'activité glutamate déshydrogénase. La synthèse de glutamate est assurée uniquement via la glutamate synthase (GltB/D) à partir de la glutamine [399, 400].

Le bacille tuberculeux possède 4 glutamine synthases GlnA1-4 mais GlnA1 est la seule démontrant une activité de synthèse de glutamine [401, 402]. En effet, un mutant *glnA1* est auxotrophe pour cet acide aminé et présente de ce fait une atténuation sévère chez le cochon d'Inde [343]. GlnA1 constitue d'ailleurs une cible thérapeutique pour l'élaboration de nouveaux antituberculeux [403]. Cet enzyme a la particularité d'être produit massivement par la bactérie et est sécrété probablement de façon non spécifique [404]. Le rôle de la sécrétion massive de GlnA1 dans la physiologie du bacille reste à déterminer mais une étude réalisée chez *M. bovis* a pu montrer que la sécrétion de cet enzyme servirait à la synthèse de polymères de glutamine renforçant le rôle protecteur de la paroi mycobactérienne [405].

Compte-tenu du rôle central des glutamine synthases dans le métabolisme de l'azote chez les bactéries, leur activité est finement régulée à la fois au niveau post-traductionnel et transcriptionnel. Les protéines Amt, GlnD, GlnE et PII jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme central de l'azote chez les bactéries. Les protéines PII et GlnD ont la capacité de percevoir le « statut azoté » de la bactérie, notamment le ratio α -cétoglutarate/glutamine, et d'y répondre via une cascade de signalisation [399, 406]. En condition limitante en nutriments azotés, GlnD uridylyle la protéine PII qui à son tour active la protéine GlnE en l'adénylant. La protéine GlnE, alors activée, inhibe l'activité de la glutamine synthase GlnA en l'adénylant à son tour. Ce mécanisme permet ainsi de limiter la synthèse de glutamine pour ne pas dépleter la bactérie en glutamate. Chez certaines bactéries, comme *Corynebacterium glutamicum*, la protéine PII est également capable de se fixer au transporteur d'ammonium Amt permettant ainsi de limiter l'import d'ammonium à l'intérieur de la bactérie. En condition limitante en azote, l'uridylation de la protéine PII par GlnD permet donc à la fois d'inhiber la synthèse de glutamine via l'inhibition de GlnA mais également de promouvoir l'entrée d'ammonium via son détachement du transporteur Amt [399].

Chez *M. tuberculosis*, la régulation de GlnA1 par GlnE a pu être confirmée [407, 408]. Également, par similarité avec leurs homologues présents chez *C. glutamicum*, l'interaction entre la protéine PII et le transporteur Amt pourrait avoir lieu chez *M. tuberculosis* [399]. Cependant, bien que le rôle de GlnD dans l'uridylation de la protéine PII ait été démontré, ces deux protéines ne semblent pas réguler l'activité de GlnA1 [396, 397]. En effet, un mutant pour *glnD* conserve une activité glutamine synthase équivalente à celle de la souche sauvage. De façon intéressante, il a été observé que ce mutant, par contre, est affecté pour la sécrétion de GlnA1 [397]. Le mécanisme par lequel GlnD conduit à la sécrétion de GlnA1 reste à déterminer.

L'activité de GlnA1 semble donc être régulée par GlnE via un mécanisme GlnD/PII-indépendant. Des études supplémentaires sont requises pour avoir une meilleure appréciation des mécanismes post-traductionnels à la base de la régulation du métabolisme azoté chez *M. tuberculosis*. Récemment, une protéine nommée GarA a été caractérisée pour jouer un rôle important dans le contrôle du métabolisme azoté chez *M. tuberculosis* via la régulation de l'activité de la glutamate synthase [409].

Concernant la régulation transcriptionnelle du métabolisme azoté, *M. tuberculosis* possède un régulateur global nommé GlnR capable d'activer ou de réprimer l'expression de gènes en fonction de la quantité en azote disponible à la bactérie. Il a été montré que GlnR est capable de fixer les promoteurs des opérons *amt-Pil-glnD* et *nirBD* ainsi que des gènes *glnA1*, *ureA* et *glnR* lui-même. Ce régulateur transcriptionnel possède les caractéristiques d'un régulateur global du métabolisme azoté et pourrait avoir un rôle important durant le cycle infectieux de la bactérie [410-412]. De façon intéressante, le système à deux composants PrrAB, essentiel à la viabilité du bacille, pourrait jouer également un rôle dans la régulation du métabolisme azoté du bacille car induit en conditions limitantes en azote [413].

2. Sources potentielles d'azote durant le cycle infectieux

Certaines études ont permis de rechercher les molécules azotées impliquées dans la capacité de *M. tuberculosis* à croître durant son cycle infectieux. L'urée et les nitrates ont été les molécules principalement envisagées pour servir de source d'azote à la bactérie.

a) Les nitrates

L'assimilation des nitrates fait intervenir l'unique nitrate réductase du bacille NarGHJ. Cet enzyme permet la réduction des nitrates en nitrites qui sont pris en charge dans un second temps par la nitrite réductase NirBD assurant leur transformation en ammonium assimilable [411]. L'expression de l'opéron *nirBD* est induite par le régulateur GlnR ce qui laisse présager un lien existant entre l'utilisation des nitrates et le métabolisme azoté chez la bactérie [411].

Les nitrates sont les nutriments azotés dont l'utilisation chez le bacille a été la plus étudiée du fait de leur implication dans l'entrée en dormance du bacille (**Voir partie C.III.2b**) [327]. Cependant, bien que

de nombreuses études attestent du rôle important des nitrates dans la résistance au stress hypoxique, aucune d'entre elles n'a pu démontrer que la bactérie était capable de respirer et d'assimiler les nitrates de façon simultanée. En effet, la respiration des nitrates en hypoxie est caractérisée par un arrêt de croissance rendant difficile d'évaluer le rôle des nitrates en tant que source d'azote. Des études de métabolomique permettant le suivi de l'azote des nitrates pour évaluer leur incorporation dans les molécules azotées de la bactérie pourraient permettre de conclure sur ce rôle double potentiel que pourraient jouer les nitrates durant le cycle infectieux.

La production de NO par les macrophages permet, via son oxydation spontanée, la génération de nitrates et pourrait ainsi, en contradiction avec leur rôle microbicide premier, assurer un approvisionnement à la bactérie en source azotée. Il a d'ailleurs été proposé que les nitrates issus du NO pourraient servir de source d'azote pour la croissance de *M. tuberculosis* à l'intérieur de macrophages humains [414].

Cependant, chez des souris déficientes en iNOS, l'enzyme impliqué dans la synthèse de NO, le bacille ne présente pas de défaut de croissance mais au contraire une virulence accrue [180]. Egalement, l'utilisation des nitrates par la bactérie est dépendante de la nitrate réductase NarGHJ et la mutation de *narG* chez *M. tuberculosis* n'affecte pas la croissance du bacille chez la souris [104, 411]. Ces observations impliquent que les nitrates, bien que pouvant être en partie utilisés, ne semblent pas constituer une source majeure d'azote assurant la croissance du bacille durant son cycle infectieux.

b) L'urée

Il est également proposé que l'urée puisse servir de source d'azote à la bactérie durant son cycle infectieux [415]. La dégradation de l'urée via l'uréase UreABCDEFGH permet au bacille de limiter l'acidification de son phagosome via la sécrétion d'ammoniaque NH_3 pouvant complexer les protons pour former de l'ammonium NH_4^+ (**Voir partie C.III.1.b**). Chez certains pathogènes tels que *Helicobacter pylori*, le rôle double de l'uréase dans la résistance au pH acide et dans l'assimilation de l'azote de l'hôte a été proposé [416]. Il a pu être montré que *M. tuberculosis*, bien que ne possédant pas de transporteur prédit pour permettre l'import d'urée, était capable d'utiliser ce substrat comme unique source d'azote pour sa croissance *in vitro* [27, 415]. Cependant, un mutant de BCG dans le gène *ureA* ne possède pas de défaut de croissance à l'intérieur de macrophages cultivés *in vitro* [148]. Egalement, un mutant de *M. tuberculosis* pour ce même gène est incapable d'utiliser l'urée comme source d'azote et ne montre pas de défaut de croissance chez la souris [415]. Ces résultats

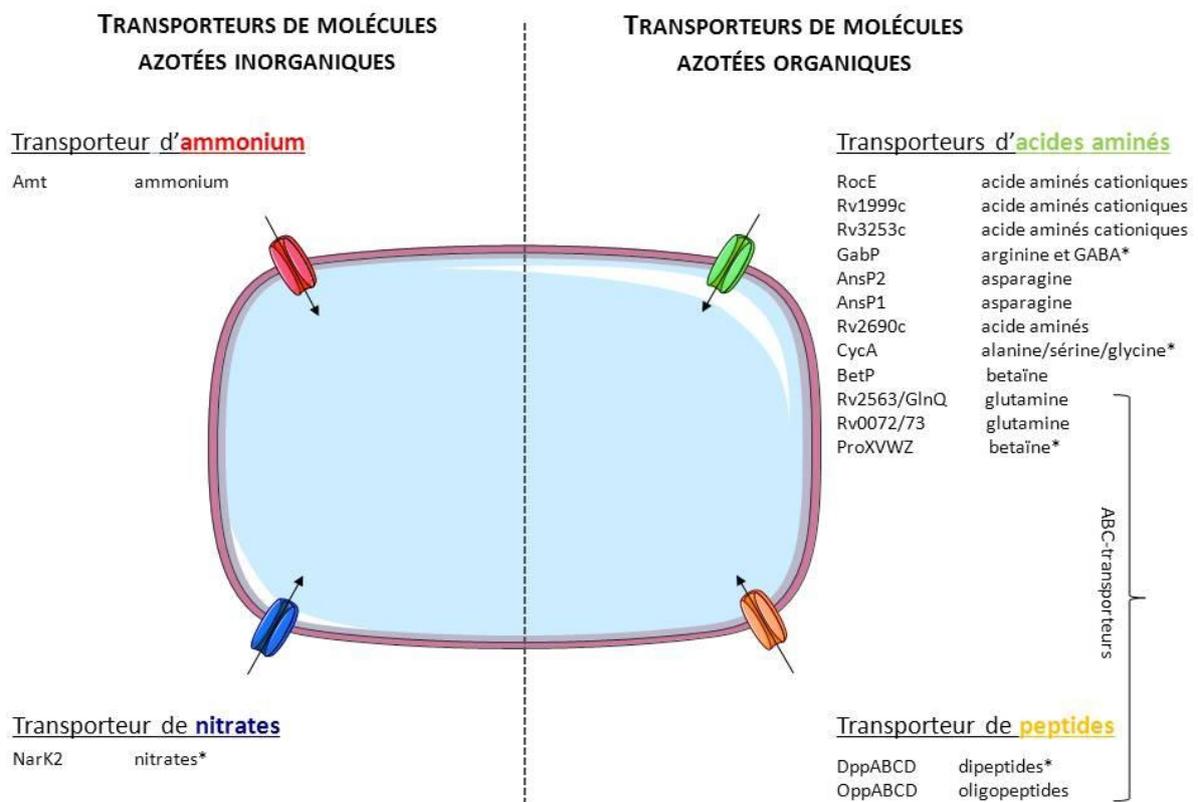


Figure 7: Transporteurs de molécules azotés présents chez *M. tuberculosis*. Suite au séquençage de son génome, il a pu être montré que *M. tuberculosis* possède des gènes ou opérons lui permettant l'expression de 16 transporteurs permettant l'import de molécules azotées. La majorité de ces gènes code pour des transporteurs de type perméase assurant le transport de leur substrat selon leur gradient de concentration. 5 d'entre eux, par contre, possèdent les caractéristiques génétiques de transporteur de type ABC (ATP binding cassette) permettant l'import de leur substrat contre leur gradient de concentration via l'hydrolyse de l'ATP. Parmi l'ensemble de ces transporteurs, 2 permettent l'import de molécules azotées inorganiques nommément Amt et NarK2 permettant l'import d'ammonium et de nitrates, respectivement. 14 d'entre eux sont prédits pour assurer l'import de molécules azotées organiques du type acides aminés et peptides. Il est important de noter que la majorité de ces gènes n'a qu'une fonction putative qui leur a été attribuée par homologie de séquence avec des gènes caractérisés d'autres bactéries. (* transporteur dont la fonction a été pleinement ou en partie confirmée). D'après Cole *et al*, 1998

impliquent donc que l'urée ne semble pas être une source majeure d'azote pour la croissance du bacille tuberculeux. Egalement, la neutralisation du pH acide du phagosome via la sécrétion d'ammonium dépendante de l'activité uréase apparaît dispensable pour la virulence des mycobactéries.

L'utilisation de l'urée et des nitrates en tant que source d'azote par le bacille tuberculeux semble donc limitée. Cependant, on ne peut pas exclure une utilisation mutuelle de ces substrats qui permettrait au mutant *ureA* de croître via l'utilisation des nitrates et au mutant *narG* via l'utilisation de l'urée. L'étude d'un double mutant *narG/ureA* chez *M. tuberculosis* pourrait permettre de conclure sur l'utilisation de ces molécules en tant que source azotée.

3. Systèmes d'acquisition des molécules azotées

Le séquençage du génome de *M. tuberculosis* a permis l'identification des gènes prédits pour l'expression de transporteurs permettant l'import de molécules azotées (**Figure 7**) [27]. Seize transporteurs sont dénombrés et parmi eux 11 sont prédits pour être des perméases assurant un transport actif secondaire, c'est-à-dire utilisant comme énergie le gradient de concentration des molécules transportées ou co-transportées. Cinq d'entre eux en revanche possèdent les caractéristiques génétiques de transporteurs ABC (ATP-binding-cassette) utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le transport des molécules contre leur gradient de concentration. Il s'agit des transporteurs Rv2563/GlnQ, Rv0072/Rv0073, ProXVWZ, DppABCD et OppABCD. Chacun de ces transporteurs ABC est codé en opéron permettant la co-transcription de protéines transmembranaires permettant le passage des molécules à travers la membrane plasmique et de protéines possédant un domaine NBD (*nucleotide binding domain*) de fixation et d'hydrolyse de l'ATP fournissant l'énergie nécessaire au transport [27, 417]. De façon intéressante, il est proposé que les deux transporteurs ABC Rv2563/GlnQ et Rv0072/Rv0073 puissent s'assembler de façon hétérodimérique compte tenu de leur similarité de séquence [418].

Parmi l'ensemble des 16 transporteurs, 2 d'entre eux sont prédits pour assurer l'import d'azote inorganique à la bactérie, nommément les transporteurs NarK2 et Amt, permettant l'import de nitrates et d'ammonium, respectivement. Les 14 autres transporteurs sont quant à eux prédits pour permettre l'import d'azote organique sous forme d'acides aminés et de peptides. Il est important de noter que la majorité de ces gènes n'a qu'une fonction putative qui leur a été attribuée par

homologie de séquence avec d'autres gènes de transporteurs bactériens. Parmi ces 16 transporteurs, seulement 6 ont fait l'objet d'études ayant permis en partie ou pleinement leur caractérisation.

Le plus étudié d'entre eux est Nark2 du fait de son implication dans l'import des nitrates durant le stress hypoxique. Ce transporteur a été caractérisé comme étant un membre de la superfamille des facilitateurs majeurs et fonctionnant en tant que symporteur H^+ /nitrates [419]. Le transporteur CycA, prédit pour permettre l'import d'alanine, de sérine et de glycine, a également été caractérisé pour être impliqué dans l'import de la D-cyclosérine, un antituberculeux de seconde ligne (**Voir Tableau 2**) [420]. La D-cyclosérine étant un analogue structurel de la sérine, il est très probable que CycA permette également l'import de cet acide aminé.

Le transporteur GabP a quant à lui été étudié chez BCG, et est impliqué dans l'import d'arginine et d'acide γ -aminobutyrique (GABA). Cependant, la mutation du gène *gabP* chez BCG n'induit pas de défaut de croissance de la bactérie à l'intérieur de macrophages murins au repos [419]. De façon intéressante, cette mutation permet même d'augmenter la croissance de BCG dans l'environnement intracellulaire en induisant un import plus important d'arginine dans les macrophages et en augmentant leur activité arginase. Le modèle proposé dans cette étude établit que la croissance du mutant est favorisée via l'utilisation de l'ornithine et de l'urée issues de la dégradation de l'arginine importée à l'intérieur des macrophages [420, 421]. Cette étude souligne à nouveau la grande plasticité du métabolisme bactérien et le lien étroit existant entre la nutrition bactérienne et le métabolisme de la cellule hôte. Il est très probable que le transporteur GabP de *M. tuberculosis* possède une fonction équivalente à celui de BCG avec lequel il partage 100% d'homologie.

Le transporteur ABC ProXVWZ a été identifié comme permettant l'import de bétaïne chez le bacille tuberculeux. Cette molécule correspond à de la glycine triméthylée et son import intervient dans la résistance au stress osmotique rencontré par les bactéries dans des environnements riches en solutés tel que l'environnement intracellulaire. La mutation des gènes codant ce transporteur inhibe modestement la multiplication de *M. tuberculosis* dans les phases précoce (48 heures) de l'infection à l'intérieur de macrophages humains [422]. Bien que la bétaïne ne soit pas envisagée comme une source d'azote, son import à l'intérieur des cellules hôtes souligne le rôle important de l'acquisition de molécules azotées par le bacille tuberculeux durant l'infection.

Pour finir, les transporteurs ABC de dipeptides et d'oligopeptides, respectivement DppABCD et OppABCD ont également été caractérisés. Une mutation dans le gène *oppD* rend BCG résistant à l'activité toxique du tripeptide glutathione. Cette étude montre donc que ce transporteur est nécessaire à l'import d'oligopeptides, ici de tripeptides, en accord avec les prédictions bioinformatiques [423]. Une autre étude, réalisée chez *M. tuberculosis*, est en contradiction avec celle précédemment mentionnée et a pu démontrer, que contrairement aux prédictions bioinformatiques, le transporteur OppABCD serait un importeur de dipeptides et que DppABCD constitue donc l'unique transporteur d'oligopeptides chez le bacille tuberculeux [424]. La spécificité exacte de ces transporteurs reste donc à confirmer. Alternativement, il a pu être montré que l'inactivation du transporteur DppABCD diminuait la quantité de lipides pariétaux impliqués dans la virulence, tels que les DIMs, à la surface de la bactérie. En effet, les auteurs soulignent dans cette étude le rôle joué par ce transporteur dans l'import potentiel de peptides signaux permettant l'expression de gènes de virulence bactérienne à l'intérieur des cellules hôtes. Le mutant *dppABCD* est d'ailleurs atténué pour sa persistance chez la souris. Cependant, cette atténuation est minime et n'affecte pas la phase de répllication de *M. tuberculosis* chez l'animal, phase où l'acquisition en nutriments azotés doit être la plus importante [424]. L'import des peptides par ce transporteur ne semblerait donc pas être impliqué de façon majeure dans la nutrition du bacille, au moins chez la souris. Alternativement, il a pu être montré, chez *M. tuberculosis*, que le transporteur OppABCD permettrait, via l'import potentiel de glutathione, d'induire l'apoptose des macrophages [425]. Cette observation est surprenante étant donné que l'apoptose est un processus de mort cellulaire généralement délétère aux pathogènes intracellulaires (**Voir partie C.II.4**). La compréhension du rôle exact joué par ce transporteur durant l'infection nécessite des études supplémentaires.

Le bacille tuberculeux possède donc 16 transporteurs de molécules azotés, et le peu d'entre eux ayant été caractérisés semblent pas impliqués dans l'import de nutriments azotés majeurs soutenant le métabolisme azoté de la bactérie. De façon intéressante, sur les 16 transporteurs de molécules azotées décrits, 12 d'entre eux sont prédits pour assurer l'import d'acides aminés. Cette observation peut suggérer que le bacille possède une capacité importante pour l'import des acides aminés pouvant refléter une préférence nutritionnelle pour leur utilisation en tant que source d'azote.

4. Les sources préférentielles d'azote *in vitro*

M. tuberculosis est une bactérie prototrophe capable d'utiliser de l'azote inorganique, tel que l'ammonium et les nitrates, ou organique tel que l'urée et les acides aminés comme unique source d'azote [411, 415, 426, 427]. Etant donné que *M. tuberculosis* est un pathogène non retrouvé à l'état libre dans l'environnement, ses préférences pour certaines sources azotées lors de sa croissance *in vitro* pourraient refléter l'utilisation de celles-ci lors de sa croissance *in vivo* chez son hôte humain. Il a pu être observé que la croissance *in vitro* du bacille est plus importante en présence d'acides aminés que d'azote inorganiques, tels que les nitrates et l'ammonium. En effet, lorsque *M. tuberculosis* croît en présence d'asparagine ou de glutamate, la concentration bactérienne est doublée en phase exponentielle de croissance en comparaison à celle mesurée lors de l'utilisation de l'ammonium ou des nitrates [426]. L'urée quant à elle semble être une source d'azote également moins prompte que les acides aminés à promouvoir la croissance du bacille car elle permet une croissance similaire à celle observée en présence de nitrates ou d'ammonium. En effet, l'utilisation d'urée comme source d'azote est corrélée à un taux de croissance trois fois inférieur à celui observé en présence de glutamate [415]. L'urée et les nitrates, bien que accessibles au pathogène durant l'infection, semblent donc avoir une capacité réduite, en tant que source d'azote, à promouvoir la croissance de *M. tuberculosis*.

Les acides aminés constituent donc une source d'azote préférentielle pour la croissance du bacille tuberculeux en comparaison à l'ammonium, aux nitrates et à l'urée. Cependant, cela ne semble pas être le cas pour tous les acides aminés car l'arginine, par exemple, promeut un taux croissance similaire à celui observé en présence de nitrates [426]. Les acides aminés sont donc une source d'azote préférentielle pour la bactérie *in vitro* mais ne semblent pas tous présenter la même capacité à promouvoir la croissance bactérienne.

III. L'asparagine : une source préférentielle d'azote

Depuis les débuts de la mycobactériologie, l'asparagine est utilisée couramment en tant que source d'azote principale dans des milieux de cultures tel que les milieux de Dubos ou de Sauton. Des études réalisées avec une souche atténuée de *M. tuberculosis*, nommée H37Ra, ont permis d'étudier l'utilisation de l'asparagine et d'autres acides aminés comme source d'azote pour la croissance du bacille. Ces études ont montré que la bactérie présente une croissance importante en présence

d'asparagine mais également d'alanine, de glutamate et d'aspartate. De façon intéressante, l'asparagine est déplétée des milieux de culture plus rapidement que les autres acides aminés. Cette utilisation apparaît « non économique » car elle ne corrèle pas pour autant avec une croissance bactérienne supérieure à celle observée avec d'autres acides aminés comme l'alanine [427]. De façon intéressante, il a pu être montré que l'utilisation des acides aminés était diphasique. En effet, en présence d'asparagine, de glutamate et d'alanine, l'asparagine est utilisée prioritairement par le bacille, suggérant un mécanisme de répression catabolique favorisant son utilisation. A l'inverse, la présence d'asparagine favorise l'utilisation d'aspartate présent dans le milieu [428]. Cette observation pourrait refléter le fait que l'aspartate, une molécule très proche de l'asparagine, partage les mêmes voies métaboliques pour son assimilation que l'asparagine à l'intérieur de la bactérie.

Plus récemment, une étude ayant pour but de déterminer les conditions optimales de croissance du bacille tuberculeux *in vitro* a pu confirmer que l'asparagine est l'un des acides aminés les plus rapidement déplété par le bacille. Dans cette étude, l'asparagine a d'ailleurs été choisie pour constituer la source d'azote principale du milieu de culture élaboré [429].

1. L'asparagine : une source préférentielle d'azote à pH acide

Une étude récente a investigué la capacité des 20 acides aminés conventionnels à constituer une source d'azote pour la croissance du bacille tuberculeux dans un environnement acide (pH 5,5) *in vitro*. Cette étude a pu montrer que seuls 4 acides aminés permettent la croissance du bacille dans ces conditions, nommément l'asparagine, l'aspartate, le glutamate et la glutamine [286]. Parmi ces 4 acides aminés, l'asparagine est l'acide aminé permettant la croissance la plus précoce du bacille. De façon intéressante, cette croissance en présence d'asparagine est corrélée à l'excrétion d'ammoniaque NH_3 , une base faible pouvant intervenir dans la neutralisation du pH acide via la formation d'ammonium NH_4^+ permettant la capture des protons. D'ailleurs, la croissance du bacille en présence d'asparagine permet une neutralisation du pH du milieu plus précoce que celle mesurée pour les autres acides aminés. Il est à noter que l'on observe également la présence d'ammoniaque dans le milieu contenant de la glutamine mais dans ce cas, il ne semble pas provenir de la sécrétion de la base par la bactérie mais plus probablement de la dégradation spontanée de la glutamine en solution [430]. De façon intéressante, cette sécrétion d'ammoniaque est en partie promue par la porine OmpATb par un mécanisme encore indéterminé (**Voir partie C.III.1.b**).

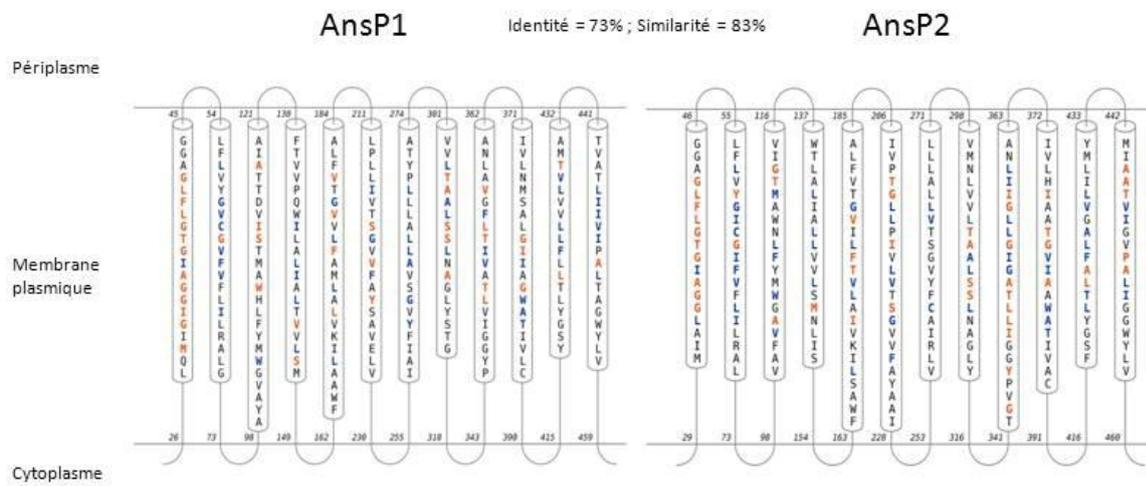


Figure 8: Schéma de prédiction de la topologie des transporteurs AnsP1 et AnsP2. Les transporteurs putatifs d'asparagine AnsP1 et AnsP2 ont une forte homologie car possédant 73% d'identité et 83% de similarité (NCBI, BLAST). Ils possèdent également une structure prédite similaire comportant 12 segments transmembranaires au niveau de la membrane plasmique bactérienne. D'après Cole *et al*, 1998 et Rose *et al*, 2009 (Logiciel de prédiction RYTHM).

L'asparagine constitue donc la source préférentielle d'azote pour la croissance de *M. tuberculosis* à pH acide et son utilisation au cours du cycle infectieux permettrait au bacille à la fois d'acquérir l'azote nécessaire à sa croissance mais également de résister au stress acide via la sécrétion d'ammoniaque.

2. Les systèmes de transport de l'asparagine : AnsP1 et AnsP2

Le génome de *M. tuberculosis* contient deux gènes codant pour des transporteurs putatifs d'asparagine nommés AnsP1 et AnsP2. Ces transporteurs possèdent une forte homologie de séquence entre eux, 73% d'identité et 83% de similarité, et sont prédits pour permettre l'import d'asparagine en raison de leur similarité de séquence avec d'autres transporteurs d'asparagine bactériens bien caractérisés tels que le transporteur AnsP de *S. enterica* avec lequel ils partagent 58% d'identité et 73% de similarité. AnsP1 et 2 appartiennent à la superfamille des APC (Amino acid/Polyamine/organoCation) et à la famille des AAT (2.A.3.1) (*Amino Acid Transporters*) [431]. Ces 2 transporteurs possèdent 12 segments transmembranaires et permettraient l'import d'asparagine via le co-transport de sodium Na^+ ou de proton H^+ (**Figure 8**) [432]. Ces transporteurs sont prédits pour être des perméases utilisant l'énergie du gradient de concentration des solutés transportés (asparagine) et co-transportés (Na^+ ou H^+) [433]. Aucune étude n'a été réalisée sur ces transporteurs. Cependant, l'étude du transcriptome de bactéries issues de poumons de patients humains souffrant de tuberculose a pu mettre en évidence que le gène *ansP2* est parmi les gènes de transporteur d'acides aminés les plus exprimés durant la pathologie [434]. Cette observation suggère que ce transporteur pourrait jouer un rôle durant le cycle infectieux du bacille chez l'homme, notamment en lui permettant d'importer de l'asparagine.

De façon intéressante, le gène *ansP1* est prédit pour coder l'unique transporteur de molécules azotées chez la mycobactérie *M. leprae*. *M. leprae* est un pathogène intracellulaire obligatoire dont le génome a subi une réduction évolutive importante donnant lieu à de nombreux événements de pseudogénération et de délétion de matériel génétique rendus dispensables à sa vie intracellulaire. Ainsi, les gènes conservés chez le bacille de la lèpre pourraient témoigner de leur rôle dans la survie des mycobactéries dans l'environnement intracellulaire.

Parmi les 16 gènes codant les transporteurs de molécules azotées présents chez *M. tuberculosis*, 12 d'entre eux ont été délétés chez *M. leprae* et 3 autres, nommément RocE, Amt et OppABCD, sont annotés en tant que pseudogènes, c'est-à-dire des gènes dont la séquence ou la séquence de leur promoteur a subi un ou plusieurs événements de mutation les rendant non fonctionnels [435]. Enfin,

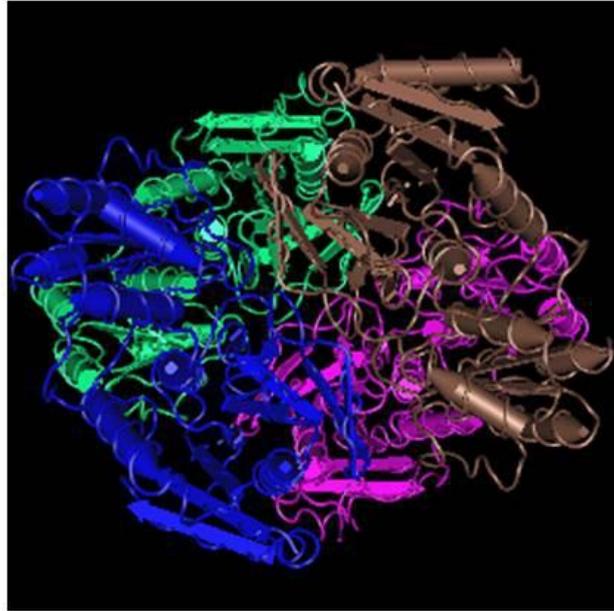


Figure 9: Représentation de la structure de l'asparaginase de type II d'*Escherichia coli*. La structure de l'asparaginase de type II d'*E. coli* a été obtenue par cristallisation puis représentée en structure en 3 dimensions avec une résolution de 2.3 Å . L'enzyme s'homodimérise pour constituer un tétramère actif. AnsA chez *M. tuberculosis* partage 36% d'identité et 49 % de similarité avec cette asparaginase et est prédit pour posséder une structure quaternaire similaire (NCBI, BLAST). D'après Borek *et al*, 2001. PDB ID 1JJA.

en plus de constituer l'unique gène codant un transporteur de molécules azotées, *ansP1* est même dupliqué dans le génome de *M. leprae*, renforçant l'idée que ce transporteur puisse jouer un rôle important dans l'adaptation du bacille de la lèpre et potentiellement de *M. tuberculosis*, à l'environnement intracellulaire.

L'ensemble de ces observations suggère donc que les transporteurs AnsP1 et AnsP2 pourraient jouer un rôle important dans l'acquisition de nutriments azotés, notamment d'asparagine, pour soutenir le cycle infectieux du bacille tuberculeux.

3. L'utilisation de l'asparagine : l'asparaginase AnsA

Une fois importée par les bactéries, l'entrée de l'asparagine dans les différentes voies métaboliques nécessite au préalable sa désamination permettant la formation d'asparate et d'ammonium assimilables. Cette désamination est permise par des enzymes appelés asparaginases. Chez *M. tuberculosis* H37Ra, il a pu être montré au début des années 1960 que des extraits du bacille possédaient une activité asparaginase dont l'activité était deux fois supérieure à celle de la mycobactérie saprophyte *M. smegmatis* [436].

Le séquençage du génome de *M. tuberculosis* a ensuite permis de mettre en évidence un gène unique nommé *ansA* prédit pour coder une asparaginase putative [27]. Cette asparaginase est homologue aux asparaginases de type II qui possèdent, contrairement à celle de type I, une forte affinité pour leur substrat. Egalement, les asparaginases de type II peuvent être sécrétées par les bactéries et retrouvées au niveau du périplasme bactérien et/ou dans l'environnement extracellulaire [437]. AnsA est prédite pour s'homodimériser et former un tetramère dont la structure a été déterminée pour l'asparaginase de type II d'*E. coli* avec laquelle AnsA partage 36% d'identité et 49% de similarité (**Figure 9**).

AnsA étant l'unique asparaginase prédite chez *M. tuberculosis*, cet enzyme devrait donc être nécessaire à l'utilisation de l'asparagine chez le bacille. Cet enzyme serait donc impliqué à la fois dans l'utilisation de l'asparagine comme source d'azote mais probablement aussi dans la sécrétion d'ammoniaque observée lors de son utilisation. En effet, il a récemment été démontré l'implication de l'asparaginase AnsA de BCG dans la croissance du bacille en présence d'asparagine à pH acide et la sécrétion d'ammonium observée lors de l'utilisation de cet acide aminé [438]. De façon intéressante, certaines asparaginases de types II sont également impliquées dans la virulence de pathogènes

bactériens tels que *H. pylori*, *Campylobacter jejuni* et *S. typhimurium* en permettant l'exploitation de l'asparagine des tissus de l'hôte et/ou la déplétion d'asparagine au niveau du site infectieux à l'origine de l'inhibition de l'activité de défense des cellules immunitaires [439-441].

D'après ces observations, nous avons postulé que la préférence nutritionnelle du bacille tuberculeux pour l'asparagine observée *in vitro* pourrait refléter son utilisation en tant que source d'azote durant le cycle infectieux. Mon projet de thèse a donc consisté à disséquer les mécanismes d'utilisation de cet acide aminé par l'étude du rôle des protéines AnsP1, AnsP2 et AnsA dans la physiologie et la virulence de *M. tuberculosis*.

RESULTATS

A. L'aspartate : un acide aminé requis pour l'acquisition de l'azote et la virulence de *M. tuberculosis*.

Afin d'évaluer l'implication du transporteur AnsP1 dans l'import de l'asparagine chez *M. tuberculosis*, nous avons construit un mutant inactivé dans ce gène que nous avons nommé *ansP1-KO*. Cependant, la délétion de ce gène n'affecte pas la croissance de la bactérie en présence d'asparagine comme unique source d'azote. De façon intéressante, nous avons pu observer que la mutation de ce transporteur, en revanche, abrogeait la capacité de *M. tuberculosis* à croître en présence d'aspartate comme unique source d'azote.

Cette observation a permis de suggérer que ce mutant n'était plus capable d'importer cet acide aminé, ce que nous avons pu confirmer grâce à des tests de transports à l'aide d'aspartate radioactif. Ces premières expériences ont donc permis de mettre en évidence qu'AnsP1 est l'unique transporteur d'aspartate présent chez *M. tuberculosis*.

En accord avec la littérature, nous avons pu confirmer que l'aspartate ne constitue pas une source de carbone et d'énergie efficace pour permettre la croissance du bacille tuberculeux. De plus, des études métabolomiques ciblées permettant le suivi d'isotopes lourds du carbone (^{13}C) et de l'azote (^{15}N), nous ont permis de montrer que l'azote de l'aspartate, contrairement au carbone, était pleinement assimilé par *M. tuberculosis* et ceci de façon AnsP1-dépendante. En effet, nous avons pu mesurer l'incorporation de cet azote au niveau des molécules centrales du métabolisme azoté, comme le glutamate et la glutamine, ainsi que son transfert consécutif vers d'autres métabolites.

