



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : *IMMUNOLOGIE*

---

Présentée et soutenue par  
Charlotte PASSEMAR

Le Mardi 02 juillet 2013

**Titre :**

*Etude du rôle des lipides de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis  
dans la virulence et la pathogénie de la tuberculose.*

---

### JURY

<i>Hélène BIERNE, Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Paris</i>	<i>Rapportrice</i>
<i>Laleh MAJLESSI, Chargée de Recherche, Institut Pasteur, Paris</i>	<i>Rapportrice</i>
<i>Laurent KREMER, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Nathalie WINTER, Directrice de Recherche, INRA, Tours</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Denis HUDRISIER, Professeur, Université Toulouse III-Paul Sabatier</i>	<i>Président du jury</i>

---

**Ecole doctorale :** *Biologie-Santé, Biotechnologies*

**Unité de recherche :** *Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR5089*

**Directeur(s) de Thèse :** *Catherine ASTARIE-DEQUEKER*

**Rapporteurs :** *Hélène BIERNE*

*Laleh MAJLESSI*

*Laurent KREMER*

Avec 1.4 millions de décès et 8.7 millions de nouveaux cas en 2012, la tuberculose fait encore aujourd'hui partie des plus importantes maladies infectieuses. Ce constat alarmant souligne l'état d'urgence dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Malgré l'impact de cette pathologie sur la santé publique, les molécules bactériennes impliquées dans la pathogénie de la tuberculose ainsi que leurs mécanismes d'action restent mal connus. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent pathogène responsable de la tuberculose, est une bactérie capable de résister au sein de son hôte, l'Homme, et ce même lorsqu'elle est confrontée à une réponse immunitaire intacte.

*M. tuberculosis* synthétise une large quantité et variété de composés lipidiques incorporés dans son enveloppe cellulaire, notamment dans les couches externes. De fait, ils sont stratégiquement localisés pour interagir avec l'hôte, et donc potentiellement impliqués dans la pathogénie de la tuberculose. Ces composés lipidiques peuvent être définis en différentes catégories, parmi lesquelles les lipides contenant des mycocérosates (phénolglycolipides (PGL) et dimycocérosates de phthiocérol (DIM)) et les lipides dérivés de tréhaloses (sulfolipides (SL) et di- et poly- acyltrehaloses (DAT et PAT, respectivement)). Les lipides de ces deux familles n'ont pas de rôle structural majeur, cependant leur distribution restreinte au genre *Mycobacterium* est en accord avec leur rôle dans la pathogénie. Dans ce contexte, l'équipe du Dr. Guilhot s'intéresse à analyser le rôle fonctionnel de ces lipides dans la pathogénie en étudiant leurs voies de biosynthèses ainsi que leurs contributions dans l'interaction avec les cellules de l'hôte. Grâce à cette approche, les DIM ont été décrits comme des facteurs de virulence ayant un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire des macrophages humains. A l'inverse, le rôle des DAT/PAT et des SL reste ambigu. Ils ne semblent pas contribuer, individuellement ou collectivement, à la virulence *in vivo*. Toutefois, lorsque ces glycolipides sont étudiés sous forme purifiée, ils montrent des activités biologiques qui pourraient avoir des répercussions sur l'interaction de *M. tuberculosis* avec les cellules hôtes.

Grâce à une bourse de la Fondation Médicale pour la Recherche obtenue en 2009, j'ai eu l'opportunité de rejoindre le laboratoire du Dr. Guilhot sous la direction du Dr. Astarie-Dequeker, afin d'étudier la contribution respective de chacun de ces lipides spécifiques de *M. tuberculosis* dans la pathogénie. Dans cet optique, nous avons développé une stratégie génétique au cours de laquelle nous interrompons la biosynthèse de ces différents lipides. Nous avons par la suite analysé les conséquences de ces simples ou multiples mutations sur la virulence bactérienne dans un modèle animal, puis dans la réponse immunitaire des macrophages humains, cellules cibles de *M. tuberculosis*. Nous avons établi i) une redondance fonctionnelle entre les DIM, les DAT/PAT et les SL au cours de l'interaction entre les mycobactéries et les cellules hôtes, ii) la contribution des DAT/PAT et des SL à la fois dans la phase aigüe d'infection chez la souris mais aussi dans les macrophages humains via la modulation de la maturation du phagosome, iii) un effet dominant des DIM dans la virulence de *M. tuberculosis*, principalement en modulant les fonctions bactéricides des macrophages. En collaboration avec d'autres laboratoires de recherche, j'ai aussi obtenu des résultats préliminaires suggérant que les DIM, DAT/PAT et SL contribueraient à l'échappement de *M. tuberculosis* depuis le phagosome vers le cytosol des macrophages infectés, ainsi qu'au contrôle de deux processus cellulaires d'autodestruction : l'autophagie et l'apoptose.

La construction de notre collection de souches mutées est un outil majeur dans la compréhension du rôle des lipides spécifiques de l'enveloppe de *M. tuberculosis* en tant que facteurs de virulence.

Mots-clés : *Mycobacterium tuberculosis* ; macrophages ; lipides ; enveloppe ; réponse immunitaire



**Je dédie mon travail au Professeur Alain AYATS,**

prof de ma vie qui m'a appris énormément au travers de ses cours d'Histoire-Géographie !

Avec mes « Très Vives Félicitations » pour avoir été Mon extraordinaire Professeur.

La cartésienne humaniste.





Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à

**Monsieur le Docteur Christophe GUILHOT** pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe, ainsi qu'à **Madame le Docteur Catherine ASTARIE-DEQUEKER** pour m'avoir accompagnée pendant ces 4 années. Il y a des moments dans la vie qui ne s'oublient pas, et si ma thèse en fait partie c'est aussi car vous avez tous les deux contribué à la rendre agréable. Ces années à vos côtés resteront comme quatre années mémorables ! Il me reste à vous dire simplement : Merci pour tout.

**Madame le Docteur Laleh MAJLESSI,**

pour avoir accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour la qualité de la discussion que vous avez amené.

**Madame le Docteur Hélène BIERNE,**

pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, assez éloignée de son travail de recherche mais qui a permis d'apporter un œil neuf et averti. Je vous remercie pour la curiosité et la considération apportée à mon travail.

**Monsieur le Docteur Laurent KREMER,**

pour avoir évalué ce travail en qualité de rapporteur. Merci pour votre considération ainsi que pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de thèse.

**Madame le Docteur Nathalie WINTER,**

pour avoir participé à mon jury de thèse en qualité d'examineur. Merci pour votre curiosité ainsi que pour la qualité de la discussion que nous avons partagé.

Enfin, merci à **Monsieur le Professeur Denis HUDRISIER**, d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci Denis pour ton implication et tes conseils. Sois assuré de ma profonde reconnaissance.



C'est parti !

Avec l'inquiétude de n'oublier personne, de montrer à chacun à quel point vous avez tous été importants dans ma vie de thésarde, et que je ne l'oublierai jamais, je me lance...

**Christophe**, quand j'ai postulé pour la bourse de thèse proposée dans ton équipe, je ne savais pas la chance que j'allais avoir ! Merci d'avoir été là, la porte de ton bureau toujours ouverte pour discuter, partager, toujours prêt à faire du café...trop fort ! Merci aussi d'avoir été disponible dans les bons moments, compréhensif dans ceux qui l'étaient moins. Tu es un chef d'équipe formidable.

**Cathy**, ah ma KT, ma chef ! La première chose qui me vient à l'esprit, après le légendaire « ça va le faire ! », c'est « On l'a fait ! ». Dans ma tête, j'imagine notre relation comme un feu d'artifice, qui explose à en faire mal aux oreilles, mais dont on ne se rappelle au final que la beauté ! Et je me souviendrai de ces quatre années avec toi comme d'un excellent moment, le duo des blondes biocellistes ! Merci pour tout, ton écoute, ta patience, les pauses café à parler de la vie et des macrophages et les réunions au soleil ! Merci aussi pour ton soutien dans les moments moins faciles. Mais ça y est, 2012 est définitivement derrière nous !

« **WladGyver** », heureusement que t'es là toi ! j'ai cherché quoi te dire mais au final, le plus simple c'est merci d'être toi ! batteur insatiable (on t'entend du bureau d'à côté !), râleur (on t'entend aussi du bureau d'à côté !), caféinomane (presque autant que moi !), pro de la TLC et des tomates et moteur de cette équipe ! Y'en a pas deux comme toi, et je suis heureuse d'avoir croisé ton chemin !

**Christian**, merci pour ta patience en réunion d'équipe et pour avoir toujours été présent pour répondre à mes questions de biomol lorsque je me noyais dans une publi !

**Le bureau des filles !** Temple du Girl power, des potins débrief shopping du weekend et autres actus purepeople, vous allez me manquer ! Jamais je ne retrouverai une telle atmosphère, on avait trouvé le bon compromis café, travail, café, paillasse, café ! **Ainhoa**, guapa, estoy muy feliz de haberte conocido y esto es sólo el comienzo de una larga amistad ! « Ainhoapédia forever » ! Merci pour tous ces moments passés ensemble, au labo comme à l'extérieur ! **Sophie**, toi et ton éternel « non mais voilà quoi ! » toujours dans les nuages, réservée en apparence mais rarement la dernière à déconner ! Je suis ravie d'avoir partagé ces moments de thésarde avec toi ! et je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite ! **Hénar** et **Véro**, les petites dernières, je vous souhaite du bonheur et de la réussite !

Sans oublier les anciens du labo, **Gaelle** pour sa gentillesse et son écoute, ma **Chabina** pour sa générosité et crises de rire interminables, **Tomtom** pour m'avoir descendu ce qui me manquait au P3, et parce qu'il me manquait tout le temps un truc ! Mais aussi Cécile, Pierre-Yves, Jérôme, Anaïs, Simon... je ne vous oublie pas ! Bonne chance, chacun dans votre voie !

**Les Neyrolles**, au grand complet ! Ces quatre années passées à coté de vous ont été riches en fou-rires, discussions, gâteaux (vous mangez tout le temps, vous le savez ?) Merci pour votre compagnie au P3 comme à la salle de culture ! Avec une mention spéciale à GC, Alan, mon pti Firmin et Hélène !

Merci aux autres équipes de l'IPBS, et en particulier **les Daffé et les Mourey**, avec qui j'ai partagé d'excellents moments, Ainsi qu'à Patricia, Laurence et Flavie pour leur aide indispensable au P3 et à l'A3 !



Mais je n'ai pas connu que l'IPBS, et c'est pourquoi j'adresse mes plus tendres remerciements au **Docteur Françoise Benoit-Vical**. Merci Françoise de m'avoir initiée à la recherche et m'avoir fait aimer cela. Mon séjour en parasito est un excellent souvenir, surtout quand on se souvient de l'équipe de choc **Marie-Laure, Benoît** et **Patrice**, merci à eux aussi.

Aussi, je voudrais dire un grand merci au **Professeur Charlotte Casper**, alias « la Grande Charlotte » pour avoir supervisé mon stage de Master et m'avoir fait partager sa passion ! Je me revois traversant l'hôpital Purpan clopin-clopant avec un seau dans la main contenant un placenta encore tout chaud ! Merci à toute l'équipe CMV, **Christian Davrinche, Melinda, Jérôme, Benjamin** et **Hélène** pour votre aide et votre gentillesse.

Mais heureusement, en thèse il y a l'après-labo, moment où l'on retrouve ses amis pour recharger les batteries, surtout quand elles sont complètement à plat ! Merci à eux !

Et « eux » commence par les deux autres galériens de la bande, **Etienne** et **Rami**, non pardon, Dr. Etienne et Dr. Rami ! Et oui, c'est fini ! Merci les garçons d'avoir été là, vous êtes des amis génialissimes. Etienne, ta rencontre en M2 fut comme une évidence, on était fait pour s'entendre ! Et Rami, ah mon petit Rami, tu es tout un poème et je suis ravie de pouvoir partager ça avec toi... mais aussi les soirées Fifa, où heureusement que ma bibliothèque est remplie de bons livres !

**Bilou** et **Typhanie, Mooky** et **Mookette, Miche** et **Marion**, merci pour votre patience quand on appelait pour vous dire qu'on n'avait pas fini au labo, et qu'on serait en retard ! Merci d'être vous, des amis fidèles, des amours de coupaings ! Et je ne désespère pas de prendre Mookette en flagrant délit de sieste au cours de yoga !