Au regard du rôle unique joué par AnsP1 pour l'acquisition et l'assimilation de l'aspartate chez le bacille, nous avons ensuite voulu déterminer si *M. tuberculosis* avait accès à ce nutriment au cours de l'infection. Grâce à une technique associant la microscopie à la spectrométrie de masse, nous avons pu démontrer que l'aspartate est en effet présent au niveau du phagosome de *M. tuberculosis* à l'intérieur de macrophages cultivés *in vitro*.

Finalement, nous avons pu montrer que, bien que le transporteur AnsP1 ne soit pas requis pour la croissance du bacille à l'intérieur de macrophages cultivés *in vitro*, ce transporteur est nécessaire à la croissance de *M. tuberculosis in vivo* chez la souris immunodéficiente SCID ainsi que chez la souris immunocompétente C57BL/6.

Ainsi, cette étude a permis d'identifier pour la première fois un nutriment, l'aspartate, nécessaire au soutien du métabolisme azoté du bacille durant son cycle infectieux. Ces résultats viennent d'être publiés dans *Nature Chemical Biology*.

Mycobacterium tuberculosis nitrogen assimilation and host colonization require aspartate

Alexandre Gouzy^{1,2}, Gérald Larrouy-Maumus³, Ting-Di Wu^{4,5}, Antonio Peixoto^{1,2}, Florence Levillain^{1,2}, Geanncarlo Lugo-Villarino^{1,2}, Jean-Luc Gerquin-Kern^{4,5}, Luiz Pedro Sório de Carvalho³, Yannick Poquet^{1,2} & Olivier Neyrolles^{1,2*}

Here we identify the amino acid transporter AnsP1 as the unique aspartate importer in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. Metabolomic analysis of a mutant with an inactive AnsP1 revealed that the transporter is essential for *M. tuberculosis* to assimilate nitrogen from aspartate. Virulence of the AnsP1 mutant is impaired *in vivo*, revealing that aspartate is a primary nitrogen source required for host colonization by the tuberculosis bacillus.

M. tuberculosis, the causative agent of tuberculosis, is still responsible for nearly 1.5 million deaths annually, and new drugs and vaccines are needed to achieve eradication in the decades to come. In this context, a better understanding of *M. tuberculosis* metabolic requirements during host colonization may help identify targets for new antimicrobials. For instance, flexible catabolic pathways allowing the use of host-derived fatty acids, cholesterol and glucose were reported to provide *M. tuberculosis* with multiple carbon and energy sources and to play a key part in mycobacterial physiology and virulence^{1–5}. Today, inhibitors of such pathways represent one of the most promising therapeutic approaches for tuberculosis in combination with the current set of antibiotics⁵.

In addition to carbon, nitrogen is an essential component of biomolecules, including amino acids, nucleotides and organic cofactors, and nitrogen sources used by the pathogen during infection have yet to be identified⁶. Recent studies have substantiated past observations establishing amino acids (asparagine, in particular) as the favored *in vitro* nitrogen source for *M. tuberculosis* in comparison to inorganic nitrogen donors (for example, ammonia or nitrates)^{6–9}. In the present study, we provide unequivocal evidence that the putative asparagine transporter AnsP1 (locus Rv2127)¹⁰ is an essential transporter in the assimilation of nitrogen from aspartate, suggesting that aspartate-dependent pathways may enhance the fitness of *M. tuberculosis* during colonization of its host.

We initially chose to inactivate the AnsP1-encoding gene (Supplementary Results, Supplementary Fig. 1) largely owing to the strong potential of AnsP1 to be an asparagine transporter in *M. tuberculosis*¹⁰, as reflected by the 55% identity and 70% similarity to the *Salmonella enterica* asparagine transporter AnsP¹¹. Yet, when we evaluated the capacity of the *ansP1* knockout (KO) mutant to grow in minimal medium containing asparagine or other structurally related amino acids (i.e., glutamine and glutamate) as the sole nitrogen sources, there was no growth defect compared to the wild-type strain (Fig. 1a). This result suggested that AnsP1 is either irrelevant for the transport of these amino acids or that growth is compensated for by unknown transporters

with redundant substrate affinities. Notwithstanding, we found that the *ansP1*-KO strain was notably unable to grow with aspartate as sole nitrogen source, a phenotype that was fully reversed upon

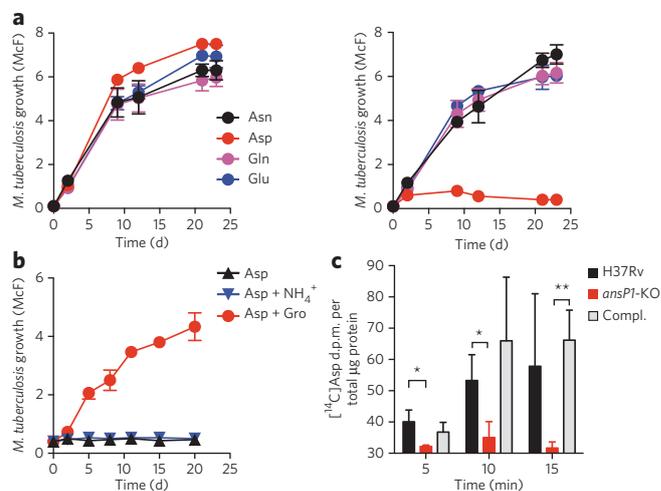


Figure 1 | AnsP1 is essential for *M. tuberculosis* growth on aspartate as sole nitrogen source. (a) Growth of *M. tuberculosis* H37Rv (left) and the *ansP1*-KO mutant (right) strains in various conditions. Growth was measured by monitoring turbidity; data represent mean \pm s.d. of triplicate samples and are representative of at least three independent experiments.

Bacteria were grown in minimal medium containing 5 mM asparagine, aspartate, glutamine or glutamate as the sole nitrogen source. (b) As in a, but bacteria (H37Rv) were grown in minimal medium containing 50 mM aspartate only (Asp), 50 mM aspartate plus 15 mM ammonium (Asp + NH₄⁺) or 50 mM aspartate plus 10 g/L glycerol (Asp + Gro) as nitrogen or carbon sources. (c) [¹⁴C]Aspartate uptake assay with *M. tuberculosis* H37Rv, the *ansP1*-KO mutant and its complemented strains (Compl.). Bacteria previously grown in 7H9 with 5 mM aspartate were harvested and resuspended in an uptake buffer containing a mix of ¹⁴C-radiolabeled and nonlabeled aspartate to obtain a final concentration of 20 μ M aspartate. Bacteria were incubated at 37 °C, and samples were removed; bacteria-associated ¹⁴C radioactivity was quantified at the indicated time points. Data are expressed as the number of disintegrations per minute (d.p.m.) per total μ g protein, represent mean \pm s.d. of triplicate samples, are representative of three independent experiments and were analyzed using the Student's *t*-test; **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

¹Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France. ²Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France. ³Mycobacterial Research Division, Medical Research Council National Institute for Medical Research, London, UK. ⁴Institut Curie, Laboratoire de Microscopie Ionique, Orsay, France. ⁵INSERM U759, Orsay, France.

*e-mail: olivier.neyrolles@ipbs.fr

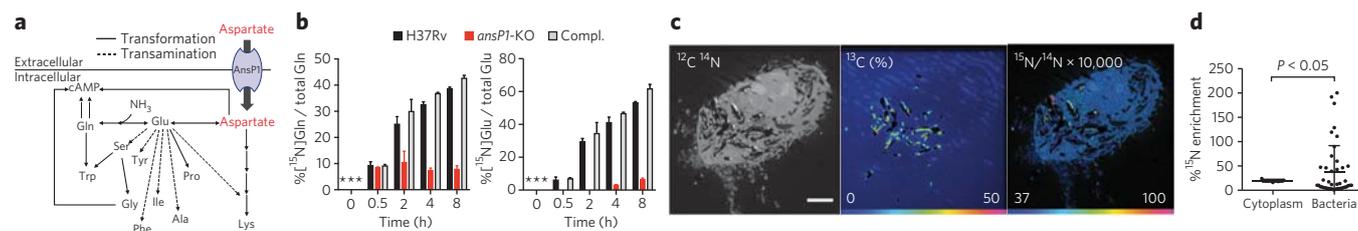


Figure 2 | AnsP1 is essential for *M. tuberculosis* nitrogen assimilation from aspartate. (a) Nitrogen incorporation pathways from aspartate into various N-containing metabolites resulting from transamination and/or transformation reactions. (b) Frequency of [^{15}N]glutamine and [^{15}N]glutamate detected in the presence of [^{15}N]aspartate in either *M. tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansP1*-KO mutant or its complemented strain (Compl). Data represent mean \pm s.d. of triplicate samples and are representative of at least two independent experiments. Asterisks denote that no signal was detected. Any signal below 5–10% corresponds to background noise. (c) ^{13}C -labeled bacteria were used to infect mouse macrophages. After pulsing the cells with [^{15}N]aspartate, ^{13}C and ^{15}N isotope compositions were analyzed by NanoSIMS. Images show a representative infected cell. Left, the as-recorded ^{12}C ^{14}N image showing the histological aspect of the cell. Scale bar, 5 μm . Middle, the ^{13}C atomic fraction map (in %) of the corresponding area. Right, the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio image, indicating the [^{15}N]aspartate uptake. For enhanced visibility, the ratio was multiplied by 10^4 . The $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio at natural ^{15}N abundance appears blue. (d) Quantification of ^{15}N enrichment (compared to the resin) in surface areas chosen in the cell cytoplasm ($n = 5$) and in intracellular ^{13}C -labeled bacteria ($n = 43$). Data represent mean \pm s.d. and were analyzed using the Student's *t*-test. The ^{15}N -enriched phagosomes, arbitrarily defined as those vacuoles with a ^{15}N enrichment above the mean + 3 s.d. of that observed in the host cell cytoplasm, represent 34.9% of all phagosomes.

genetic complementation of the mutant with a cosmid encompassing the *ansP1* region of the genome (Supplementary Fig. 2a). This unexpected phenotype was observed either when aspartate was provided from the start of the culture (Fig. 1a) or when the nitrogen source was switched to aspartate after initial bacterial replication (Supplementary Fig. 2b), indicating that AnsP1 is continuously required for growth on aspartate. We excluded a possible toxic effect of aspartate to the *ansP1*-KO mutant because (i) the loss of viability of the mutant over time was not different in the presence of aspartate compared to that in a culture medium void of any nitrogen source (Supplementary Fig. 2c) and (ii) the growth of the mutant normally resumed upon addition of a second nitrogen source (i.e., asparagine) to an aspartate-containing culture medium (Supplementary Fig. 2d). Beyond aspartate's essential role as a nitrogen source, we tested its capacity to support mycobacterial growth when provided as a sole carbon and energy source. In line with a previous report¹², we found that aspartate failed to foment mycobacterial growth when provided as the sole carbon and energy source even in the presence of ammonium as a nitrogen source, unless glycerol was included (as a carbon source) in the medium (Fig. 1b). Nevertheless, our metabolomics analysis of bacteria grown on U- ^{13}C aspartate revealed the presence of ^{13}C in various metabolites, including, for instance, α -ketoglutarate (Supplementary Fig. 3). In fact, the addition of glycerol enhanced the carbon incorporation from aspartate (Supplementary Fig. 3), indicating a synergistic use of carbon sources in *M. tuberculosis*, as we previously reported². Finally, as proof of principle, we demonstrated that AnsP1 is an aspartate importer using ^{14}C -labeled aspartate in a standard amino acid transport assay (Fig. 1c). Collectively, our results show that AnsP1 is the unique aspartate importer in *M. tuberculosis* and that this amino acid transporter is strictly required for growth of the pathogen with aspartate as its sole nitrogen source, although aspartate-derived carbon can enter the mycobacterial carbon flux to some extent.

To further explore the contribution of aspartate to nitrogen assimilation in *M. tuberculosis*, we conducted a series of metabolomic investigations using stable isotopic labeling. The ^{15}N incorporation from ^{15}N -labeled aspartate into the mycobacterial N-containing metabolome (defined here as all of the extractable N-containing small molecules present in the bacterium) was followed by TOF-MS (Fig. 2a and Supplementary Fig. 4a). In *M. tuberculosis* H37Rv, the ^{15}N assimilation was first observed with glutamine and glutamate, two amino acids that have an important role in nitrogen assimilation and storage (Fig. 2b). This result

is in agreement with previous studies showing that nitrogen incorporation takes place first in these two major nitrogen-acceptor and nitrogen-donor species in bacteria^{13,14}. In the *ansP1*-KO mutant, however, nitrogen transfer from aspartate into glutamine and glutamate was abolished, a phenotype that was reversed by genetic complementation (Fig. 2b). This deficiency in nitrogen assimilation was specific to aspartate as the nitrogen donor, given that the *ansP1*-KO mutant was able to incorporate it from [$^{15}\text{N}_2$]asparagine at a rate similar to that observed for the wild-type and complemented strains (Supplementary Fig. 4b). As observed for glutamine and glutamate, the mutant strain was impaired in nitrogen incorporation into secondary N-containing metabolites resulting from transamination reactions (Fig. 2a), such as alanine, serine, tyrosine, phenylalanine and isoleucine (Supplementary Fig. 5a), or those from other N-incorporation reactions (Fig. 2a), such as proline, glycine, lysine and tryptophan (Supplementary Fig. 5b). As expected, the ^{15}N labeling of nucleosides that are biosynthetically more distant from aspartate, such as cAMP, could not be detected in the mutant strain (Fig. 2a and Supplementary Fig. 5c). Therefore, our results unequivocally demonstrate that aspartate-derived nitrogen is fully assimilated in *M. tuberculosis* and that this process is exclusively AnsP1 dependent.

To assess the physiological relevance of our findings, we next asked whether *M. tuberculosis* could access aspartate inside its natural cellular niche, namely the macrophage. Indeed, *M. tuberculosis* is a facultative intracellular pathogen that resists innate antimicrobial mechanisms and thrives inside macrophages and other phagocytes¹⁵. To address this question, we used an ionic microprobe based on dynamic secondary ion MS (NanoSIMS), a powerful technology that allows spatial imaging of elemental and isotopic distribution with high resolution¹⁶. Mouse macrophages were infected for 20 h with ^{13}C -labeled *M. tuberculosis* H37Rv and pulsed with [^{15}N]aspartate for 4 h before fixation and analysis. The ^{13}C -labeled bacteria were unambiguously localized inside infected cells (Fig. 2c). The aspartate-derived ^{15}N signal was found distributed in spots (Fig. 2c), and a correlation analysis showed that every ^{15}N -containing spot localized together with a spot from a bacterium. Markedly, a fraction of intracellular bacteria had ^{15}N enrichment higher than that observed in the host cell cytoplasm, as compared to the background natural isotopic signal observed in the resin (Fig. 2d and Supplementary Fig. 6). Analysis of multiple cells indicated that at least ~35% of the mycobacterial phagosomes were reproducibly enriched in ^{15}N compared to the host cell cytoplasm. These results strongly suggested that *M. tuberculosis* could access aspartate

inside host macrophages. The bimodal distribution of [¹⁵N]aspartate accumulation within the *M. tuberculosis* vacuoles (Fig. 2d and Supplementary Fig. 6b) is reminiscent of the distribution observed for various maturation markers to the mycobacterial phagosomes^{17,18}. Such heterogeneity most likely reflects variability of the metabolic status of the phagocytosed bacteria. Whether aspartate accumulates differentially to the vacuoles depending on various cellular parameters (for example, differentiation program, activation status) remains to be elucidated.

To validate the pertinence of our findings during the infection context, we first tested the ability of the *ansP1*-KO mutant to proliferate inside macrophages. As aspartate is accessible as a nitrogen source in the mycobacterial phagosome, we were surprised to find no growth defect for the mutant strain in either resting or activated macrophages (Supplementary Fig. 7). To further investigate the role of Ansp1 in survival *in vivo*, we conducted infection experiments in immunodeficient (SCID) or immunocompetent (C57BL/6) animals. In contrast with the results from our *in vitro* approach with macrophages, we observed that the virulence of the *ansP1*-KO mutant was severely compromised both in immunodeficient SCID (Supplementary Fig. 8a) and immunocompetent C57BL/6 (Supplementary Fig. 8b) mice compared to that in the wild-type and complemented strains. Consistent with the reduced bacterial load observed in animals infected with the mutant strain, immunohistopathology analysis revealed that this strain induces smaller granulomas than its wild-type and complemented counterparts (Supplementary Fig. 8c,d), providing further evidence that Ansp1 is involved in *M. tuberculosis* virulence. The apparent discrepancy between our models of infection most likely reflects the complexity of the nutritional environment and immune-mediated pressure encountered by the bacteria *in vivo* relative to the less physiological conditions encountered in the *in vitro* culture systems.

Collectively, our results indicate that Ansp1 is required for *M. tuberculosis* virulence, most likely because it allows the bacteria to capture aspartate and incorporate nitrogen from host tissues. Notably, we found that *M. tuberculosis* can access aspartate inside host cells. In line with our findings, aspartate was found to be among the most abundant molecules in *M. tuberculosis* infection sites in a guinea pig model¹⁹. Although nitrate- and urea-derived ammonium are often considered important potential sources of nitrogen for *M. tuberculosis* during infection²⁰, amino acids are usually underestimated from this point of view. In this context, our results reveal for what is to our knowledge the first time that amino acids serve as an important nitrogen source for *M. tuberculosis* during infection.

A limited number of *M. tuberculosis* amino acid transporters have been studied so far⁶. Here we show that Ansp1 is the unique aspartate transporter in this pathogen. This finding is unexpected because Ansp1 belongs to the family of amino acid transporters (2.A.3.1 family²¹) and is not homologous to members of the classical bacterial dicarboxylate amino acid:cation symporter family (2.A.23 family²²) usually involved in aspartate uptake. Notably, we found that the Ansp1 homolog Ansp2 (Supplementary Fig. 9a) cannot compensate for Ansp1 deficiency in aspartate transport as a mutant inactivated in the *ansP2* gene is able to grow with aspartate as its sole nitrogen source (Supplementary Fig. 9b). The role of Ansp2 and of the other *M. tuberculosis* putative amino acid transporters in mycobacterial physiology and virulence remains to be elucidated. Furthermore, the Ansp1 transporter is duplicated in the obligate pathogen *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy (Supplementary Fig. 9a), and all of the other amino acid transporters found in *M. tuberculosis* are either deleted or pseudogenized in this species²³. This suggests an important role for aspartate utilization in the pathogenicity of the leprosy bacillus as well.

In conclusion, we propose that aspartate is a primary nitrogen source for *M. tuberculosis* during infection and that Ansp1 is an essential aspartate transporter that ultimately enhances this

pathogen's fitness within its host. We envision that biosynthesis pathways depending on aspartate as a nitrogen provider may constitute a new 'chink in the armor' for tuberculosis and possibly leprosy bacilli to be targeted for therapeutic purposes.

Received 29 April 2013; accepted 9 August 2013; published online 29 September 2013

Methods

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

References

- McKinney, J.D. *et al.* *Nature* **406**, 735–738 (2000).
- de Carvalho, L.P. *et al.* *Chem. Biol.* **17**, 1122–1131 (2010).
- Marrero, J., Trujillo, C., Rhee, K.Y. & Ehrh, S. *PLoS Pathog.* **9**, e1003116 (2013).
- Pandey, A.K. & Sasseti, C.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 4376–4380 (2008).
- Rhee, K.Y. *et al.* *Trends Microbiol.* **19**, 307–314 (2011).
- Cook, G.M. *et al.* *Adv. Microb. Physiol.* **55**, 81, 318–319 (2009).
- Lyon, R.H., Hall, W.H. & Costas-Martinez, C. *J. Bacteriol.* **117**, 151–156 (1974).
- Song, H. *et al.* *Mol. Microbiol.* **80**, 900–918 (2011).
- Song, H. & Niederweis, M. *J. Bacteriol.* **194**, 956–964 (2012).
- Cole, S.T. *et al.* *Nature* **393**, 537–544 (1998).
- Jennings, M.P., Anderson, J.K. & Beacham, I.R. *Microbiology* **141**, 141–146 (1995).
- Youmans, A.S. & Youmans, G.P. *J. Bacteriol.* **65**, 96–99 (1953).
- Reitzer, L. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 155–176 (2003).
- Yuan, J., Fowler, W.U., Kimball, E., Lu, W. & Rabinowitz, J.D. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 529–530 (2006).
- Russell, D.G. *Immunol. Rev.* **240**, 252–268 (2011).
- Guerquin-Kern, J.L., Wu, T.D., Quintana, C. & Croisy, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**, 228–238 (2005).
- Clemens, D.L. & Horwitz, M.A. *J. Exp. Med.* **181**, 257–270 (1995).
- Xu, S. *et al.* *J. Immunol.* **153**, 2568–2578 (1994).
- Somashekar, B.S. *et al.* *J. Proteome Res.* **10**, 4186–4195 (2011).
- Amon, J., Titgemeyer, F. & Burkovski, A. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 20–29 (2009).
- Jack, D.L., Paulsen, I.T. & Saier, M.H. *Microbiology* **146**, 1797–1814 (2000).
- Saier, M.H. Jr. *Microbiology* **146**, 1775–1795 (2000).
- Cole, S.T. *et al.* *Nature* **409**, 1007–1011 (2001).

Acknowledgments

We thank C. Gutierrez and D. Hudrisier for carefully reading the manuscript and for their helpful suggestions. We thank L. Lepourry and F. Moreau for technical assistance with mouse infections. We thank A. Benard (IPBS, Toulouse, France) for providing mouse cells and R. Brosch (Institut Pasteur, Paris, France) for providing the I257 cosmid. We thank Y. Verkindere (YV Photographiste, Toulouse, France) for help with graphical work. We thank the PICT-IBISA imaging facility in the Institut Curie. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (contracts SLC-TB and TB-HITS), the UK Medical Research Council (MC_UP_A253_1111) and the European Union Seventh Framework Programme NEWTBVAC (contract no. 241745). This work also benefited from the TRI RIO Optical Imaging Platform at the Institute of Pharmacology and Structural Biology (Genotoul, Toulouse, France) and was supported by grants from the Région Midi-Pyrénées (Contrat de Projets Etat-Région Midi-Pyrénées (CPER)), the Grand Toulouse community, the Agence pour la Recherche sur le Cancer (ARC équipement no. 8505), the Centre National de la Recherche Scientifique and the European Union-European Regional Development Fund program. A.G. and G.L.-V. hold a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Author contributions

A.G., J.-L.G.-K., L.P.S.d.C., Y.P. and O.N. designed the experiments. A.G., G.L.-M. and T.-D.W. performed the experiments, with technical assistance from A.P., F.L. and J.-L.G.-K. A.G., G.L.-M., T.-D.W., A.P., J.-L.G.-K., L.P.S.d.C., Y.P. and O.N. analyzed the results. A.G., G.L.-M., G.L.-V., L.P.S.d.C., Y.P. and O.N. wrote the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Supplementary information is available in the online version of the paper. Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.N.

ONLINE METHODS

Mycobacteria and classic culture conditions. Mycobacteria were grown at 37 °C in Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 10% albumin-dextrose-catalase supplement (Difco) and 0.05% Tween-80 (Sigma) or on Middlebrook 7H11 agar medium (Difco) supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase supplement (OADC, Difco). When required, kanamycin or hygromycin was added to the culture medium to a final concentration of 50 µg/ml.

Construction of *ansP1*-KO and *ansP2*-KO mutants and complemented strains. *ansP1*-KO and *ansP2*-KO mutant strains of *M. tuberculosis* H37Rv containing disrupted *ansP1* (Rv2127)::KanR or *ansP2* (Rv0346c)::KanR alleles were constructed by allelic exchange using a recombineering method²⁴. H37Rv:pJV53 was grown in 7H9-ADC-Tween80 in the presence of hygromycin until mid-log phase and induced by 0.2% acetamide (Sigma) overnight at 37 °C. After induction, electrocompetent bacteria were prepared. Electroporation was performed with linearized digestion fragments of kanamycin-resistant cassette-interrupted genes flanking with homologous regions (length 400–700 pb). After 72 h of incubation at 37 °C, bacteria were plated onto 7H11-OADC agar medium in the presence of kanamycin. For complemented strain construction, the pYUB412-derived integrative cosmid I257 encompassing the region 2,377.9–2,415.5 kb in the genome of *M. tuberculosis* H37Rv and containing a hygromycin resistance cassette²⁵ was used. Mutation and complementation events were verified by PCR and sequencing using the following primers: for the *ansP1*-KO strain, P1, 5'-TTCGTCGGCGAACCCACCTTCCCG-3', and P2, 5'-TCATCAAGTCACCGGCACCGT GGAA-3'; for the *ansP2*-KO strain, P3, 5'-CGGGTACTTGGGATGGGCCG TCACA-3', and P4, 5'-GTGACCAGCACTATGGGCAGCAGA-3'.

Macrophages and infection procedure. Bone marrow cells were flushed from the femurs and tibias of 6- to 8-week-old female C57BL/6 mice and cultured in Petri dishes (2×10^6 cells per dish) in RPMI 1640 GlutaMax (GIBCO) supplemented with 10% FCS (FCS, Pan-Biotech) and 20 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, Peprotech) at 37 °C in the presence of 5% CO₂. At day 6, cells were transferred to 24-well plastic plates (2×10^5 cells per well). For macrophage activation, cells were incubated with 10 ng/ml interferon-γ (IFN-γ, Peprotech) overnight prior to infection. Infection was performed in triplicate at a multiplicity of infection of 0.1 bacterium per cell for 4 h at 37 °C. Cells were then washed twice with DPBS before addition of fresh medium. At days 0, 2, 5 and 7, cells were lysed in 0.01% Triton X-100 (Sigma), and serial dilutions of the lysates were plated onto 7H11-OADC agar medium for CFU scoring.

Mouse infection. All animal experiments were performed in animal facilities that meet all of the legal requirements in France and by qualified personnel in such a way to minimize discomfort for the animals. All of the procedures including animal studies were conducted in strict accordance with French laws and regulations in compliance with the European community council directive 68/609/EEC guidelines and its implementation in France. All of the protocols were reviewed and approved by the Comité d'Éthique Midi-Pyrénées (reference MP/04/26/07/03). Six- to eight-week-old female C57BL/6 or SCID mice were anesthetized with a cocktail of ketamine (60 mg/kg; Merial) and xylazine (10 mg/kg; Bayer) and infected intranasally with 500 CFUs of the various mycobacterial strains in 25 µl of PBS-0.01% Tween-80. After infection, SCID mice were killed when first signs of hurt were observed. For C57BL/6 mice, at 21 and 42 days after infection, mice were killed, and lung and spleen homogenates were plated onto 7H11 agar plates for CFU scoring. In parallel, lungs of infected mice were filled with 2% low-melting agarose and fixed for 24 h in a periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) fixative. After fixation, lungs were incubated in serial incubations in sucrose solutions (10%, 20% and 30%). Finally, lungs were sectioned (30 µm) and stained for confocal microscopy with F4/80 Pacific Blue, CD4 Alexa 488 and Gr1 Alexa 647 (Biolegend). Z stacks were acquired in an Olympus FV1000 confocal microscope and analyzed in Imaris software (Bitplane).

***M. tuberculosis* growth in minimal medium.** Bacteria were grown in Sauton's modified medium containing 0.05% Tween-80, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 2 g/L citric acid, 10 g/L glycerol and 5 mM aspartate, asparagine, glutamate, glutamine or ammonium sulfate (pH 6.5–7.0). In medium prepared

for carbon assimilation, aspartate and ammonium sulfate were added at a final concentration of 50 mM and 15 mM, respectively, Tween-80 was replaced by 0.05% tyloxapol (Sigma), and citrate was omitted. Cultures were performed in triplicate in glass tubes, and bacterial growth was monitored by plating onto 7H11-OADC agar medium and CFU scoring or by measuring turbidity (in McFarland units) over time using a Densimat apparatus (BioMérieux).

[¹⁴C]Aspartate uptake experiment. Aspartate uptake experiments were carried out as described before for asparagine with minor modification⁸. Bacteria were grown in Middlebrook 7H9 containing 0.05% Tween 80 and aspartate (5 mM) at 37 °C. Bacteria were harvested by centrifugation when an OD₆₀₀ of 0.5 was reached. Bacterial pellets were washed twice in uptake buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.9, 15 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.05% Tween-80) and resuspended in the same buffer. Radiolabeled [¹⁴C]aspartate (PerkinElmer, Purity: 97 atom % ¹⁴C) and nonlabeled aspartate (Sigma) were mixed and added to cell suspensions to obtain a final concentration of 20 µM aspartate. The mixtures were incubated at 37 °C, and 250 µl of samples were removed at various time points. Bacteria were collected on a 0.45-µm Spin-X centrifuge tube filter (Costar) by mixing with an equal volume of 10% paraformaldehyde (PFA, Polyscience, Inc.) containing 0.1 M LiCl (Sigma). Filter radioactivity was determined in a liquid scintillation counter (Packard). The uptake rate was expressed in disintegrations per minute (d.p.m.) per total protein concentration ([¹⁴C]aspartate (d.p.m.) per µg protein).

Metabolite extraction experiments. Bacteria were cultivated to an OD₆₀₀ of 1 in 7H9 broth plus 0.05% Tween-80. Bacteria were centrifuged and resuspended in DPBS (threefold concentration). 1 mL was transferred to a filter (Fisher) mounted on a filtration device (Fisher) and connected to a trap and vacuum line. Filters were transferred to solid medium containing 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 2 g/L citric acid, 10 g/L glycerol, aspartate (2mM) and 1.5% agar (Invitrogen) prepared in tap water and neutralized to pH 6.5–7.0 with NaOH before autoclaving. Plates were incubated for 5 d at 37 °C. Three filters were used per strain and time point. For labeling experiments, filters were transferred on equivalent plates where aspartate was replaced by [¹⁵N] aspartate (2 mM; Sigma, Purity 98 atom % ¹⁵N) and incubated for 0.5 h, 2 h, 4 h or 8 h at 37 °C. For U-¹³C incorporation experiments, bacteria were cultivated in the same conditions without citric acid and with or without glycerol (10 g/L); next, aspartate was replaced by [¹³C]aspartate (2 mM, Sigma, Purity 98 atom % ¹³C). ¹⁵N incorporation from asparagine was evaluated following the same procedure except that aspartate was replaced by asparagine and that 7H10 was used instead of solid minimal medium; in this case, [¹⁵N₂]asparagine (Sigma, Purity 98 atom % ¹⁵N) was used. At each time point, filters were plunged into a 1-mL acetonitrile/methanol/water (2:2:1, v/v/v) mixture at –40 °C. Bacteria were then broken by glass beads using a bead-beater (5 min at 30 m/s). After centrifugation, supernatants were collected and filtered through a Spin-X column (0.2 µm) at 14,000 r.p.m. for 15 min. Extracts were stored at –80 °C before analysis.

LC/MS. Aqueous normal-phase LC was performed using an Agilent 1200 LC system equipped with a solvent degasser, binary pump, temperature-controlled autosampler (set at 4 °C) and temperature-controlled column compartment (set at 20 °C), containing a Cogent Diamond Hydride Type C silica column (150 mm × 2.1 mm; dead volume 315 µl) from Microsolv Technology Corporation. A flow rate of 0.4 ml/min was used. Elution of polar metabolites was carried out using gradient 3 (ref. 26). Briefly, solvent A consists of deionized water (resistivity ~18 MΩ cm) and 0.2% acetic acid, and solvent B consists of acetonitrile and 0.2% acetic acid; the gradient as follows: 0 min 85% B; 0–2 min 85% B; 2–3 min to 80% B; 3–5 min 80% B; 5–6 min to 75% B; 6–7 min 75% B; 7–8 min to 70% B; 8–9 min 70% B; 9–10 min to 50% B; 10–11 min 50% B; 11–11.1 min to 20% B; 11.1–14 min hold 20% B. Accurate MS was carried out using an Agilent Accurate Mass 6230 TOF apparatus. Dynamic mass axis calibration was achieved by continuous infusion, post chromatography, of a reference mass solution using an isocratic pump connected to a Multimode ionization source, operated in the positive-ion mode. ESI capillary and fragmentor voltages were set at 3,500 V and 100 V, respectively. The nebulizer pressure was set at 40 psi, and the nitrogen drying gas flow rate was set at 10 l/min. The drying gas temperature was maintained at 250 °C. The MS acquisition rate was 1.5 spectra/s, and *m/z* data ranging from 80 to 1,200 were stored. This instrument routinely enabled accurate mass spectral measurements with an error of less than 5 p.p.m., mass resolution ranging from 10,000–25,000



over the m/z range of 121 to 955 a.m.u. and a 100,000-fold dynamic range with picomolar sensitivity. Data were collected in the centroid mode in the 4-GHz (extended dynamic range) mode. Detected m/z were deemed to be identified metabolites on the basis of unique accurate mass-retention time identifiers for masses exhibiting the expected distribution of accompanying isotopomers². Typical variation in abundance for most of the metabolites stayed between 5% and 10% under these experimental conditions.

Stable isotope labeling analysis. Under the experimental conditions described above, M+1 arising from ¹⁵N incorporation can be readily distinguished from M+1 arising from naturally abundant ¹³C or from ¹³C labeling, therefore allowing direct monitoring of ¹⁵N labeling and ¹³C labeling. The extent of ¹⁵N or ¹³C labeling for each metabolite was determined by dividing the summed peak height ion intensities of all of the ¹⁵N- or ¹³C-labeled species by the ion intensity of both labeled and unlabeled species, expressed in percent.

Secondary ion MS. For ¹³C labeling, bacteria were grown in minimal medium containing 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 15 mM NH₄SO₄, 10 g/L [¹³C₃] glycerol (Sigma, Purity: 99 atom % ¹³C) supplemented with 0.05% tyloxapol (Sigma) and neutralized to pH 6.5–7.0 with NaOH before filtration. IFN-activated macrophages, plated on cover glasses, were infected at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell with ¹³C-labeled bacteria for 4 h. At 20 h after infection, the culture medium was replaced by fresh RPMI containing 10% FCS and 2 mM [¹⁵N]aspartate. After 4 h at 37 °C, cells were fixed with 4% PFA plus 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) and dehydrated through successive 30%, 50%, 70%, 90% and 100% ethanol baths. Cells were then directly included in epoxy resin before NanoSIMS analysis. Epoxy resin was prepared by mixing 4.63 mL of EMBed-812 (Sigma) and 3.70 mL of the epoxy embedding medium hardener DDSA (Sigma) at room temperature under agitation until homogeneity was reached. Then, 1.39 mL of the epoxy embedding medium hardener MNA (Sigma) was added to the mix prior to the addition of 280 µL *N,N*-dimethylbenzylamine (Sigma). Once dehydrated, cover glasses containing cells were incubated with ethanol/epoxy resin (2:1) for 1 h and then ethanol:epoxy resin (1:2) for 1 h before final incubation in pure epoxy resin for 1 h. Epoxy resin was then replaced by fresh epoxy resin before incubation of the samples overnight at room

temperature. Polymerization of epoxy resin was performed at 65 °C for 12 h. 150-nm-thin sections were deposited on clean silicon chips and inserted into a NanoSIMS-50 Ion microprobe (CAMECA, Gennevilliers, France) operating in scanning mode¹⁶. For the present study, by using a Cs⁺ primary ion beam tightly focused to a typical probe size of ~85 nm (distance between 16–84% of peak intensity from a line scan), five secondary ion species (¹²C⁻, ¹³C⁻, ¹²C¹⁴N⁻, ¹²C¹⁵N⁻, ³¹P⁻) were monitored simultaneously. The primary beam steps over the surface of the sample to create images of the selected ion species. The identification of bacteria location was highlighted by high ¹³C content, whereas the aspartate uptake was revealed by ¹⁵N enrichment. After careful Cs⁺ ion implantation to get steady-state ion emission, the acquisition was carried out in multiframe mode. The primary beam intensity was 1 pA, and the raster size ranged from 20 µm to 35 µm to image a whole cell with an image definition of 512 × 512 pixels. With a dwell time of 2 ms per pixel, up to 15 frames were acquired, and the total analysis time was 2 h. Image treatment was performed using ImageJ software²⁷. First, multiframe images were properly aligned using CN⁻ images as reference before a summed image was obtained for each ion species. A map of ¹³C atomic fraction was deduced from ¹²C⁻ and ¹³C⁻ images. In parallel, ROIs were manually defined on the basis of the ¹³C⁻ map to outline individual bacterium for data extraction. For ¹⁵N/¹⁴N ratio quantification, a sample containing no labeled cells was used as a working reference for adjusting the detectors. Further, a check was performed on the resin area surrounding the observed cells. The final ¹³C map, as well as the one for the ¹⁵N/¹⁴N ratio, are shown in hue-saturation-intensity (HSI) mode. These HSI color images were generated using OpenMIMS, an ImageJ plugin developed by C. Lechene's laboratory²⁸.

24. van Kessel, J.C. & Hatfull, G.F. *Nat. Methods* **4**, 147–152 (2007).

25. Bange, F.C., Collins, F.M. & Jacobs, W.R. Jr. *Tuber. Lung Dis.* **79**, 171–180 (1999).

26. Peseck, J.J., Matyska, M.T., Fischer, S.M. & Sana, T.R. *J. Chromatogr. A* **1204**, 48–55 (2008).

27. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).

28. Lechene, C. *et al. J. Biol.* **5**, 20 (2006).

SUPPLEMENTARY INFORMATION FOR:

***Mycobacterium tuberculosis* nitrogen assimilation and host colonization require aspartate**

Alexandre Gouzy^{1,2}, Gérald Larrouy-Maumus³, Ting-Di Wu^{4,5}, Antonio Peixoto^{1,2}, Florence Levillain^{1,2}, Geanncarlo Lugo-Villarino^{1,2}, Jean-Luc Gerquin-Kern^{4,5}, Luiz Pedro Sório de Carvalho³, Yannick Poquet^{1,2} & Olivier Neyrolles^{1,2}*

Affiliations

¹Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

²Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

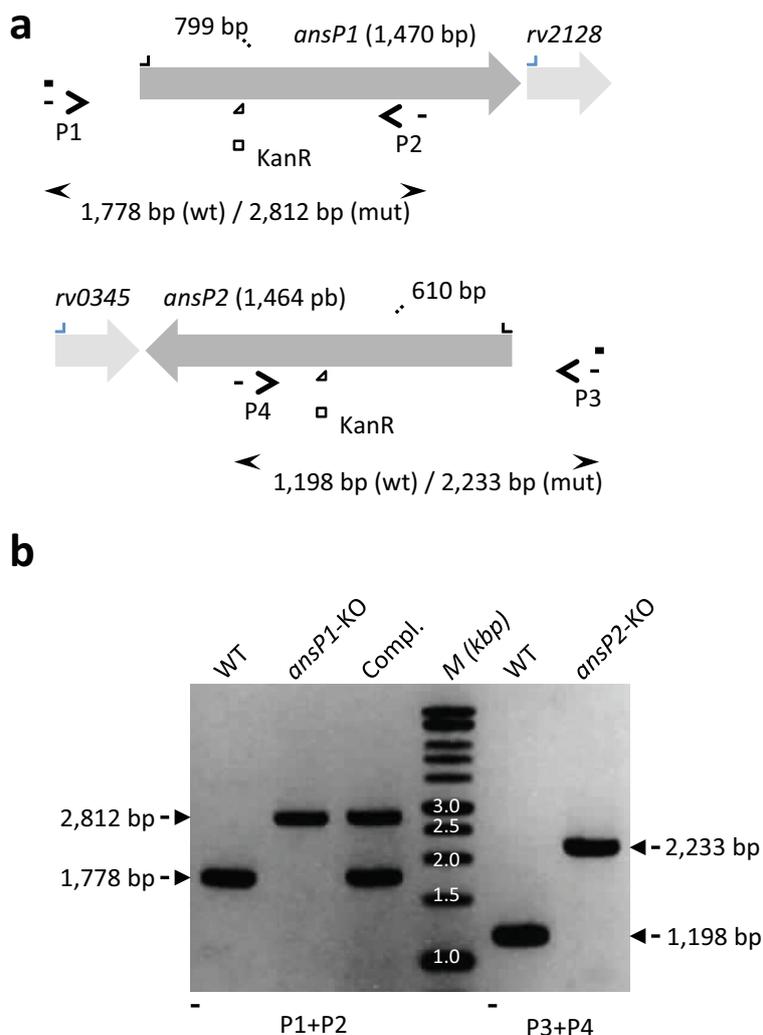
³Mycobacterial Research Division, MRC National Institute for Medical Research, London, UK

⁴Institut Curie, Laboratoire de Microscopie Ionique, Orsay, France

⁵INSERM U759, Orsay, France

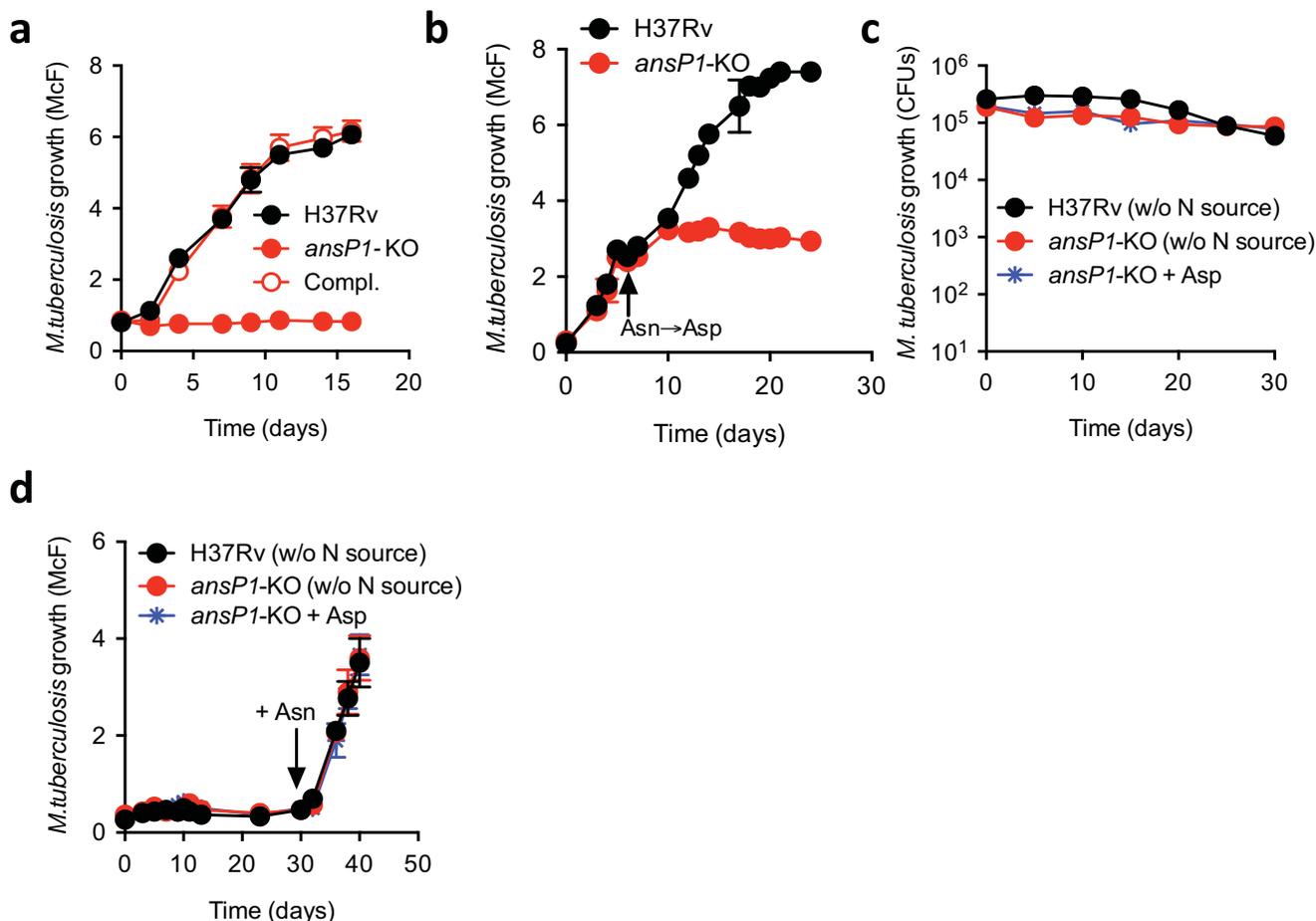
*Correspondence to: olivier.neyrolles@ipbs.fr

SUPPLEMENTARY RESULTS



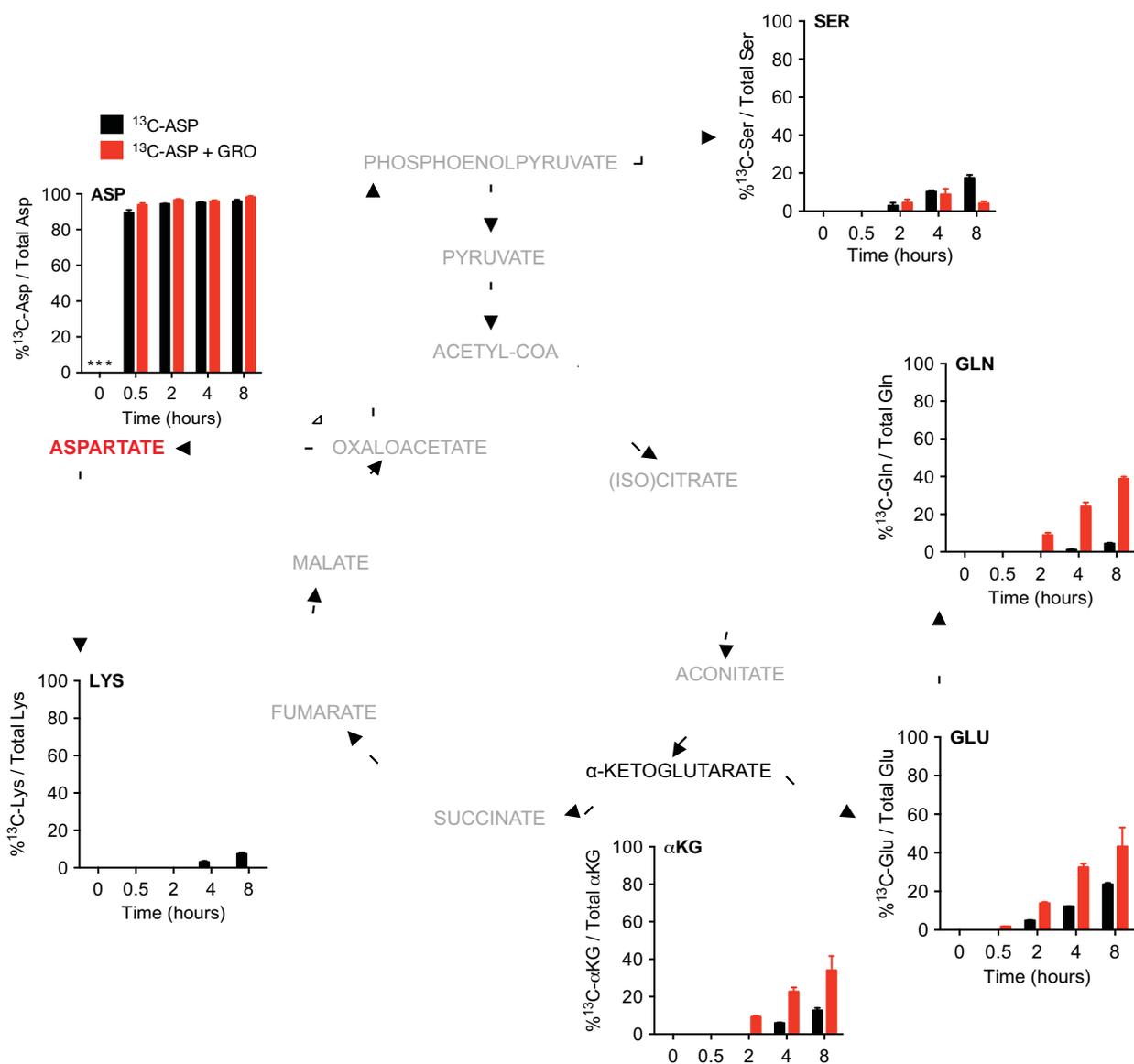
Supplementary Figure 1: Generation and characterization of *ansP1*-KO and *ansP2*-KO mutants.

(a) A schematic representation of the genetic organization of *ansP1* and *ansP2* genes. The position of the oligonucleotides (P1-4) used for PCR validation and the expected size of the resulting amplicons are shown. (b) PCR analysis of the *ansP1*-KO and *ansP2*-KO mutants with the primers shown in (a).



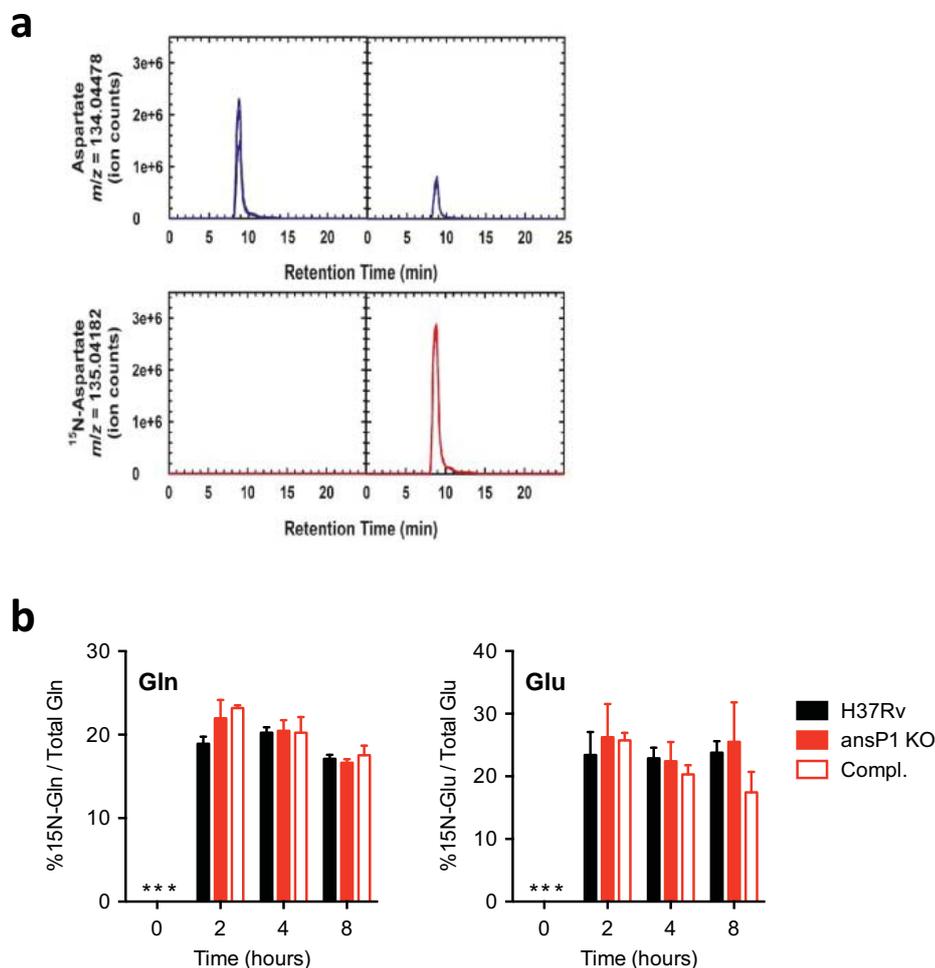
Supplementary Figure 2: AnsP1 is essential for *M. tuberculosis* growth on aspartate as sole nitrogen source.

Growth of *M. tuberculosis* H37Rv, the *ansP1*-KO mutant and the *ansP1*-KO complemented (Compl.) strains in various conditions. Growth was measured by monitoring turbidity (a, b, d) or CFU scoring (c); data represent mean \pm s.d. of triplicate samples and are representative of at least three independent experiments. (a) Bacteria were grown in minimal medium containing 5 mM aspartate as sole nitrogen source. (b) Bacteria were grown for 5 days in minimal medium containing 5 mM asparagine (Asn) as sole nitrogen source, after what asparagine was replaced by 5 mM aspartate (Asp) for the rest of the experiment. (c) Bacteria were grown for 30 days in minimal medium void of any nitrogen source (w/o N source) or supplemented with 5 mM aspartate (Asp) as sole nitrogen source. (d) Bacteria were grown as in (c), and asparagine was added to the culture medium to a final concentration of 5 mM after 30 days of bacterial growth.



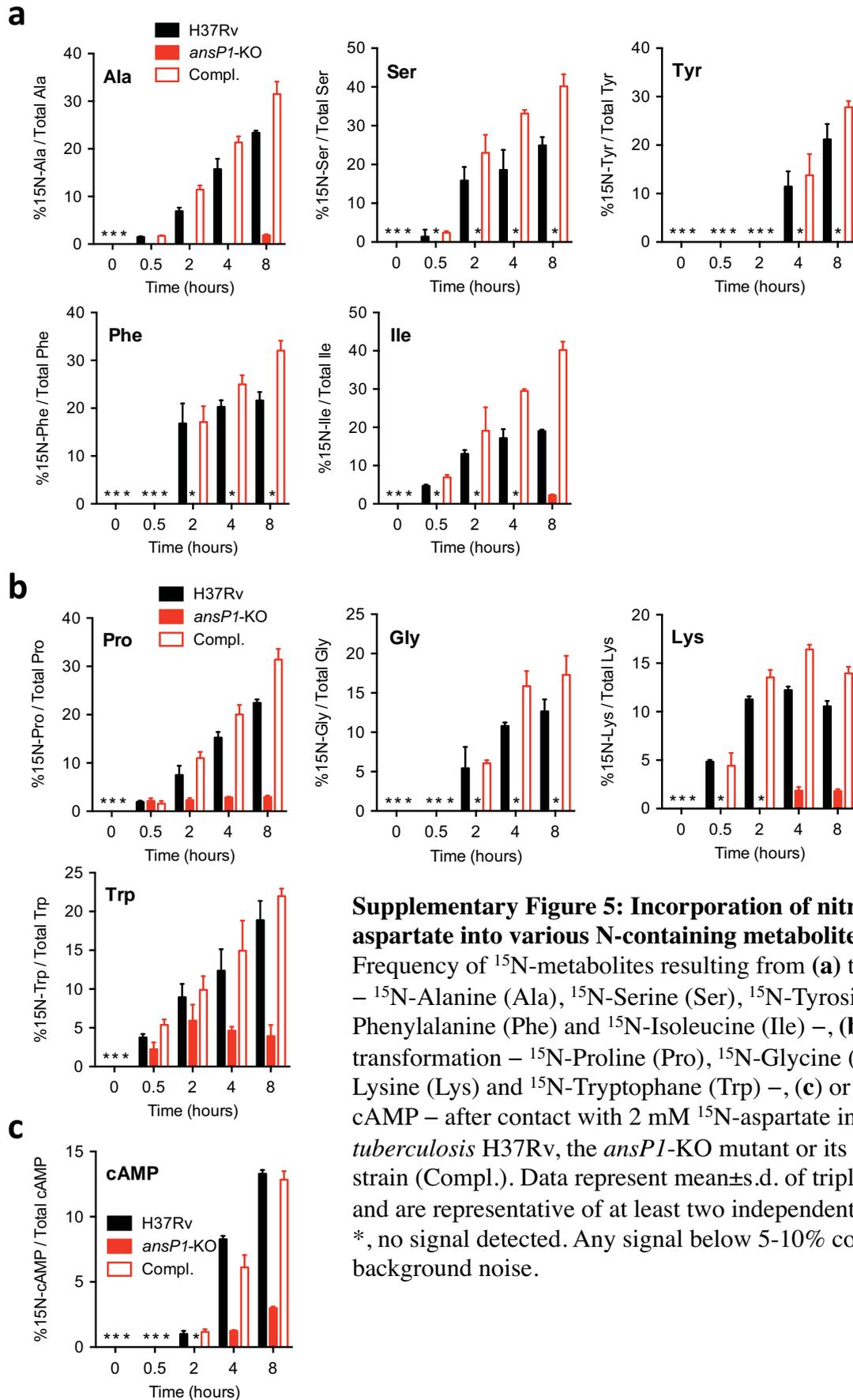
Supplementary Figure 3: Assimilation of U-¹³C isotopic-labeled aspartate.

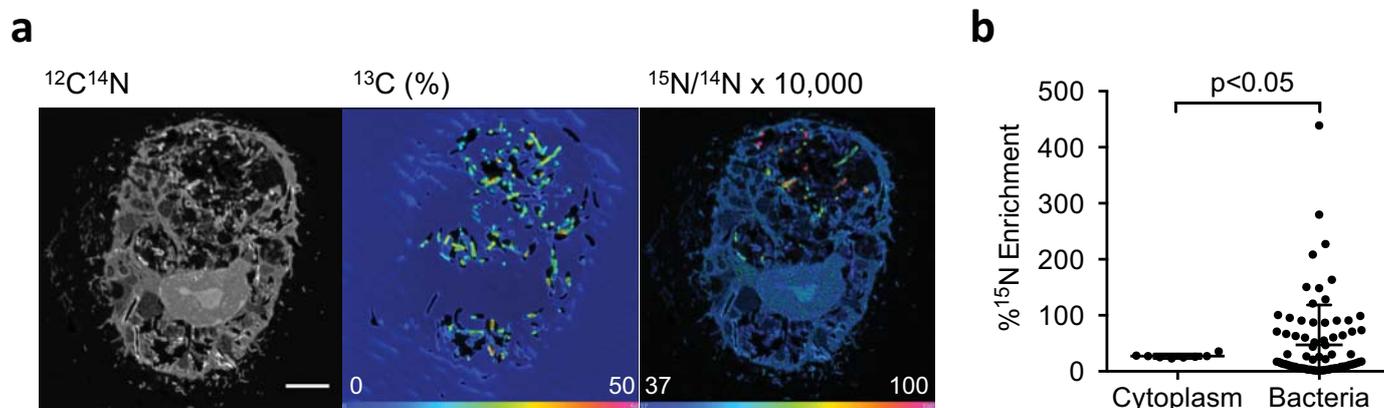
The figure shows isotopic incorporation of U-¹³C aspartate carbon into intracellular pool of selected metabolites (aspartate, lysine, α-ketoglutarate, glutamate, glutamine and serine), in the absence or presence of unlabeled glycerol. Isotopic labeling is indicated on the Y-axis as percentage of ¹³C incorporated at the indicated time points. U-¹³C-aspartate was provided at 2 mM and unlabeled glycerol at 10 g/L. Data represent mean±s.d. of three biological replicates.



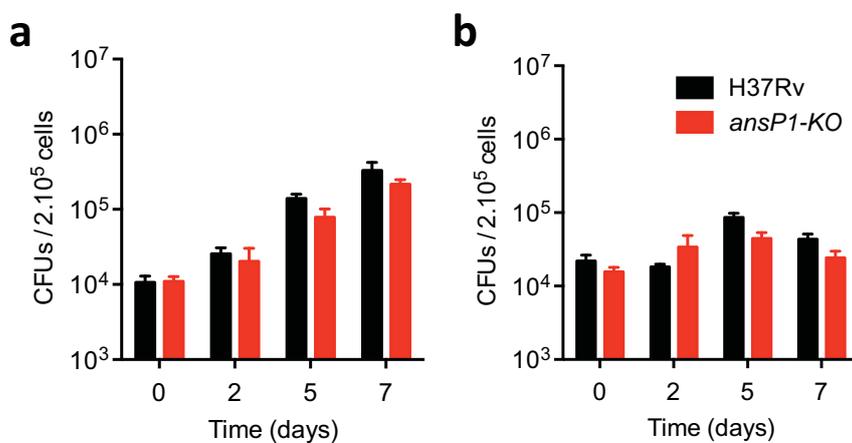
Supplementary Figure 4: Incorporation of nitrogen from asparagine into glutamine and glutamate.

(a) Illustrative plot showing representative chromatograms of natural and ^{15}N -labelled aspartate from *M. tuberculosis* metabolome. Nitrogen labelling is easily detected by accurate mass TOF. Extracted ion chromatograms of unlabelled aspartate (top panel) and [^{15}N]-aspartate (bottom panel). Left panels show time zero (no label in the media), and right panels show data for 3 hours exposure to media containing labeled aspartate. **(b)** Frequency of ^{15}N -glutamine and ^{15}N -glutamate after contact with 2 mM $^{15}\text{N}_2$ -asparagine in *M. tuberculosis* H37Rv, the *ansP1*-KO mutant, or its complemented strain (Compl.). Data represent mean \pm s.d. of triplicate samples and are representative of three independent experiments. *, no signal detected. Any signal below 5-10% corresponds to background noise.



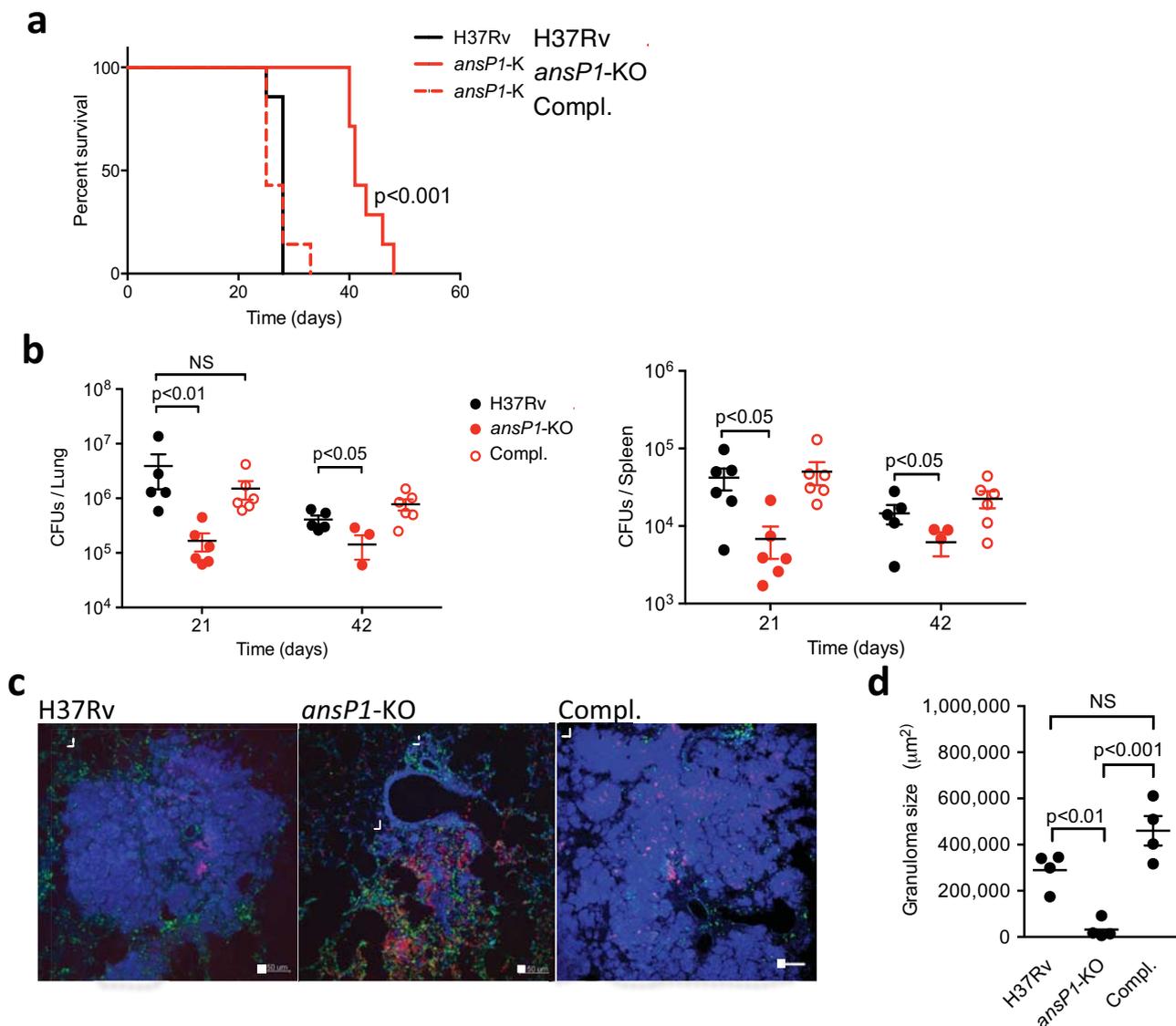


Supplementary Figure 6: Aspartate can access the mycobacterial phagosome in murine macrophages. (a) ^{13}C -labeled bacteria were used to infect mouse bone marrow-derived macrophages at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell for 4 hrs, after which cells were washed and pulsed with fresh medium. At 20 hrs post-infection, cells were pulsed for 4 hrs with 2 mM ^{15}N -aspartate, and ^{13}C and ^{15}N isotope compositions were analyzed by dynamic secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS). Images display a representative infected cell, as derived from NanoSIMS. Left panel is the as recorded $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ image showing the histological aspect of the cell (scale bar represents 5 μm). The central panel represents the ^{13}C atomic fraction map (in %) of the corresponding area, which allows the identification of the mycobacteria within the cell. The image is displayed in HSI (Hue-Saturation-Intensity) color scale with linear scale bar. Highly labeled bacteria appear purple, those moderately labeled in yellowish-green, all contrast with the natural background level in blue. The right panel, also displayed in HSI color scale, shows the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio image indicating the ^{15}N -aspartate uptake. For enhanced visibility, the ratio was multiplied by 1×10^4 . The $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio at natural ^{15}N abundance appears blue. (b) Quantification of ^{15}N isotope enrichment (compared to the resin) in surface areas chosen in the cell cytoplasm ($n=8$), and intracellular ^{13}C labeled bacteria ($n=82$). Data represent mean \pm s.d. and were analyzed using the Student's t test. The ^{15}N -enriched phagosomes, arbitrarily defined as those vacuoles with a ^{15}N enrichment above mean $+3$ s.d. of that observed in the host cell cytoplasm, represent 35.4% of all phagosomes.



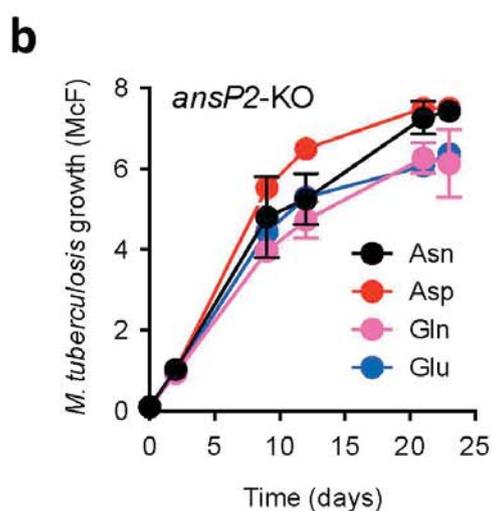
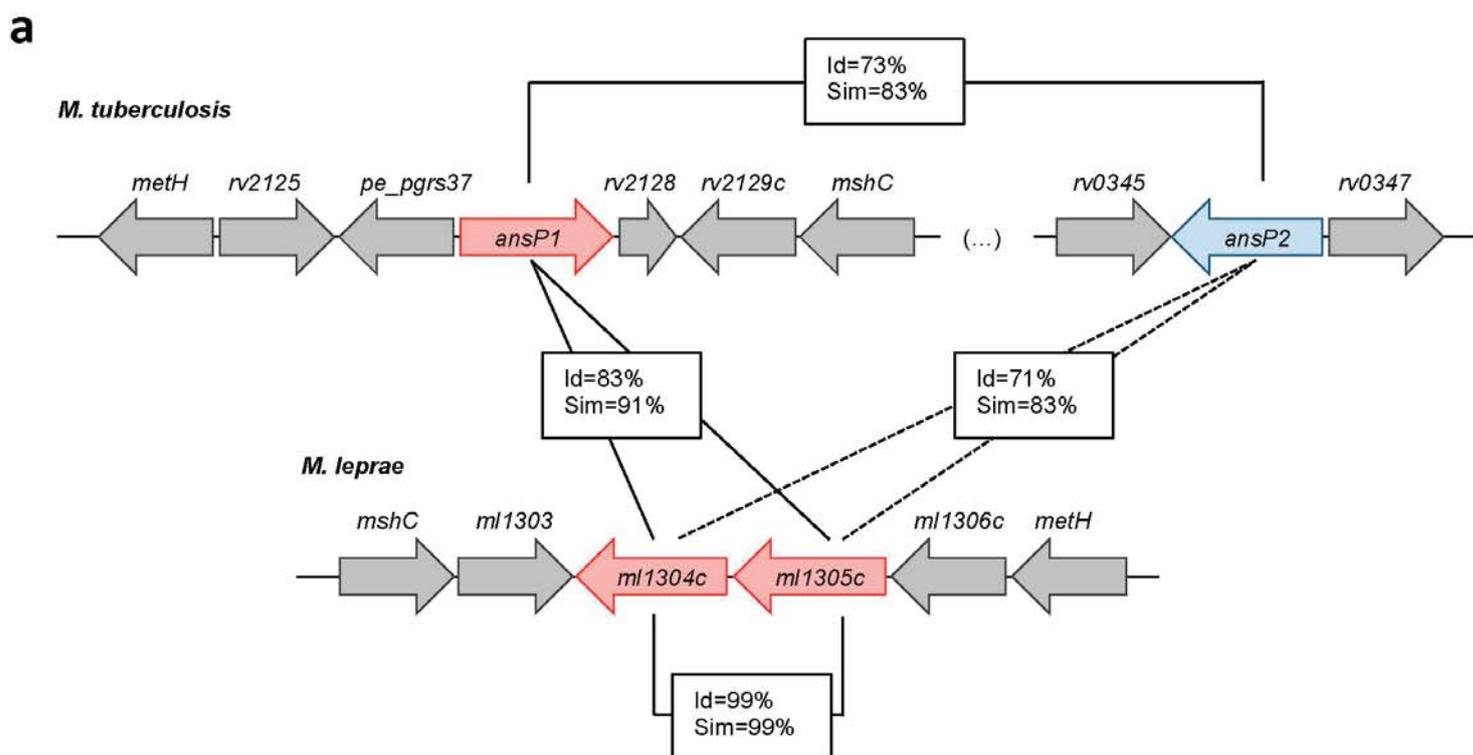
Supplementary Figure 7: The *ansP1-KO* mutant is not attenuated in murine macrophages.

Resting (left panel) or LPS- and IFN γ -activated (right panel) mouse bone marrow-derived macrophages were infected at a MOI of 0.1 bacterium/cell for 4 hrs, washed and chased with fresh medium for the indicated time. Cells were then lysed, and cell lysates were plated onto agar for CFU scoring. Data show mean \pm s.d., are representative of two independent experiments and were analyzed using the Student's *t* test. No significant difference was observed between the wild-type and the mutant strains under any conditions or time-points tested.



Supplementary Figure 8: AnsP1 is involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence.

(a) Immuno-deficient SCID mice ($n=7$) were infected intranasally with 500 CFUs of *M. tuberculosis* wild-type (H37Rv), the *ansP1-KO* mutant or its complemented strain (Compl.), and survival was monitored over time. Data are representative of two independent experiments, and were analyzed using the Kaplan-Meier method. (b) C57BL/6 mice were infected intranasally with 500 CFUs of *M. tuberculosis* wild-type (H37Rv), *ansP1-KO* or its complemented strain (Compl.). At day 21 and 42 after infection, the mice were sacrificed, and their lung and spleen homogenates were plated onto agar for CFU scoring. Each dot corresponds to one animal. Data were analyzed using the Student's *t* test and are representative of three independent experiments. (c) Immunohistological analysis of the lungs of C57BL/6 mice infected for 21 days with *M. tuberculosis* H37Rv (left panel), the *ansP1-KO* mutant (middle panel) or the complemented mutant (right panel). Images represent Z-stacks of 30 μm sections showing F4/80 in blue (macrophages), CD4 (T cells) in green and Gr1 in red (neutrophils, monocytes). Bar represents 100 μm (d) Granuloma size was calculated as the surface area occupied by F4/80 positive cells (dotted white lines in (c)) for 4 independent granulomas. Data were analyzed using the Student's *t* test. In (c) and (d), data are representative of two independent experiments. NS, not significant.



Supplementary Figure 9. Genetic organization of the *ansP* loci in *M. tuberculosis* and *M. leprae* and growth of an *ansP2-KO* mutant on various nitrogen sources.