A mes copines, **Marine** et **Emilie-Poulette**, avec qui j'ai passé d'excellents moments, et ce n'est que le début les filles !

Mention spéciale à **Marie**, ma chérie avec qui passer des heures sur un step est devenu une partie de plaisir tellement nos discussions étaient interminables ! Je nous revois à poney il y a 20 ans (aïe !), en train de prédire nos futurs métiers ! On ne s'est pas trompé !

Merci aux Bourguignons **Christelle** et **Tony** ainsi qu'à mes petites puces et toute la famille Cases-Ortiz pour avoir partagé de très agréables moments et me permettre d'être une marraine (et tarraine !) comblée !

A **Juju** et **Nat**, avec qui j'ai partagé d'excellents moments pendant 4 ans. Je suis ravie que cela nous ait permis de nous rapprocher, vous êtes des amours de cousins !

Toute cette belle aventure n'aurait jamais été possible sans l'aide inconditionnelle de mes parents, ma petite sœur et mon beauf ! **Maman** et **Papa**, merci à tous les deux d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir poussée, motivée, et permis de m'épanouir à chaque moment de ma vie ! Ma **Choupi** et **Grobidou**, merci d'être vous, nos opposés fidèles et compréhensifs ! Je n'ai pas choisi ma famille, mais si j'avais pu j'aurais pris les mêmes !

Enfin, ces dernières lignes sont pour toi, mon **R'né**. Je ne remercierai jamais assez Etienne de nous avoir présentés car j'ai trouvé en toi l'autre moitié de moi. A nos thèses, à notre vie.



INTRODUCTION.....	15
<b>A. La Tuberculose.....</b>	<b>17</b>
I.    La tuberculose d'hier à aujourd'hui.....	17
II.   Pathogénèse de la tuberculose.....	25
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : agent étiologique.....	25
2.  La tuberculose.....	25
<b>B. Réponse immunitaire à l'infection par <i>M. tuberculosis</i>.....</b>	<b>29</b>
I.    Immunopathologie de la tuberculose.....	29
II.   Le macrophage, partenaire essentiel de la physiopathologie de la tuberculose.....	39
1.  Exploitation des voies d'entrée dans le macrophage.....	39
2.  Accumulation dans un compartiment non bactéricide.....	43
3.  Survie dans un environnement hostile.....	45
4.  Echappement du phagosome.....	51
5.  Contrôle du programme de mort cellulaire.....	51
6.  Modulation de la réponse inflammatoire.....	57
Les chimiokines.....	59
Les cytokines.....	59
Activation des macrophages.....	63
<b>C. L'enveloppe mycobactérienne.....</b>	<b>67</b>
I.    Les lipides de l'enveloppe mycobactérienne.....	69
1.  Les lipoglycanes dérivés de phosphatidylinositols.....	69
2.  Les lipides dérivés de mycocérosates.....	71
3.  Les lipides dérivés de tréhalose.....	73
II.   Rôle des lipides dans l'organisation de l'enveloppe.....	75





---

III. Rôle des lipides en tant que facteurs de virulence .....	77
<b>PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>85</b>
<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>91</b>
A. Identification du rôle des lipides de l'enveloppe des mycobactéries dans la pathogénie tuberculeuse.....	93
1. Contexte de l'étude.....	93
2. Objectif & Stratégie.....	113
3. Méthodologie & Résultats.....	113
4. Discussion.....	153
B. Etude du rôle des lipides de l'enveloppe des mycobactéries dans la programmation de la mort cellulaire et la dissémination intercellulaire du bacille.....	161
1. Contexte de l'étude.....	161
2. Objectif & Stratégie.....	163
3. Méthodologie.....	163
4. Résultats.....	167
5. Discussion.....	179
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>185</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>195</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>209</b>



# INTRODUCTION

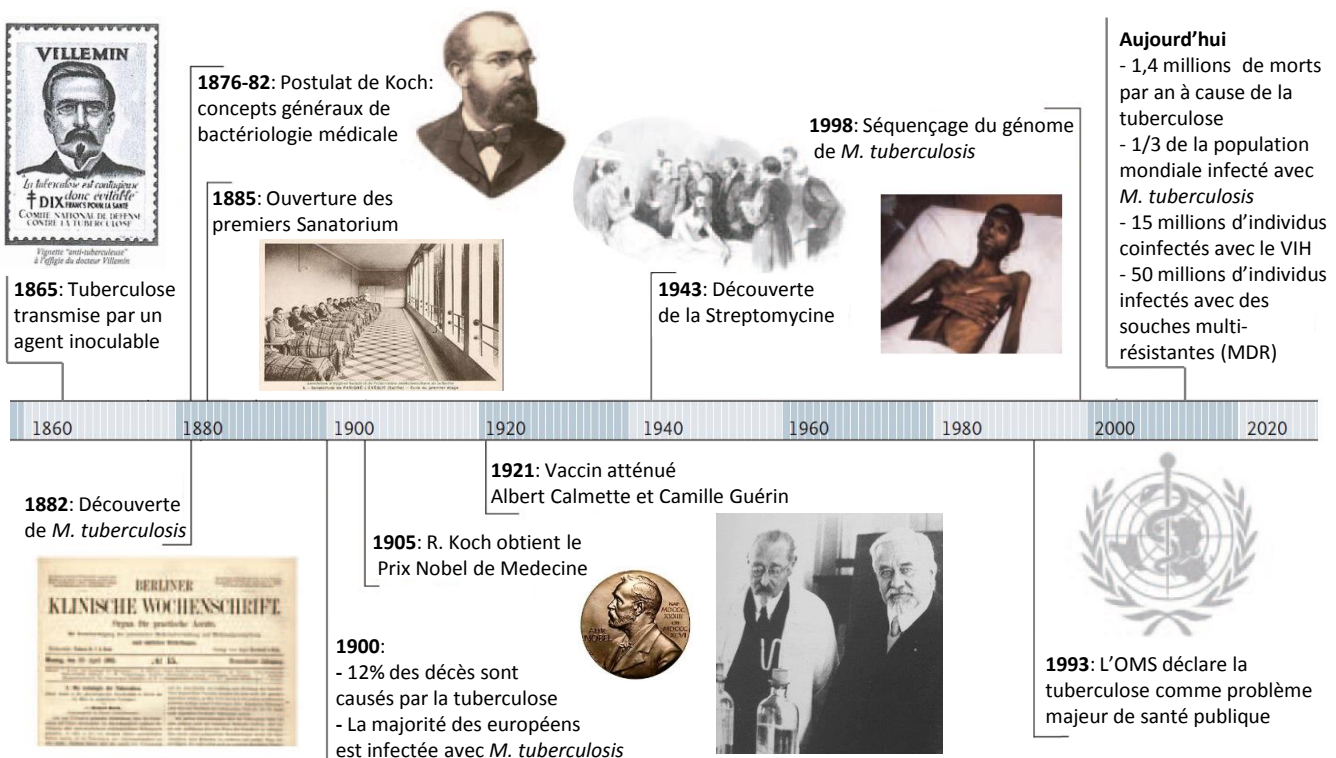


Figure 1 : Chronologie de la recherche antituberculeuse.

Depuis la découverte du bacille de Koch (*M. tuberculosis*), il y eu de grandes avancées dans la lutte contre la tuberculose. En 1921, Albert Calmette et Camille Guérin mirent au point le vaccin à partir d'une souche bovine, *M. bovis*, atténuée. En 1943, l'avènement des antibiotiques et la découverte de la streptomycine signaient le début de la « bataille finale » contre les bactéries pathogènes qui menaçaient l'espèce humaine depuis tant de siècles. Mais en 1993, l'OMS déclare la tuberculose comme un problème majeur de santé publique. En 1998, le séquençage du génome de *M. tuberculosis* provoque un nouvel espoir dans la lutte antituberculeuse et le développement de nouveaux traitements préventifs et curatifs (Adapté de Kaufmann, 2005b).

## A. La Tuberculose.

### 1. La tuberculose d'hier à aujourd'hui.

Décrite comme une maladie infectieuse ancienne, la tuberculose n'en reste pas moins un sujet d'actualité. L'agent étiologique de cette pathologie, *Mycobacterium tuberculosis* a été découvert au XIX<sup>ème</sup> siècle par Robert Koch, mais on sait maintenant que le bacille tuberculeux a co-évolué avec les hominidés depuis des millions d'années (Gutierrez *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2008).

La tuberculose, précédemment connue sous le terme de « phtisie », est décrite depuis l'époque Gréco-Romaine. Ce terme qu'utilisa Hippocrate, signifiant « consommation », se référait à l'époque aux conséquences physiques de la pathologie. Et déjà, Aristote la décrivait comme une pathologie contagieuse. Cependant, son postulat non étayé conduisit les mentalités à l'associer à l'hérédité (Leao and Portaels, 2007).

L'aspect contagieux de la maladie est repris au XVI<sup>ème</sup> siècle par G. Fracastoro, mais loin de là l'idée d'une entité vivante. A l'époque, la présence de « particules » présentes sur les vêtements de patients, et qui permet de transmettre la maladie aux personnes saines à proximité, réfère à des molécules chimiques (Leao and Portaels, 2007). La proximité fut donc caractérisée comme un facteur de risque exogène de la maladie. Aujourd'hui connus, les principaux facteurs de risques exogènes dans le développement de la tuberculose sont encore et toujours liés au contexte socio-économique des populations atteintes. En effet, cette pathologie est intimement associée à la pauvreté et la surpopulation, car elle se développe dans un contexte de proximité, de manque d'accès aux soins, de malnutrition (Cegielski and McMurray, 2004; Lonroth *et al.*, 2009; Schaible and Kaufmann, 2007).

Au XVII<sup>ème</sup> siècle, l'arrivée en Europe d'une épidémie de « Grande Peste Blanche », du fait de la pâleur des tuberculeux, fut l'un des plus grands et graves fléaux de tous les temps. Cette épidémie perdurera pendant près de 200 ans. C'est à cette époque que les premières descriptions anatomopathologiques sont faites, avec notamment la caractérisation de nodules pulmonaires semblables à des tumeurs, les si célèbres tubercules qui seront par la suite nommés granulomes.

C'est finalement au XIX<sup>ème</sup> siècle que J. L. Schlölein définit le terme de « tuberculose » pour décrire la pathologie. Le premier à suggérer un microorganisme vivant comme cause de la tuberculose fut le français J. A. Villemin en 1865 (**Figure 1**). Et c'est en mars 1882, que Robert

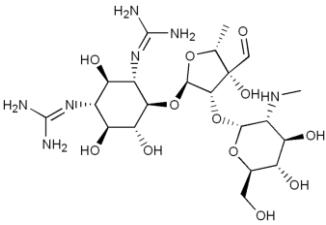
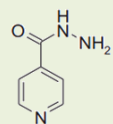
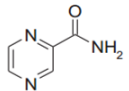
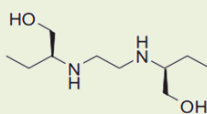
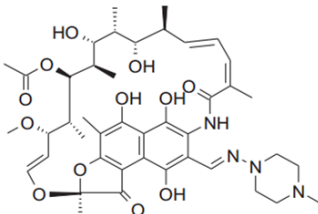
Antibiotiques de première ligne		
NOM	STRUCTURE CHIMIQUE	CIBLE
Streptomycine		Inhibition de la synthèse protéique
Isoniazide		Inhibition de la synthèse d'acides mycoliques
Pyrazinamide		Modification de l'équilibre acido-basique bactérien
Ethambutol		Inhibition de la synthèse d'arabinogalactane
Rifampicine		Inhibition de la synthèse d'ARN bactérien

Tableau 1 : Structure et fonction des antibiotiques de première ligne.

Le XX<sup>ème</sup> siècle est marqué par la découverte des premiers antibiotiques permettant de lutter contre la tuberculose. Ainsi, l'isoniazide (INH), la pyrazinamide (PZA) et l'éthambutol (EMB) sont des molécules qui vont cibler la synthèse de l'enveloppe mycobactérienne. La rifampicine (RIF) cible l'ARN mycobactérien, et la streptomycine la synthèse protéique.