(a) Genetic loci were retrieved from the Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) and Leproma (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>) servers. Gene homology was analyzed using the Blast program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). (b) Growth of *M. tuberculosis* H37Rv and the *ansP2-KO* mutant in minimal medium containing 5 mM asparagine (Asn), aspartate (Asp), glutamine (Gln) or glutamate (Glu) as sole nitrogen sources. Growth was measured by monitoring turbidity; data represent mean \pm s.d. of triplicate samples and are representative of at least three independent experiments.

B. L'asparagine : un acide aminé impliqué dans l'acquisition de l'azote et la résistance au stress acide chez *M. tuberculosis*.

Dans le but de caractériser le rôle du transporteur AnsP2 et de l'asparaginase AnsA pour l'utilisation de l'asparagine chez *M. tuberculosis*, nous avons construit des mutants dans ces gènes que nous avons nommés *ansP2-KO* et *ansA-KO*.

Nous avons pu démontrer que le transporteur AnsP2 est impliqué dans l'import de cet acide aminé ainsi que dans l'assimilation de son azote pour la synthèse de glutamine et de glutamate à pH physiologique (pH 7). Cependant, la croissance du mutant *ansP2-KO* en présence d'asparagine n'est pas altérée dans ces conditions. De façon intéressante, le mutant *ansP2-KO* est caractérisé par un retard de croissance, en présence d'asparagine à pH acide (pH 5,5). Ce phénotype est corrélé avec une capacité moindre du mutant à sécréter de l'ammoniaque ainsi qu'à neutraliser le pH acide du milieu de croissance. Ces résultats démontrent l'implication d'AnsP2 dans l'import de l'asparagine mais révèlent également l'existence d'autres transporteurs assurant l'import de cet acide aminé chez le bacille tuberculeux.

L'infection de macrophages murins ainsi que de souris immunocompétentes C57BL/6 a pu montrer que ce transporteur n'est pas nécessaire à la croissance du bacille durant l'infection. La présence de transporteurs d'asparagine autres qu'AnsP2 explique probablement l'absence de phénotype d'atténuation du mutant *ansP2-KO*.

Nous avons ensuite caractérisé la protéine AnsA et pu démontrer son activité asparaginase *in vitro* via son expression hétérologue chez la mycobactérie à croissance rapide *M. smegmatis*. Contrairement au mutant *ansP2-KO*, un mutant pour le gène *ansA* possède un défaut de croissance important à pH 7 en présence d'asparagine comme seule source d'azote. Cependant, on observe tout de même une croissance résiduelle du mutant dans ces conditions provenant probablement d'une activité de désamination non spécifique de l'asparagine. En revanche, la croissance du mutant *ansA-KO*, en présence d'asparagine est totalement abrogée à pH acide. Ce phénotype s'accompagne d'une absence de sécrétion d'ammoniaque par le mutant ainsi que d'une absence de neutralisation du pH du milieu de culture.

Par l'utilisation de techniques de métabolomique, nous avons pu montrer que le mutant *ansA-KO* accumule l'asparagine dans son cytoplasme en quantité très supérieure à celle retrouvée chez la souche sauvage. Par le suivi d'asparagine contenant des isotopes lourds de l'azote, nous avons pu

confirmer que l'assimilation de l'azote de cet acide aminé requiert AnsA, et ce notamment en conditions acides.

Afin d'évaluer l'implication du catabolisme de l'asparagine au cours de l'infection, nous avons ensuite procédé à des expériences d'infection de macrophages ainsi que de souris immunocompétentes C57BL/6 avec le mutant *ansA*-KO. Ces expériences ont pu révéler qu'AnsA participe à la multiplication du bacille tuberculeux à l'intérieur de macrophages murins activés ainsi que chez la souris.

Au vu du lien existant entre l'assimilation de l'asparagine et la résistance du bacille au stress acide, nous avons voulu évaluer l'implication éventuelle de cet enzyme dans la résistance de *M. tuberculosis* à l'acidification du phagosome. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'AnsA est requis pour limiter l'acidification du phagosome de *M. tuberculosis* à l'intérieur des cellules. De plus, la bafilomycine, un inhibiteur spécifique de la pompe à proton V-ATPase responsable de l'acidification des phagosomes, permet de restaurer la croissance du mutant à l'intérieur des macrophages, confirmant ainsi le rôle de AnsA dans la résistance du bacille au stress acide.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence que l'utilisation de l'asparagine, acquise en partie via le transporteur AnsP2 et assimilée via AnsA, est nécessaire à la nutrition du bacille et/ou sa résistance au stress acide durant son cycle infectieux. Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit actuellement en cours de révision pour publication dans *PLOS Pathogens*.

1 *Mycobacterium tuberculosis* exploits asparagine to assimilate
2 nitrogen and resist acid stress during infection

3

4 **Alexandre Gouzy^{1,2}, Gérald Larrouy-Maumus³, Alexia Dumas^{1,2}, Joshua B. Wallach⁴,**
5 **Renaud Poincloux^{1,2}, Dirk Schnappinger⁴, Luiz Pedro Sório de Carvalho³, Yannick**
6 **Poquet^{1,2} & Olivier Neyrolles^{1,2} ***

7

8 ¹Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale,
9 Toulouse, France

10 ²Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie
11 Structurale, Toulouse, France

12 ³Mycobacterial Research Division, MRC National Institute for Medical Research, London, UK

13 ⁴Department of Microbiology and Immunology, Weill Cornell Medical College, New York, New
14 York, United States of America

15

16 *E-mail: olivier.neyrolles@ipbs.fr

17

18

1 **Abstract**

2 *Mycobacterium tuberculosis* is a facultative intracellular pathogen. Within macrophages, *M.*
3 *tuberculosis* thrives in a specialized membrane-bound vacuole, the phagosome, whose pH is
4 slightly acidic and where access to nutrients is limited. Understanding how the bacillus
5 extracts and incorporates nutrients from its host may help develop novel strategies to combat
6 tuberculosis. Here we show *M. tuberculosis* employs the asparagine transporter AnsP2 and
7 the asparaginase AnsA to assimilate nitrogen and resist acid stress through asparagine
8 hydrolysis and ammonia release. While the role of AnsP2 is partially spared by yet to be
9 identified transporter(s), that of AnsA is crucial in both phagosome acidification arrest and
10 intracellular replication, as a *M. tuberculosis* mutant lacking this asparaginase is ultimately
11 attenuated in macrophages and immune-competent mice. Our study provides yet another
12 example of the intimate link between physiology and virulence in the tuberculosis bacillus,
13 and identifies a novel pathway to be targeted for therapeutic purposes.

14

15 **Author summary**

16 Tuberculosis (TB) is still responsible for nearly 1.5 million deaths annually. There is an
17 urgent need to identify novel drug targets in the tuberculosis bacillus, *Mycobacterium*
18 *tuberculosis*, in order to develop novel therapeutics to combat and possibly eradicate the
19 disease in the decades to come. To proliferate inside its human host, and ensure its spreading,
20 *M. tuberculosis*, like all pathogenic microorganisms, must adapt its nutritional requirements
21 and metabolism to the molecular environment it encounters during infection. Elucidating the
22 origin, nature, and acquisition mechanisms of the nutrients required by *M. tuberculosis* inside
23 its host may help identify targets for novel antimicrobials. In this study we asked how the TB
24 bacillus acquires nitrogen, a vital constituent of all living organisms, from host tissues. We
25 show the amino acid asparagine to be an important source of nitrogen for the bacillus, and we
26 identify two bacterial proteins, AnsP2 and AnsA, that allow the pathogen to capture and
27 ‘digest’ asparagine, respectively. In addition, we report asparagine ‘digestion’ allows the
28 pathogen to resist host immune defense and to survive inside host cells and tissues. This study
29 paves the way for future research into *M. tuberculosis* nitrogen metabolism, and for the
30 development of alternative therapeutic strategies to impair nitrogen acquisition by the bacillus
31 and treat patients with TB.

32

1 **Introduction**

2 With nearly 1.5 million lives claimed in 2011, as reported by the World Health
3 Organization, tuberculosis (TB) remains the major cause of death due to a single bacterial
4 pathogen. A better understanding of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis*, the
5 etiologic agent of TB, and its human host may help improve current therapies. In particular,
6 unraveling the microbial mechanisms involved in uptake and catabolism of host-derived
7 nutrients required by the pathogen during its life cycle may identify targets for novel
8 antimicrobials [1-3].

9 The TB bacillus is a facultative intracellular microorganism that thrives inside host
10 macrophages. Although *M. tuberculosis* can be found in the host cell cytosol [4-6], the
11 prevailing consensus is that the pathogen resides and multiplies mostly within phagosomes,
12 which fuse poorly with host cell lysosomes and poorly acidify (pH~6.5) [7-10]. In
13 macrophages activated by immune cell-derived cytokines, such as interferon (IFN)- γ , and
14 microbial ligands, such as lipopolysaccharide (LPS), the pH of the mycobacterial phagosome
15 drops below 5.5, and mycobacterial growth is constrained to some extent [8,11,12]. The
16 ability to block phagosome maturation and avoid lysosomal degradation is considered chief
17 among *M. tuberculosis* virulence strategies, although the molecular mechanisms involved in
18 this process are likely to be multiple and remain yet to be fully elucidated [10]. In addition to
19 being slightly acidic, the mycobacterial phagosome is considered an environment in which
20 nutrient availability is limited [1,3,13]. Such multiple stresses typically translate into a marked
21 remodeling of the mycobacterial transcriptional landscape soon after phagocytosis, as
22 supported, for example, by the induction of acid-responsive genes and those involved in
23 utilization of alternative carbon sources, such as host-derived fatty acids and cholesterol [14-
24 18]. Carbon metabolism reprogramming, in particular, appears instrumental in mycobacteria
25 adaptation to their host, and a number of studies identified major pathways used by *M.*
26 *tuberculosis* to gather carbon during infection [19-24].

27 In addition to carbon, nitrogen is an essential component of biomolecules, such as amino
28 acids, nucleotides and organic co-factors. However, the mechanisms by which nitrogen is
29 acquired by *M. tuberculosis* during infection remain poorly characterized. Here we report that
30 AnsP2 (AroP2/Rv0346c), a predicted asparagine transporter, and AnsA (Rv1538c), a
31 predicted asparaginase [25], allow asparagine uptake and subsequent deamination,
32 respectively. The hydrolysis of asparagine in turn allows *M. tuberculosis* to assimilate
33 nitrogen into downstream metabolites such as glutamate and glutamine. In parallel, this

1 system of asparagine acquisition supports the *in vitro* mycobacterial growth in acidic
2 conditions through ammonia release and pH buffering. Finally, we demonstrate that AnsA is
3 crucial for *M. tuberculosis* phagosome acidification arrest and intracellular survival in
4 macrophages, ultimately serving as a virulence factor in immune-competent mice.
5 Collectively, these results provide compelling evidence that asparagine is an important source
6 of nitrogen for *M. tuberculosis* during host colonization, and identify AnsA and the
7 asparagine transport complex as potential novel targets to be considered for therapeutic
8 purposes.

9

1 **Results**

2
3 **Asparagine catabolism plays a virulent role in *M. tuberculosis*.** Because asparagine is
4 known to be one of the best nitrogen sources used by *M. tuberculosis* in vitro [26,27], we
5 reasoned that the pathogen may have a transport system in place to scavenge asparagine from
6 its host. Among putative transporters, AnsP2 became an obvious candidate based on its high
7 primary sequence identity with the *Salmonella enterica* asparagine transporter AnsP (58%)
8 [28]. Moreover, *ansP2* expression is markedly induced in *M. tuberculosis* in the lungs of
9 patients with TB, which may reflect an important role for this putative transporter in a natural
10 setting [29]. We first performed a ¹⁴C-asparagine uptake experiment with wild-type *M.*
11 *tuberculosis* H37Rv and an *ansP2*-deficient mutant strain that we generated by
12 recombineering [30,31]. In agreement with the functional annotation of AnsP2, we found
13 asparagine transport was impaired in the mutant as compared to its wild-type counterpart (Fig.
14 1A). This phenotype was reversed upon genetic complementation of the mutant strain with an
15 integrative cosmid harboring the *ansP2* gene region (Fig. 1A), thus demonstrating the
16 implication of AnsP2 in asparagine uptake. Based on these results, we hypothesized the
17 *ansP2*-KO mutant should be affected in its ability to grow in the presence of asparagine as
18 sole nitrogen source. Surprisingly, we found the mutant multiplied equally to the wild-type
19 strain under this condition (Fig. 1B), indicating the reduced amount of asparagine imported by
20 the mutant strain (Fig. 1A) was nevertheless sufficient to promote bacterial growth. Moreover,
21 the *ansP2*-KO mutant failed to be attenuated in immune-competent mice (Fig. 1C).
22 Altogether, while these results identify AnsP2 as an asparagine transporter in *M. tuberculosis*,
23 they also allude to the presence of additional transporter(s) responsible for the uptake of this
24 amino acid.

25 Once asparagine is scavenged by the bacillus, we inferred it must undergo an assimilation
26 process carried out by amidase enzymes called asparaginases, which hydrolase this amino
27 acid into aspartate and ammonia. Indeed, asparaginase activity was described several decades
28 ago in lysates of various mycobacteria species, including *M. tuberculosis* [32,33]. In the *M.*
29 *tuberculosis* genome, a unique gene by the name of *ansA* is predicted to encode an
30 asparaginase [25], and whose homologue was recently proven to hydrolyze asparagine *in vitro*
31 in the closely related attenuated vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG [34]. Building upon
32 these observations, we decided to produce and purify a recombinant HIS₆-tagged version of
33 AnsA in the *M. tuberculosis*-related fast grower *Mycobacterium smegmatis* in order to
34 evaluate its asparaginase activity. The recombinant enzyme, with a predicted molecular

1 weight of 34 kDa, was immuno-detected both in total bacterial lysate and after purification on
2 a nickel column using an appropriate anti-HIS₆ antibody (Fig. 1D). The ability of recombinant
3 AnsA to hydrolyze asparagine was then assessed in a coupled enzymatic reaction in which the
4 ammonia generated after asparagine deamination is used in a secondary reaction to form
5 glutamate via a NADPH-dependent glutamate dehydrogenase. Disappearance of NADPH was
6 followed as a marker of asparagine consumption in the reaction mixture, and revealed that
7 AnsA mediates asparagine hydrolysis (Fig. 1E). By contrast, we found AnsA could not
8 hydrolyze glutamine (Fig. 1E), indicating the enzyme is void of any glutaminase activity
9 frequently associated to asparaginases [30,35].

10 Since AnsA is the only predicted asparaginase in *M. tuberculosis* [25], as opposed to the
11 case for other bacteria such as *E. coli* [36], we deduced that the genetic inactivation of AnsA
12 should have a significant impact on asparagine metabolism in this species. Given that *ansA* is
13 thought to be essential in *M. tuberculosis* [24], we designed a conditional inactivation strategy
14 to knock this gene out [37] (Fig. S1). Unexpectedly, we could readily generate a viable *ansA*-
15 KO mutant strain, revealing *ansA* is not essential in *M. tuberculosis*. The apparent
16 contradiction between the observed viability of the mutant and the predicted essentiality can
17 be reconciled by the use of asparagine as the main nitrogen source in the culture medium, the
18 condition employed for transposon mutant screening and gene essentiality testing [24].
19 Consistent with this assumption, and with the obtained enzymatic activity of AnsA *in vitro*,
20 we found the growth of the *ansA*-KO mutant was impaired, although not abolished, when
21 asparagine was provided as sole nitrogen donor (Fig. 1F). It is likely that the remaining
22 minimal growth of the mutant observed under this condition is due to residual asparagine
23 deamination mediated by other yet to be identified amidases present in *M. tuberculosis*. As a
24 control, the *ansA*-KO mutant replicated equally to the wild-type strain in the presence of
25 another nitrogen source, such as glutamate (Fig. S2), evidencing that *ansA* inactivation does
26 not lead to general growth defects. Equally important, we found the *ansA*-KO mutant was
27 impaired in host tissue colonization (Fig. 1G), thus revealing an unprecedented role of
28 asparagine catabolism in *M. tuberculosis* virulence.

29

30 **AnsP2 and AnsA are involved in nitrogen incorporation from asparagine in *M.***
31 ***tuberculosis*.** The results above suggested *M. tuberculosis* exploits asparagine from host
32 tissues during infection to support growth. In agreement with previous studies reporting
33 asparagine is a preferred source of nitrogen in *M. tuberculosis* [26,27], we found this amino
34 acid does not support mycobacterial growth when provided as sole carbon and energy source

1 (Fig. S3). To further understand the role of asparagine assimilation in *M. tuberculosis*, we
2 used targeted metabolomics to follow nitrogen incorporation in the *ansP2*- and *ansA*-KO
3 mutants during growth on ¹⁵N-labeled asparagine. As compared to wild-type *M. tuberculosis*,
4 we found the *ansP2*-KO mutant was impaired in nitrogen incorporation from asparagine into
5 other amino acids, such as glutamate and glutamine, which serve as initial nitrogen providers
6 in the central nitrogen metabolism; this phenotype was reversed upon genetic
7 complementation with a functional *ansP2* allele (Fig. 2A). Strikingly, total asparagine content
8 of the *ansA*-KO strain at the steady state in a medium containing asparagine as sole nitrogen
9 provider was found ~1,000-fold higher than in its wild-type and complemented counterparts
10 (Fig. 2B), a likely consequence arising from the impaired asparagine catabolism in the
11 mutant. In line with this hypothesis, the amounts of total (Fig. 2B), as well as newly
12 synthesized (Fig. 2C), glutamate and glutamine were reduced in the mutant strain, further
13 evidencing a clear impairment of nitrogen incorporation from asparagine into downstream
14 metabolites in the absence of AnsA. Of notice, nitrogen assimilation from asparagine was not
15 completely abolished in the *ansA*-KO mutant, and this phenotype paralleled the residual
16 growth of the mutant in the presence of asparagine reported above (Fig. 1F). Altogether, these
17 results reveal that asparagine-derived nitrogen is fully assimilated in *M. tuberculosis*, and that
18 AnsP2 and AnsA are involved in this process.

19

20 **Asparagine catabolism in *M. tuberculosis* mediates resistance to acid stress and**
21 **intracellular survival.** A recent study reported asparagine is the best among the few amino
22 acids that can support *M. tuberculosis* resistance to acid stress [38]. This feature most likely
23 relies on the specific release of the weak base ammonia and subsequent pH buffering that
24 accompany asparagine consumption [38]. Building upon this observation, we found the
25 growth of the *ansP2*-KO strain in the presence of asparagine, as sole nitrogen provider, was
26 greatly reduced at pH 5.5 as compared to the wild-type and complemented strains (Fig. 3A).
27 This phenotype correlated with a markedly diminished capacity of the mutant to secrete
28 ammonia and neutralize pH of the culture medium (Fig. 3B,C). In the same conditions,
29 however, the phenotypes of the *ansA*-KO mutant were even more pronounced. Indeed,
30 mycobacterial growth, asparagine-mediated ammonia secretion and pH buffering were totally
31 abolished in the absence of AnsA (Fig. 3D-F). In line with this result, nitrogen assimilation
32 from asparagine into glutamate and glutamine was fully abrogated in the *ansA*-KO mutant at
33 acidic pH (Fig. S4). Collectively, these results unequivocally demonstrate that, in particular in

1 an acidic environment, asparagine catabolism partially requires AnsP2 and is strictly
2 dependent on AnsA to sustain *M. tuberculosis* growth in the presence of asparagine.

3 We next evaluated to what extent the sensitivity of our mutants to acid stress may impact
4 their ability to survive in an acidic phagosome and to parasitize host macrophages. On the one
5 hand, the *ansP2*-KO mutant was found not affected in its ability to survive in IFN γ - and LPS-
6 activated mouse bone marrow-derived macrophages (BMMs), in which the pH of the
7 mycobacterial phagosome readily drops below 5.5 ([8] ; Fig. S5). This result correlates with
8 the remaining amount of ammonia secretion observed in this mutant (Fig. 3B). On the other
9 hand, the intracellular survival of the *ansA*-KO strain was strongly impaired in activated
10 BMMs (Fig. 3G). Strikingly, labeling of infected cells with the acidotropic dye LysoTracker
11 at early time-points after infection revealed that the phagosomes harboring the *ansA*-KO
12 mutant acidified more readily compared to those containing the wild type or complemented
13 strains (Fig. 3H,I). Consistent with these observations, treatment of BMMs with bafilomycin
14 A1, a specific V-ATPase inhibitor preventing phagosome acidification [39], restored the
15 ability of the *ansA*-KO mutant to multiply intracellularly (Fig. 3J).

16 Collectively, this study puts forward an acquisition system for asparagine that not only
17 protects against phagosomal acidification, but also serves to assimilate nitrogen from this
18 amino acid, with a central role for the asparaginase AnsA in enhancing the fitness of *M.*
19 *tuberculosis* during host colonization.

20

21 **Discussion**

22 Identifying the nutrients used by *M. tuberculosis* to assimilate essential elements, such as
23 carbon and nitrogen, is key to understanding host-pathogen interactions in TB. Here we show
24 asparagine can serve as a source of nitrogen for the pathogen through transport by the amino
25 acid permease AnsP2, and subsequent hydrolysis by the asparaginase AnsA. Furthermore, our
26 results establish a unique link between mycobacterial physiology and virulence since we show
27 AnsA has a dual function in both nitrogen assimilation and in protection against acid stress
28 inside host cells (Fig. 4).

29 Regarding asparagine uptake in *M. tuberculosis*, it is clear from the present study that one
30 or more transporter(s) complement the function of AnsP2, since the *ansP2*-KO mutant was
31 only partially impaired in nitrogen incorporation from asparagine *in vitro*, and it was not
32 attenuated inside host cells and *in vivo*. The AnsP2 paralogue AnsP1 is an obvious candidate
33 to fulfill this function [25]. Two other putative amino acid transporters, namely

1 CycA/Rv1704c and GabP/Rv0522 [25], show some similarity with AnsP2 and may contribute
2 to asparagine transport. The construction of multiple mutants inactivated in two or more of
3 these candidates will be required in order to uncover the complete asparagine transport
4 machinery in *M. tuberculosis*. Nevertheless, our results identify AnsP2 as a major asparagine
5 transporter in *M. tuberculosis*, in particular at acidic pH.

6 Beyond the complexity of asparagine uptake, further efforts should be allocated to decipher
7 the exact contribution of AnsA to mycobacterial virulence. Whether attenuation of the *ansA*-
8 KO mutant is due to either or both its inability to counteract phagosome acidification or to
9 incorporate nitrogen from asparagine resulting in an impaired fitness will require careful
10 investigation. In this context, it is worth noticing that, like AnsA, another mycobacterial
11 hydrolase, namely the urease, was proposed to play a part both in nitrogen acquisition and in
12 counteracting phagosome acidification through hydrolysis of urea and subsequent release of
13 ammonia [40-42]. However, unlike for AnsA, mycobacterial mutants deficient in urease
14 production are barely impaired in intracellular survival and their capacity to persist or
15 multiply in vivo is not affected [40-42].

16 Finally, a role for asparaginase in virulence of other bacterial pathogens, including
17 *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella typhimurium*, has been reported
18 [43-47]. In these species, asparaginase is secreted into the periplasm and is thought to
19 contribute to host colonization either through direct microbial asparagine utilization in vivo
20 [43], or through indirect starvation-mediated exhaustion of immune cells following asparagine
21 depletion in infected tissues [44-47]. The *M. tuberculosis* asparaginase AnsA does not contain
22 any detectable signal sequence in its N-terminus. Yet, we cannot exclude the enzyme could be
23 secreted through an alternative, Sec-independent pathway, as reported for other secreted
24 mycobacterial enzymes, such as the superoxide dismutase SodA and the catalase KatG, which
25 also lack a classical signal sequence [48]. Strikingly, *M. tuberculosis* AnsA is more similar to
26 the periplasmic asparaginase AnsB than to the cytosolic enzyme AnsA from *E. coli* (35% vs.
27 28% identity, respectively) [36], suggesting AnsA might be a secreted asparaginase in *M.*
28 *tuberculosis*. Should this be the case, it is tempting to speculate that AnsA may also contribute
29 to T cell impairment through local nutrient deprivation in TB lesions, as reported in
30 *Salmonella* infection [44].

31 In conclusion, our study provides yet another example of the tight connections forged
32 throughout evolution between physiology and virulence in microbial pathogens. It also
33 highlights the need to further explore the expanding field of metabolism and infection in order
34 to accelerate the identification and validation of novel strategies to combat infections.

1 **Materials & Methods**

2 **Mycobacteria and culture conditions**

3 Mycobacteria were grown at 37°C in Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with
4 10% albumin-dextrose-catalase (ADC, Difco) and 0.05% Tween-80 (Sigma), or on
5 Middlebrook 7H11 agar medium (Difco) supplemented with 10% oleic acid-albumindextrose-
6 catalase supplement (OADC, Difco). When required, kanamycin, hygromycin, streptomycin
7 (50 µg/mL) or zeocin (25 µg/mL) were added to the culture media. For growth tests with
8 asparagine as a carbon source, bacteria were grown in Sauton's modified medium (pH 6.5-
9 7.0) containing, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 50 mM asparagine, 0.05% tyloxapol
10 (Sigma) and supplemented with or without 10 g/L glycerol and 15 mM (NH₄)₂SO₄. For
11 growth tests with asparagine as sole nitrogen source, bacteria were grown in Sauton's
12 modified medium containing 0.05% Tween-80, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 2 g/L citric
13 acid, 10 g/L glycerol and 5 mM asparagine prepared in tap water and neutralized to pH 7.0 or
14 pH 5.5 with NaOH before autoclaving. Cultures were performed in triplicate in glass tubes
15 and bacterial growth was monitored measuring turbidity (in McFarland units) over time using
16 a Densimat apparatus (BioMerieux).

17 **Construction of *ansP2*-KO and *ansA*-KO mutants and complemented strains**

18 The *ansP2*-KO mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv containing a disrupted
19 *ansP2* (Rv0346c)::KanR allele was constructed by allelic exchange using recombineering
20 [30,31]. H37Rv:pJV53 was grown in 7H9-ADC-Tween 80 in the presence of hygromycin
21 until mid-log phase and expression of the recombineering enzyme was induced by 0.2%
22 acetamide (Sigma) overnight at 37°C. After induction, electrocompetent bacteria were
23 prepared. Electroporation was performed with a linearized fragment of a kanamycin
24 resistance cassette-interrupted *ansP2* gene flanked with homologous regions (400-500 bp
25 length). After 72 h incubation at 37°C, bacteria were plated onto 7H11-OADC agar medium
26 in the presence of kanamycin. For the complementation of the *ansP2*-KO strain, we used the
27 pYUB412-derived integrative cosmid I541 encompassing the region 398 to 432 kbp in the
28 genome of *M. tuberculosis* H37Rv, which contains a hygromycin resistance cassette. For the
29 *ansA*-KO strain construction, a second copy of the *ansA* gene was first integrated in the
30 chromosome of wild type H37Rv at the bacteriophage insertion site *attL5*. For this, we used
31 the plasmid pGMCS-Puv15-*ansA* which contains the *ansA* gene under the control of the
32 Psmyc promoter and a streptomycin resistance cassette[49]. After selection of streptomycin
33 resistant clones, the original *ansA* gene was disrupted using a linearized digestion fragment of

1 kanamycin resistance cassette-interrupted *ansA* gene flanked with homologous regions (450-
2 600 bp length). The additional copy of *ansA* was then deleted by replacing pGMCS-Puv15-
3 *ansA* with the plasmid pGMCZq17, which contains a zeocine resistance cassette. Selection of
4 a zeocin resistant clone resulted in an *ansA*-KO strain and proved that *ansA* is not essential.
5 For complementation of the *ansA*-KO strain, the pYUB412-derived integrative cosmid I16
6 encompassing the region 1,719 to 1,756 kbp in the genome of *M. tuberculosis* H37Rv, and
7 containing a hygromycin resistance cassette was used.

8 **¹⁴C-Asparagine uptake experiment**

9 Asparagine uptake experiments were carried out as described elsewhere with minor
10 modifications [38]. Briefly, bacteria were grown in Middlebrook 7H9 containing 0.05%
11 Tween 80 and asparagine (5 mM) at 37°C. Bacteria were harvested by centrifugation when an
12 OD₆₀₀~0.5 was reached. Bacterial pellets were washed twice in uptake buffer [50 mM Tris-
13 HCl pH 6.9, 15 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.05% Tween 80] and resuspended in the same
14 buffer. Radiolabeled ¹⁴C-asparagine (PerkinElmer) and non-labeled asparagine (Sigma) were
15 mixed (3:1) and added to 5 mL of cell suspensions to obtain a final concentration of 20 μM
16 asparagine. The mixtures were incubated at 37°C and 250 μL of samples were removed at the
17 indicated time points. Bacteria were collected on a 0.45 μm Spin-X centrifuge tube filter
18 (Costar) by mixing with an equal volume of 10% paraformaldehyde (Polyscience, Inc)
19 containing 0.1 M LiCl (Sigma). Filters radioactivity was determined in a liquid scintillation
20 counter (Packard). The uptake rate was expressed in desintegration per minute (DPM) per
21 total protein concentration (¹⁴C-Asn (DPM).μg protein⁻¹).

22 **Ammonium and pH measurement**

23 Bacteria were grown in supplemented 7H9 with 0.05% Tween-80 until OD₆₀₀~1. 10 mL of
24 cultures were removed and washed twice with DPBS and used for inoculation of 200 mL
25 Sauton's modified medium containing 0.05% Tween-80, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄, 2
26 g/L citric acid, 10 g/L glycerol and 5 mM asparagine prepared in tap water and buffered to pH
27 5.5 with NaOH before autoclaving. Bacteria were incubated at 37°C and, at indicated time
28 points, 1 mL of culture was removed and centrifuged at 1,300 rpm for 2 min to collect
29 supernatants. To determine ammonium concentration, supernatants were diluted 4-fold in
30 DPBS and 50 μL of diluted samples were mixed in a 96 plate with 50 μL of Nessler's reagent
31 (Fluka) and incubated for 20 min at room temperature. 100 μL of NaOH were then added to
32 stop the reaction prior to measurement of OD₅₂₀ using a μQuant apparatus (BIO-TEK
33 instruments, Inc).

1 **Expression, purification and measure of enzymatic activity of recombinant HIS₆-tagged**

2 **AnsA**

3 The *ansA* gene was cloned into a pVV16 vector allowing the constitutive expression of C-
4 terminus HIS₆-tagged fusion proteins under the control of a GroEL2 promoter and carrying
5 kanamycin and hygromycin resistance cassettes. The pVV16 *ansA-his₆* vector was
6 electroporated into the non-pathogenic fast-grower *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strain
7 and clones containing pVV16 *ansA-his₆* were selected on solid medium containing kanamycin
8 and hygromycin.

9 At OD₆₀₀~1,5, 15 mL of cultures were centrifuged and washed with DPBS and bacteria were
10 resuspended in 1 mL of lysis buffer containing 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300mM NaCl and
11 10 mM imidazole and broken with glass beads (0.1-0.25 mm) for 10 min at 30 m/s using a
12 Bead Beater apparatus (Retscher, BioBrock scientific). AnsA-HIS₆ protein was purified from
13 600 µL of lysates using the Ni-NTA Spin kit (QIAGEN) and eluted in an elution buffer
14 containing 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl and 400 mM imidazole at pH 8. AnsA-HIS₆
15 purified fraction was quantified using the Bradford method. Total lysates and AnsA-HIS₆
16 purified fractions were denatured in the presence of SDS, heated at 95 °C for 5 min and
17 separated along a 12% acrylamide SDS-PAGE gel (Invitrogen). Proteins were then
18 transferred onto a nitrocellulose membrane using iBlot Transfer Stacks (Invitrogen) and the
19 apparatus iBLOT™ (Invitrogen). The membrane was saturated with DPBS/0.1% Tween
20 20/5% milk for 1 h and then incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-histidine
21 tag antibody (eBioscience, 1/1,000 dilution). After 3 washes with DPBS/0,1% Tween 20, the
22 membrane was incubated for 1 h with a donkey polyclonal anti-rabbit antibody coupled with
23 Horseradish Peroxidase (eBioscience, 1/10,000 dilution). After 3 washes with DPBS, the
24 AnsA-HIS₆ protein was detected by chemiluminescence reaction using ECL™ Prime Western
25 Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

26 For enzymatic tests, we used the L-Asparagine/L-Glutamine/Ammonia ASSAY KIT
27 (Megazyme) following manufacturer's recommendaitons. Enzymatic activities were
28 measured by following the disappearance of NADPH along time as an indirect indication of
29 asparagine deamination at 340 nm using a SAFAS Monaco mc² spectrophotometer and the
30 SAFAS SP 2000 software.

31 **Metabolite extraction experiments**

32 Bacteria were cultivated to an OD₆₀₀ of 1 in 7H9-0.05% Tween-80. Bacteria were centrifuged
33 and resuspended in DPBS (3-fold concentration). 1 mL was transferred to a filter (Fisher)
34 mounted on a filtration device (Fisher) and connected to a trap and vacuum line. Filters were

1 transferred to a 7H10 based agar medium (Sigma) supplemented with asparagine (2 mM) or
2 to solid media containing 0.5 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 2 g/L citric acid, 10 g/L glycerol,
3 aspartate (2mM) and 1.5% agar (Invitrogen) prepared in tap water and neutralized to pH 6.5-
4 7.0 with NaOH before autoclaving. Plates were incubated for 5 days at 37°C. Three filters
5 were used per strain and time point. For labeling experiments, filters were transferred on
6 equivalent plates where aspartate was replaced by $^{15}\text{N}_2$ -asparagine (2 mM, Sigma, Purity 98
7 atom % ^{15}N) and incubated for 0.5, 2, 4 or 8 h at 37°C. At each time point, filters were
8 plunged into 1 mL acetonitrile/methanol/water (2:2:1, v/v/v) mixture at -40°C. Bacteria were
9 then broken by glass beads using a bead-beater (5 min at 30 m/s). After centrifugation,
10 supernatants were collected and filtered through a Spin-X column 0.2 μm at 14,000 rpm for
11 15 min. Extracts were stored at -80°C before analysis.

12 **Liquid chromatography-mass spectrometry**

13 Aqueous normal phase liquid chromatography was performed using an Agilent 1200 LC
14 system equipped with a solvent degasser, binary pump, temperature-controlled auto-sampler
15 (set at 4°C) and temperature-controlled column compartment (set at 20°C), containing a
16 Cogent Diamond Hydride Type C silica column (150 mm \times 2.1 mm; dead volume 315 μl),
17 from Microsolv Technology Corporation. Flow-rate of 0.4 ml/min was used. Elution of polar
18 metabolites was carried out using gradient 3[50]. Briefly, solvent A consists in deionized
19 water (Resistivity \sim 18 M Ω cm), 0.2% acetic acid and solvent B consists in acetonitrile and
20 0.2% acetic acid, and the gradient as follows: 0 min 85% B; 0-2 min 85% B; 2-3 min to 80%
21 B; 3-5 min 80% B; 5-6 min to 75% B; 6-7 min 75% B; 7-8 min to 70% B; 8-9 min 70% B; 9-
22 10 min to 50% B; 10-11 min 50% B; 11-11.1 min to 20% B; 11.1-14 min hold 20% B.
23 Accurate mass spectrometry was carried out using an Agilent Accurate Mass 6230 TOF
24 apparatus. Dynamic mass axis calibration was achieved by continuous infusion, post-
25 chromatography, of a reference mass solution using an isocratic pump connected to a
26 multimode ionization source, operated in the positive-ion mode. ESI capillary and fragmentor
27 voltages were set at 3,500 V and 100 V, respectively. The nebulizer pressure was set at 40 psi
28 and the nitrogen drying gas flow rate was set at 10 L/min. The drying gas temperature was
29 maintained at 250°C. The MS acquisition rate was 1.5 spectra/sec and m/z data ranging from
30 80-1,200 were stored. This instrument routinely enabled accurate mass spectral measurements
31 with an error of less than 5 parts-per-million (ppm), mass resolution ranging from 10,000-
32 25,000 over the m/z range of 121-955 atomic mass units, and a 100,000-fold dynamic range
33 with picomolar sensitivity. Data were collected in the centroid mode in the 4 GHz (extended
34 dynamic range) mode. Detected m/z were deemed to be identified metabolites on the basis of

1 unique accurate mass-retention time identifiers for masses exhibiting the expected distribution
2 of accompanying isotopomers (21035735). Typical variation in abundance for most of the
3 metabolites stayed between 5 and 10% under these experimental conditions.

4 **¹⁵N-labeling analysis**

5 Under the experimental conditions described above, M+1 arising from ¹⁵N incorporation can
6 be readily distinguished from M+1 arising from natural abundance ¹³C, therefore allowing
7 direct monitoring of ¹⁵N labeling. The extent of ¹⁵N labeling for each metabolite was
8 determined by dividing the summed peak height ion intensities of all ¹⁵N labeled species by
9 the ion intensity of both labeled and unlabeled species, expressed in percent.

10 **Macrophages & infection procedure**

11 Bone marrow cells were flushed from the femurs and tibiae of 6-8 weeks old female C57BL/6
12 mice, and cultured in Petri dishes (2.10⁶ cells/dish) in RPMI 1640 GlutaMax (GIBCO)
13 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Pan-Biotech) and 20 ng/mL macrophage
14 colony-stimulating factor (M-CSF, Peprotech) at 37°C in the presence of 5% CO₂. At day 6,
15 cells were transferred to 24-well plastic plates (2.10⁵ cells/well). For macrophage activation,
16 cells were incubated with 10 ng/mL interferon gamma (IFN γ , Peprotech) and 5 ng/mL LPS
17 (Invivogen) overnight prior to infection. Infection was performed in triplicate at a multiplicity
18 of infection of 0.1 bacterium per cell for 4 h at 37°C. Cells were then washed 2 times with
19 DPBS before addition of fresh medium. At day 0, 2 and 5, cells were lysed in 0.01% Triton
20 X-100 (Sigma), and serial dilutions of the lysates were plated onto 7H11-OADC agar medium
21 for CFU scoring. For infection experiments using Bafilomycin A1 (Sigma), cells were pre-
22 incubated 1 h with 100 nM bafilomycin A1 prior to infection and removed at 24 h post-
23 infection.

24 **Confocal Microscopy**

25 Murine macrophages were prepared as described above, plated after 6 days of differentiation
26 on cover glasses at 2.10⁵ cells/well in a 24-well plates, and activated with IFN γ (10 ng/mL)
27 and LPS (5 ng/mL) overnight prior to infection. 10 mL of bacteria grown until OD₆₀₀ of 1 in
28 complete 7H9 were centrifuged for 7 min at 4,000 rpm, and washed two times with 20 mL
29 DPBS. For bacteria labeling, pellets were suspended in 250 μ L of Alexa Fluor 488
30 succinimidyl ester (Fisher) (1.5 μ L Alexa Fluor 488 in 248.5 μ L DPBS) and incubated at
31 room temperature for 45 min. Bacteria were then washed two times with 20 mL DPBS and
32 disaggregated manually for 30 sec with sterile glass beads. Bacteria were then resuspended in
33 7 mL of complete RPMI and centrifuged for 5 min at 1,200 rpm to remove aggregates. The
34 OD₆₀₀ of bacterial suspensions was then measured to determine the number of bacteria. Cells

1 were infected at an MOI of 10 bacteria/cell for 1 h at 37°C and washed two times with DPBS
2 before addition of fresh medium. After 1 and 3 h infection, cells were stained with 1 µM
3 LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes) in complete RPMI for 1 h, washed with DPBS
4 and fixed for 2 h with PFA 4% at room temperature. Cover glasses were then mounted on
5 glass slides using a VECTASHIELD Hardset Mounting Medium with DAPI (Cliniscience)
6 and stored overnight at 4°C. Images were acquired with an LSM710 microscope equipped
7 with a 40x 1.30 NA objective (Carl Zeiss, Inc.), recorded with Zen software (Carl Zeiss, Inc.),
8 and analyzed with ImageJ software. All images were acquired with the same confocal
9 microscope settings. The LysoTracker signal intensity of every phagosome was measured
10 with ImageJ software and the same threshold was applied for each condition to count the
11 proportions of LysoTracker-positive phagosomes. See Figure 3 for examples of phagosomes
12 that were considered positive for LysoTracker. Quantification of LysoTracker-positive
13 phagosomes was realized for at least 100 phagosomes per condition.

14 **Mouse infection**

15 All animal experiments were performed in animal facilities that meet all legal requirements in
16 France and by qualified personnel in such a way to minimize discomfort for the animals. All
17 procedures including animal studies were conducted in strict accordance with French laws
18 and regulations in compliance with the European community council directive 68/609/EEC
19 guidelines and its implementation in France. All protocols were reviewed and approved by the
20 Comité d'Ethique Midi-Pyrénées (reference MP/04/26/07/03). Six- to eight-week-old female
21 C57BL/6 mice were anesthetized with a cocktail of ketamine (60 mg/kg; Merial) and xylazine
22 (10 mg/kg; Bayer) and infected intranasally with 1,000 CFUs of the various mycobacterial
23 strains in 25 µL of PBS-0.01% Tween 80. At 21 days post-infection, five mice per strain
24 tested were sacrificed and lung and spleen homogenates were plated onto 7H11 agar plates for
25 CFU scoring.

26

27 **Acknowledgments**

28 We thank Geanncarlo Lugo-Villarino, Alan Bénard, Denis Hudrisier and Claude Gutierrez for
29 reading the manuscript and helpful suggestions. We thank Laurence Lepourry and Flavie
30 Moreau for technical assistance with mouse infections. We thank Roland Brosch for
31 providing the I541 and I16 cosmids. This work was supported by *Agence Nationale de la*
32 *Recherche* (ANR, Contracts SLC-TB & TB-HITS), MRC (MC_UP_A253_1111), and the EU
33 FP7 programme NEWTBVAC (Contract n° 241745). This work also benefited from the TRI
34 RIO Optical Imaging Platform at IPBS (Genotoul, Toulouse, France) supported by grants

1 from the Région Midi-Pyrénées (CPER), the Grand Toulouse community, the ARC (ARC
2 Equipement N°8505), the CNRS and the EU through the FEDER program. AG holds a
3 fellowship from the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FRM). The funders had no role
4 in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the
5 manuscript.

6

1 **References**

- 2 1. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, et al. (2009) Physiology of
3 mycobacteria. *Adv Microb Physiol* 55: 81-182, 318-189.
- 4 2. Schnappinger D, Schoolnik GK, Ehrt S (2006) Expression profiling of host pathogen
5 interactions: how *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage adapt to one
6 another. *Microbes Infect* 8: 1132-1140.
- 7 3. Zhang YJ, Rubin EJ (2013) Feast or famine: the host-pathogen battle over amino acids.
8 *Cell Microbiol* 15: 1079-1087.
- 9 4. Lee BY, Clemens DL, Horwitz MA (2008) The metabolic activity of *Mycobacterium*
10 *tuberculosis*, assessed by use of a novel inducible GFP expression system, correlates
11 with its capacity to inhibit phagosomal maturation and acidification in human
12 macrophages. *Mol Microbiol* 68: 1047-1060.
- 13 5. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, et al. (2012) Phagosomal rupture
14 by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* 8:
15 e1002507.
- 16 6. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, et al. (2007) *M. tuberculosis*
17 and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*
18 129: 1287-1298.
- 19 7. de Chastellier C (2009) The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria
20 for survival within host macrophages. *Immunobiology* 214: 526-542.
- 21 8. Ehrt S, Schnappinger D (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome:
22 defence against host stresses. *Cell Microbiol* 11: 1170-1178.
- 23 9. Russell DG (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev*
24 *Mol Cell Biol* 2: 569-577.
- 25 10. Russell DG (2011) *Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic
26 infection. *Immunol Rev* 240: 252-268.
- 27 11. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG (1998) Cytokine
28 activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-
29 containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 160: 1290-1296.
- 30 12. Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, et al. (1998) Effects of
31 cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* 111 (Pt 7): 897-905.
- 32 13. Appelberg R (2006) Macrophage nutriptive antimicrobial mechanisms. *J Leukoc Biol* 79:
33 1117-1128.
- 34 14. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH (2010) Functional genetic diversity
35 among *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates: delineation of
36 conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. *PLoS*
37 *Pathog* 6: e1000988.
- 38 15. Rohde KH, Abramovitch RB, Russell DG (2007) *Mycobacterium tuberculosis* invasion of
39 macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host*
40 *Microbe* 2: 352-364.
- 41 16. Rohde KH, Veiga DF, Caldwell S, Balazsi G, Russell DG (2012) Linking the
42 transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis*
43 during an extended intracellular infection. *PLoS Pathog* 8: e1002769.
- 44 17. Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, et al. (2003) Transcriptional
45 Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the
46 Phagosomal Environment. *J Exp Med* 198: 693-704.
- 47 18. Tailleur L, Waddell SJ, Pelizzola M, Mortellaro A, Withers M, et al. (2008) Probing host
48 pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis*
49 and infected human dendritic cells and macrophages. *PLoS One* 3: e1403.

- 1 19. de Carvalho LP, Fischer SM, Marrero J, Nathan C, Ehrst S, et al. (2010) Metabolomics of
2 Mycobacterium tuberculosis reveals compartmentalized co-catabolism of carbon
3 substrates. *Chem Biol* 17: 1122-1131.
- 4 20. Marrero J, Trujillo C, Rhee KY, Ehrst S (2013) Glucose phosphorylation is required for
5 Mycobacterium tuberculosis persistence in mice. *PLoS Pathog* 9: e1003116.
- 6 21. McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, et al. (2000)
7 Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the
8 glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406: 735-738.
- 9 22. Pandey AK, Sasseti CM (2008) Mycobacterial persistence requires the utilization of host
10 cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4376-4380.
- 11 23. Rhee KY, de Carvalho LP, Bryk R, Ehrst S, Marrero J, et al. (2011) Central carbon
12 metabolism in Mycobacterium tuberculosis: an unexpected frontier. *Trends Microbiol*
13 19: 307-314.
- 14 24. Griffin JE, Pandey AK, Gilmore SA, Mizrahi V, McKinney JD, et al. (2012) Cholesterol
15 catabolism by Mycobacterium tuberculosis requires transcriptional and metabolic
16 adaptations. *Chem Biol* 19: 218-227.
- 17 25. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the
18 biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*
19 393: 537-544.
- 20 26. Lyon RH, Hall WH, Costas-Martinez C (1970) Utilization of Amino Acids During
21 Growth of Mycobacterium tuberculosis in Rotary Cultures. *Infect Immun* 1: 513-520.
- 22 27. Lyon RH, Hall WH, Costas-Martinez C (1974) Effect of L-asparagine on growth of
23 Mycobacterium tuberculosis and on utilization of other amino acids. *J Bacteriol* 117:
24 151-156.
- 25 28. Jennings MP, Anderson JK, Beacham IR (1995) Cloning and molecular analysis of the
26 *Salmonella enterica* ansP gene, encoding an L-asparagine permease. *Microbiology* 141
27 (Pt 1): 141-146.
- 28 29. Rachman H, Strong M, Ulrichs T, Grode L, Schuchhardt J, et al. (2006) Unique
29 transcriptome signature of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis.
30 *Infect Immun* 74: 1233-1242.
- 31 30. Gouzy A, Larrouy-Maumus G, Wu T-D, Peixoto A, Levillain F, et al. Aspartate is
32 required for Mycobacterium tuberculosis nitrogen assimilation and host colonization.
33 *Nat Chem Biol* In press.
- 34 31. van Kessel JC, Hatfull GF (2007) Recombineering in Mycobacterium tuberculosis. *Nat*
35 *Methods* 4: 147-152.
- 36 32. Katayama T, Tanaka S, Aoki K (1954) [Aminoacids metabolism of tubercle bacillus. II.
37 Studies on the asparaginase]. *Kekkaku* 29: 472-476; English summary, 510-471.
- 38 33. Kirchheimer F, Whittaker CK (1954) Asparaginase of Mycobacteria. *Am Rev Tuberc* 70:
39 920-921.
- 40 34. Cai X, Wu B, Fang Y, Song H (2012) [Asparaginase mediated acid adaptation of
41 mycobacteria]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 52: 1467-1476.
- 42 35. Jack DL, Paulsen IT, Saier MH (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC)
43 superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations.
44 *Microbiology* 146 (Pt 8): 1797-1814.
- 45 36. Srikhanta YN, Attack JM, Beacham IR, Jennings MP (2013) Distinct physiological roles
46 for the two L-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res*
47 *Commun*.
- 48 37. Ehrst S, Guo XV, Hickey CM, Ryou M, Monteleone M, et al. (2005) Controlling gene
49 expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids*
50 *Res* 33: e21.

- 1 38. Song H, Huff J, Janik K, Walter K, Keller C, et al. (2011) Expression of the ompATb
2 operon accelerates ammonia secretion and adaptation of Mycobacterium tuberculosis
3 to acidic environments. *Mol Microbiol* 80: 900-918.
- 4 39. Recchi C, Chavrier P (2006) V-ATPase: a potential pH sensor. *Nat Cell Biol* 8: 107-109.
- 5 40. Lin W, Mathys V, Ang EL, Koh VH, Martinez Gomez JM, et al. (2012) Urease activity
6 represents an alternative pathway for Mycobacterium tuberculosis nitrogen
7 metabolism. *Infect Immun* 80: 2771-2779.
- 8 41. Reyrat JM, Lopez-Ramirez G, Ofredo C, Gicquel B, Winter N (1996) Urease activity does
9 not contribute dramatically to persistence of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-
10 Guerin. *Infect Immun* 64: 3934-3936.
- 11 42. Sendide K, Deghmane AE, Reyrat JM, Talal A, Hmama Z (2004) Mycobacterium bovis
12 BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the
13 macrophage cell surface. *Infect Immun* 72: 4200-4209.
- 14 43. Hofreuter D, Novik V, Galan JE (2008) Metabolic diversity in Campylobacter jejuni
15 enhances specific tissue colonization. *Cell Host Microbe* 4: 425-433.
- 16 44. Kullas AL, McClelland M, Yang HJ, Tam JW, Torres A, et al. (2012) L-asparaginase II
17 produced by Salmonella typhimurium inhibits T cell responses and mediates
18 virulence. *Cell Host Microbe* 12: 791-798.
- 19 45. Leduc D, Gallaud J, Stingl K, de Reuse H (2010) Coupled amino acid deamidase-
20 transport systems essential for Helicobacter pylori colonization. *Infect Immun* 78:
21 2782-2792.
- 22 46. Scotti C, Sommi P, Paschetto MV, Cappelletti D, Stivala S, et al. (2010) Cell-cycle
23 inhibition by Helicobacter pylori L-asparaginase. *PLoS One* 5: e13892.
- 24 47. Shibayama K, Takeuchi H, Wachino J, Mori S, Arakawa Y (2011) Biochemical and
25 pathophysiological characterization of Helicobacter pylori asparaginase. *Microbiol*
26 *Immunol* 55: 408-417.
- 27 48. Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR, Jr. (2003) SecA2 functions in
28 the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium
29 tuberculosis. *Mol Microbiol* 48: 453-464.
- 30 49. Woong Park S, Klotzsche M, Wilson DJ, Boshoff HI, Eoh H, et al. (2011) Evaluating the
31 sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to biotin deprivation using regulated gene
32 expression. *PLoS Pathog* 7: e1002264.
- 33 50. Pesek JJ, Matyska MT, Fischer SM, Sana TR (2008) Analysis of hydrophilic metabolites
34 by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry using a silica hydride-
35 based stationary phase. *J Chromatogr A* 1204: 48-55.

36

37 **Author contributions**

38 AG, DS, LPSDC, YP and ON designed the experiments. AG and GLM performed the
39 experiments, with technical assistance from AD, RP and JBW. AG, GLM, AD, JBW, DS,
40 LPSDC, YP and ON analyzed the results. AG, GLM, LPSDC, YP and ON wrote the
41 manuscript.

42

43

1 Legend to figures

2 **Figure 1. The function and *in vivo* relevance of AnsP2 and AnsA in asparagine** 3 **utilization in *M. tuberculosis*.**

4 (a) U-¹⁴C-Asn uptake assay with *M. tuberculosis* H37Rv, the *ansP2*-KO mutant and its
5 complemented strains (Compl.). Bacteria previously grown in 7H9 with 5 mM Asn, were
6 harvested and resuspended in an uptake buffer containing a mix of ¹⁴C-labeled and non-
7 labeled asparagine to obtain a final concentration of 20 μM asparagine. Bacteria were
8 incubated at 37°C and samples were removed and bacteria-associated ¹⁴C radioactivity was
9 quantified at the indicated time points. Data are expressed as the number of disintegrations per
10 minute (DPM) per total protein concentration (¹⁴C-Asn (DPM).μg protein⁻¹). (b) Growth of
11 *M. tuberculosis* H37Rv and the *ansP2*-KO mutant strain in the presence of asparagine as sole
12 nitrogen source. (c) C57BL/6 mice were infected intranasally with 1,000 CFUs *M.*
13 *tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansP2*-KO mutant or its complemented strain (Compl.).
14 Three weeks later, lungs and spleen were recovered, homogenized and plated onto agar for
15 CFU scoring. Data represent mean±s.d. of triplicate samples and are representative of three
16 independent experiments. (d) Western blotting analysis of total protein extracts (Tot) or a Ni-
17 NTA purified fraction (Pur) from *M. smegmatis* containing a pVV16 control plasmid
18 (pVV16) or an *ansA-his₆* cassette cloned into pVV16 (pVV16 *ansA-his₆*), using an anti-HIS₆
19 monoclonal antibody. The expected molecular weight of recombinant AnsA-HIS₆ fusion
20 protein is of 34 kDa. (e) Asparaginase activity, as monitored by NADPH disappearance at
21 OD₃₄₀ (see Materials & Methods), of recombinant AnsA in the presence of asparagine (Asn)
22 or glutamine (Gln). Control reactions lack (w/o) substrate or enzyme. (f) Growth of *M.*
23 *tuberculosis* H37Rv, the *ansA*-KO mutant strain, and the *ansA*-KO complemented strain
24 (Compl.) in minimal medium containing 5 mM asparagine as sole nitrogen source. In (a) and
25 (f), Growth was measured by monitoring turbidity; data represent mean±s.d. of triplicate
26 samples and are representative of two independent experiments. (g) C57BL/6 mice were
27 infected intranasally with 1,000 CFUs *M. tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansA*-KO
28 mutant or its complemented strain (Compl.). Three weeks later, lungs and spleen were
29 recovered, homogenized and plated onto agar for CFU scoring. In (a), (c) and (g), data were
30 analyzed using the Student's *t* test ; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. NS, not significant.

31

32

1 **Figure 2. AnsP2 and AnsA are involved in nitrogen incorporation from asparagine in *M.***
2 ***tuberculosis*.**

3 (a) Frequency of ¹⁵N-glutamate (GLU) and ¹⁵N-glutamine (GLN) detected in the presence of
4 U-¹⁵N-Asn (2 mM) in *M. tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansP2*-KO mutant and its
5 complemented strain (Compl.). (b) Total asparagine (ASN), glutamate (GLU) and glutamine
6 (GLN) ion counts in *M. tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansA*-KO mutant and its
7 complemented strain (Compl.). (c) Frequency of ¹⁵N-glutamate (GLU) and ¹⁵N-glutamine
8 (GLN) detected in *M. tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansA*-KO mutant and its
9 complemented strain (Compl.) cultivated in minimal medium in the presence of 2 mM ¹⁵N-
10 asparagine as sole nitrogen source. #, not detected. Data represent mean±s.d. of triplicate
11 samples, are representative of two independent experiments, and were analyzed using the
12 Student's *t* test ; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; ****, P<0.0001.

13

14 **Figure 3. Varied requirement of AnsP2 and AnsA for *M. tuberculosis* resistance to acid**
15 **in host macrophages.**

16 (a-c) Growth (a), culture supernatant NH₄⁺ concentration (b) and pH (c) of *M. tuberculosis*
17 H37Rv, the *ansP2*-KO mutant strain, or the *ansP2*-KO complemented strain (Compl.) at
18 acidic pH (5.5) in the presence of asparagine as sole nitrogen source. (d-f) Growth (d), culture
19 supernatant NH₄⁺ concentration (e) and pH (f) of *M. tuberculosis* H37Rv, the *ansA*-KO
20 mutant strain, or the *ansA*-KO complemented strain (Compl.) at acidic pH (5.5) in the
21 presence of asparagine as sole nitrogen source. (g) Activated BMMs were infected with *M.*
22 *tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansA*-KO mutant or its complemented strain (Compl.) at
23 a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 bacterium/cell for 4 h at 37°C. Cells were washed and
24 further incubated with fresh medium for 0, 2 or 5 days. At the indicated time-points, cells
25 lysates were plated for CFU scoring. (h) Confocal microscopy analysis of IFN γ - and LPS-
26 activated mouse bone marrow-derived macrophages (BMMs) infected for 1 h with Alexa
27 Fluor 488-labeled *M. tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansA*-KO mutant or its
28 complemented strain (Compl.) (green), and stained with LysoTracker Red DND-99 (red) and
29 DAPI (blue) to visualize nuclei. Bar represents 10 μ m. Arrowheads point to example
30 phagosomes considered positive for LysoTracker staining. (i) Quantification of LysoTracker-
31 positive phagosomes in samples prepared as in (h) 2 or 4 h after infection. 100 phagosomes
32 were counted per condition. (j) Cells were pre-incubated with 100 nM bafilomycin A1 for 1 h,
33 infected as in (g) and bafilomycin A1 was removed after 24 h. In (a, b, d, e, g, i, j), data
34 represent mean±s.d. of triplicate samples, are representative of at least two independent

1 experiments, and were analyzed using the Student's *t* test. *, P<0.05; **, P<0.01; ***,
2 P<0.001; ****, P<0.0001. Data are representative of at least two independent experiments. #,
3 not detected.

4
5 **Figure 4. Schematic representation of the role of asparagine catabolism in resistance to**
6 **acid and intracellular survival.** Within activated macrophages, asparagine enters the *M.*
7 *tuberculosis* phagosome through an unknown mechanism. Asparagine is captured by *M.*
8 *tuberculosis* through AnsP2 (and other transporters yet to be identified), and hydrolyzed by
9 AnsA resulting in nitrogen assimilation into glutamine and glutamate, and release of
10 ammonia. In the phagosomal lumen, ammonia reacts with protons transported by the V-
11 ATPase to form ammonium ions allowing phagosomal pH buffering.

12

13

1 **Supporting Information**

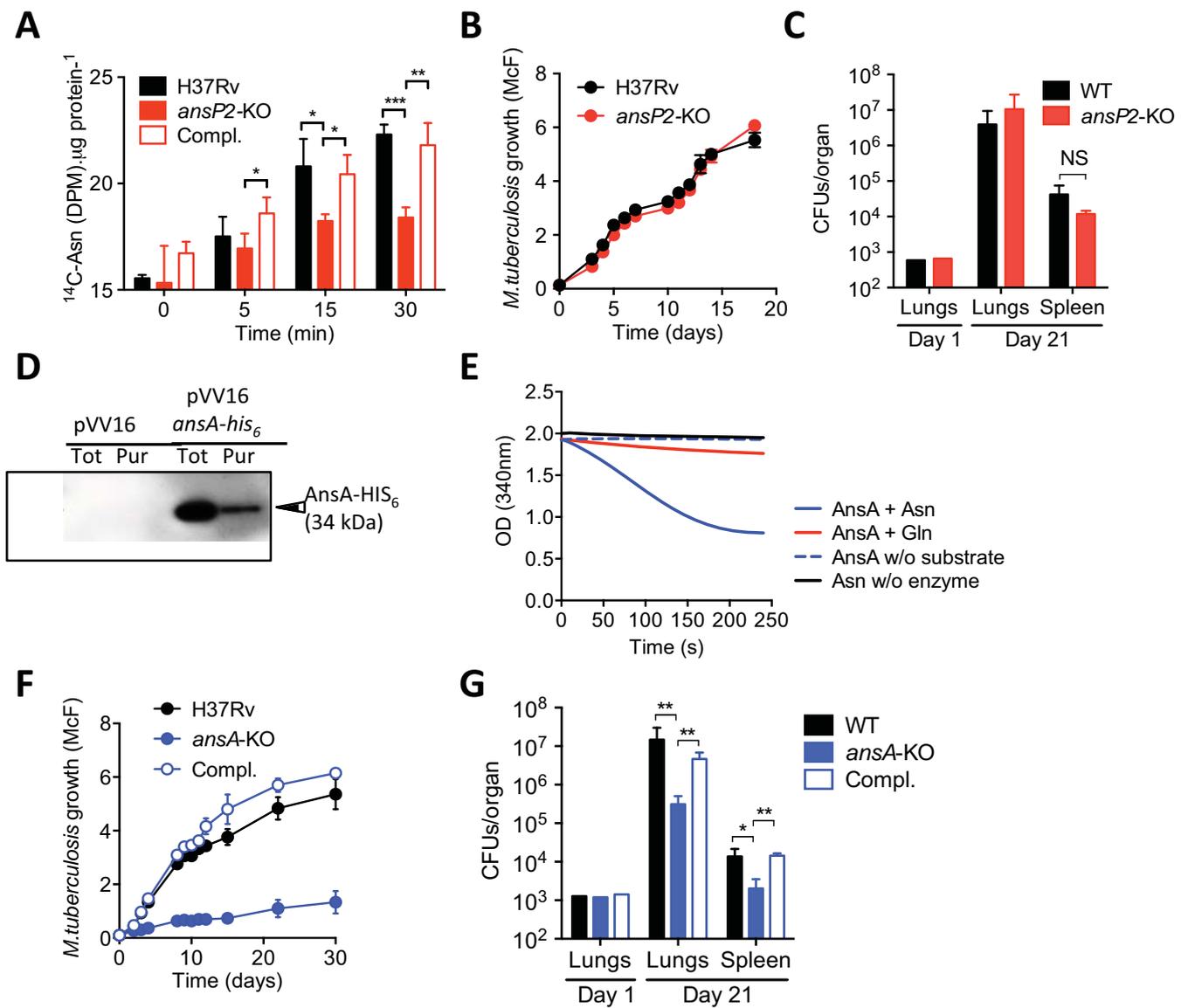
2 **Supplementary Figure 1. A genetic strategy to construct the *ansA*-KO mutant in *M.***
3 ***tuberculosis*, including the assessment of its essentiality.** (a) Genetic organization of the
4 *ansA* locus in *M. tuberculosis*. (b) We first generated a merodiploid strain harboring an
5 additional copy of *ansA* at the phage recombination site *attL5* [37]. (c) The original *ansA* gene
6 was replaced by a kanamycin-resistance cassette through recombination. (d) Exogenously
7 inserted *ansA* allele was replaced by a zeocin resistance cassette.

8
9 **Supplementary Figure 2. Growth of *ansA*-KO with asparagine or glutamate as sole**
10 **nitrogen source.** Growth of *M. tuberculosis* H37Rv or the *ansA*-KO mutant strains in
11 minimal medium containing 5 mM asparagine (ASN) or 5 mM glutamate (GLU) as sole
12 nitrogen source. Growth was measured by monitoring turbidity; data represent mean±s.d. of
13 triplicate samples and are representative of two independent experiments.

14
15 **Supplementary Figure 3. Asparagine supports *M. tuberculosis* growth mostly through**
16 **providing nitrogen.** Growth of *M. tuberculosis* H37Rv in minimal medium containing 50
17 mM asparagine (Asn), 50 mM asparagine and 15 mM ammonium (Asn + NH₄⁺) or 50 mM
18 asparagine and 10 g/L glycerol (Asn + Gro). Growth was measured by monitoring turbidity;
19 data represent mean±s.d. of triplicate samples and are representative of at least three
20 independent experiments.

21
22 **Supplementary Figure 4. AnsA is essential for nitrogen assimilation from asparagine at**
23 **acidic pH.** Frequency of ¹⁵N-glutamate (GLU) and ¹⁵N-glutamine (GLN) detected in *M.*
24 *tuberculosis* wild type (H37Rv), the *ansA*-KO mutant and its complemented strain (Compl.)
25 cultivated in minimal medium in the presence of 2 mM ¹⁵N-asparagine as sole nitrogen source
26 at pH 5.5. Data represent mean±s.d. of triplicate samples and are representative of at least two
27 independent experiments. #, not detected.

28
29 **Supplementary Figure 5. AnsP2 is not involved in *M. tuberculosis* intracellular survival.**
30 IFN γ - and LPS-activated mouse bone marrow-derived macrophages were infected with *M.*
31 *tuberculosis* wild type (H37Rv) or the *ansP2*-KO mutant at a multiplicity of infection of 0.1
32 bacterium/cell for 4 h at 37°C. Cells were washed and further incubated with fresh medium
33 for 0, 2 or 5 days. At the indicated time-points, cells lysates were plated for CFU scoring.



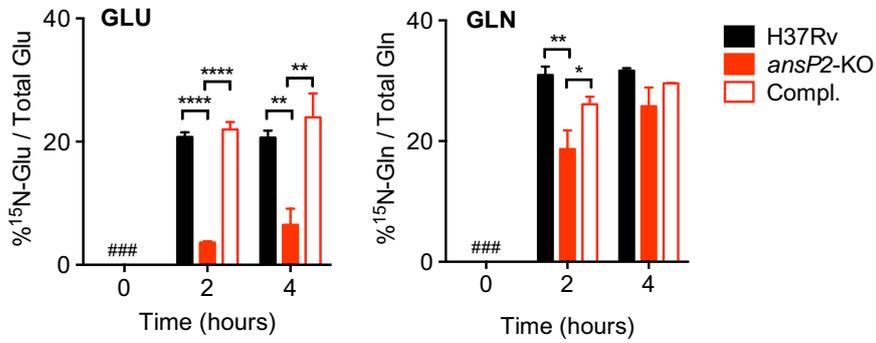
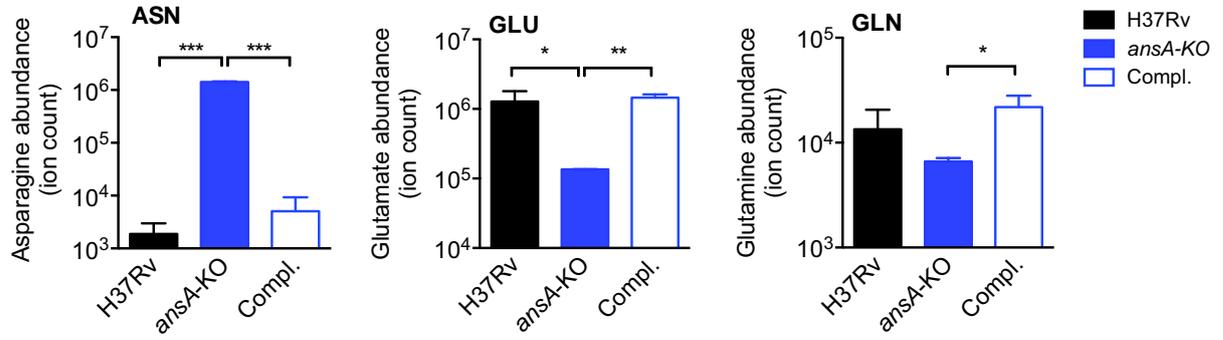
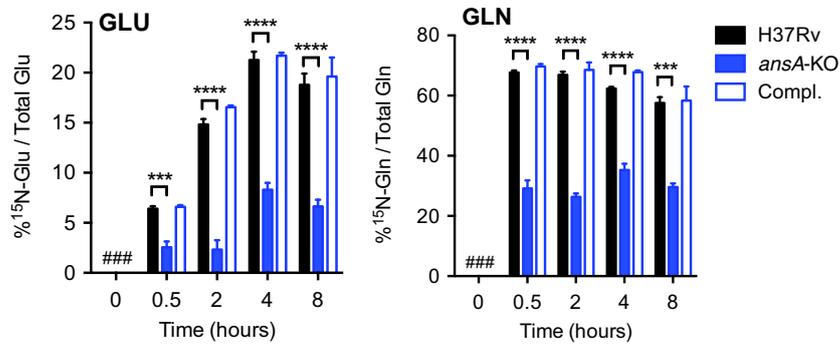
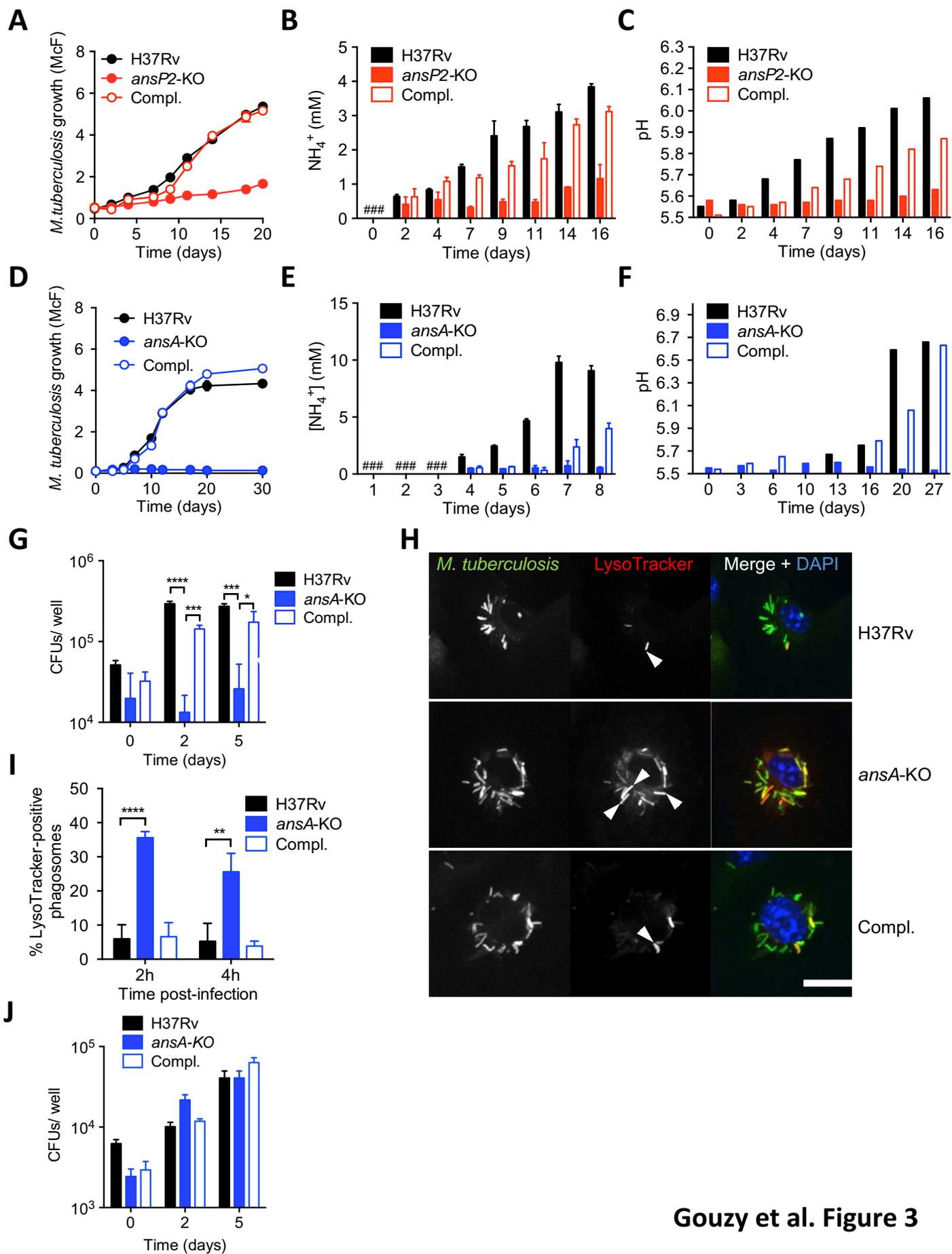
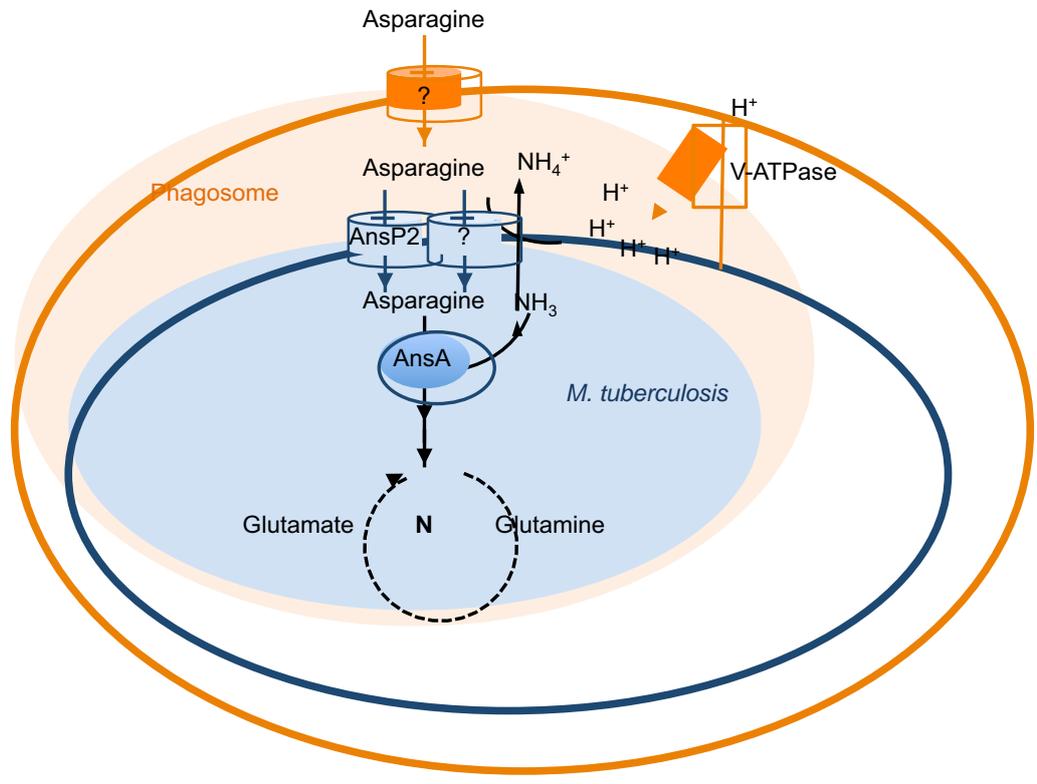
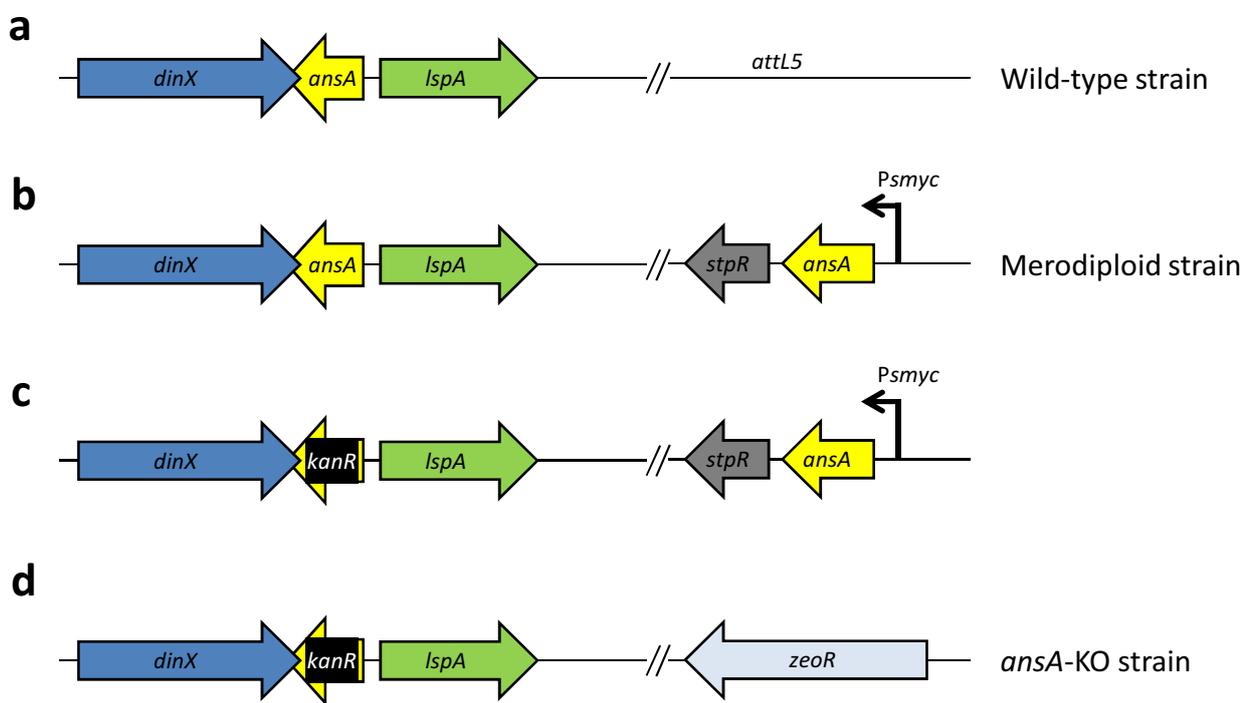
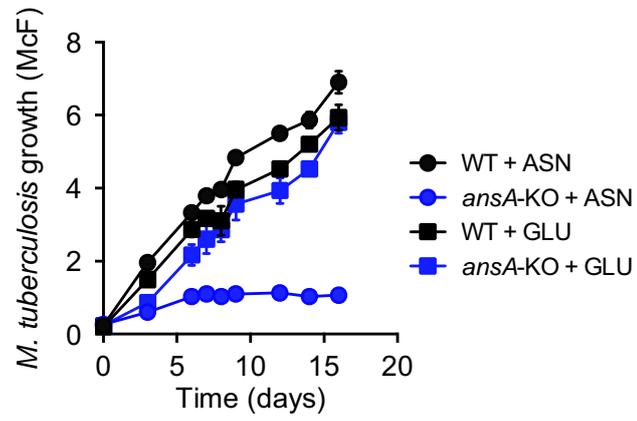
A**B****C**