Koch fit sa célèbre présentation « *Die Ätiologie Der Tuberkuloze* », au cours de laquelle il démontra la nature infectieuse de la tuberculose grâce à la mise au point de techniques développées par ses soins, utilisant des milieux de culture solides afin d'obtenir des cultures bactériennes pures. De là, il publia le « postulat de Koch » quelques années plus tard. Ce postulat permet de définir un microorganisme comme agent pathogène suivant quatre critères : i) l'agent infectieux doit uniquement infecter les animaux malades ; ii) l'agent infectieux doit pouvoir être isolé depuis un animal malade ; iii) l'agent infectieux doit rendre un animal sain malade ; et enfin iv) l'agent infectieux doit pouvoir être ré-isolé de l'animal infecté expérimentalement. Ce postulat posa les bases de la microbiologie moderne (Herzog, 1998; Kaufmann, 2005b). Ces travaux lui valurent le Prix Nobel de Médecine en 1905 (**Figure 1**).

Forts de ces découvertes, les recherches se multiplient pendant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Et c'est à cette période, en se basant sur des expériences de vaccination contre la variole, qu'Albert Calmette et Camille Guérin développent le premier vaccin préventif contre la tuberculose (**Figure 1**). Pendant près de vingt ans, ces scientifiques enchaînent des passages sériés de cultures du bacille tuberculeux affectant les bovins, *Mycobacterium bovis*. Ces passages successifs permirent une diminution de la virulence, jusqu'à l'obtention d'une souche non virulente mais toujours capable de stimuler le système immunitaire (Andersen and Doherty, 2005). Cette souche *M. bovis* BCG (Bacille Calmette-Guérin) a été distribuée à de nombreux instituts dans le monde afin de vacciner rapidement la population. Dès lors, à force de passages et de conditions de cultures différentes, il n'y a plus eu une souche unique de *M. bovis* BCG mais plusieurs, nécessitant une classification (Behr, 2002). Trois décennies après sa mise en circulation, l'efficacité du vaccin s'est avérée avoir une variabilité de protection allant de 0 à 80% (Andersen and Doherty, 2005). Cette variabilité s'explique notamment par l'exposition à des mycobactéries environnementales possédant les mêmes motifs antigéniques que *M. tuberculosis*, et conférant une immunité préexistante aux personnes exposées, mais aussi la perte de protection après un certain nombre d'années, au-delà desquelles l'immunité antituberculeuse conférée par le vaccin passe un seuil en dessous duquel elle n'est plus efficace (Fine, 1995). Néanmoins, on estime aujourd'hui à 3 milliards le nombre de personnes vaccinées dans le monde, et on recense 100 millions de nouvelles vaccinations chaque année, faisant du BCG le vaccin le plus utilisé chez l'Homme (Behr, 2002).

Le XX<sup>ème</sup> siècle fut aussi marqué par ce que l'on a pensé être le point final de la menace bactérienne qui pesait sur l'espèce humaine depuis des siècles : l'avènement des antibiotiques. Après la pénicilline, la streptomycine (Schatz, 1944), premier traitement curatif de la tuberculose, fut découverte (**Tableau 1, Figure 1**). L'engouement dans le traitement de la tuberculose conduira



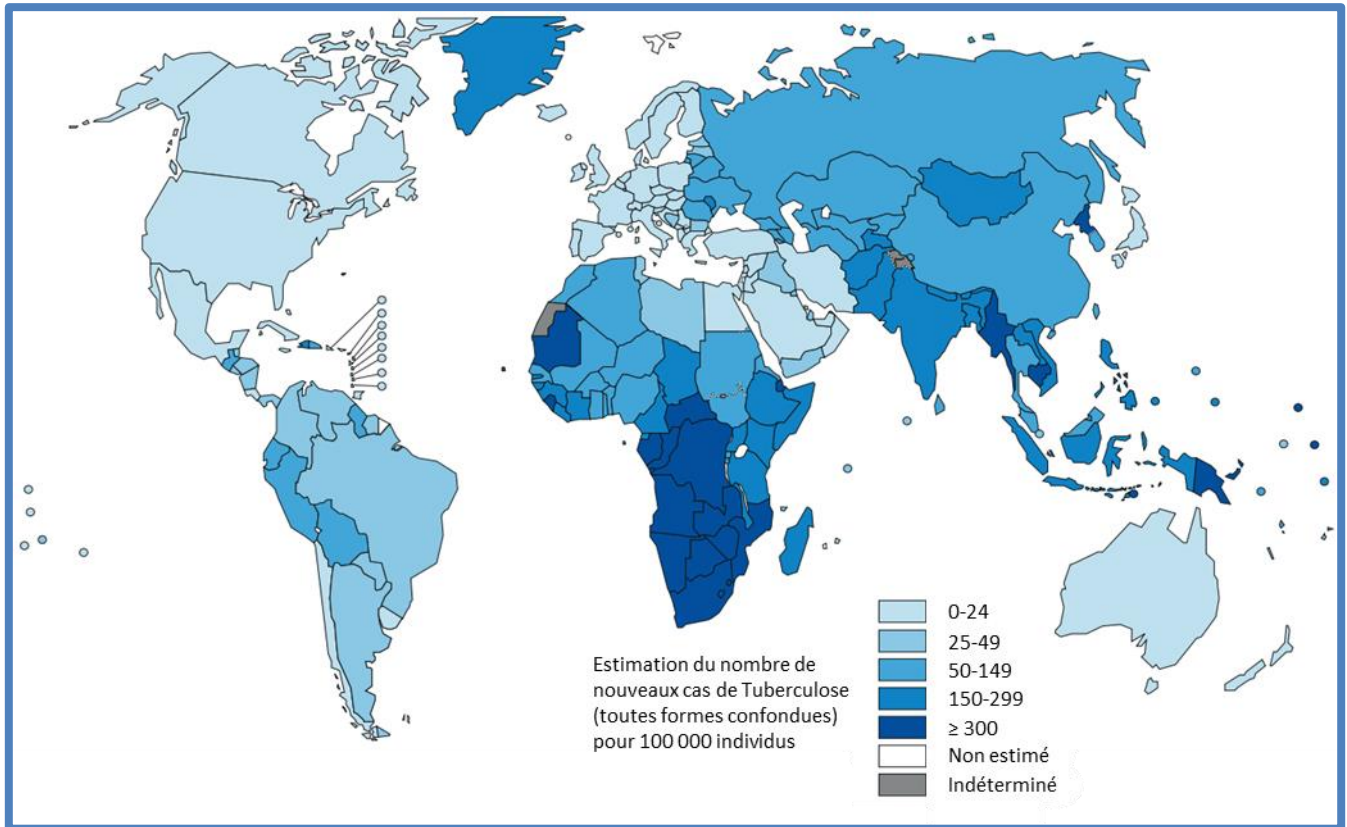


Figure 2 : Répartition mondiale des cas de tuberculose en 2012.

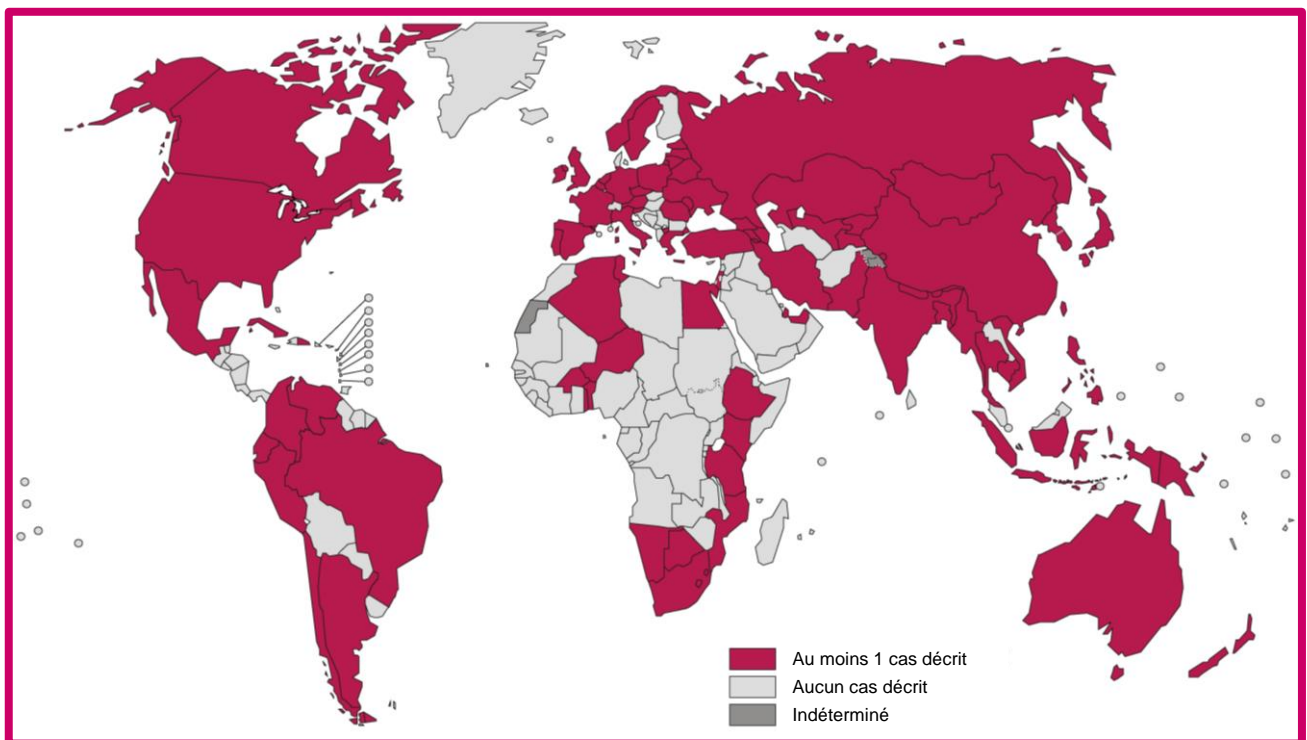
En 2012, l'OMS recensait 8.7 millions de cas incidents de tuberculose. Plus de 80% des cas sont localisés en Asie (59%) et en Afrique (26%). Les cinq pays les plus touchés sont l'Inde, la Chine, l'Afrique du Sud, l'Indonésie et le Pakistan (Adapté de WHO, 2011).

à la découverte d'autres molécules aux activités antibiotiques. Ainsi, l'isoniazide (INH) et la pyrazinamide (PZA) (Bernstein et al., 1952; Malone et al., 1952), l'éthambutol (EMB) et la rifampicine (RIF) (Maggi et al., 1966; Thomas et al., 1961) furent développés (**Tableau 1**). Mais très vite, cet engouement retomba avec l'apparition des premières souches résistantes à ces antibiotiques. Une méthode alternative fut adoptée en associant ces antibiotiques afin de les rendre efficaces contre des souches résistantes. Ces cinq antibiotiques aux mécanismes d'action différents jouent encore aujourd'hui un rôle important dans le traitement antituberculeux, formant la première ligne d'attaque contre le bacille. De nos jours, le traitement préconisé est l'utilisation de quatre de ces antibiotiques les deux premiers mois, à savoir INH, PZA, EMB et RIF, suivi d'une association INH/RIF pendant les quatre mois suivants.

Jusque dans les années 1980, les découvertes du début du siècle permettaient d'envisager une éradication complète de la tuberculose, prévue à l'époque pour les années 2010. Cependant, ce n'est que quelques années plus tard, en 1985, que des nouveaux cas de tuberculose sont réapparus dans les pays industrialisés. Cette résurgence fut causée par l'abandon des programmes de lutte contre la maladie, associé à une fragilisation du système immunitaire d'une partie de la population. Cette partie de la population regroupe les personnes immunodéprimées, que ce soit pour des raisons thérapeutiques (chimiothérapie) ou pathologiques (virus de l'immunodéficience humaine VIH) (Kwan and Ernst, 2011), ainsi que celles dont les phénomènes sociétaux affectent l'intégrité du système immunitaire, tels que le développement de la pollution, ou encore la consommation d'alcool, de tabac ou de drogues (Pai *et al.*, 2007; Underner and Perriot, 2012; Zaridze *et al.*, 2009). En 1993, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclare la tuberculose comme problème majeur de santé publique (**Figure 1**).