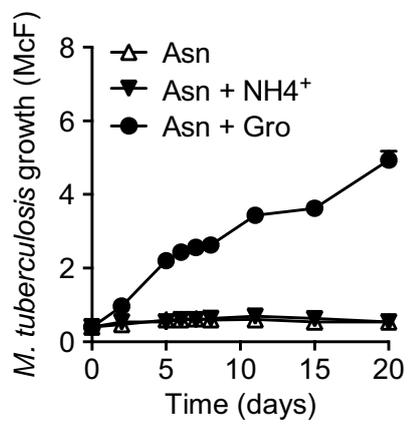
Figure 3
[Click here to download Figure: Figure 3.pdf](#)



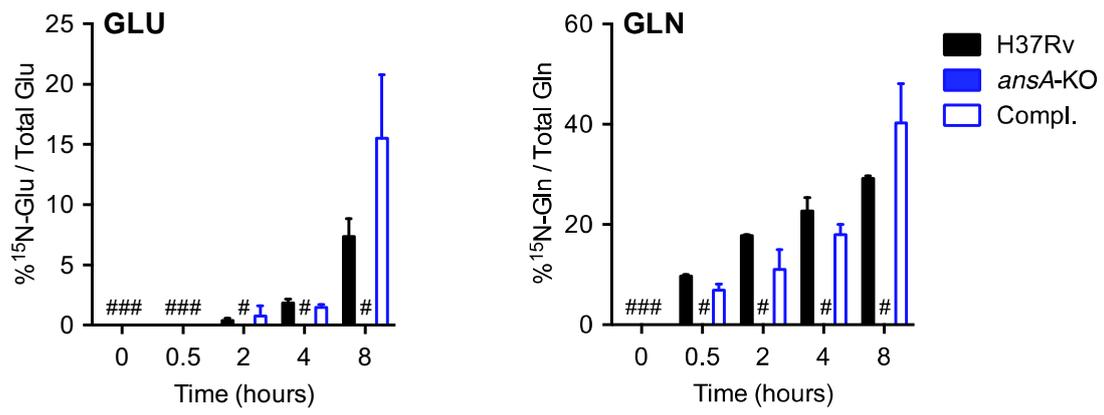


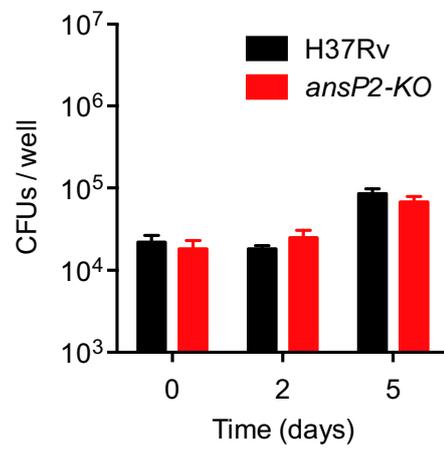






A





DISCUSSION

A. L'aspartate : une source d'azote requise pour la croissance de *M. tuberculosis in vivo*

Durant notre étude, nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation de l'aspartate est requise pour la multiplication du bacille tuberculeux au cours de son cycle infectieux. Cette étude ouvre la voie pour l'exploration du métabolisme azoté du pathogène afin de déterminer le ou les mécanisme(s) par le(s)quel(s) cet acide aminé est dirigé au phagosome de *M. tuberculosis* ainsi que les voies métaboliques permettant son assimilation par la bactérie au cours de l'infection. Les perspectives de ce travail ont fait l'objet d'un « *General Commentary* » actuellement en presse à *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*.



A central role for aspartate in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence

Alexandre Gouzy^{1,2}, Yannick Poquet^{1,2} and Olivier Neyrolles^{1,2*}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

² Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

*Correspondence: olivier.neyrolles@ipbs.fr

Edited by:

Monique Barel, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

Reviewed by:

Greg Cook, University of Otago, New Zealand

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, macrophage, phagosome, aspartate, nitrogen

A commentary on

Mycobacterium tuberculosis nitrogen assimilation and host colonization require aspartate

by Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Wu, T. D., Peixoto, A., Levillain, F., Lugo-Villarino, G., et al. (2013). *Nat. Chem. Biol.* doi: 10.1038/nchembio.1355

The tuberculosis (TB) bacillus, *Mycobacterium tuberculosis*, is a facultative intracellular pathogen that multiplies inside macrophages, in which it resides within a specialized compartment, the phagosome, where nutrient sources are likely limited. A number of studies provided compelling evidence that *M. tuberculosis* has the ability to exploit host-derived carbon sources, such as triglycerides, cholesterol and glucose, and to proliferate inside host cells (Mckinney et al., 2000; Pandey and Sasseti, 2008; Daniel et al., 2011; Marrero et al., 2013). In addition to carbon, nitrogen is an essential constituent of all living organisms. As compared to carbon requirements, little is known about the nature of nitrogen-containing molecules utilized by the TB bacillus during infection. We recently discovered that nitrogen incorporation from exogenous aspartate is required for host colonization by *M. tuberculosis* (Gouzy et al., 2013). This study highlights, for the first time, the potential of amino acids, and aspartate in particular, as a major nitrogen reservoir supporting *M. tuberculosis* virulence *in vivo*. It also opens a series of questions to be addressed in the future.

Chief among these questions is the origin and molecular mechanism(s) of transport allowing mycobacterial access to aspartate inside host cells. TB lesions are enriched in aspartate, and this likely relies on global metabolic changes in immune cells during granuloma formation (Somashekar et al., 2011). How nutrients, such as aspartate, access the *M. tuberculosis* phagosome during infection is an intriguing issue. Using mass spectrometry imaging, we further showed that aspartate can access the mycobacterial phagosome, at least *in vitro* (Gouzy et al., 2013). In mammalian cells, aspartate uptake relies on transporters of the solute carriers (SLC) superfamily, and in particular on those of the high-affinity glutamate and neutral amino acid (SLC1) and of the cationic amino acid (SLC7) transporter families. Among these transporters, SLC1A2 was reported to mediate aspartate transport inside macrophages (Rimaniol et al., 2001; Ye et al., 2010). Interestingly, we reported the expression of the *slc1a2* gene is increased in human macrophages upon *M. tuberculosis* infection (Tailleux et al., 2008). Increased expression of this transporter could impact considerably the ability of *M. tuberculosis* to multiply inside macrophages, as it is the case for the neutral amino acid transporter SLC1A5 in the context of *Francisella tularensis* and *Legionella pneumophila* infection (Wieland et al., 2005; Barel et al., 2012). These studies suggested the transport of yet to be identified amino acid(s) is important to sustain intracellular multiplication of these two bacterial species. Whether SLC1A2 and/or

other members of the SLC superfamily allow *M. tuberculosis* to access aspartate and multiply inside host cells remains to be evaluated.

Another issue raised by our study is: how is nitrogen transferred from aspartate to other nitrogen-containing molecules in *M. tuberculosis*? Once acquired by the bacillus through its unique aspartate importer AnsP1, we showed this amino acid species mostly serves as a nitrogen provider and barely enters carbon metabolism through the Krebs cycle (Gouzy et al., 2013). Nitrogen assimilation from aspartate must rely on transamination steps allowing the transfer of aspartate-derived nitrogen to glutamate, which in turn, together with glutamine, provides nitrogen to most of biosynthesis pathways. In *M. tuberculosis*, two aspartate transaminases, called AspB and AspC, are predicted to mediate nitrogen transfer from aspartate to glutamate (Cole et al., 1998). Interestingly, the *aspC* gene is thought to be essential in *M. tuberculosis* (Sasseti et al., 2003), which may indicate that AspC is involved mostly in aspartate biosynthesis, rather than in aspartate catabolism and glutamate synthesis. Genetic inactivation of *aspC* may thus result in aspartate auxotrophy. The *aspB* gene, on the opposite, is not essential *in vitro* (Sasseti et al., 2003). Interestingly, *aspB* is expressed at higher level in bacteria withstanding conditions mimicking the intracellular environment (Fisher et al., 2002). AspB may thus be involved in aspartate-derived nitrogen assimilation during infection, and may be required

for *M. tuberculosis* virulence. Noteworthy, AspB and AspC possess two homologue proteins, called Rv0858c and Rv1178, that are predicted to act as aspartate aminotransferases, and that might provide alternative pathways for aspartate-derived nitrogen assimilation in the TB bacillus (Cole et al., 1998).

Finally, our study suggests aspartate is an important metabolite required for mycobacterial virulence, and this raises several questions regarding the therapeutic potential of inhibitors of enzymes using aspartate as a substrate. In addition to serve as a nitrogen provider, aspartate possesses non-redundant and essential functions in bacterial metabolism. As a consequence, several enzymes involved in aspartate metabolism, namely the aspartate decarboxylase PanD, the aspartokinase ASK, and the aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase ASD, are considered promising targets for novel antituberculous compounds (Shafiani et al., 2005; Gopalan et al., 2006; Chaitanya et al., 2010; Sharma et al., 2012a,b). PanD is the sole enzyme in *M. tuberculosis* mediating the decarboxylation of aspartate, which allows the formation of vitamin B5, a precursor of the coenzyme A (CoA) co-factor. CoA is an acyl-carrier co-enzyme involved in fatty acid metabolism and is essential for the viability of several microorganisms, including *M. tuberculosis* (Ambady et al., 2012). Consequently, deletion of the *panD* gene was shown to result in a severe attenuation of *M. tuberculosis* virulence in the mouse model (Sambandamurthy et al., 2002). Another essential pathway relying on aspartate metabolism is the synthesis of amino acids belonging to the aspartate amino acid family, namely methionine, threonine and isoleucine, and involving the ASK and ASD enzymes, that play a unique and essential part in aspartate incorporation into these biosynthesis pathways. Furthermore, in addition to their role in the biosynthesis of these amino acids, both enzymes are involved in the synthesis of diaminopimelic acid, an intermediate of the lysine biosynthesis pathway, which is an essential constituent of the bacterial cell wall constituent peptidoglycan. As a consequence, ASK and ASD are attractive drug targets for new antituberculous

molecules since i/ they possess no homologue in humans, and ii/ their inhibition in *M. tuberculosis* may cause both amino acid auxotrophy and cell wall destruction (Shafiani et al., 2005; Chaitanya et al., 2010).

In conclusion, we believe aspartate acquisition and assimilation pathways should be further considered as promising targets for novel anti-TB therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors received no specific funding for this work. The laboratory of Olivier Neyrolles is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Agence Nationale de la Recherche, the European Union, and the Fondation Mérieux. Alexandre Gouzy holds a fellowship from the FRM. The funders had no role in the decision to publish this article or in its preparation.

REFERENCES

- Ambady, A., Awasthy, D., Yadav, R., Basuthkar, S., Seshadri, K., and Sharma, U. (2012). Evaluation of CoA biosynthesis proteins of *Mycobacterium tuberculosis* as potential drug targets. *Tuberculosis (Edinb)*. 92, 521–528. doi: 10.1016/j.tube.2012.08.001
- Barel, M., Meibom, K., Dubail, I., Botella, J., and Charbit, A. (2012). Francisella tularensis regulates the expression of the amino acid transporter SLC1A5 in infected THP-1 human monocytes. *Cell Microbiol.* 14, 1769–1783. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01837.x
- Chaitanya, M., Babajan, B., Anuradha, C. M., Naveen, M., Rajasekhar, C., Madhusudana, P., et al. (2010). Exploring the molecular basis for selective binding of *Mycobacterium tuberculosis* Asp kinase toward its natural substrates and feedback inhibitors: a docking and molecular dynamics study. *J. Mol. Model.* 16, 1357–1367. doi: 10.1007/s00894-010-0653-4
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544. doi: 10.1038/31159
- Daniel, J., Mamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D., and Kolattukudy, P. E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog.* 7:e1002093. doi: 10.1371/journal.ppat.1002093
- Fisher, M. A., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. (2002). Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J. Bacteriol.* 184, 4025–4032. doi: 10.1128/JB.184.14.4025-4032.2002

- Gopalan, G., Chopra, S., Ranganathan, A., and Swaminathan, K. (2006). Crystal structure of uncleaved L-aspartate-alpha-decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins* 65, 796–802. doi: 10.1002/prot.21126
- Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Wu, T. D., Peixoto, A., Levillain, F., Lugo-Villarino, G., et al. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen assimilation and host colonization require aspartate. *Nat. Chem. Biol.* doi: 10.1038/nchembio.1355. [Epub ahead of print].
- Marrero, J., Trujillo, C., Rhee, K. Y., and Ehrst, S. (2013). Glucose phosphorylation is required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence in mice. *PLoS Pathog.* 9:e1003116. doi: 10.1371/journal.ppat.1003116
- Mckinney, J. D., Honer Zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., et al. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735–738. doi: 10.1038/35021074
- Pandey, A. K., and Sasseti, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4376–4380. doi: 10.1073/pnas.0711159105
- Rimaniol, A. C., Mialocq, P., Clayette, P., Dormont, D., and Gras, G. (2001). Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C1964–C1970.
- Sambandamurthy, V. K., Wang, X., Chen, B., Russell, R. G., Derrick, S., Collins, F. M., et al. (2002). A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat. Med.* 8, 1171–1174. doi: 10.1038/nm765
- Sasseti, C. M., Boyd, D. H., and Rubin, E. J. (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 48, 77–84. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x
- Shafiani, S., Sharma, P., Vohra, R. M., and Tewari, R. (2005). Cloning and characterization of aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv. *J. Appl. Microbiol.* 98, 832–838. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02505.x
- Sharma, R., Florea, M., Nau, W. M., and Swaminathan, K. (2012a). Validation of drug-like inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* L-aspartate alpha-decarboxylase using nuclear magnetic resonance (¹H NMR). *PLoS ONE* 7:e45947. doi: 10.1371/journal.pone.0045947
- Sharma, R., Kothapalli, R., Van Dongen, A. M., and Swaminathan, K. (2012b). Chemoinformatic identification of novel inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* L-aspartate alpha-decarboxylase. *PLoS ONE* 7:e33521. doi: 10.1371/journal.pone.0033521
- Somashekar, B. S., Amin, A. G., Rithner, C. D., Trout, J., Basaraba, R., Izzo, A., et al. (2011). Metabolic profiling of lung granuloma in *Mycobacterium tuberculosis* infected guinea pigs: *ex vivo* ¹H magic angle spinning NMR studies. *J. Proteome Res.* 10, 4186–4195. doi: 10.1021/pr2003352
- Tailleux, L., Waddell, S. J., Pelizzola, M., Mortellaro, A., Withers, M., Tanne, A., et al. (2008). Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium*

- tuberculosis and infected human dendritic cells and macrophages. *PLoS ONE* 3:e1403. doi: 10.1371/journal.pone.0001403
- Wieland, H., Ullrich, S., Lang, F., and Neumeister, B. (2005). Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* depends on host cell amino acid transporter SLC1A5. *Mol. Microbiol.* 55, 1528–1537. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04490.x
- Ye, R., Rhoderick, J. F., Thompson, C. M., and Bridges, R. J. (2010). Functional expression, purification and high sequence coverage mass spectrometric characterization of human excitatory amino acid transporter EAAT2. *Protein Expr. Purif.* 74, 49–59. doi: 10.1016/j.pep.2010.04.006
- Received: 30 September 2013; accepted: 09 October 2013; published online: 24 October 2013.
- Citation: Gouzy A, Poquet Y and Neyrolles O (2013) A central role for aspartate in Mycobacterium tuberculosis physiology and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:68. doi: 10.3389/fcimb.2013.00068
- This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Copyright © 2013 Gouzy, Poquet and Neyrolles. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

B. L'asparagine : un acide aminé essentiel à l'acquisition de l'azote et à la résistance au stress acide au cours du cycle infectieux de *M. tuberculosis*

Durant notre étude, nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation de l'asparagine est requise pour la multiplication du bacille tuberculeux au cours de son cycle infectieux. Nous avons pu démontrer que l'asparagine est acquise en partie via le transporteur AnsP2 puis désaminée par AnsA pour permettre son assimilation et la sécrétion d'une base faible, l'ammoniaque, participant à la résistance du bacille à l'acidité de son environnement.

L'asparagine doit être désaminée en aspartate et ammonium pour être assimilée et possède donc des voies d'assimilation identiques à celles de l'aspartate. Une partie de l'ammonium issu de la désamination de l'asparagine, et non sécrétée, pourrait également être assimilée via la synthèse de glutamine par la glutamine synthase GlnA1.

Nous avons pu montrer que le mutant *ansP2*-KO présente un défaut de croissance en présence d'asparagine à pH acide (pH 5,5) mais pas à pH physiologique (pH 7). Ce phénotype peut avoir plusieurs origines, notamment le fonctionnement exclusif de ce transporteur à pH acide. En effet, AnsP2 est prédit pour co-transporter l'asparagine avec des protons et son activité de transport pourrait ainsi être potentialisée à pH acide via l'entrée des protons facilitant l'import de l'asparagine. A l'inverse, AnsP2 pourrait également permettre l'entrée d'asparagine via l'expulsion de protons facilitant ainsi l'import de l'acide aminé tout en favorisant le maintien de la neutralité du pH intrabactérien.

Des expériences préliminaires ont été réalisées dans notre laboratoire afin d'évaluer le lien existant entre le fonctionnement de AnsP2 et le pH. De façon intéressante, la réalisation de tests de transport à l'aide d'asparagine ¹⁴C a permis de montrer que le mutant *ansP2*-KO présente un défaut d'import de l'asparagine similaire à pH acide que celui observé à pH physiologique. Cette observation suggère que le fonctionnement de AnsP2 n'est pas dépendant du pH et que ce transporteur est donc utilisé par la bactérie indépendamment du pH de son environnement. De plus, la mesure de la concentration en ammonium ainsi que du pH du milieu lors de la croissance du mutant à pH 7 a permis de révéler que le mutant possède un défaut d'alcalinisation de son milieu ainsi que de sécrétion d'ammoniaque similaire à celui observé à pH acide (**Figure 10**).

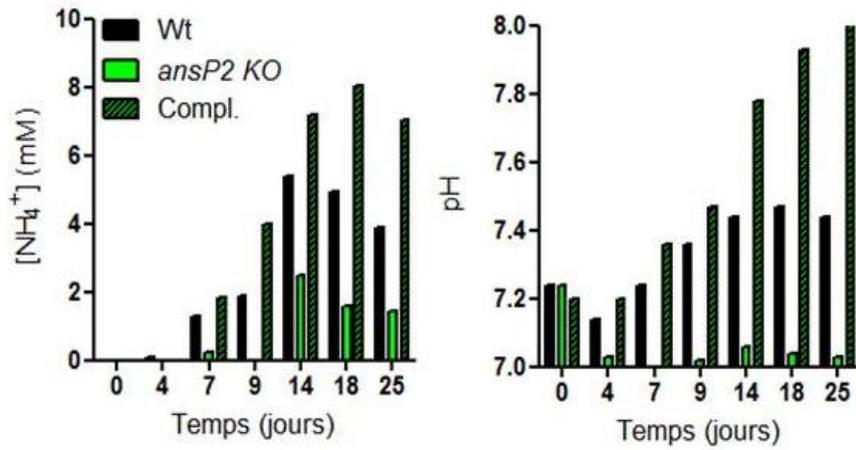


Figure 10: Mesure de la concentration en ammonium et du pH du milieu lors de la croissance à pH 7 de *M. tuberculosis* en présence d'asparagine comme unique source d'azote. La souche sauvage (Wt), le mutant pour le gène *ansP2* (*ansP2-KO*) et le mutant complétementé (Compl.) ont été cultivés dans 200 mL de milieu contenant de l'asparagine (5mM) comme unique source d'azote. Aux différents temps, 1 mL de surnageant a été récolté pour réaliser la mesure du pH et de la concentration en ions ammonium.

L'ensemble de ces observations atteste que la mutation du gène *ansP2* affecte l'import d'asparagine, et la sécrétion d'ammoniaque consécutive à son utilisation, de façon pH-indépendante (**voir Figure 3 B et C manuscrit PLOS Pathogens**). Ces résultats convergent donc vers l'hypothèse selon laquelle le défaut de croissance observé pour le mutant *ansP2*-KO à pH acide pourrait être dû à la diminution de la sécrétion d'ammoniaque observée chez ce mutant, ayant un rôle dispensable à pH physiologique mais favorisant la croissance bactérienne à pH acide.

Malgré la mutation du gène *ansP2*, le bacille tuberculeux est toujours capable d'importer l'asparagine présente dans son milieu démontrant ainsi l'existence d'autres transporteurs d'asparagine. Le transporteur AnsP1 est le transporteur dont l'homologie est la plus proche de celle du transporteur AnsP2 (83% de similarité). Ainsi, AnsP1 pourrait permettre, parallèlement à sa fonction exclusive pour l'import de l'aspartate, l'import d'asparagine chez le bacille tuberculeux. La construction d'un mutant double *ansP1/ansP2* permettrait d'étudier cette possibilité.

Il peut paraître surprenant d'observer la sécrétion d'un nutriment azoté tel que l'ammoniaque dans l'environnement du phagosome de *M. tuberculosis* décrit comme pauvre en nutriments (**Voir partie C.III.3**). Ceci pourrait suggérer que ce mécanisme de sécrétion soit important pour l'adaptation du bacille à son environnement intracellulaire et notamment à sa résistance au stress acide induit par l'activation des macrophages, un phénomène connu pour accélérer la maturation des phagosomes en phagolysosomes [156].

L'inhibition de l'acidification du phagosome de *M. tuberculosis* par l'ammoniaque peut s'effectuer à deux niveaux. Tout d'abord l'ammoniaque est une base qui va spontanément être complexée aux protons permettant ainsi une augmentation du pH environnant comme observé lors de la croissance de *M. tuberculosis* en présence d'asparagine *in vitro*.

Egalement, l'ammonium sécrété peut agir en amont car il possède un effet inhibiteur sur la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs et les lysosomes et pourrait ainsi participer à l'arrêt de maturation du phagosome de *M. tuberculosis* et donc à l'inhibition de son acidification [146, 147]. Dans ce sens, la concentration en ammonium à l'intérieur du cytoplasme de macrophages est augmentée lors de leur infection par la souche vaccinale BCG [148]. De façon intéressante, l'inactivation de l'uréase de BCG diminue la concentration en ammonium dans le cytoplasme des macrophages sans toutefois l'abroger. Au vu de notre étude, l'activité asparaginase de AnsA pourrait être responsable de cette capacité persistante de la bactérie à sécréter de l'ammonium.

Cette sécrétion d'ammonium dans le cytoplasme des macrophages nécessite son passage à travers la membrane phagosomale. Cependant, cette molécule est peu diffusante dans les membranes biologiques, suggérant que des transporteurs présents au niveau de la membrane du phagosome puissent intervenir dans sa sécrétion hors du phagosome. De façon intéressante, il a pu être montré que l'ammonium peut se substituer au potassium et aux protons pour être sécrété au niveau des cellules rénales par l'utilisation de transporteurs ATPase Na^+/K^+ et de transporteurs Na^+/H^+ [442]. L'analyse du protéome de phagosomes modèles de billes de latex a d'ailleurs pu révéler la présence de transporteurs ATPase Na^+/K^+ , ATP1B3 et ATP1A4, et du transporteur Na^+/H^+ , NHE1, sur leur membrane [218]. Ces transporteurs pourraient ainsi être exploités par le pathogène pour l'inhibition de la maturation du phagosome via la sécrétion d'ammonium.

Comme pour l'aspartate, cette étude ouvre la voie à l'exploration des mécanismes par lesquels l'asparagine est dirigée au phagosome de *M. tuberculosis*. En prenant une nouvelle fois comme modèle le protéome du phagosome de bille de latex, alors qu'aucun transporteur présent sur le phagosome ne semble permettre le transport d'aspartate, l'un d'entre eux nommé SLC1A5 pourrait assurer celui de l'asparagine. L'expression de ce transporteur a d'ailleurs déjà été mise en cause pour permettre la croissance d'autres pathogènes intracellulaires tels que *Francisella tularensis* et *Legionella pneumophila* à l'intérieur des macrophages [443, 444].

C. L'utilisation de l'aspartate et de l'asparagine chez *M. tuberculosis* : un mécanisme couplé ?

Alors que *Escherichia coli* possède une asparaginase de type I cytoplasmique et une asparaginase de type II sécrétée dans son périplasme, *M. tuberculosis* possède une seule asparaginase, AnsA, appartenant aux asparaginases de type II [437]. Certaines asparaginases de type II ont été impliquées dans la virulence de pathogènes bactériens, et ce notamment via leur sécrétion (**Voir partie D.III.3**). AnsA ne possède pas de séquence signal prédite pour son export via les systèmes de sécrétion Sec et Tat classiquement retrouvés chez les bactéries [27, 445]. Cependant, il a été montré que certaines protéines pouvaient être sécrétées sans posséder de séquence signal chez *M. tuberculosis*. C'est le cas notamment pour la glutamine synthase GlnA1 qui serait sécrétée de façon non spécifique en raison de sa forte expression [404]. Plus spécifiquement, un système de sécrétion appelé SecA2 a été identifié comme permettant l'export de protéines ne possédant pas de séquence signal comme la superoxyde dismutase SodA et la catalase-peroxidase KatG, deux enzymes permettant au bacille de

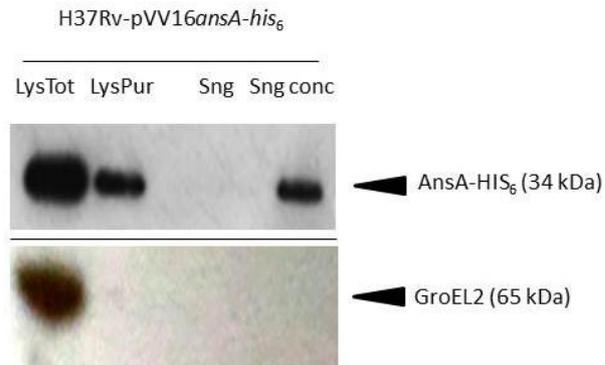


Figure 11: Détection de la sécrétion de AnsA par *M. tuberculosis*. La souche sauvage de *M. tuberculosis* (H37Rv) a été transformée avec le plasmide pVV16ansA-his₆, permettant l'expression de la fusion AnsA-HIS₆. La souche recombinante a été cultivée en milieu liquide 7H9 non supplémenté. A jour 7, la culture a été centrifugée pour séparer les bactéries du milieu de culture. Les bactéries ont été lysées (Lys Tot) puis les lysats purifiés sur colonne de nickel retenant AnsA-HIS₆ (LysPur). Le surnageant (Sng) a été concentré en protéine à l'aide d'une colonne Amicon (Sng conc). AnsA-HIS₆ a été détecté suivant le protocole déjà décrit dans notre étude pour la purification de la protéine. En parallèle, la protéine cytosolique GroEL2 native a été détectée dans les différentes fractions et sert ici de contrôle de l'absence de lyse bactérienne.

résister à l'action bactéricide des ROS [445, 446]. La délétion du système de sécrétion SecA2 altère de ce fait considérablement la virulence de *M. tuberculosis* [447].

Nous avons entrepris au laboratoire de déterminer si l'asparaginase AnsA pouvait être sécrétée par le bacille. Pour ce faire, nous avons exprimé la protéine étiquetée (AnsA-HIS₆) chez *M. tuberculosis* et nous avons cherché sa présence dans le lysat et le surnageant de cultures bactériennes *in vitro*.

Après concentration des protéines du surnageant, nous avons pu détecter AnsA. Comme contrôle, la protéine exclusivement cytosolique GroEL2 n'est pas détectée dans cette fraction, confirmant que la détection de AnsA dans le surnageant n'est pas consécutive à une lyse des bactéries (**Figure 11**).

Ces expériences nous ont donc permis de mettre en évidence, pour la première fois, que *M. tuberculosis* possède une asparaginase fonctionnelle pouvant être sécrétée.

En collaboration avec le Docteur Daria Bottai (Université de Pise, Italie), nous avons également réalisé des expériences préliminaires afin de déterminer le mécanisme de sécrétion de AnsA. Ces expériences, en cours de confirmation, ont pu montrer que la sécrétion de AnsA est abrogée chez un mutant de *M. tuberculosis* délété pour le système de sécrétion SecA2. La sécrétion de AnsA par ce système étant en adéquation avec l'absence de séquence de signal chez l'asparaginase.

De façon intéressante, il a pu être montré que l'atténuation du mutant *secA2* à l'intérieur des macrophages n'était pas abrogée chez des cellules ne produisant plus de ROS. Cette observation a permis de suggérer que SecA2 était impliqué dans un mécanisme de virulence autre que celui de la résistance aux ROS par la sécrétion de SodA et KatG [447]. Plus récemment, il a pu être montré qu'un mutant *secA2* était altéré dans ses capacités à inhiber l'acidification de son phagosome suggérant que ce système permettait la sécrétion d'un facteur inhibant la maturation du phagosome de *M. tuberculosis*. De plus, la bafilomycine permet de restaurer la croissance du mutant *secA2* à l'intérieur des macrophages explicitant que le mécanisme premier d'atténuation de ce mutant est dû à son incapacité à stopper la maturation de son phagosome [448].

De façon intéressante, le phénotype d'atténuation du mutant *secA2* est similaire à celui observé dans notre étude pour le mutant *ansA-KO*. L'absence de sécrétion de AnsA pourrait donc être la cause de l'atténuation du mutant *secA2* et AnsA pourrait ainsi constituer un facteur de virulence nouveau sécrété par ce système. Si ces observations sont confirmées, cela signifie que l'action de AnsA dans l'inhibition de l'acidification du phagosome dépend de sa sécrétion. Ainsi, AnsA pourrait permettre la désamination de l'asparagine à l'extérieur du bacille au niveau de la lumière du phagosome et/ou

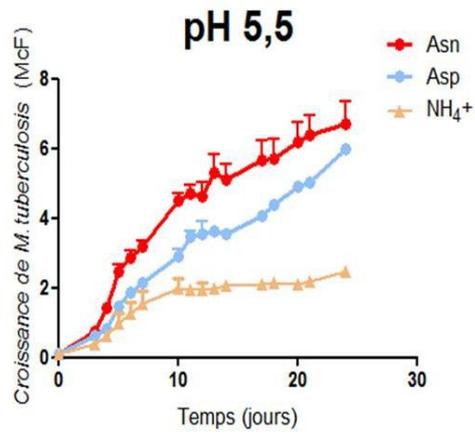


Figure 12: Croissance de *M. tuberculosis* à pH acide. Croissance au cours du temps de la souche sauvage de *M. tuberculosis* à pH acide (pH 5,5) en présence d'asparagine (Asn), d'aspartate (Asp) ou d'ammonium (NH₄⁺) comme unique source d'azote (5mM).

dans le cytoplasme du macrophage facilitant ainsi l'action de l'ammonium généré pour l'inhibition du trafic vésiculaire.