En 2012, l'OMS dénombrait 8,7 millions de cas incidents (*i.e.* nombre de nouveaux cas par an) de tuberculose dans le monde et 1,4 millions de décès chaque année, faisant de la tuberculose la pathologie la plus meurtrière causée par un agent infectieux unique (WHO, 2011). Plus de 80% des cas de tuberculose ont été recensés en Asie (59%) et en Afrique (26%), où l'on compte parmi les cinq pays les plus touchés : l'Inde, la Chine, l'Afrique du Sud, l'Indonésie et le Pakistan (WHO, 2011). La dispersion de la pathologie sur le globe s'est faite depuis les foyers d'infection initiaux localisés dans les pays en voies de développement vers les pays occidentalisés, notamment par le développement des flux migratoires (immigration, ouvertures de nouvelles voies touristiques) (**Figure 2**).

La démarche globale « d'urgence mondiale » déclarée par l'OMS a permis la mise en place de la thérapie DOTS (Directly Observed Treatment Short course), suivie par le développement d'une



*Figure 3 : Pays ayant recensés au moins un cas de tuberculose XDR en 2012.*

En 2012, des cas de tuberculose par des souches extrêmement résistantes aux antibiotiques (XDR) ont été recensés dans 84 pays. Parmi eux, 65 ont une surveillance accrue dans l'évolution de la proportion de cas de tuberculose XDR parmi les cas de tuberculose MDR (Adapté de WHO, 2011).

stratégie de lutte via l'élaboration d'un Plan Global de Halte à la Tuberculose. Ce plan fixe, à l'horizon 2015, une série d'avancées parmi lesquelles le renforcement de la stratégie DOTS, la lutte contre la co-infection Tuberculose/VIH et la pharmacorésistance, ou encore la promotion de la recherche (WHO, 2011).

La recherche de nouveaux traitements préventifs et curatifs ayant une plus grande efficacité s'est développée ces dernières années, relancée notamment à la fin des années 1990 avec le premier séquençage génétique de la souche de *M. tuberculosis* H37Rv (**Figure 1**) (Cole et al., 1998). Cette recherche s'articule autour de deux grands axes principaux. Le premier est un axe préventif qui vise à développer de nouveaux vaccins via l'utilisation de souches vivantes recombinantes de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* atténuées ou d'autres souches mycobactériennes génétiquement modifiées. Une autre méthode implique le développement de « boosters vaccinaux » via l'utilisation de protéines antigéniques intégrées à un adjuvant ou exprimées dans des vecteurs viraux, permettant de stimuler le système immunitaire après une première injection de la souche vaccinale (Kaufmann, 2012).

Le second axe de recherche consiste en le développement de nouveaux traitements curatifs. En effet, l'utilisation d'antibiotiques de seconde ligne (fluoroquinolones et aminoglycosides) est uniquement préconisée dans le traitement de tuberculoses développées par des souches dites multi-résistantes (MDR pour Multi-Drug Resistant). Ces souches MDR sont définies par leur résistance à la fois à l'INH et la RIF. Mais l'utilisation de ces nouveaux antibiotiques a aussi générer le développement de résistances par les mycobactéries, engendrant une nouvelle catégorie de souches dites extrêmement résistantes (XDR, pour Extensively Drug Resistant). En 2012, au moins un cas d'infection par une souche XDR était recensé sur chaque continent et dans tous les pays développés (**Figure 3**). Il faut plusieurs années de traitement combinant des antibiotiques de première et seconde ligne pour venir à bout d'infections par des souches XDR. Depuis peu, on recense des patients atteints par une souche totalement résistante aux antibiotiques actuels (dite TDR pour Totally Drug Resistant, ou super-XDR). Cette souche émergente en Inde est pour le moment incurable (Rowland, 2012; Udwadia *et al.*, 2012). Avec l'apparition de ces nouvelles souches TDR, il n'a jamais été aussi urgent de développer de nouveaux antituberculeux. Les stratégies de recherche employées se sont développées soit à partir de molécules existantes développées en tant qu'antibiotiques mais ne ciblant pas *M. tuberculosis* en première intention, soit à partir de molécules nouvellement identifiées (Villemagne *et al.*, 2012).

Aujourd'hui, la démarche scientifique dans le traitement de la tuberculose s'oriente vers une action ciblée des molécules pharmaceutiques au détriment d'un criblage aléatoire. De ce fait, une



meilleure connaissance du bacille tuberculeux, et de la pathogénèse de la tuberculose est indispensable pour mener à bien ce combat.

### II. Pathogénèse de la tuberculose.

#### 1. *Mycobacterium tuberculosis* : agent étiologique

L'agent étiologique de la tuberculose, *M. tuberculosis*, est une bactérie appartenant à l'ordre actinomycètes, genre des mycobactéries. Ce genre est composé d'une soixantaine de bactéries aérobies, asporulées, immobiles, principalement saprophytes et non pathogènes. Quelques-unes seulement sont des pathogènes majeurs, entres autres à l'origine de la lèpre (*M. leprae*) et de la tuberculose. Les bactéries responsables de la tuberculose sont regroupées dans le *Complexe Mycobacterium tuberculosis (MTBC)* (Cole *et al.*, 1998) (**Figure 4**). Parmi elles, deux souches sont responsables d'une tuberculose humaine : *M. tuberculosis* et *M. africanum*; les autres sont responsables de tuberculoses animales (*M. bovis* chez les bovins, *M. caprae* chez les chèvres & moutons, *M. microti* chez les campagnols et *M. pinnipedii* chez les phoques & lions de mer) (Smith *et al.*, 2006). Des cas de tuberculoses humaines provoquées par *M. bovis* ont été diagnostiqués par le passé, mais ces faits ont quasiment disparus avec la pasteurisation (Gagneux, 2012; Grange, 2001). Il a récemment été proposé d'intégrer la souche *M. orygis*, responsable de tuberculoses humaines et animales, au complexe *MTBC* (van Ingen *et al.*, 2012). La souche *M. canettii* est un cas particulier du complexe *MTBC* (**Figure 4**). Comme les autres mycobactéries du complexe, *M. canettii* est une mycobactérie pathogène responsable de tuberculoses humaines. Cependant, cette souche possède des caractéristiques phénotypiques différentes de celles ayant permis de constituer le complexe *MTBC*. Cette souche est considérée comme étant à l'origine phylogénétique du *Complexe M. tuberculosis* (**Figure 4**).

#### 2. La tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse. Une personne malade expire des microgouttelettes contenant les mycobactéries, qui peuvent être inhalées par une personne saine située à proximité. Il suffit d'une bactérie pour engendrer une infection (Russell, 2007). Dans approximativement 30% des cas, les personnes exposées sont infectées par les mycobactéries (**Figure 5**) (Ahmed and Hasnain, 2011). Une fois inhalées, les mycobactéries traversent le système respiratoire pour se loger dans les poumons au niveau des alvéoles, et on parle alors de primo-infection (**Figure 5**). Dès lors, l'hôte déclenche une réponse immunitaire. Parmi ces



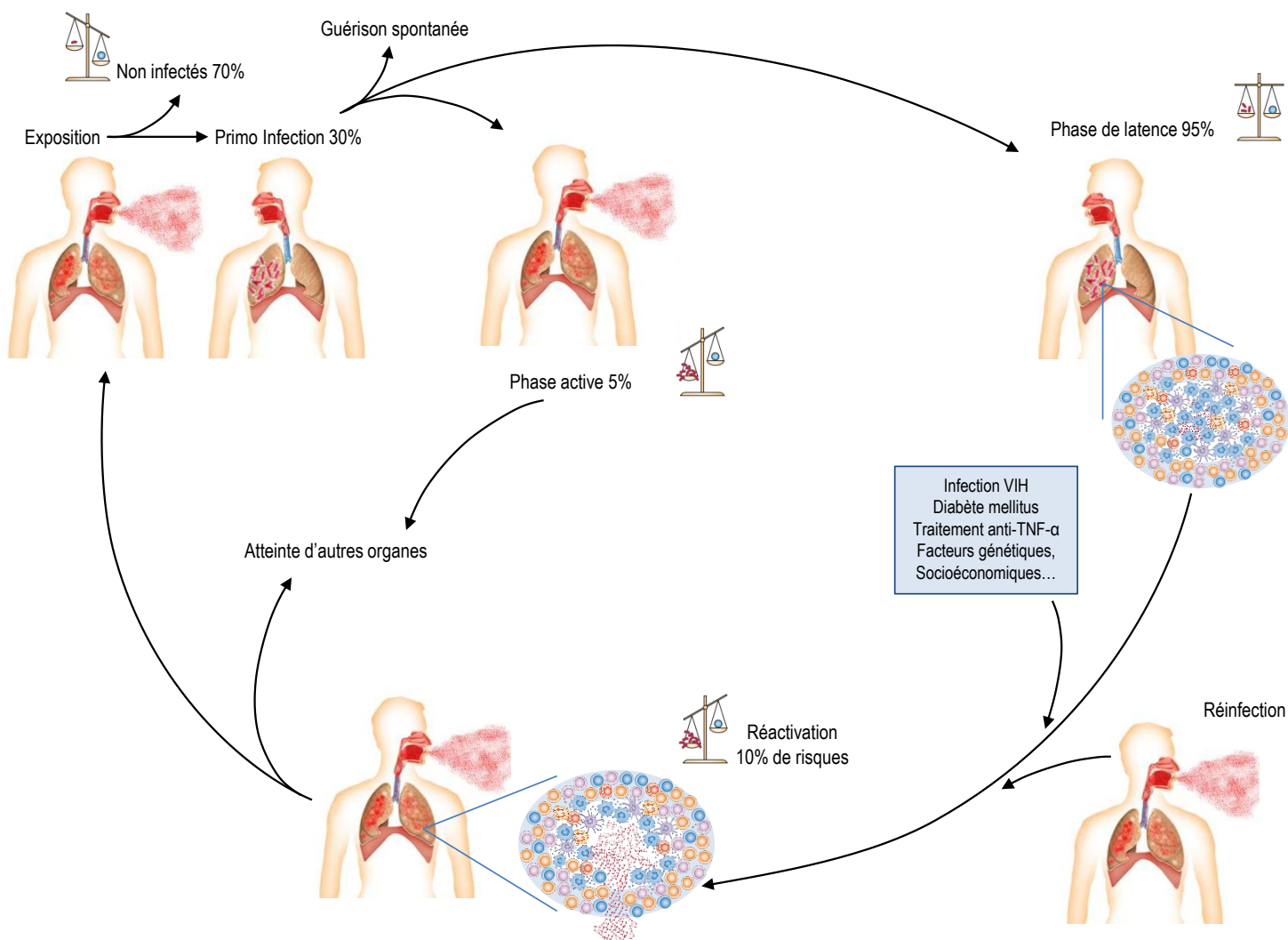


Figure 5 : Pathogénèse de la tuberculose.

La tuberculose se transmet par les voies aériennes via l'inhalation de microgouttelettes (1-5  $\mu\text{m}$ ) contenant *M. tuberculosis*. Les mycobactéries inhalées se dirigent vers les alvéoles pulmonaires où l'interaction entre l'hôte et le pathogène a lieu. Dans 70% des cas, les individus exposés ne sont pas infectés alors que 30% développent une infection. 90% des individus infectés contiennent l'infection et un équilibre entre l'infection et le système immunitaire se crée (phase de latence). Les 5% restant développent une tuberculose primaire pulmonaire, pouvant disséminer et induire une tuberculose extra-pulmonaire ou miliaire. Les individus ayant des tuberculoses latentes peuvent voir l'équilibre instauré être perturbé par une fragilisation du système immunitaire (immunosuppression thérapeutique ou pathologique). Dans ce cas, une réactivation de l'infection est possible, rendant l'individu malade (Adapté de Kaufmann and McMichael, 2005)

individus, 95% vont contenir l'infection, 5% vont déclencher une tuberculose active, et une part inconnue va réussir à éliminer totalement l'infection (**Figure 5**).