Le phénotype du mutant *ansP2-KO*, diminué dans sa capacité d'import de l'asparagine et la sécrétion d'ammoniaque, implique tout de même qu'une partie de l'asparagine doit être désaminée à l'intérieur des bactéries. La mesure de la concentration en ammonium libéré dans le surnageant d'un mutant *secA2*, en présence d'asparagine comme unique source d'azote, permettrait d'évaluer l'implication de la localisation de l'enzyme Ansa sur l'apparition de l'ammonium dans l'environnement extracellulaire.

La sécrétion de Ansa par *M. tuberculosis*, qu'elle soit dépendante ou non du système SecA2, a un impact global sur nos études de l'utilisation de l'asparagine et de l'aspartate chez le bacille tuberculeux. En effet, l'aspartate importé via AnsaP1 pourrait être le produit de la désamination extracellulaire de l'asparagine issu de l'activité asparaginase d'Ansa.

De façon intéressante, nous avons pu remarquer au laboratoire que l'ammonium n'est pas une bonne source d'azote pour la croissance du bacille en comparaison à l'aspartate et à l'asparagine en conditions acides (pH 5,5) (**Figure 12**).

Cette observation suggère donc que le bacille acquiert essentiellement l'aspartate, via AnsaP1, pour subvenir à ses besoins azotés lors de l'hydrolyse extracellulaire de l'asparagine. Ainsi, l'asparagine pourrait être considérée comme une forme de « pro-aspartate » dont l'utilisation, en comparaison à l'aspartate, aurait l'avantage de s'accompagner d'une diminution du pH acide environnant et à l'inhibition de maturation du phagosome.

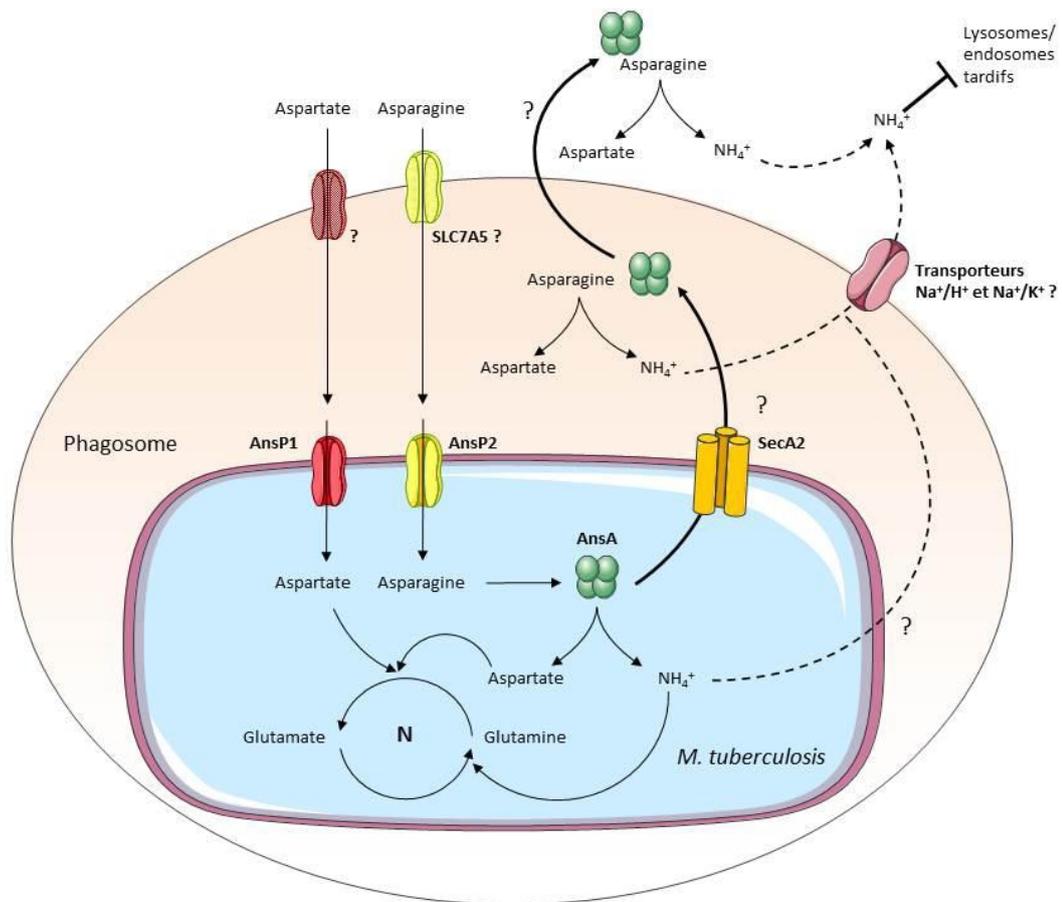


Figure 11: Rôle de la triade Ansp1/Ansp2/AnsA dans la nutrition et la résistance au stress acide chez *M. tuberculosis*. L'asparagine pourrait entrer dans le phagosome de *M. tuberculosis* via le transporteur SLC7A5 puis dans la bactérie en partie via le transporteur Ansp2. L'asparaginase Ansa permet alors sa désamination assurant ainsi l'assimilation de l'aspartate produit dans le métabolisme central azoté (N) assurant la synthèse de glutamate et de glutamine. L'ammoniaque issu de la désamination est quant à lui transformé en ammonium et permet la diminution de la concentration en protons dans le cytoplasme bactérien et/ou dans la lumière du phagosome par un phénomène de sécrétion bactérien restant à déterminer. Alternativement, une partie de l'ammonium formé peut être assimilée pour la synthèse de glutamine. La sécrétion de l'asparaginase Ansa, potentiellement permise par le système SecA2, permet la génération d'ammonium dans la lumière du phagosome qui, par l'intermédiaire des transporteurs Na^+/H^+ et Na^+/K^+ qui pourraient assurer son passage à travers la membrane phagosomale, pourrait servir à l'inhibition de la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs et les lysosomes. Ultérieurement, Ansa pourrait être sécrétée en dehors du phagosome et permettre la génération d'ammonium directement dans le cytoplasme du macrophage. L'aspartate présent dans le cytoplasme de la cellule et pouvant être issu de la désamination de l'asparagine pourrait alors être importé à l'intérieur du phagosome, par l'intermédiaire d'un transporteur encore indéterminé, et permet de soutenir le métabolisme azoté du bacille via son acquisition exclusive par le transporteur Ansp1.

La triade AnsP1/AnsP2/AnsA pourrait ainsi agir de concert permettant au bacille tuberculeux de s'adapter à son environnement intracellulaire en couplant sa nutrition et sa résistance au stress acide (**Figure 13**).

La sécrétion de AnsA pourrait également avoir un impact important sur le métabolisme des cellules de l'hôte et notamment les cellules de l'immunité présentes au sein des granulomes. Il a pu être montré que la sécrétion de l'asparaginase chez *H. pylori* est responsable d'un arrêt du cycle cellulaire des cellules des muqueuses gastriques. Cette inhibition serait induite par la déplétion en asparagine du cytoplasme des cellules mais le mécanisme exact d'action de l'asparaginase dans ce processus reste à déterminer [449]. De façon intéressante, la sécrétion de l'asparaginase de *S. typhimurium* permet à ce pathogène d'inhiber l'activité des cellules T effectrices ainsi que leur prolifération au niveau du site infectieux en induisant également une déplétion locale en asparagine [439]. Cette asparaginase semble donc être impliqué dans un mécanisme immunosuppresseur lui permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte. L'existence de tels mécanismes dépendants de l'expression de AnsA chez le bacille tuberculeux pourraient être recherchée. En collaboration avec le Docteur Chantal De Chastellier (CIML, Marseille), nous avons démarré des expériences de détection de la protéine AnsA à l'intérieur des macrophages par microscopie électronique.

Conclusion

Mon projet de thèse consistait à identifier les nutriments utilisés par le bacille tuberculeux pour soutenir son métabolisme azoté *in vivo* et permettre sa croissance durant le cycle infectieux. Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, que les acides aminés et en particulier l'aspartate et l'asparagine sont des sources d'azote nécessaires à la réplication du pathogène au sein des tissus, au moins chez la souris.

Nos travaux ont mis en évidence que le bacille tuberculeux possède un transporteur unique pour l'acquisition de l'aspartate nommé AnsP1, et confirmer que ce nutriment sert exclusivement de source d'azote pour promouvoir la croissance bactérienne. Egalement, nous avons pu localiser ce nutriment au niveau du phagosome de *M. tuberculosis* et démontrer que son acquisition est nécessaire à la virulence de la bactérie chez la souris.

Parallèlement, nous avons pu identifier le transporteur AnsP2 comme étant responsable, en partie, de l'import de l'asparagine chez le bacille ainsi qu'à sa croissance en présence d'asparagine comme unique source d'azote à pH acide. Nous avons pu également caractériser la protéine AnsA comme étant l'unique asparaginase du bacille tuberculeux et démontrer que sa présence est requise pour l'assimilation de l'azote présent dans l'asparagine, et ce notamment à pH acide.

De manière intéressante, nous avons pu démontrer que le mécanisme de sécrétion d'ammonium, corrélée à l'utilisation de cet acide aminé, est AnsA-dépendant et qu'il intervient dans la résistance du bacille au stress acide à l'intérieur des macrophages. Enfin, nous avons pu observer que AnsA est sécrété chez le bacille tuberculeux, probablement via le système de sécrétion SecA2, révélant ainsi que cet enzyme pourrait permettre la génération d'aspartate utilisable par la bactérie mais également jouer un rôle immunosuppresseur au sein de l'hôte.

Cette étude permet d'ouvrir la voie pour l'étude du métabolisme de l'azote chez *M. tuberculosis* durant son cycle infectieux qui, contrairement à celui du carbone, n'a été que peu étudié. Il serait notamment intéressant de déterminer les mécanismes par lesquels les acides aminés sont rendus accessibles à la bactérie au sein du phagosome. Les transporteurs SLC1A2 et SLC1A5 qui permettent l'import d'aspartate et d'asparagine, respectivement, pourraient assurer l'accès de ces acides aminés au pathogène au cours de l'infection. En effet, l'expression du gène *slc1a2* est très

augmentée chez le macrophage infecté par *M. tuberculosis* et il pourrait ainsi assurer l'import d'aspartate à l'intérieur des cellules ainsi qu'à l'intérieur des phagosomes si sa localisation sous-cellulaire le permet [450]. Le transporteur SLC1A5, quant à lui, peut être localisé à la membrane des phagosomes et est impliqué dans l'apport d'acides aminés assurant la réplication des pathogènes intracellulaires *F. tularensis* et *L. pneumophila* [218, 443, 444]. Ce dernier voit d'ailleurs son expression induite spécifiquement par la présence des pathogènes suggérant un mécanisme actif pour l'expression de transporteurs de nutriments phagosomiaux induit par les bactéries. Des expériences d'ARN interférence diminuant l'expression des gènes de ces transporteurs ainsi que des expériences d'immunohistochimie pour détecter leur présence éventuelle au phagosome de *M. tuberculosis* permettraient d'évaluer leur implication dans la nutrition du bacille au cours de l'infection. On peut noter que le transporteur SLC1A2 est également impliqué dans le transport de glutamate et le transporteur SLC1A5 dans celui de nombreux autres acides aminés tel que l'alanine, la sérine, la cystéine, la thréonine et la glutamine. Également, un autre transporteur d'acides aminés nommé SLC7A5, permettant l'import d'arginine, a également été localisé à la membrane des phagosomes. Ainsi, la localisation au phagosome de *M. tuberculosis* de ces transporteurs pourrait expliquer l'accessibilité de ces différents nutriments azotés à la bactérie durant l'infection. Cependant, on peut noter que l'acquisition des acides aminés n'est pas nécessairement liée à la présence de transporteurs sur la membrane du phagosome car ils pourraient être acquis, comme pour le fer, via la fusion du phagosome avec les endosomes de recyclage [451].

Cette étude a pu souligner, notamment via la caractérisation du mutant *ansP1-KO*, que l'étude de « mutants nutritionnels » est limitée par les conditions artificielles dans lesquelles les expériences d'infection de cellules cultivées *in vitro* sont réalisées. En effet, alors que le mutant *ansP1-KO* ne présente pas de défaut de croissance à l'intérieur de macrophages cultivés *in vitro*, il se révèle pourtant atténué pour sa croissance chez l'animal. Des cas similaires ont été reportés pour des mutants auxotrophes dépendant de l'acquisition d'acides aminés branchés ou de glutamine pour leur croissance [343, 344]. L'étude d'un mutant de la glutamine synthase GlnA1 a clairement permis de mettre en cause la concentration trop élevée en glutamine du milieu de culture cellulaire induisant une croissance du mutant dans les cellules ne corroborant pas avec son incapacité à survivre dans les tissus chez la souris. L'étude de « mutants nutritionnels » s'avère donc indispensablement liée à l'expérimentation animale.

Des techniques de métabolomiques non ciblées permettent, par un comparatif de tissus infectés avec des tissus sains, de cartographier l'environnement nutritionnel du bacille. Une de ces études a

d'ailleurs permis de mettre en évidence que les granulomes présents au niveau des poumons chez le cochon d'Inde constituent un environnement riche en aspartate [452]. Connaître le métabolisme du bacille tuberculeux lorsqu'il est présent au sein des tissus s'avèrerait particulièrement informatif de son métabolisme global durant l'infection. Cependant, l'extraction directe des métabolites bactériens à partir de tissus infectés est difficile à envisager du fait de la faible stabilité de ces métabolites, de leur quantité réduite et surtout de leur spécificité à l'égard des métabolites présents dans les tissus de l'hôte.

En revanche, des méthodes de criblage phénotypique (phénomique) ont été récemment développées et permettraient de faire avancer rapidement nos connaissances sur le métabolisme du bacille tuberculeux *in vitro*. Ces techniques permettent de déterminer les préférences nutritionnelles de microorganismes par le test d'un grand nombre de composés pour leur capacité à servir d'unique source de carbone ou d'azote à la croissance bactérienne dans diverses conditions environnementales tel que des pH acides ou une quantité réduite en oxygène [453, 454]. Également, le rôle de nombreux gènes reste à évaluer pour leur implication dans le métabolisme azoté de *M. tuberculosis* tels que les gènes codant pour des transporteurs de molécules azotées, notamment des acides aminés, ainsi que les gènes codant pour des enzymes assurant leur assimilation tel que AspB potentiellement impliqué dans l'assimilation de l'azote de l'aspartate. L'utilisation de criblages phénotypiques à l'aide de banques de mutants de transposition aléatoire permettrait d'identifier, de façon globale, les gènes impliqués dans l'utilisation de nutriments tels que les acides aminés chez la bactérie. Notamment, ces approches permettraient d'identifier des gènes dont la fonction première n'est pas prédite, comme ce fut le cas pour le transporteur AnsP1 et son rôle exclusif pour l'utilisation de l'aspartate chez le bacille tuberculeux.

Notre étude a donc permis de révéler le rôle de l'aspartate et de l'asparagine dans le métabolisme azoté de *M. tuberculosis* au cours de l'infection et ouvre plus généralement la voie à l'étude des mécanismes d'utilisation de ces acides aminés par la bactérie. L'élaboration de molécules inhibant l'acquisition et/ou l'assimilation de ces acides aminés par la bactérie afin d'aider à l'efficacité du système immunitaire ainsi qu'aux traitements antituberculeux actuels pourrait être envisagée. Enfin, cette étude a pu révéler le rôle insoupçonné des acides aminés pour promouvoir la croissance du bacille tuberculeux et pourrait conduire à une exploration plus fine de l'utilisation d'autres acides aminés chez la bactérie au cours de son cycle infectieux.

REFERENCES

1. Gagneux, S., *Host-pathogen coevolution in human tuberculosis*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1590): p. 850-9.
2. Young, D.B., H.P. Gideon, and R.J. Wilkinson, *Eliminating latent tuberculosis*. Trends Microbiol, 2009. **17**(5): p. 183-8.
3. Katona, P. and J. Katona-Apte, *The interaction between nutrition and infection*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(10): p. 1582-8.
4. Fischer Walker, C. and R.E. Black, *Zinc and the risk for infectious disease*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 255-75.
5. Pawlowski, A., et al., *Tuberculosis and HIV co-infection*. PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002464.
6. Corbett, E.L., et al., *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic*. Arch Intern Med, 2003. **163**(9): p. 1009-21.
7. Ghebreyesus, T.A., et al., *Tuberculosis and HIV: time for an intensified response*. Lancet, 2010. **375**(9728): p. 1757-8.
8. Harries, A.D., et al., *The HIV-associated tuberculosis epidemic--when will we act?* Lancet, 2010. **375**(9729): p. 1906-19.
9. Harries, A.D., et al., *Deaths from tuberculosis in sub-Saharan African countries with a high prevalence of HIV-1*. Lancet, 2001. **357**(9267): p. 1519-23.
10. Sullivan, T. and Y. Ben Amor, *The co-management of tuberculosis and diabetes: challenges and opportunities in the developing world*. PLoS Med, 2012. **9**(7): p. e1001269.
11. Rehm, J., et al., *The association between alcohol use, alcohol use disorders and tuberculosis (TB). A systematic review*. BMC Public Health, 2009. **9**: p. 450.
12. Wen, C.P., et al., *The reduction of tuberculosis risks by smoking cessation*. BMC Infect Dis, 2010. **10**: p. 156.
13. Lin, H.H., M. Ezzati, and M. Murray, *Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. PLoS Med, 2007. **4**(1): p. e20.
14. Ponce-De-Leon, A., et al., *Tuberculosis and diabetes in southern Mexico*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1584-90.
15. Marriott, I. and Y.M. Huet-Hudson, *Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms*. Immunol Res, 2006. **34**(3): p. 177-92.
16. Neyrolles, O. and L. Quintana-Murci, *Sexual inequality in tuberculosis*. PLoS Med, 2009. **6**(12): p. e1000199.
17. Yamamoto, Y., et al., *Sex differences in host resistance to Mycobacterium marinum infection in mice*. Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4089-96.
18. Azad, A.K., W. Sadee, and L.S. Schlesinger, *Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis*. Infect Immun, 2012. **80**(10): p. 3343-59.

19. Qu, H.Q., S.P. Fisher-Hoch, and J.B. McCormick, *Knowledge gaining by human genetic studies on tuberculosis susceptibility*. J Hum Genet, 2011. **56**(3): p. 177-82.
20. Che, N., et al., *Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(21-22): p. 1645-9.
21. Farhat, M., et al., *False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?* Int J Tuberc Lung Dis, 2006. **10**(11): p. 1192-204.
22. McNerney, R., et al., *Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities*. J Infect Dis, 2012. **205 Suppl 2**: p. S147-58.
23. Hepple, P., N. Ford, and R. McNerney, *Microscopy compared to culture for the diagnosis of tuberculosis in induced sputum samples: a systematic review*. Int J Tuberc Lung Dis, 2012. **16**(5): p. 579-88.
24. Cuevas, L.E., *The urgent need for new diagnostics for symptomatic tuberculosis in children*. Indian J Pediatr, 2011. **78**(4): p. 449-55.
25. Lawn, S.D., et al., *Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(4): p. 349-61.
26. Sester, M., et al., *Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. Eur Respir J, 2011. **37**(1): p. 100-11.
27. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
28. Garnier, T., et al., *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7877-82.
29. Liu, J., et al., *BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy*. Hum Vaccin, 2009. **5**(2): p. 70-8.
30. Andersen, P. and T.M. Doherty, *The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 656-62.
31. Brosch, R., et al., *Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5596-601.
32. Ritz, N., et al., *Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(5): p. 821-41.
33. Aguirre-Blanco, A.M., et al., *Strain-dependent variation in Mycobacterium bovis BCG-induced human T-cell activation and gamma interferon production in vitro*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 3197-201.
34. Keyser, A., et al., *BCG sub-strains induce variable protection against virulent pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection, with the capacity to drive Th2 immunity*. Vaccine, 2011. **29**(50): p. 9308-15.
35. Aldwell, F.E., et al., *Oral delivery of lipid-encapsulated Mycobacterium bovis BCG extends survival of the bacillus in vivo and induces a long-term protective immune response against tuberculosis*. Vaccine, 2006. **24**(12): p. 2071-8.
36. Olsen, A.W., et al., *The influence of remaining live BCG organisms in vaccinated mice on the maintenance of immunity to tuberculosis*. Scand J Immunol, 2004. **60**(3): p. 273-7.
37. Brandt, L., et al., *Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 672-8.

38. Demangel, C., et al., *Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with Mycobacterium bovis BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens*. *Infect Immun*, 2005. **73**(4): p. 2190-6.
39. Cayabyab, M.J., L. Macovei, and A. Campos-Neto, *Current and novel approaches to vaccine development against tuberculosis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012. **2**: p. 154.
40. Horwitz, M.A., et al., *Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13853-8.
41. Hoft, D.F., et al., *A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers*. *J Infect Dis*, 2008. **198**(10): p. 1491-501.
42. Grode, L., et al., *Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(9): p. 2472-9.
43. Farinacci, M., S. Weber, and S.H. Kaufmann, *The recombinant tuberculosis vaccine rBCG DeltaureC::hly(+) induces apoptotic vesicles for improved priming of CD4(+) and CD8(+) T cells*. *Vaccine*, 2012. **30**(52): p. 7608-14.
44. Grode, L., et al., *Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial*. *Vaccine*, 2013. **31**(9): p. 1340-8.
45. Jensen, K., et al., *A recombinant attenuated Mycobacterium tuberculosis vaccine strain is safe in immunosuppressed simian immunodeficiency virus-infected infant macaques*. *Clin Vaccine Immunol*, 2012. **19**(8): p. 1170-81.
46. Kaufmann, S.H., *Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation*. *Semin Immunol*, 2013. **25**(2): p. 172-81.
47. Martin, C., et al., *The live Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs*. *Vaccine*, 2006. **24**(17): p. 3408-19.
48. Arbues, A., et al., *Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials*. *Vaccine*, 2013.
49. Hoft, D.F., et al., *A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity*. *Vaccine*, 2012. **30**(12): p. 2098-108.
50. Tameris, M.D., et al., *Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial*. *Lancet*, 2013. **381**(9871): p. 1021-8.
51. Cardona, P.J., *RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006. **86**(3-4): p. 273-89.
52. Vilaplana, C., et al., *Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI*. *Vaccine*, 2010. **28**(4): p. 1106-16.
53. Gupta, A., et al., *Efficacy of Mycobacterium indicus pranii immunotherapy as an adjunct to chemotherapy for tuberculosis and underlying immune responses in the lung*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e39215.

54. Gupta, A., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of "Mycobacterium w" against Mycobacterium tuberculosis in mice immunized with live versus heat-killed M. w by the aerosol or parenteral route.* Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 223-31.
55. Zumla, A., P. Nahid, and S.T. Cole, *Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens.* Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(5): p. 388-404.
56. Velayati, A.A., P. Farnia, and M.R. Masjedi, *The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB).* Int J Clin Exp Med, 2013. **6**(4): p. 307-9.
57. Cohen, K. and G. Meintjes, *Management of individuals requiring antiretroviral therapy and TB treatment.* Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(1): p. 61-9.
58. Onyebujoh, P.C., I. Ribeiro, and C.C. Whalen, *Treatment Options for HIV-Associated Tuberculosis.* J Infect Dis, 2007. **196** Suppl 1: p. S35-45.
59. Cholo, M.C., et al., *Clofazimine: current status and future prospects.* J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(2): p. 290-8.
60. De Lorenzo, S., et al., *Efficacy and safety of meropenem-clavulanate added to linezolid-containing regimens in the treatment of MDR-/XDR-TB.* Eur Respir J, 2013. **41**(6): p. 1386-92.
61. Maiga, M., et al., *Successful shortening of tuberculosis treatment using adjuvant host-directed therapy with FDA-approved phosphodiesterase inhibitors in the mouse model.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30749.
62. Wong, E.B., K.A. Cohen, and W.R. Bishai, *Rising to the challenge: new therapies for tuberculosis.* Trends Microbiol, 2013.
63. Srinivasan, A., et al., *Low plasma levels of cholecalciferol and 13-cis-retinoic acid in tuberculosis: Implications in host-based chemotherapy.* Nutrition, 2013. **29**(10): p. 1245-51.
64. Kuijl, C., et al., *Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1.* Nature, 2007. **450**(7170): p. 725-30.
65. Lienhardt, C., et al., *Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects.* Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(6): p. 407-16.
66. Russell, D.G., C.E. Barry, 3rd, and J.L. Flynn, *Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us.* Science, 2010. **328**(5980): p. 852-6.
67. Sato, K., et al., *Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines.* J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1139-47.
68. Repasy, T., et al., *Intracellular bacillary burden reflects a burst size for Mycobacterium tuberculosis in vivo.* PLoS Pathog, 2013. **9**(2): p. e1003190.
69. Tailleux, L., et al., *Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells.* J Immunol, 2003. **170**(4): p. 1939-48.
70. Neyrolles, O., et al., *Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence?* PLoS One, 2006. **1**: p. e43.
71. Kleinnijenhuis, J., et al., *Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis.* Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 405310.
72. Astarie-Dequeker, C., et al., *Phthiocerol dimycocerosates of M. tuberculosis participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids.* PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000289.

73. Briken, V., et al., *Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response*. Mol Microbiol, 2004. **53**(2): p. 391-403.
74. Fukuda, T., et al., *Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis*. MBio, 2013. **4**(1): p. e00472-12.
75. Layre, E., et al., *Deciphering sulfoglycolipids of Mycobacterium tuberculosis*. J Lipid Res, 2011. **52**(6): p. 1098-110.
76. Indrigo, J., R.L. Hunter, Jr., and J.K. Actor, *Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 8): p. 2049-59.
77. Dorhoi, A., S.T. Reece, and S.H. Kaufmann, *For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 235-51.
78. Underhill, D.M., et al., *Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14459-63.
79. Liu, P.T., et al., *Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response*. Science, 2006. **311**(5768): p. 1770-3.
80. Kang, P.B., et al., *The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 987-99.
81. Lowe, D.M., et al., *Neutrophils in tuberculosis: friend or foe?* Trends Immunol, 2012. **33**(1): p. 14-25.
82. Russell, D.G., *Who puts the tubercle in tuberculosis?* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 39-47.
83. Cobat, A., et al., *Two loci control tuberculin skin test reactivity in an area hyperendemic for tuberculosis*. J Exp Med, 2009. **206**(12): p. 2583-91.
84. Schaible, U.E., et al., *Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis*. Nat Med, 2003. **9**(8): p. 1039-46.
85. Clayton, A.R., et al., *Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2362-74.
86. Kwon, O.J., *The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis*. J Korean Med Sci, 1997. **12**(6): p. 481-7.
87. Woodworth, J.S. and S.M. Behar, *Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells and their role in immunity*. Crit Rev Immunol, 2006. **26**(4): p. 317-52.
88. Stenger, S., et al., *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. Science, 1998. **282**(5386): p. 121-5.
89. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.
90. Caruso, A.M., et al., *Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5407-16.
91. Green, A.M., R. Difazio, and J.L. Flynn, *IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2013. **190**(1): p. 270-7.

92. O'Garra, A., et al., *The immune response in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 475-527.
93. Maglione, P.J. and J. Chan, *How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 676-86.
94. Russell, D.G., et al., *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma*. Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 943-8.
95. Egen, J.G., et al., *Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas*. Immunity, 2008. **28**(2): p. 271-84.
96. Botha, T. and B. Ryffel, *Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3110-8.
97. Diedrich, C.R., et al., *Reactivation of latent tuberculosis in cynomolgus macaques infected with SIV is associated with early peripheral T cell depletion and not virus load*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9611.
98. Selvaraj, S., et al., *In silico analysis of DosR regulon proteins of Mycobacterium tuberculosis*. Gene, 2012. **506**(1): p. 233-41.
99. Boon, C. and T. Dick, *How Mycobacterium tuberculosis goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later*. Future Microbiol, 2012. **7**(4): p. 513-8.
100. Bartek, I.L., et al., *The DosR regulon of M. tuberculosis and antibacterial tolerance*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(4): p. 310-6.
101. Rao, S.P., et al., *The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 11945-50.
102. Hett, E.C., M.C. Chao, and E.J. Rubin, *Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001020.
103. Russell-Goldman, E., et al., *A Mycobacterium tuberculosis Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes*. Infect Immun, 2008. **76**(9): p. 4269-81.
104. Aly, S., et al., *Oxygen status of lung granulomas in Mycobacterium tuberculosis-infected mice*. J Pathol, 2006. **210**(3): p. 298-305.
105. Cardona, P.J., *A spotlight on liquefaction: evidence from clinical settings and experimental models in tuberculosis*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 868246.
106. Flynn, J.L., et al., *Non-human primates: a model for tuberculosis research*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 116-8.
107. Calderon, V.E., et al., *A humanized mouse model of tuberculosis*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63331.
108. Harper, J., et al., *Mouse model of necrotic tuberculosis granulomas develops hypoxic lesions*. J Infect Dis, 2012. **205**(4): p. 595-602.
109. Volkman, H.E., et al., *Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium*. Science, 2010. **327**(5964): p. 466-9.
110. Davis, J.M. and L. Ramakrishnan, *The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection*. Cell, 2009. **136**(1): p. 37-49.
111. Desjardins, M., *Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(5): p. 183-6.

112. Pfeffer, S. and D. Aivazian, *Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 886-96.
113. Brown, F.C. and S.R. Pfeffer, *An update on transport vesicle tethering*. Mol Membr Biol, 2010. **27**(8): p. 457-61.
114. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 689-704.
115. Chavrier, P., et al., *Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments*. Cell, 1990. **62**(2): p. 317-29.
116. Takahashi, S., et al., *Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 17): p. 4049-57.
117. Flannagan, R.S., G. Cosio, and S. Grinstein, *Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 355-66.
118. Vieira, O.V., et al., *Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation*. J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 19-25.
119. Simonsen, A., et al., *EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 494-8.
120. Kinchen, J.M. and K.S. Ravichandran, *Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells*. Nature, 2010. **464**(7289): p. 778-82.
121. Poteryaev, D., et al., *Identification of the switch in early-to-late endosome transition*. Cell, 2010. **141**(3): p. 497-508.
122. Vieira, O.V., et al., *Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2501-14.
123. Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein, *The cell biology of phagocytosis*. Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 61-98.
124. Binker, M.G., et al., *Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2*. Cell Microbiol, 2007. **9**(9): p. 2153-66.
125. Huynh, K.K., et al., *LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 313-24.
126. Claus, V., et al., *Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9842-51.
127. Harrison, R.E., et al., *Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(18): p. 6494-506.
128. Jerala, R., et al., *pH-induced conformational transitions of the propeptide of human cathepsin L. A role for a molten globule state in zymogen activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(19): p. 11498-504.
129. Turk, B., D. Turk, and V. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 98-111.
130. Sturgill-Koszycki, S., et al., *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase*. Science, 1994. **263**(5147): p. 678-81.

131. Rohde, K., et al., *Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 37-54.
132. Armstrong, J.A. and P.D. Hart, *Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes*. J Exp Med, 1971. **134**(3 Pt 1): p. 713-40.
133. Clemens, D.L. and M.A. Horwitz, *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 257-70.
134. Fratti, R.A., et al., *Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 631-44.
135. Rajni, N. Rao, and L.S. Meena, *Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by Mycobacterium tuberculosis: LAM and Cord Factor: An Overview*. Biotechnol Res Int, 2011. **2011**: p. 274693.
136. Malik, Z.A., S.S. Iyer, and D.J. Kusner, *Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3392-401.
137. Vergne, I., J. Chua, and V. Deretic, *Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 653-9.
138. Vergne, I., J. Chua, and V. Deretic, *Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking*. Traffic, 2003. **4**(9): p. 600-6.
139. Deretic, V., et al., *Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism*. Cell Microbiol, 2006. **8**(5): p. 719-27.
140. Malik, Z.A., et al., *Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2811-5.
141. Thompson, C.R., et al., *Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3551-61.
142. Vergne, I., et al., *Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 751-60.
143. Vergne, I., et al., *Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4033-8.
144. Walburger, A., et al., *Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages*. Science, 2004. **304**(5678): p. 1800-4.
145. Tiwari, D., et al., *Key residues in Mycobacterium tuberculosis protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host*. J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27467-79.
146. Gordon, A.H., P.D. Hart, and M.R. Young, *Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages*. Nature, 1980. **286**(5768): p. 79-80.
147. Hart, P.D. and M.R. Young, *Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel*

- pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast.* J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 881-9.
148. Sendide, K., et al., *Mycobacterium bovis BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface.* Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4200-9.
 149. Goren, M.B., O. Brokl, and W.B. Schaefer, *Lipids of putative relevance to virulence in Mycobacterium tuberculosis: phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid.* Infect Immun, 1974. **9**(1): p. 150-8.
 150. Pethe, K., et al., *Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13642-7.
 151. Stewart, G.R., et al., *Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification.* PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. 269-78.
 152. Brodin, P., et al., *High content phenotypic cell-based visual screen identifies Mycobacterium tuberculosis acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling.* PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001100.
 153. Gomes, M.S., et al., *Survival of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis in acidified vacuoles of murine macrophages.* Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3199-206.
 154. Schaible, U.E., et al., *Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages.* J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1290-6.
 155. Welin, A., et al., *Importance of phagosomal functionality for growth restriction of Mycobacterium tuberculosis in primary human macrophages.* J Innate Immun, 2011. **3**(5): p. 508-18.
 156. MacMicking, J.D., G.A. Taylor, and J.D. McKinney, *Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47.* Science, 2003. **302**(5645): p. 654-9.
 157. Leake, E.S., Q.N. Myrvik, and M.J. Wright, *Phagosomal membranes of Mycobacterium bovis BCG-immune alveolar macrophages are resistant to disruption by Mycobacterium tuberculosis H37Rv.* Infect Immun, 1984. **45**(2): p. 443-6.
 158. Myrvik, Q.N., E.S. Leake, and M.J. Wright, *Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of Mycobacterium tuberculosis. A correlate of virulence.* Am Rev Respir Dis, 1984. **129**(2): p. 322-8.
 159. Clemens, D.L., B.Y. Lee, and M.A. Horwitz, *The Mycobacterium tuberculosis phagosome in human macrophages is isolated from the host cell cytoplasm.* Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5800-7.
 160. Moreira, A.L., et al., *Sequestration of Mycobacterium tuberculosis in tight vacuoles in vivo in lung macrophages of mice infected by the respiratory route.* Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 305-8.
 161. Stamm, L.M., et al., *Mycobacterium marinum escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility.* J Exp Med, 2003. **198**(9): p. 1361-8.
 162. Smith, J., et al., *Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in Mycobacterium marinum escape from the vacuole.* Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5478-87.

163. Hsu, T., et al., *The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12420-5.
164. Guinn, K.M., et al., *Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2004. **51**(2): p. 359-70.
165. van der Wel, N., et al., *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1287-98.
166. Welin, A. and M. Lerm, *Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2012. **92**(2): p. 113-20.
167. de Chastellier, C., *The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 526-42.
168. Tsunawaki, S. and C.F. Nathan, *Enzymatic basis of macrophage activation. Kinetic analysis of superoxide production in lysates of resident and activated mouse peritoneal macrophages and granulocytes*. J Biol Chem, 1984. **259**(7): p. 4305-12.
169. Nunes, P., N. Demarex, and M.C. Dinauer, *Regulation Of The NADPH Oxidase And Associated Ion Fluxes During Phagocytosis*. Traffic, 2013.
170. Imlay, J.A., *Pathways of oxidative damage*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 395-418.
171. Chan, J., et al., *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 1111-22.
172. Russell, D.G., *Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 252-68.
173. Sun, J., et al., *Mycobacterium tuberculosis nucleoside diphosphate kinase inactivates small GTPases leading to evasion of innate immunity*. PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003499.
174. Edwards, K.M., et al., *Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(12): p. 2213-9.
175. Ng, V.H., et al., *Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst*. Mol Microbiol, 2004. **52**(5): p. 1291-302.
176. Zhu, L., C. Gunn, and J.S. Beckman, *Bactericidal activity of peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 452-7.
177. Zaki, M.H., T. Akuta, and T. Akaike, *Nitric oxide-induced nitrative stress involved in microbial pathogenesis*. J Pharmacol Sci, 2005. **98**(2): p. 117-29.
178. Miller, B.H., et al., *Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection*. Infect Immun, 2004. **72**(5): p. 2872-8.
179. Davis, A.S., et al., *Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes*. PLoS Pathog, 2007. **3**(12): p. e186.
180. MacMicking, J.D., et al., *Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5243-8.
181. Zacharia, V.M. and M.U. Shiloh, *Effect of carbon monoxide on Mycobacterium tuberculosis pathogenesis*. Med Gas Res, 2012. **2**(1): p. 30.
182. Shiloh, M.U., P. Manzanillo, and J.S. Cox, *Mycobacterium tuberculosis senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(5): p. 323-30.