Chez 95% des individus immunocompétents, le système immunitaire est rapidement capable de contenir l'infection au sein d'une structure multicellulaire appelée le granulome (**Figure 5**). Le confinement de ces bacilles tuberculeux par le système immunitaire est caractéristique d'une phase de latence, période d'équilibre entre l'infection et la réponse immunitaire pendant laquelle l'individu infecté n'est ni malade, ni contagieux. Le caractère latent de cette pathologie explique l'existence de nombreux « porteurs sains » dans la population. L'OMS évalue à un tiers de la population mondiale le nombre d'individus infectés, faisant de l'Homme un vaste réservoir pour *M. tuberculosis* (Barry et al., 2009). Dans moins de 10% des cas, les mycobactéries peuvent disséminer dans l'organisme et atteindre spécifiquement d'autres organes tels que les os, les méninges ou encore le tractus digestif : on parle alors de tuberculose extra-pulmonaire. Les mycobactéries peuvent aussi disséminer de façon systémique et toucher plusieurs organes : on parle alors de tuberculose miliaire. Dans les cas où l'infection est contrôlée, l'équilibre trouvé entre l'infection et la réponse immunitaire pendant la phase de latence est pérenne. Néanmoins, la perturbation de cet équilibre est possible, entraînant un phénomène de réactivation de l'infection (**Figure 5**). Chez l'Homme, une infection par le VIH, le développement d'un diabète *mellitus*, l'utilisation thérapeutique de molécules neutralisant les effets du TNF $\alpha$ , ou encore l'utilisation de glucocorticoïdes peuvent être à l'origine d'une réactivation de la tuberculose (Pour revue, Ernst, 2012). Au cours des différentes phases de cette maladie, des caractéristiques physiologique et anatomopathologique spécifiques permettent le dépistage de la tuberculose.

Pour des raisons indéterminées, dans 5% des cas, les individus primo-infectés sont incapables de contenir l'infection et développent la maladie. La tuberculose pulmonaire est la forme la plus fréquente et la seule contagieuse. Cette phase active de la maladie se caractérise par une toux persévérante, de la fièvre, associées à une perte de poids et une pâleur importantes (**Figure 5**).

La pathogénèse a permis de définir l'infection tuberculeuse comme un phénomène cyclique, où une phase de latence caractérisée par l'instauration d'un état d'équilibre entre la virulence du pathogène et la réponse immunitaire de l'hôte sépare les deux phases active de la maladie (primo-infection et réactivation). Si l'agent pathogène est neutralisé, il n'est pas pour autant éliminé. De ce fait, un des nouveaux challenges pour la recherche consiste à décrypter les mécanismes de la réponse immunitaire mis en jeu afin de comprendre leur subversion par *M. tuberculosis*.



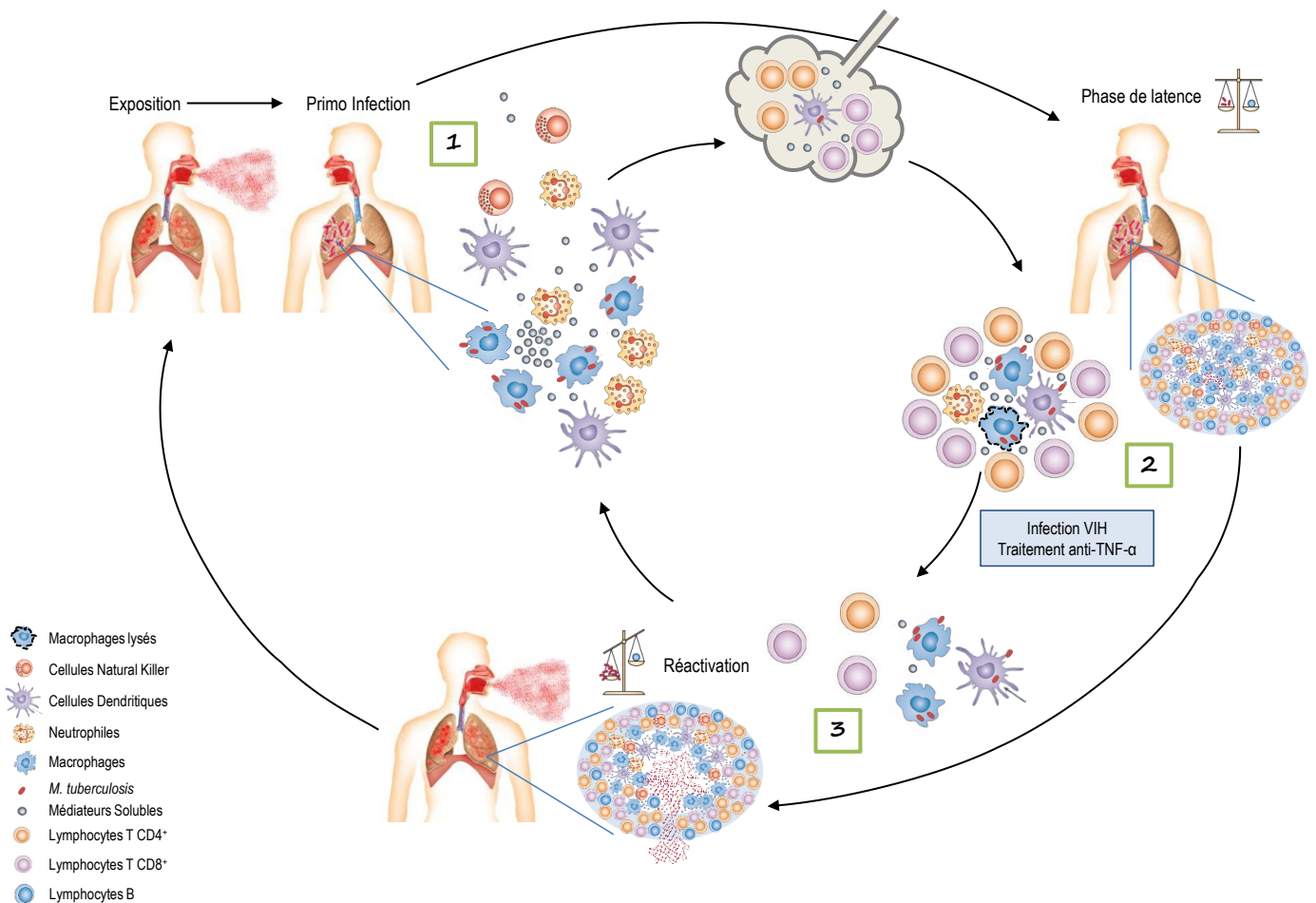


Figure 6 : Réponse immunitaire antituberculeuse.

Après inhalation de microgouttelettes contenant des mycobactéries, ces dernières migrent jusque dans les alvéoles pulmonaires où elles sont phagocytées par les macrophages alvéolaires environnants. Ces macrophages infectés sécrètent des médiateurs solubles permettant le recrutement d'autres populations cellulaires, telles que les neutrophiles, les cellules dendritiques (DCs) et plus tard les cellules Natural killer (NKs) (1). Les DCs sont des cellules présentatrices de l'antigène capables de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires afin de recruter les lymphocytes T. De retour sur le site d'infection, les différentes populations cellulaires vont s'organiser afin de former un granulome nécessaire au confinement de l'infection (2). Une immunosuppression, qu'elle soit thérapeutique (traitement anti-TNF $\alpha$ ) ou pathologique (co-infection par le VIH), peut entraîner dans certains cas une désorganisation de la structure granulomateuse associée à une réactivation de la pathologie tuberculeuse (3).

## *B. Réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis*.*

*M. tuberculosis* est transmis par les voies aériennes via l'inhalation de microgouttelettes présentes dans l'air. La charge bactérienne nécessaire à l'installation de l'infection est minimale : une bactérie suffit (Russell, 2007). Une fois inhalées, les mycobactéries sont localisées au niveau pulmonaire où elles vont interagir avec les cellules environnantes et déclencher la réponse immunitaire de l'hôte. Le cycle infectieux caractéristique de *M. tuberculosis* est rythmé par cette réponse immunitaire ainsi que par les mécanismes mis en place par les mycobactéries pour le déjouer. Les macrophages, acteurs principaux de cette interaction, sont au carrefour entre les réponses immunitaires innée (réponse immunitaire rapide, non spécifique et de courte durée) et adaptative (réponse immunitaire tardive, spécifique et durable), faisant d'eux la cible des mécanismes de résistances mycobactériens.

### *1. Immunopathologie de la tuberculose.*

L'interaction des mycobactéries avec les cellules des alvéoles pulmonaires permet la mise en place de la réponse immunitaire innée, première barrière physique et chimique à un agent pathogène. Les cellules qui la composent ont des fonctions de sentinelles afin de détecter les agents pathogènes, de tenter de les détruire via leurs activités microbicides, et d'induire la réponse immunitaire adaptative à travers la présentation antigénique. La réponse immunitaire innée à une infection par *M. tuberculosis* débute par l'internalisation du pathogène au sein de la cellule hôte. La réponse inflammatoire qui en découle met en jeu différents mécanismes antimicrobiens et est régulée par la production de médiateurs solubles. La réponse immunitaire de l'hôte ayant pour objectif de contenir l'infection le temps de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

Les macrophages alvéolaires infectés quittent les alvéoles et migrent au sein des tissus pulmonaires où s'initie la formation du granulome (Pour revue Ramakrishnan, 2012). Parallèlement, ces macrophages sécrètent des médiateurs solubles parmi lesquels des cytokines, molécules essentielles à la mise en place des différents processus cellulaires, et des chimiokines qui participent à l'attraction depuis la circulation sanguine des neutrophiles, des DCs, des monocytes et plus tardivement des cellules Natural killer (NKs) vers le site d'infection où ils s'accumulent (Junqueira-Kipnis et al., 2003; Kang et al., 2011; Wolf et al., 2007) (**Figure 6<sub>1</sub>**). Sur place, les neutrophiles agissent sur les mycobactéries en les phagocytant, en utilisant leur fonction de dégranulation permettant la libération de facteurs antimicrobiens dans le milieu

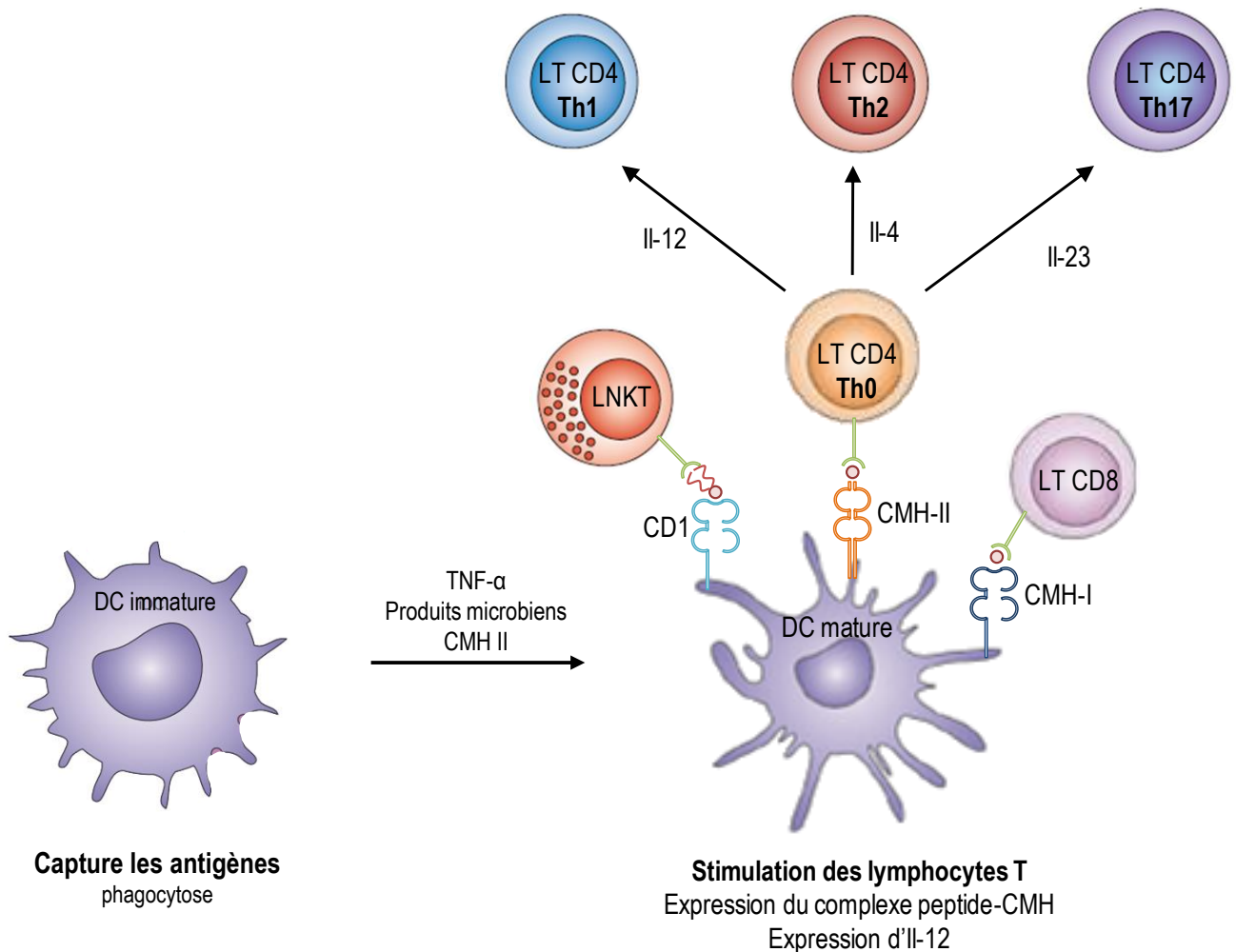


Figure 7 : Les cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes.

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules phagocytaires qui une fois matures, ont la capacité de migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T. Cette présentation se fait par le biais de différents complexes, appelés complexes majeur d'histocompatibilité (CMH) classiques ou non classiques. Les DCs présentent des antigènes de nature peptidique aux LTs CD8 via le CMH-I, aux LTs CD4 via le CMH-II, ainsi que des antigènes lipidiques dits non classiques aux lymphocytes T Natural killer (LNKTs) via le CD1. Cette présentation permet la différenciation des LTs en cellules spécifiques d'antigènes mycobactériens. Ainsi, à partir de LTs Th0, l'induction des LTs CD4<sup>+</sup> Th1 et Th17 se fait respectivement par sécrétion d'IL-12 et d'IL-23. Ces cellules sont impliquées dans une réponse immunitaire pro-inflammatoire, essentielle dans la lutte contre l'infection par *M. tuberculosis*. Une autre différenciation est possible, en LTs CD4<sup>+</sup> Th2, cellules aux propriétés anti-inflammatoires.

extracellulaire, ou enfin en formant des NETs (Neutrophils Extracellular Traps) aux effets séquestreurs sur les mycobactéries (Korbel et al., 2008; Ramos-Kichik et al., 2009). Les cellules NKs sont quant à elles capables d'induire la mort des cellules infectées par exocytose de granules cytolytiques ou encore en induisant l'apoptose (Brill et al., 2001; Vankayalapati et al., 2002). Enfin, à l'interface entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative se trouvent les cellules dendritiques. Outre leur fonction de phagocytes, ce sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (**Figure 7**). L'induction de l'inflammation par l'infection mycobactérienne permet aux macrophages infectés de potentialiser les capacités phagocytaires des DCs en induisant l'augmentation des récepteurs à leur surface, mais aussi de les activer. Une fois internalisées, les mycobactéries sont dégradées et les fragments antigéniques d'origines peptidiques qui en résultent sont présentés à la surface des DCs via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II (**Figure 7**). Il existe une présentation croisée d'antigènes peptidiques par le CMH de type I, mais aussi d'antigènes lipidiques par les molécules CD1 exprimées à la surface des DCs, rendue possible par la phagocytose de corps apoptotiques issus de macrophages alvéolaires infectés par *M. tuberculosis* (Schaible et al., 2003) (**Figure 7**). La spécificité de ces CPAs est de migrer via la circulation sanguine jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires pour y interagir avec les lymphocytes et induire leur expansion clonale. D'autres cellules, telles que les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires, sont capables d'interagir avec le pathogène au niveau pulmonaire dès les premières étapes de l'infection (Bermudez and Goodman, 1996). L'accumulation de ces cellules engendre sur le site d'infection les prémices de la formation du granulome.

A l'inverse de la majorité des maladies infectieuses au cours desquelles les pathogènes attirent les cellules du système immunitaire nécessaires à une forte diminution, voire l'élimination complète de ces pathogènes, *M. tuberculosis* semble profiter de l'accumulation de ces cellules immunitaires dans les premières étapes de l'infection car elles lui procurent de nouvelles niches de multiplication (Davis and Ramakrishnan, 2009). Ainsi, les macrophages infectés incapables de contrôler la multiplication mycobactérienne vont devenir apoptotiques, et les vésicules qui en découlent vont alors être phagocytées par les cellules phagocytaires nouvellement recrutées, permettant l'infection de nouvelles cellules par le bacille tuberculeux (Davis and Ramakrishnan, 2009). Ce recrutement cellulaire profite aussi à la défense de l'hôte, lui permettant à la fois de contenir l'infection mais aussi d'accumuler des DCs qui une fois matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles initient la mise en place de la réponse adaptative (Cooper, 2009) (**Figure 6**).

Le développement de la réponse immunitaire adaptative à une infection par *M. tuberculosis* se fait dans des délais relativement longs en comparaison à d'autres agents pathogènes. En effet, chez

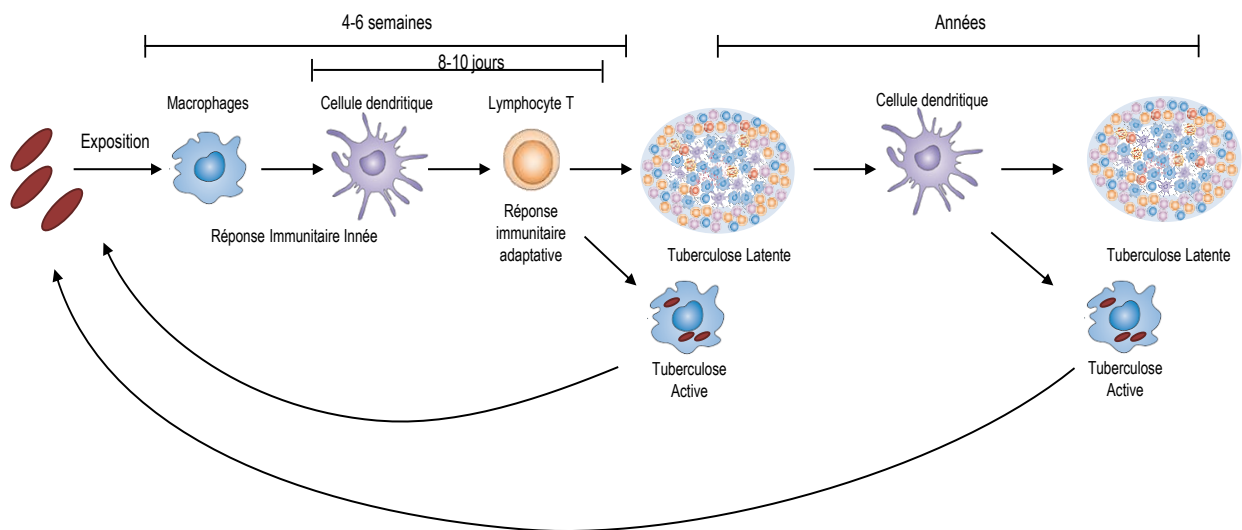


Figure 8 : Le cycle infectieux dans le temps.

Chez l'homme, il faut entre 4 et 6 semaines au système immunitaire après infection par le bacille tuberculeux pour recruter des lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Cette période est restreinte chez le modèle murin à qui il faut entre 8 et 10 jours. Ce laps de temps est incompressible et peut même être augmenté par les mécanismes subversifs développés par *M. tuberculosis*. Une fois la réponse immunitaire en place, la formation du granulome permet le confinement des mycobactéries pendant plusieurs années (adapté de Young et al., 2008).

l'homme l'immunité adaptative est seulement détectable plus d'un mois après exposition aux mycobactéries. Ce laps de temps est décrit comme incompressible car une disponibilité précoce de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> n'affecte pas la croissance mycobactérienne au cours de la première semaine après infection (Gallegos et al., 2008; Wolf et al., 2008). Ces résultats suggèrent le développement de mécanismes subversifs par les mycobactéries face à ces cellules ainsi que face aux mécanismes antimicrobiens mis en place dans ces délais. Le temps nécessaire aux cellules dendritiques matures, principales cellules présentatrices de l'antigène (CPA), pour migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires peut qui plus est être augmenté par les mécanismes développés par *M. tuberculosis* afin de retarder la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Blomgran et al., 2012; Blomgran and Ernst, 2011).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, l'interaction des DCs avec des lymphocytes T (LTs) naïfs via le CMH II entraîne leur activation en LTs effecteurs CD4<sup>+</sup> (**Figure 7**). Il existe deux sous-populations de LTs CD4<sup>+</sup> effecteurs classiquement définies. Les LTs CD4<sup>+</sup> Th1 sont des cellules impliquées dans une réponse pro-inflammatoire et essentielles à la réponse immunitaire contre *M. tuberculosis*. Elles sécrètent de l'IFN- $\gamma$  ainsi que du TNF $\alpha$ , qui ont principalement une action synergique sur l'activation des mécanismes microbicides des macrophages. Récemment, un mécanisme de contrôle de *M. tuberculosis* par ces cellules a été mis en évidence, indépendamment de la voie de sécrétion IFN- $\gamma$ /TNF $\alpha$  (Gallegos et al., 2011; Rook et al., 2004) (**Figure 7**). Une seconde sous-population de LTs CD4<sup>+</sup>, dite Th2, est impliquée dans une réponse anti-inflammatoire et régule aussi la réponse immunitaire à médiation humorale. Cette sous-population est généralement décrite comme n'étant pas impliquée dans l'immunité anti tuberculeuse. Cependant, la sécrétion d'Il-4 qu'elle induit pourrait moduler la croissance mycobactérienne en modulant l'effet du TNF $\alpha$  (Potian et al., 2011). La réponse immunitaire CD4<sup>+</sup> est dépendante de la sécrétion d'Il-12p40 par les DCs (Khader et al., 2006). Cette cytokine est le précurseur de deux autres : l'Il-12p70 et l'Il-23, respectivement impliquées dans la différenciation des LTs CD4<sup>+</sup> en Th1 et Th17. Les LTs CD4<sup>+</sup> Th17 sont des cellules pro-inflammatoires impliquées dans les étapes précoces de la réponse immunitaire adaptative à *M. tuberculosis* et dont la sécrétion d'Il-17 s'avèrerait être essentielle à la formation des granulomes pulmonaires (Khader et al., 2007; Okamoto Yoshida et al., 2010). Par présentation croisée, les DCs activent des LTs CD8<sup>+</sup>, cellules cytolytiques (**Figure 7**). Si le rôle de ces cellules dans la sécrétion de cytokines activatrices des macrophages (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) ou encore dans la mort des cellules infectées par cytotoxicité est bien décrit *in vitro*, il n'a pas encore été défini chez l'homme (Gupta et al., 2012). Beaucoup moins étudiés jusqu'alors, les lymphocytes B (LBs) sont depuis peu suspectés de jouer un rôle dans le façonnement de l'immunité antituberculeuse