183. Darwin, K.H. and C.F. Nathan, *Role for nucleotide excision repair in virulence of Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2005. **73**(8): p. 4581-7.
184. Darwin, K.H., et al., *The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide*. *Science*, 2003. **302**(5652): p. 1963-6.
185. Mendez-Samperio, P., *Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections*. *Peptides*, 2008. **29**(10): p. 1836-41.
186. Lehrer, R.I., A.K. Lichtenstein, and T. Ganz, *Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 105-28.
187. Hancock, R.E. and G. Diamond, *The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(9): p. 402-10.
188. Rivas-Santiago, B., et al., *Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells*. *Infect Immun*, 2005. **73**(8): p. 4505-11.
189. Rivas-Santiago, B., et al., *The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 2008. **67**(5): p. 448-52.
190. Rivas-Santiago, B., et al., *beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection*. *J Infect Dis*, 2006. **194**(5): p. 697-701.
191. Nickel, D., et al., *Hypoxia triggers the expression of human beta defensin 2 and antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in human macrophages*. *J Immunol*, 2012. **188**(8): p. 4001-7.
192. Fattorini, L., et al., *In vitro activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against Mycobacterium tuberculosis*. *Peptides*, 2004. **25**(7): p. 1075-7.
193. Rivas-Santiago, B., et al., *Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells*. *Infect Immun*, 2008. **76**(3): p. 935-41.
194. Sonawane, A., et al., *Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages*. *Cell Microbiol*, 2011. **13**(10): p. 1601-17.
195. Liu, P.T., et al., *Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin*. *J Immunol*, 2007. **179**(4): p. 2060-3.
196. Martineau, A.R., et al., *IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37*. *J Immunol*, 2007. **178**(11): p. 7190-8.
197. Yang, D., O. Chertov, and J.J. Oppenheim, *Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(5): p. 691-7.
198. van der Does, A.M., et al., *LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature*. *J Immunol*, 2010. **185**(3): p. 1442-9.
199. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. *Cell*, 2011. **147**(4): p. 728-41.
200. Klionsky, D.J., et al., *A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition)*. *Autophagy*, 2011. **7**(11): p. 1273-94.

201. Rubinsztein, D.C., T. Shpilka, and Z. Elazar, *Mechanisms of autophagosome biogenesis*. *Curr Biol*, 2012. **22**(1): p. R29-34.
202. Randow, F. and C. Munz, *Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(10): p. 475-87.
203. Singh, S.B., et al., *Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria*. *Science*, 2006. **313**(5792): p. 1438-41.
204. King, K.Y., et al., *Polymorphic allele of human IRGM1 is associated with susceptibility to tuberculosis in African Americans*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16317.
205. Vergne, I., et al., *Autophagy in immune defense against Mycobacterium tuberculosis*. *Autophagy*, 2006. **2**(3): p. 175-8.
206. Wang, Y., et al., *Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis*. *Autophagy*, 2013. **9**(10).
207. Gutierrez, M.G., et al., *Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages*. *Cell*, 2004. **119**(6): p. 753-66.
208. Songane, M., et al., *The role of autophagy in host defence against Mycobacterium tuberculosis infection*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2012. **92**(5): p. 388-96.
209. Briken, V., *Mycobacterium tuberculosis genes involved in regulation of host cell death*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **783**: p. 93-102.
210. Behar, S.M., et al., *Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(3): p. 279-87.
211. Lee, J., M. Hartman, and H. Kornfeld, *Macrophage apoptosis in tuberculosis*. *Yonsei Med J*, 2009. **50**(1): p. 1-11.
212. Keane, J., H.G. Remold, and H. Kornfeld, *Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages*. *J Immunol*, 2000. **164**(4): p. 2016-20.
213. Velmurugan, K., et al., *Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(7): p. e110.
214. Hinchey, J., et al., *Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(8): p. 2279-88.
215. Bafica, A., et al., *Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(6): p. 1601-6.
216. Chen, M., et al., *Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death*. *J Exp Med*, 2008. **205**(12): p. 2791-801.
217. Soldati, T. and O. Neyrolles, *Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)!* *Traffic*, 2012. **13**(8): p. 1042-52.
218. Trost, M., et al., *The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages*. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 143-54.
219. Lemire, J.A., J.J. Harrison, and R.J. Turner, *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(6): p. 371-84.
220. Wagner, D., et al., *Elemental analysis of Mycobacterium avium-, Mycobacterium tuberculosis-, and Mycobacterium smegmatis-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system*. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1491-500.

221. Wolschendorf, F., et al., *Copper resistance is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1621-6.
222. Ward, S.K., et al., *CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2010. **77**(5): p. 1096-110.
223. Botella, H., et al., *Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages*. Cell Host Microbe, 2011. **10**(3): p. 248-59.
224. Appelberg, R., *Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1117-28.
225. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *A nutritive view on the host-pathogen interplay*. Trends Microbiol, 2005. **13**(8): p. 373-80.
226. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *Iron and microbial infection*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(12): p. 946-53.
227. Nairz, M., et al., *The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface*. Cell Microbiol, 2010. **12**(12): p. 1691-702.
228. Gruenheid, S., et al., *Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 717-30.
229. Searle, S., et al., *Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 19)**: p. 2855-66.
230. Goswami, T., et al., *Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 3): p. 511-9.
231. Forbes, J.R. and P. Gros, *Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1884-92.
232. Li, X., et al., *SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15831.
233. Greenwood, C.M., et al., *Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(2): p. 405-16.
234. Zwilling, B.S., et al., *Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1386-92.
235. North, R.J., et al., *Consequence of Nramp1 deletion to Mycobacterium tuberculosis infection in mice*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5811-4.
236. Van Zandt, K.E., et al., *The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 689-700.
237. Nairz, M., et al., *The co-ordinated regulation of iron homeostasis in murine macrophages limits the availability of iron for intracellular Salmonella typhimurium*. Cell Microbiol, 2007. **9**(9): p. 2126-40.
238. Byrd, T.F. and M.A. Horwitz, *Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 969-76.
239. Byrd, T.F. and M.A. Horwitz, *Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of Legionella pneumophila by limiting the availability of iron*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1457-65.

240. Howard, D.H., *Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(3): p. 394-404.
241. Haley, K.P. and E.P. Skaar, *A battle for iron: host sequestration and Staphylococcus aureus acquisition*. Microbes Infect, 2012. **14**(3): p. 217-27.
242. Rodriguez, G.M., *Control of iron metabolism in Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol, 2006. **14**(7): p. 320-7.
243. Krithika, R., et al., *A genetic locus required for iron acquisition in Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2069-74.
244. Gobin, J. and M.A. Horwitz, *Exochelins of Mycobacterium tuberculosis remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the M. tuberculosis cell wall*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1527-32.
245. Olakanmi, O., et al., *The nature of extracellular iron influences iron acquisition by Mycobacterium tuberculosis residing within human macrophages*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2022-8.
246. Olakanmi, O., et al., *Intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49727-34.
247. Raghu, B., G.R. Sarma, and P. Venkatesan, *Effect of iron on the growth and siderophore production of mycobacteria*. Biochem Mol Biol Int, 1993. **31**(2): p. 341-8.
248. De Voss, J.J., et al., *The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1252-7.
249. Rodriguez, G.M. and I. Smith, *Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2006. **188**(2): p. 424-30.
250. Farhana, A., et al., *Mechanistic insights into a novel exporter-importer system of Mycobacterium tuberculosis unravel its role in trafficking of iron*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2087.
251. Wells, R.M., et al., *Discovery of a siderophore export system essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003120.
252. Siegrist, M.S., et al., *Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18792-7.
253. Jones, C.M. and M. Niederweis, *Mycobacterium tuberculosis can utilize heme as an iron source*. J Bacteriol, 2011. **193**(7): p. 1767-70.
254. Tullius, M.V., et al., *Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5051-6.
255. Owens, C.P., et al., *Characterization of heme ligation properties of Rv0203, a secreted heme binding protein involved in Mycobacterium tuberculosis heme uptake*. Biochemistry, 2012. **51**(7): p. 1518-31.
256. Nambu, S., et al., *A new way to degrade heme: the Mycobacterium tuberculosis enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO*. J Biol Chem, 2013. **288**(14): p. 10101-9.
257. Owens, C.P., et al., *The Mycobacterium tuberculosis Secreted Protein Rv0203 Transfers Heme to Membrane Proteins MmpL3 and MmpL11*. J Biol Chem, 2013. **288**(30): p. 21714-28.

258. Camaschella, C. and P. Strati, *Recent advances in iron metabolism and related disorders*. Intern Emerg Med, 2010. **5**(5): p. 393-400.
259. Agranoff, D., et al., *Mycobacterium tuberculosis expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family*. J Exp Med, 1999. **190**(5): p. 717-24.
260. Boechat, N., et al., *Disruption of the gene homologous to mammalian Nramp1 in Mycobacterium tuberculosis does not affect virulence in mice*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4124-31.
261. Manabe, Y.C., et al., *Attenuation of virulence in Mycobacterium tuberculosis expressing a constitutively active iron repressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12844-8.
262. Gold, B., et al., *The Mycobacterium tuberculosis IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages*. Mol Microbiol, 2001. **42**(3): p. 851-65.
263. Reddy, P.V., et al., *Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection*. J Bacteriol, 2012. **194**(3): p. 567-75.
264. Johnson, E.E., et al., *Siderocalin inhibits the intracellular replication of Mycobacterium tuberculosis in macrophages*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **58**(1): p. 138-45.
265. Hoette, T.M., et al., *Immune interference in Mycobacterium tuberculosis intracellular iron acquisition through siderocalin recognition of carboxymycobactins*. ACS Chem Biol, 2011. **6**(12): p. 1327-31.
266. Halaas, O., et al., *Intracellular Mycobacterium avium intersect transferrin in the Rab11(+) recycling endocytic pathway and avoid lipocalin 2 trafficking to the lysosomal pathway*. J Infect Dis, 2010. **201**(5): p. 783-92.
267. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
268. Yang, C.S., et al., *NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3696-705.
269. Jo, E.K., *Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy*. Cell Microbiol, 2010. **12**(8): p. 1026-35.
270. Raynaud, C., et al., *The functions of OmpATb, a pore-forming protein of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 191-201.
271. Vandal, O.H., et al., *Acid-susceptible mutants of Mycobacterium tuberculosis share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment*. J Bacteriol, 2009. **191**(2): p. 625-31.
272. Vandal, O.H., C.F. Nathan, and S. Ehrt, *Acid resistance in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2009. **191**(15): p. 4714-21.
273. Zhang, Y. and D. Mitchison, *The curious characteristics of pyrazinamide: a review*. Int J Tuberc Lung Dis, 2003. **7**(1): p. 6-21.
274. Brennan, P.J., *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 91-7.
275. Zuber, B., et al., *Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state*. J Bacteriol, 2008. **190**(16): p. 5672-80.

276. Brennan, P.J. and H. Nikaido, *The envelope of mycobacteria*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 29-63.
277. Camacho, L.R., et al., *Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of Mycobacterium tuberculosis. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 19845-54.
278. Vandal, O.H., et al., *A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 849-54.
279. Small, J.L., et al., *Substrate specificity of MarP, a periplasmic protease required for resistance to acid and oxidative stress in Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2013. **288**(18): p. 12489-99.
280. Rohde, K.H., R.B. Abramovitch, and D.G. Russell, *Mycobacterium tuberculosis invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 352-64.
281. Tan, S., et al., *Mycobacterium tuberculosis responds to chloride and pH as synergistic cues to the immune status of its host cell*. PLoS Pathog, 2013. **9**(4): p. e1003282.
282. Abramovitch, R.B., et al., *aprABC: a Mycobacterium tuberculosis complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome*. Mol Microbiol, 2011. **80**(3): p. 678-94.
283. Senaratne, R.H., et al., *Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. J Bacteriol, 1998. **180**(14): p. 3541-7.
284. Molle, V., et al., *pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from Mycobacterium tuberculosis and characterization of the channel by peptidic dissection*. Mol Microbiol, 2006. **61**(3): p. 826-37.
285. Teriete, P., et al., *Mycobacterium tuberculosis Rv0899 adopts a mixed alpha/beta-structure and does not form a transmembrane beta-barrel*. Biochemistry, 2010. **49**(13): p. 2768-77.
286. Song, H., et al., *Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to acidic environments*. Mol Microbiol, 2011. **80**(4): p. 900-18.
287. Foster, J.W., *Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(11): p. 898-907.
288. Biukovic, G., et al., *Variations of subunit {varepsilon} of the Mycobacterium tuberculosis F1Fo ATP synthase and a novel model for mechanism of action of the tuberculosis drug TMC207*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(1): p. 168-76.
289. Haagsma, A.C., et al., *ATP synthase in slow- and fast-growing mycobacteria is active in ATP synthesis and blocked in ATP hydrolysis direction*. FEMS Microbiol Lett, 2010. **313**(1): p. 68-74.
290. Lee, E.J., M.H. Pontes, and E.A. Groisman, *A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase*. Cell, 2013. **154**(1): p. 146-56.
291. Buchmeier, N., et al., *A parallel intraphagosomal survival strategy shared by mycobacterium tuberculosis and Salmonella enterica*. Mol Microbiol, 2000. **35**(6): p. 1375-82.
292. Viala, J.P., et al., *Sensing and adaptation to low pH mediated by inducible amino acid decarboxylases in Salmonella*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22397.

293. Park, Y.K., et al., *Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 1996. **20**(3): p. 605-11.
294. Giles, T.N. and D.E. Graham, *Characterization of an acid-dependent arginine decarboxylase enzyme from Chlamydomophila pneumoniae*. J Bacteriol, 2007. **189**(20): p. 7376-83.
295. De Biase, D. and E. Pennacchiotti, *Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the gadBC operon*. Mol Microbiol, 2012. **86**(4): p. 770-86.
296. Via, L.E., et al., *Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2333-40.
297. Wayne, L.G. and C.D. Sohaskey, *Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 139-63.
298. Sherman, D.R., et al., *Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha-crystallin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7534-9.
299. Rustad, T.R., et al., *Hypoxia: a window into Mycobacterium tuberculosis latency*. Cell Microbiol, 2009. **11**(8): p. 1151-9.
300. Voskuil, M.I., K.C. Visconti, and G.K. Schoolnik, *Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy*. Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(3-4): p. 218-27.
301. Hosler, J.P., S. Ferguson-Miller, and D.A. Mills, *Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 165-87.
302. Honaker, R.W., et al., *Unique roles of DosT and DosS in DosR regulon induction and Mycobacterium tuberculosis dormancy*. Infect Immun, 2009. **77**(8): p. 3258-63.
303. Boon, C. and T. Dick, *Mycobacterium bovis BCG response regulator essential for hypoxic dormancy*. J Bacteriol, 2002. **184**(24): p. 6760-7.
304. Honaker, R.W., et al., *DosS responds to a reduced electron transport system to induce the Mycobacterium tuberculosis DosR regulon*. J Bacteriol, 2010. **192**(24): p. 6447-55.
305. Kumar, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11568-73.
306. Voskuil, M.I., et al., *Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 705-13.
307. Kim, M.J., et al., *Different roles of DosS and DosT in the hypoxic adaptation of Mycobacteria*. J Bacteriol, 2010. **192**(19): p. 4868-75.
308. Park, H.D., et al., *Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2003. **48**(3): p. 833-43.
309. Rosenkrands, I., et al., *Hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins*. J Bacteriol, 2002. **184**(13): p. 3485-91.
310. Starck, J., et al., *Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis grown under aerobic and anaerobic conditions*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 11): p. 3821-9.
311. Yuan, Y., et al., *The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9578-83.

312. Stewart, J.N., et al., *Increased pathology in lungs of mice after infection with an alpha-crystallin mutant of Mycobacterium tuberculosis: changes in cathepsin proteases and certain cytokines*. *Microbiology*, 2006. **152**(Pt 1): p. 233-44.
313. Hu, Y., et al., *Deletion of the Mycobacterium tuberculosis alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo*. *Infect Immun*, 2006. **74**(2): p. 861-8.
314. Chang, Z., et al., *Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(12): p. 7218-23.
315. Hu, Y. and A.R. Coates, *Mycobacterium tuberculosis acg gene is required for growth and virulence in vivo*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e20958.
316. Chauviac, F.X., et al., *Crystal structure of reduced MsAcg, a putative nitroreductase from Mycobacterium smegmatis and a close homologue of Mycobacterium tuberculosis Acg*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(53): p. 44372-83.
317. Purkayastha, A., L.A. McCue, and K.A. McDonough, *Identification of a Mycobacterium tuberculosis putative classical nitroreductase gene whose expression is coregulated with that of the acr aene within macrophages, in standing versus shaking cultures, and under low oxygen conditions*. *Infect Immun*, 2002. **70**(3): p. 1518-29.
318. Chao, M.C. and E.J. Rubin, *Letting sleeping dos lie: does dormancy play a role in tuberculosis?* *Annu Rev Microbiol*, 2010. **64**: p. 293-311.
319. Parish, T., et al., *Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2003. **71**(3): p. 1134-40.
320. Malhotra, V., et al., *Disruption of response regulator gene, devR, leads to attenuation in virulence of Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2004. **231**(2): p. 237-45.
321. Converse, P.J., et al., *Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in Mycobacterium tuberculosis virulence in three animal models*. *Infect Immun*, 2009. **77**(3): p. 1230-7.
322. Richardson, D.J., *Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment*. *Microbiology*, 2000. **146** (Pt 3): p. 551-71.
323. Sohaskey, C.D., *Nitrate enhances the survival of Mycobacterium tuberculosis during inhibition of respiration*. *J Bacteriol*, 2008. **190**(8): p. 2981-6.
324. Wayne, L.G. and L.G. Hayes, *Nitrate reduction as a marker for hypoxic shiftdown of Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*, 1998. **79**(2): p. 127-32.
325. Moreno-Vivian, C., et al., *Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(21): p. 6573-84.
326. Sohaskey, C.D. and L.G. Wayne, *Role of narK2X and narGHJ in hypoxic upregulation of nitrate reduction by Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(24): p. 7247-56.
327. Khan, A. and D. Sarkar, *Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency*. *Microbiology*, 2012. **158**(Pt 2): p. 301-7.
328. Sohaskey, C.D., *Regulation of nitrate reductase activity in Mycobacterium tuberculosis by oxygen and nitric oxide*. *Microbiology*, 2005. **151**(Pt 11): p. 3803-10.
329. Giffin, M.M., et al., *Mutational analysis of the respiratory nitrate transporter Nark2 of Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45459.

330. Akhtar, S., et al., *Nitrite Reductase NirBD Is Induced and Plays an Important Role during In Vitro Dormancy of Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2013. **195**(20): p. 4592-9.
331. Chauhan, S., A. Singh, and J.S. Tyagi, *A single-nucleotide mutation in the -10 promoter region inactivates the narK2X promoter in Mycobacterium bovis and Mycobacterium bovis BCG and has an application in diagnosis*. FEMS Microbiol Lett, 2010. **303**(2): p. 190-6.
332. Honaker, R.W., et al., *Mycobacterium bovis BCG vaccine strains lack narK2 and narX induction and exhibit altered phenotypes during dormancy*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2587-93.
333. Fritz, C., et al., *Dependence of Mycobacterium bovis BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific*. Infect Immun, 2002. **70**(1): p. 286-91.
334. Weber, I., et al., *Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of Mycobacterium bovis BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice*. Mol Microbiol, 2000. **35**(5): p. 1017-25.
335. Watanabe, S., et al., *Fumarate reductase activity maintains an energized membrane in anaerobic Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002287.
336. Eoh, H. and K.Y. Rhee, *Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(16): p. 6554-9.
337. Zhang, Y.J. and E.J. Rubin, *Feast or famine: the host-pathogen battle over amino acids*. Cell Microbiol, 2013. **15**(7): p. 1079-87.
338. Gordhan, B.G., et al., *Construction and phenotypic characterization of an auxotrophic mutant of Mycobacterium tuberculosis defective in L-arginine biosynthesis*. Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 3080-4.
339. Hondalus, M.K., et al., *Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2888-98.
340. Pavelka, M.S., Jr., et al., *Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2003. **71**(7): p. 4190-2.
341. Smith, D.A., et al., *Characterization of auxotrophic mutants of Mycobacterium tuberculosis and their potential as vaccine candidates*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 1142-50.
342. Parish, T., *Starvation survival response of Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2003. **185**(22): p. 6702-6.
343. Tullius, M.V., G. Harth, and M.A. Horwitz, *Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of Mycobacterium tuberculosis in human THP-1 macrophages and guinea pigs*. Infect Immun, 2003. **71**(7): p. 3927-36.
344. Awasthy, D., et al., *Inactivation of the ilvB1 gene in Mycobacterium tuberculosis leads to branched-chain amino acid auxotrophy and attenuation of virulence in mice*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 9): p. 2978-87.
345. Sambandamurthy, V.K., et al., *A pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis is highly attenuated and protects mice against tuberculosis*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1171-4.
346. Jackson, M., et al., *Persistence and protective efficacy of a Mycobacterium tuberculosis auxotroph vaccine*. Infect Immun, 1999. **67**(6): p. 2867-73.
347. Peirs, P., et al., *Mycobacterium tuberculosis with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1898-902.

348. Potrykus, K. and M. Cashel, *(p)ppGpp: still magical?* Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 35-51.
349. Avarbock, D., et al., *Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from Mycobacterium tuberculosis*. Gene, 1999. **233**(1-2): p. 261-9.
350. Klinkenberg, L.G., et al., *The stringent response is required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs*. J Infect Dis, 2010. **202**(9): p. 1397-404.
351. Primm, T.P., et al., *The stringent response of Mycobacterium tuberculosis is required for long-term survival*. J Bacteriol, 2000. **182**(17): p. 4889-98.
352. Connolly, L.E. and J.S. Cox, *CarD tricks and magic spots: mechanisms of stringent control in mycobacteria*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(1): p. 1-2.
353. Stallings, C.L., et al., *CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for Mycobacterium tuberculosis persistence*. Cell, 2009. **138**(1): p. 146-59.
354. Srivastava, D.B., et al., *Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(31): p. 12619-24.
355. Kim, M.J., et al., *Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(7): p. 258-74.
356. Singh, V., et al., *Mycobacterium tuberculosis-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(5): p. 669-81.
357. Daniel, J., et al., *Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002093.
358. Peyron, P., et al., *Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000204.
359. Beatty, W.L., et al., *Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages*. Traffic, 2000. **1**(3): p. 235-47.
360. Beatty, W.L., H.J. Ullrich, and D.G. Russell, *Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event*. Eur J Cell Biol, 2001. **80**(1): p. 31-40.
361. Brzostek, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis is able to accumulate and utilize cholesterol*. J Bacteriol, 2009. **191**(21): p. 6584-91.
362. Pandey, A.K. and C.M. Sassetti, *Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4376-80.
363. Griffin, J.E., et al., *Cholesterol catabolism by Mycobacterium tuberculosis requires transcriptional and metabolic adaptations*. Chem Biol, 2012. **19**(2): p. 218-27.
364. Griffin, J.E., et al., *High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002251.
365. Van der Geize, R., et al., *A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into Mycobacterium tuberculosis survival in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1947-52.
366. Kendall, S.L., et al., *A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2007. **65**(3): p. 684-99.
367. Yang, X., et al., *Cholesterol is not an essential source of nutrition for Mycobacterium tuberculosis during infection*. J Bacteriol, 2011. **193**(6): p. 1473-6.

368. Chang, J.C., et al., *igr Genes and Mycobacterium tuberculosis cholesterol metabolism*. J Bacteriol, 2009. **191**(16): p. 5232-9.
369. Waltermann, M., et al., *Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up*. Mol Microbiol, 2005. **55**(3): p. 750-63.
370. Garton, N.J., et al., *Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 10): p. 2951-8.
371. Low, K.L., et al., *Lipid droplet-associated proteins are involved in the biosynthesis and hydrolysis of triacylglycerol in Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21662-70.
372. Sirakova, T.D., et al., *Identification of a diacylglycerol acyltransferase gene involved in accumulation of triacylglycerol in Mycobacterium tuberculosis under stress*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 9): p. 2717-25.
373. Baek, S.H., A.H. Li, and C.M. Sassetti, *Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity*. PLoS Biol, 2011. **9**(5): p. e1001065.
374. Deb, C., et al., *A novel in vitro multiple-stress dormancy model for Mycobacterium tuberculosis generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e6077.
375. Daniel, J., et al., *Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in Mycobacterium tuberculosis as it goes into a dormancy-like state in culture*. J Bacteriol, 2004. **186**(15): p. 5017-30.
376. Chauhan, S. and J.S. Tyagi, *Powerful induction of divergent tgs1-Rv3131 genes in Mycobacterium tuberculosis is mediated by DevR interaction with a high-affinity site and an adjacent cryptic low-affinity site*. J Bacteriol, 2009. **191**(19): p. 6075-81.
377. Deb, C., et al., *A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3866-75.
378. Titgemeyer, F., et al., *A genomic view of sugar transport in Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2007. **189**(16): p. 5903-15.
379. Rengarajan, J., B.R. Bloom, and E.J. Rubin, *Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8327-32.
380. Sassetti, C.M. and E.J. Rubin, *Genetic requirements for mycobacterial survival during infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12989-94.
381. Kalscheuer, R., et al., *Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21761-6.
382. Marrero, J., et al., *Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for Mycobacterium tuberculosis to establish and maintain infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9819-24.
383. Marrero, J., et al., *Glucose phosphorylation is required for Mycobacterium tuberculosis persistence in mice*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003116.
384. Rachman, H., et al., *Mycobacterium tuberculosis gene expression profiling within the context of protein networks*. Microbes Infect, 2006. **8**(3): p. 747-57.

385. Schnappinger, D., et al., *Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 693-704.
386. Russell, D.G., et al., *Mycobacterium tuberculosis wears what it eats*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(1): p. 68-76.
387. Eisenreich, W., et al., *Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(6): p. 401-12.
388. Lorenz, M.C. and G.R. Fink, *Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence*. Eukaryot Cell, 2002. **1**(5): p. 657-62.
389. McKinney, J.D., et al., *Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 735-8.
390. Munoz-Elias, E.J. and J.D. McKinney, *Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence*. Nat Med, 2005. **11**(6): p. 638-44.
391. Gould, T.A., et al., *Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2006. **61**(4): p. 940-7.
392. Munoz-Elias, E.J., et al., *Role of the methylcitrate cycle in Mycobacterium tuberculosis metabolism, intracellular growth, and virulence*. Mol Microbiol, 2006. **60**(5): p. 1109-22.
393. Jain, M., et al., *Lipidomics reveals control of Mycobacterium tuberculosis virulence lipids via metabolic coupling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5133-8.
394. Ouellet, H., J.B. Johnston, and P.R. de Montellano, *Cholesterol catabolism as a therapeutic target in Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol, 2011. **19**(11): p. 530-9.
395. Ji, L., et al., *Identification of mannich base as a novel inhibitor of Mycobacterium tuberculosis isocitrate by high-throughput screening*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(3): p. 376-82.
396. Williams, K.J., et al., *Adenylylation of mycobacterial GlnK (Pll) protein is induced by nitrogen limitation*. Tuberculosis (Edinb), 2013. **93**(2): p. 198-206.
397. Read, R., et al., *The role of GlnD in ammonia assimilation in Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2007. **87**(4): p. 384-90.
398. Bandyopadhyay, A., et al., *Expression and molecular characterization of the Mycobacterium tuberculosis Pll protein*. J Biochem, 2010. **147**(2): p. 279-89.
399. Harper, C., et al., *Regulation of nitrogen metabolism in Mycobacterium tuberculosis: a comparison with mechanisms in Corynebacterium glutamicum and Streptomyces coelicolor*. IUBMB Life, 2008. **60**(10): p. 643-50.
400. Amon, J., F. Titgemeyer, and A. Burkovski, *Common patterns - unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(4): p. 588-605.
401. Hayward, D., P.D. van Helden, and I.J. Wiid, *Glutamine synthetase sequence evolution in the mycobacteria and their use as molecular markers for Actinobacteria speciation*. BMC Evol Biol, 2009. **9**: p. 48.
402. Harth, G., et al., *All four Mycobacterium tuberculosis glnA genes encode glutamine synthetase activities but only GlnA1 is abundantly expressed and essential for bacterial homeostasis*. Mol Microbiol, 2005. **58**(4): p. 1157-72.

403. Harth, G. and M.A. Horwitz, *Inhibition of Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 456-64.
404. Tullius, M.V., G. Harth, and M.A. Horwitz, *High extracellular levels of Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6348-63.
405. Chandra, H., et al., *Glutamine synthetase encoded by glnA-1 is necessary for cell wall resistance and pathogenicity of Mycobacterium bovis*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 12): p. 3669-77.
406. Forchhammer, K., *P(II) signal transducers: novel functional and structural insights*. Trends Microbiol, 2008. **16**(2): p. 65-72.
407. Carroll, P., C.A. Pashley, and T. Parish, *Functional analysis of GlnE, an essential adenylyl transferase in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2008. **190**(14): p. 4894-902.
408. Pashley, C.A., et al., *Identification of the Mycobacterium tuberculosis GlnE promoter and its response to nitrogen availability*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 9): p. 2727-34.
409. Ventura, M., et al., *GarA is an essential regulator of metabolism in Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2013.
410. Tiffert, Y., et al., *The Streptomyces coelicolor GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes*. Mol Microbiol, 2008. **67**(4): p. 861-80.
411. Malm, S., et al., *The roles of the nitrate reductase NarGHJI, the nitrite reductase NirBD and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 4): p. 1332-9.
412. Amon, J., F. Titgemeyer, and A. Burkovski, *A genomic view on nitrogen metabolism and nitrogen control in mycobacteria*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2009. **17**(1): p. 20-9.
413. Haydel, S.E., et al., *The prrAB two-component system is essential for Mycobacterium tuberculosis viability and is induced under nitrogen-limiting conditions*. J Bacteriol, 2012. **194**(2): p. 354-61.
414. Jung, J.Y., et al., *The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria*. Infect Immun, 2013. **81**(9): p. 3198-209.
415. Lin, W., et al., *Urease activity represents an alternative pathway for Mycobacterium tuberculosis nitrogen metabolism*. Infect Immun, 2012. **80**(8): p. 2771-9.
416. Williams, C.L., et al., *Helicobacter pylori utilises urea for amino acid synthesis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **13**(1): p. 87-94.
417. Davidson, A.L., et al., *Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(2): p. 317-64, table of contents.
418. Braibant, M., P. Gilot, and J. Content, *The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev, 2000. **24**(4): p. 449-67.
419. Seth, A. and N.D. Connell, *Amino acid transport and metabolism in mycobacteria: cloning, interruption, and characterization of an L-Arginine/gamma-aminobutyric acid permease in Mycobacterium bovis BCG*. J Bacteriol, 2000. **182**(4): p. 919-27.
420. Talaue, M.T., et al., *Arginine homeostasis in J774.1 macrophages in the context of Mycobacterium bovis BCG infection*. J Bacteriol, 2006. **188**(13): p. 4830-40.

421. Peteroy-Kelly, M.A., et al., *Modulation of J774.1 macrophage L-arginine metabolism by intracellular Mycobacterium bovis BCG*. Infect Immun, 2003. **71**(2): p. 1011-5.
422. Price, C.T., et al., *Glycine betaine uptake by the ProXVWZABC transporter contributes to the ability of Mycobacterium tuberculosis to initiate growth in human macrophages*. J Bacteriol, 2008. **190**(11): p. 3955-61.
423. Green, R.M., A. Seth, and N.D. Connell, *A peptide permease mutant of Mycobacterium bovis BCG resistant to the toxic peptides glutathione and S-nitrosoglutathione*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 429-36.
424. Flores-Valdez, M.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis modulates its cell surface via an oligopeptide permease (Opp) transport system*. FASEB J, 2009. **23**(12): p. 4091-104.
425. Dasgupta, A., et al., *An oligopeptide transporter of Mycobacterium tuberculosis regulates cytokine release and apoptosis of infected macrophages*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12225.
426. Song, H. and M. Niederweis, *Uptake of sulfate but not phosphate by Mycobacterium tuberculosis is slower than that for Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 2012. **194**(5): p. 956-64.
427. Lyon, R.H., W.H. Hall, and C. Costas-Martinez, *Utilization of Amino Acids During Growth of Mycobacterium tuberculosis in Rotary Cultures*. Infect Immun, 1970. **1**(6): p. 513-20.
428. Lyon, R.H., W.H. Hall, and C. Costas-Martinez, *Effect of L-asparagine on growth of Mycobacterium tuberculosis and on utilization of other amino acids*. J Bacteriol, 1974. **117**(1): p. 151-6.
429. James, B.W., A. Williams, and P.D. Marsh, *The physiology and pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis grown under controlled conditions in a defined medium*. J Appl Microbiol, 2000. **88**(4): p. 669-77.
430. Arij, K., et al., *Degradation kinetics of L-glutamine in aqueous solution*. Eur J Pharm Sci, 1999. **9**(1): p. 75-8.
431. Jack, D.L., I.T. Paulsen, and M.H. Saier, *The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations*. Microbiology, 2000. **146 (Pt 8)**: p. 1797-814.
432. Rose, A., et al., *RHYTHM--a server to predict the orientation of transmembrane helices in channels and membrane-coils*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W575-80.
433. Saier, M.H., Jr., *Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives*. Microbiology, 2000. **146 (Pt 8)**: p. 1775-95.
434. Rachman, H., et al., *Unique transcriptome signature of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1233-42.
435. Cole, S.T., et al., *Massive gene decay in the leprosy bacillus*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1007-11.
436. Ott, J.L., *Asparaginase from mycobacteria*. J Bacteriol, 1960. **80**: p. 355-61.
437. Srikhanta, Y.N., et al., *Distinct physiological roles for the two L-asparaginase isozymes of Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(3): p. 362-5.
438. Cai, X., et al., *[Asparaginase mediated acid adaptation of mycobacteria]*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2012. **52**(12): p. 1467-76.
439. Kullas, A.L., et al., *L-asparaginase II produced by Salmonella typhimurium inhibits T cell responses and mediates virulence*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(6): p. 791-8.

440. Hofreuter, D., V. Novik, and J.E. Galan, *Metabolic diversity in Campylobacter jejuni enhances specific tissue colonization*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(5): p. 425-33.
441. Leduc, D., et al., *Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for Helicobacter pylori colonization*. Infect Immun, 2010. **78**(6): p. 2782-92.
442. Weiner, I.D. and J.W. Verlander, *Role of NH₃ and NH₄⁺ transporters in renal acid-base transport*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **300**(1): p. F11-23.
443. Barel, M., et al., *Francisella tularensis regulates the expression of the amino acid transporter SLC1A5 in infected THP-1 human monocytes*. Cell Microbiol, 2012. **14**(11): p. 1769-83.
444. Wieland, H., et al., *Intracellular multiplication of Legionella pneumophila depends on host cell amino acid transporter SLC1A5*. Mol Microbiol, 2005. **55**(5): p. 1528-37.
445. Ligon, L.S., J.D. Hayden, and M. Braunstein, *The ins and outs of Mycobacterium tuberculosis protein export*. Tuberculosis (Edinb), 2012. **92**(2): p. 121-32.
446. Braunstein, M., et al., *SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2003. **48**(2): p. 453-64.
447. Kurtz, S., et al., *The SecA2 secretion factor of Mycobacterium tuberculosis promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response*. Infect Immun, 2006. **74**(12): p. 6855-64.
448. Sullivan, J.T., et al., *The Mycobacterium tuberculosis SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 996-1006.
449. Scotti, C., et al., *Cell-cycle inhibition by Helicobacter pylori L-asparaginase*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13892.
450. Tailleux, L., et al., *Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both Mycobacterium tuberculosis and infected human dendritic cells and macrophages*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1403.
451. Clemens, D.L. and M.A. Horwitz, *The Mycobacterium tuberculosis phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1349-55.
452. Somashekar, B.S., et al., *Metabolic profiling of lung granuloma in Mycobacterium tuberculosis infected guinea pigs: ex vivo 1H magic angle spinning NMR studies*. J Proteome Res, 2011. **10**(9): p. 4186-95.
453. Bochner, B., et al., *Phenotype microarray profiling of Zymomonas mobilis ZM4*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **161**(1-8): p. 116-23.
454. Yan, Q., et al., *Complete genome sequence and phenotype microarray analysis of Cronobacter sakazakii SP291: a persistent isolate cultured from a powdered infant formula production facility*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 256.