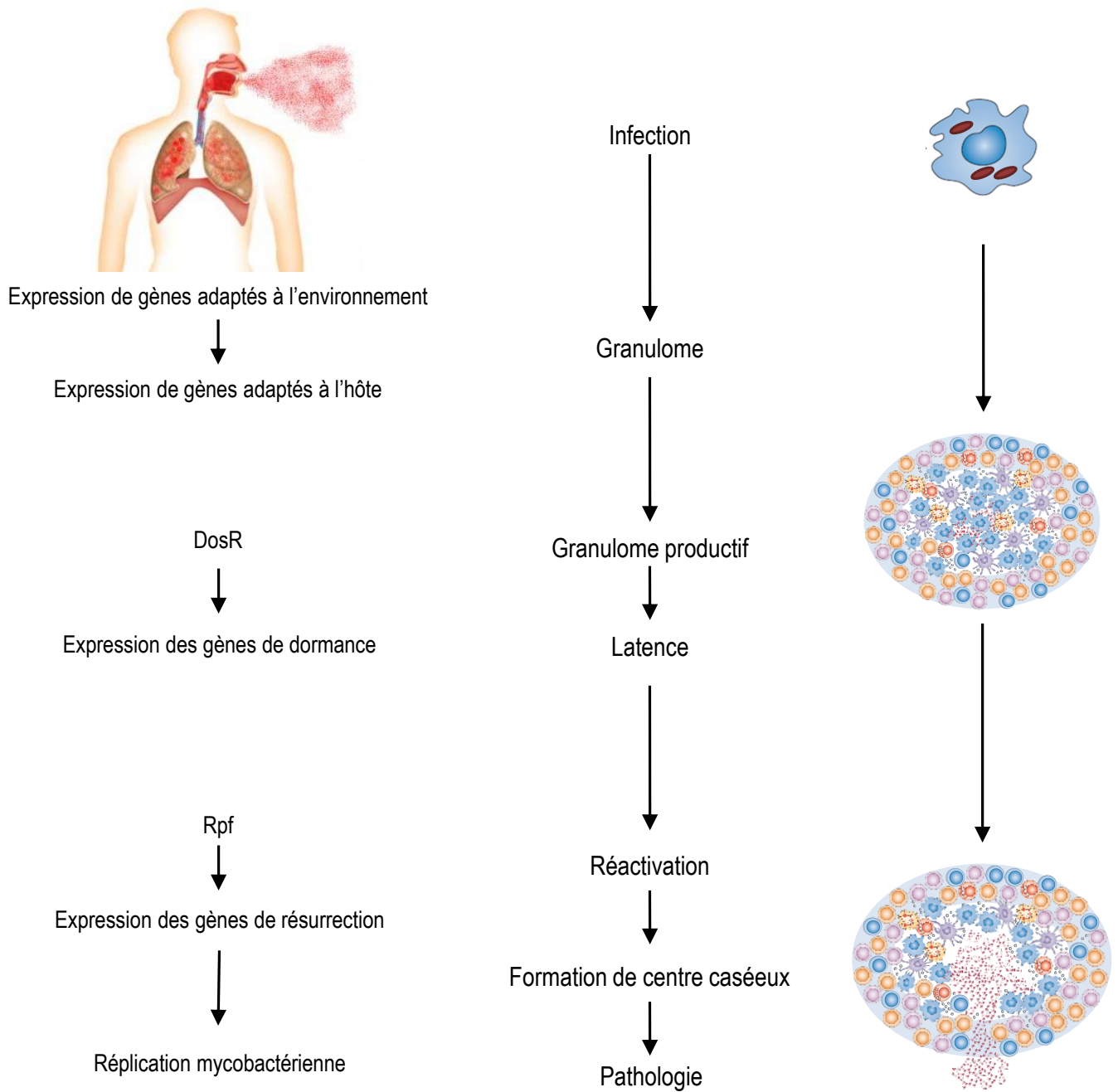


Figure 9 : *Mycobacterium tuberculosis* et le granulome.

La formation du granulome a très longtemps été pensée comme une simple réponse du système immunitaire de l'hôte qui, à défaut de pouvoir éliminer les mycobactéries, les contenait dans une structure complexe. Une nouvelle vision du granulome a récemment émergé, le considérant à la fois comme un mécanisme de défense, mais aussi comme un mécanisme bénéfique à *M. tuberculosis*. Les mycobactéries ont su s'adapter en modulant l'expression de gènes en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent, et ainsi tirer profit de la situation (Adapté de Kaufmann, 2005a).



(Maglione and Chan, 2009). En effet, leur présence dans les poumons de patients atteints de tuberculose, et plus précisément au niveau des granulomes, laissent à penser qu'ils jouent un rôle dans le contrôle de l'infection. (Phuah et al., 2012; Tsai et al., 2006).

L'ensemble de ces cellules participe à la formation complète du granulome, solidifié par une structure fibreuse composée majoritairement de collagène et permettant de définir la structure granulomateuse, caractéristique de la tuberculose. Jusqu'alors, cette organisation cellulaire était considérée comme principalement bénéfique à l'hôte. En effet, la fonction principale du granulome est de contenir l'infection, à défaut de l'éradiquer, et de ce fait instaurer une phase de latence au cours de laquelle la balance entre la réponse immunitaire et la multiplication bactérienne est à l'équilibre et peut durer plusieurs années (**Figure 8**). L'absence de cette organisation cellulaire entraînerait donc une plus grande prolifération et dissémination des mycobactéries dans l'organisme, laissant penser un avantage exclusif de la formation du granulome au bénéfice de l'hôte (Bean et al., 1999; Chakravarty et al., 2008; Flynn et al., 1995). Récemment, de nouveaux arguments en faveur d'un bénéfice de la formation du granulome pour *M. tuberculosis* ont été avancés. Parmi eux, l'exploitation de la formation du granulome par les mycobactéries afin de faciliter leur réplique. En effet, l'utilisation du poisson zèbre comme modèle d'étude a permis de montrer que la formation du granulome était corrélée à une augmentation de la prolifération de *M. tuberculosis* (Volkman et al., 2004). Cette corrélation est la conséquence d'une induction du recrutement de macrophages au niveau de la structure granulomateuse en formation, et que ce recrutement est modulé par l'expression et la sécrétion du facteur de virulence ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Volkman et al., 2004; Volkman et al., 2010). Les mycobactéries ne subiraient donc pas la formation du granulome mais y contribueraient et en bénéficieraient (Pour revue, Ramakrishnan, 2012). De la même manière, l'instauration de la phase de latence n'est pas juste une conséquence de la réponse immunitaire de l'hôte mais surtout un état induit par des mécanismes mycobactériens. En effet, la capacité de *M. tuberculosis* à s'adapter réside entre autres dans l'expression d'un système à deux composantes DosR/DosS (**Figure 9**). L'induction de ce système par des stimuli environnementaux présents pendant la phase de latence (hypoxie, présence de NO et CO) entraîne l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation de sources d'énergies alternatives (et notamment des lipides) aboutissant à une diminution de la respiration, du métabolisme et de la croissance mycobactérienne (Pour revue, Boon and Dick, 2012). Toutefois, si la population mycobactérienne globale n'évolue pas pendant cette période de latence, une sous-population de mycobactéries continue de se multiplier (Gill et al., 2009).

L'ensemble de ces données fait de l'état d'équilibre qu'est le granulome un phénomène dynamique au cours duquel le système immunitaire de l'hôte contient l'infection tout en permettant





aux mycobactéries de survivre au sein d'une niche cellulaire et d'être ainsi hors d'atteinte des mécanismes microbicides.

Dans certains cas, le système immunitaire peut être fragilisé, ce qui entraîne une réactivation de la croissance mycobactérienne et la déstructuration du granulome via la formation de centres nécrotiques et caséux. Une des causes de la fragilisation du système immunitaire entraînant une réactivation tuberculeuse est l'immunodépression pathologique par co-infection avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cette infection entraîne une modulation à la fois quantitative et qualitative des LTs CD4<sup>+</sup>. En effet, après infection par le VIH, une diminution du nombre de LTs CD4<sup>+</sup> est constatée, et en priorité ceux spécifiques d'antigènes tuberculeux (Geldmacher et al., 2010; Geldmacher et al., 2008). Cette cible cellulaire spécifique dont le mécanisme reste encore inconnu serait une des causes de l'augmentation de la susceptibilité à la tuberculose chez ces patients.

Une autre cause de réactivation possible est liée à une immunodépression thérapeutique par traitement anti-TNF $\alpha$ . En effet, l'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquant l'action du TNF $\alpha$  entraîne une modulation de la réponse immunitaire à différents niveaux, parmi lesquels une diminution de l'activité antimicrobienne du macrophage, une augmentation de la population de LTs régulateurs ainsi qu'une diminution du nombre de LTs CD8<sup>+</sup> à l'activité cytolytique par la présence de molécules cytotoxiques de granulysine.

L'action ciblée sur les LTs CD4<sup>+</sup> ainsi que sur le TNF $\alpha$  font de ces deux éléments des protagonistes majeurs de la réponse immunitaire. D'autres conditions thérapeutiques peuvent entraîner une réactivation de la tuberculose (diabète, traitement glucocorticoïde...), mais dont les mécanismes d'action ne sont pas connus. Chez *M. tuberculosis*, ce phénomène de réactivation est associé à une reprise du métabolisme et de la multiplication. Tout comme pour le phénomène de dormance, le phénomène de « résurrection » mycobactérien est associé à l'expression de gènes codant des protéines Rpf (Resuscitation-promoting factors) nécessaires à la reprise d'une activité biologique normale (Downing et al., 2005) (**Figure 9**). Une fois le granulome totalement déstructuré, les mycobactéries sont libérées et peuvent alors être disséminées dans l'organisme, ou être exhalées et transmises : on parle alors de tuberculose active.

L'immunité antituberculeuse est un processus complexe faisant intervenir différents partenaires cellulaires qui vont, au cours de l'infection, interagir avec les macrophages, cellules centrales dans la défense de l'organisme contre l'infection par *M. tuberculosis*.

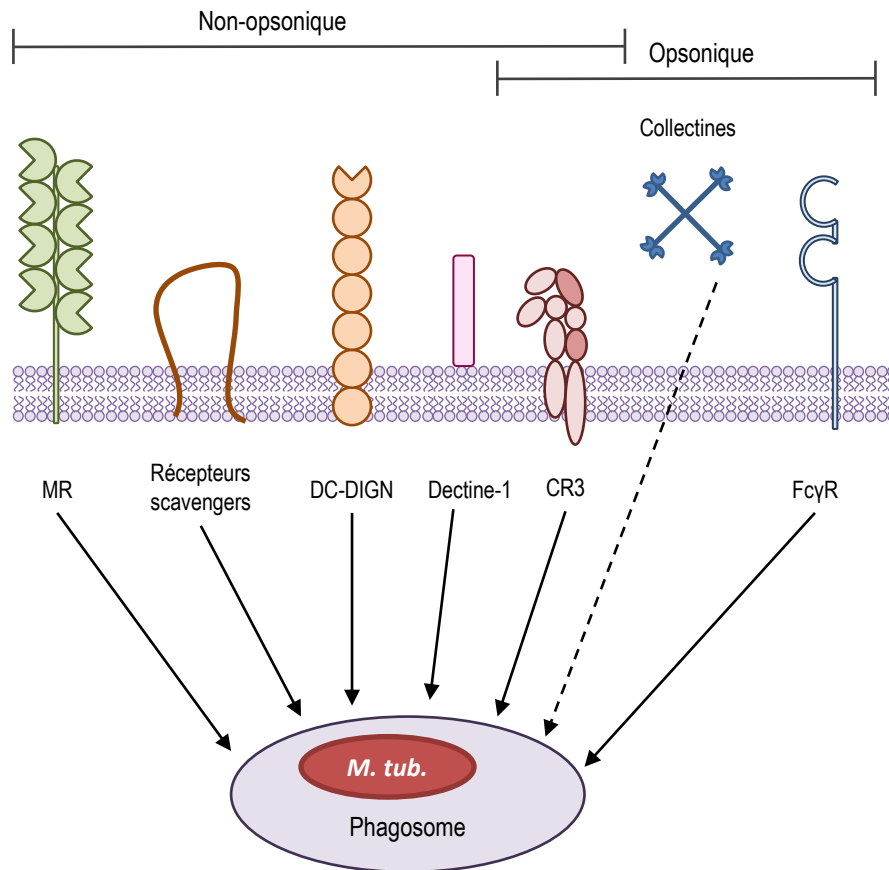


Figure 10 : Reconnaissance de *M. tuberculosis* par des récepteurs cellulaires.

L'activation de la réponse immunitaire du macrophage par *M. tuberculosis* se fait par interaction entre les deux protagonistes. Cette interaction met en jeu différents récepteurs présents à la surface du macrophage. Ainsi, l'internalisation des mycobactéries au sein d'un phagosome se fait soit par interaction directe avec les récepteurs membranaires tels que le récepteur au mannose (MR) ou encore les récepteurs scavengers, DC-SIGN ou le site lectine du récepteur au complément de type 3 (CR3) ; soit par interaction indirecte après opsonisation. Dans ce cas, le CR3 ainsi que le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines (FcγR) sont impliqués. *M. tuberculosis* peut aussi être opsonisé par des collectines, molécules qui vont permettre son internalisation. (Adapté de Sasindran and Torrelles, 2011).

## II. *Le macrophage, partenaire essentiel de la physiopathologie de la tuberculose*

Le macrophage est une cellule définie comme étant un phagocyte professionnel doté de diverses et nombreuses fonctions dans la lutte contre l'infection. L'immunopathologie de la tuberculose est conditionnée par la rencontre entre *M. tuberculosis* et le macrophage, cellule intervenant à différentes étapes du cycle infectieux. Les macrophages sont des cellules clés, siège de la multiplication de *M. tuberculosis*, nécessaires à l'initiation et la propagation de l'infection alors qu'elles constituent classiquement la première barrière de défense de l'organisme. Pour détourner cette cellule à son avantage, *M. tuberculosis* a su développer de nombreuses stratégies d'adaptation afin de transformer le macrophage en un environnement favorable à sa multiplication.

### 1. *Exploitation des voies d'entrée dans le macrophage.*

L'activation de la réponse immunitaire du macrophage face à *M. tuberculosis* nécessite une interaction entre ces deux protagonistes. A la surface des macrophages sont localisés des récepteurs capables d'interagir avec *M. tuberculosis*. La reconnaissance du pathogène qui induit une cascade de signalisation aboutissant l'internalisation du pathogène via un mécanisme de phagocytose (**Figure 10**).

La phagocytose est un processus cellulaire physiologique permettant l'internalisation de pathogènes par des cellules phagocytaires. Ce phénomène est issu d'un remodelage du cytosquelette d'actine induisant la formation de pseudopodes ou une invagination de la membrane plasmique en fonction du récepteur avec lequel se fait l'interaction (Caron and Hall, 1998). L'induction de la phagocytose peut se faire après reconnaissance directe ou indirecte des mycobactéries par le macrophage.

La phagocytose indirecte dite opsonique, fait intervenir des opsonines dont les plus étudiées sont les opsonines classiques du sérum : les immunoglobulines et les fragments du complément. Ces molécules sont reconnues respectivement par les récepteurs du fragment Fcγ des immunoglobulines (FcγRs) et le récepteur du complément, et notamment le récepteur au complément de type 3 (CR3) (**Figure 10 ; Tableau 2**). Il existe aussi d'autres molécules opsonisantes telles que les collectines, familles à laquelle appartiennent les protéines du surfactant A & D (SP-A et SP-D) ainsi que la fibronectine, ou encore le mannose-binding lectin

Récepteur	Ligands	Rôle	Références
<b>Récepteur au Mannose</b>	Man-LAM PIM	Phagocytose Inhibition de la maturation du phagosome	(Schlesinger et al., 1994) (Schlesinger, 1993) (Torrelles et al., 2006)
<b>Récepteur Scavenger</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Phagocytose Coopération avec TLR2	(Zimmerli et al., 1996) (Hoebe et al., 2005)
<b>DC-SIGN</b>	Man-LAM ?	Phagocytose	(Tailleux et al., 2005)
<b>Récepteur au Complément de type 3</b>	Antigène 85C PIM	Phagocytose	(Schlesinger et al., 1990) (Velasco-Velazquez et al., 2003)
<b>Dectine-1</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Phagocytose Induit la réponse adaptative Coopération TLR2	(Yadav and Schorey, 2006)

Tableau 2 : Récepteurs macrophagiques impliqués dans l'internalisation de *M. tuberculosis*

(MBL) (Pour revue Sasindran and Torrelles, 2011) (**Figure 10 ; Tableau 2**). La phagocytose opsonique est généralement associée à un mécanisme en faveur de l'hôte, déclenchant une réponse bactéricide du macrophage (de Haas et al., 1995).

La phagocytose directe ou non opsonique de *M. tuberculosis* consiste en la reconnaissance de molécules associées au pathogène (PAMPs pour Pathogen Associated Molecular Patterns) localisées au niveau de l'enveloppe mycobactérienne, tels que le peptidoglycane, des lipoprotéines ou autres molécules à la surface de *M. tuberculosis*, avec des PRRs (Patterns Recognizing Receptors). La phagocytose non-opsonique implique divers récepteurs, parmi lesquels on retrouve les récepteurs lectines de types C tels que le récepteur au mannose (MR) (Astarie-Dequeker et al., 1999; Schlesinger, 1993) et DC-SIGN (Dendritic Cells- Specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) (Tailleux et al., 2005), le site lectine du CR3 (Cywes et al., 1996) ainsi que les récepteurs scavengers (Zimmerli et al., 1996) ou encore Dectin-1 (Yadav and Schorey, 2006). (**Figure 10 ; Tableau 2**).

La contribution relative de ces récepteurs dans le devenir et la survie des mycobactéries à l'intérieur de la cellule n'est toujours pas clairement définie. Néanmoins, l'infection de macrophages par deux souches différentes par leur virulence a montré qu'elles empruntent des voies d'entrée différentes (Schlesinger et al., 1996). De plus, l'internalisation via le MR ou les récepteurs scavengers entraînent un blocage de la maturation du phagosome associée à la poursuite de la croissance mycobactérienne, alors que les mycobactéries opsonisées et internalisées via le fragment Fc $\gamma$  sont éliminées (Kang et al., 2005; Torrelles et al., 2006). Même si ce n'est pas clairement décrit, il paraît donc plausible que l'utilisation par *M. tuberculosis* des différentes voies de phagocytose dans la cellule et de leur répercussion sur l'induction de la réponse immunitaire soit une stratégie de survie.

L'interaction de *M. tuberculosis* avec d'autres récepteurs membranaires non responsables de l'induction de la phagocytose est possible. Ces récepteurs agissent souvent comme co-récepteurs de phagocytose. Ainsi, l'interaction avec les TLRs (Toll-Like Receptors) induit la sécrétion de médiateurs solubles et active différents mécanismes bactéricides du macrophage infecté, provoquant une différence dans la survie du pathogène au sein de l'hôte (Meena and Rajni, 2010).

Une fois phagocytées, les mycobactéries se retrouvent localisées dans un phagosome qui reste bloqué à un stade précoce et ne subit pas les différentes étapes de maturation le long de la voie endocytique aboutissant classiquement à la formation d'un phagolysosome bactéricide.

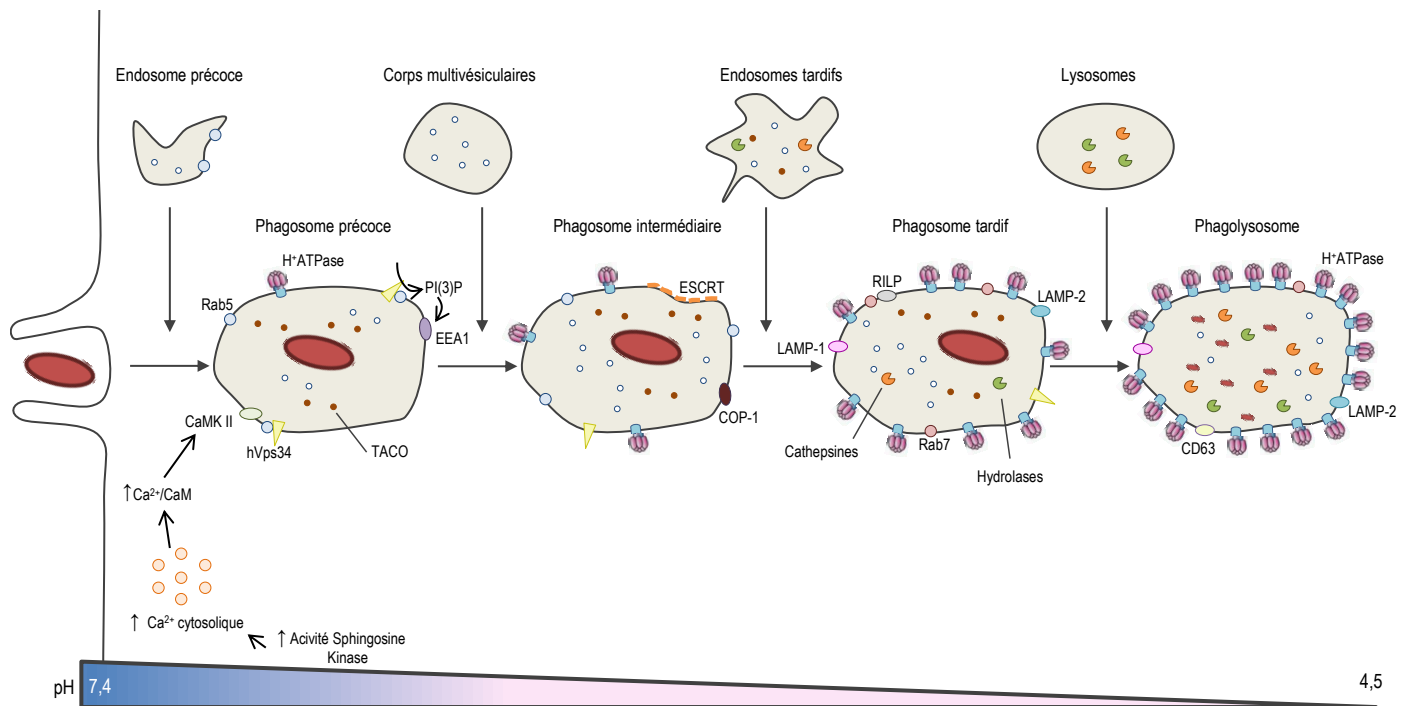


Figure 11 : Maturation du phagosome après phagocytose d'une bactérie.

La phagocytose induit une augmentation de la concentration cytosolique de  $\text{Ca}_2^+$ . Cette augmentation permet l'association du  $\text{Ca}_2^+$  à la calmoduline, et le complexe formé induit l'activation de la calmoduline kinase II (CamKII). Le recrutement de la protéine Rab5A par fusion avec les endosomes précoces (Bucci et al., 1992) permet le recrutement de la phosphatidylinositol-3-kinase ( $\text{PI}_3\text{K}$ ) hVps34 à la membrane du phagosome précoce en réponse à l'activation de la calmoduline kinase II (CaMKII) (Fratti et al., 2001; Murray et al., 2002). Une fois la  $\text{PI}_3\text{K}$  hVps34 recrutée, elle induit la formation de phosphatidylinositol-3-phosphate ( $\text{PI}_3\text{P}$ ) qui, en présence de Rab5A, permet le recrutement de la protéine EEA1, protéine responsable de la poursuite de la maturation par la fusion du phagosome précoce avec les endosomes tardifs (Gaullier et al., 2000; Lawe et al., 2000). Les phagosomes intermédiaires sont une étape permettant le renouvellement de la membrane plasmique via l'implication des GTPases Rab et de la protéine COP1 (coat protein 1) (Botelho et al., 2000). Les membranes devant être dégradées sont ubiquitinylées avant d'être associées au complexe protéique ESCRT (pour Endosomal-Sorting Complex Required for Transport) (Lee et al., 2005). L'interaction avec les endosomes tardifs entraîne la formation de phagosomes tardifs. Ces phagosomes expriment notamment à leur surface les protéines lysosomales associées aux membranes (LAMP-1 et -2). De plus, les  $\text{H}^+$ -ATPases présentes à la surface permettent d'acidifier la lumière du phagosome jusqu'à atteindre un pH de 5,5-6 (Desjardins et al., 1994). La GTPase Rab7A est une protéine nécessaire à la fusion entre les phagosomes tardifs et les lysosomes. Son recrutement implique la protéine Rab5, aussi indispensable pour la fusion avec les lysosomes (Vieira et al., 2003). Rab7A recrute plusieurs effecteurs à la membrane de la vacuole. Parmi eux, les RILP (Rab-interacting lysosomal protein) vont permettre le rapprochement entre les deux compartiments, permettant la fusion phagolysosomale (Harrison et al., 2003). Le phagolysosome est différentiable du phagosome tardif notamment par des membranes internes enrichies en  $\text{PI}_3\text{P}$ , une teneur élevée en cathepsine, l'absence de mannose-6-phosphate, la présence à la membrane de la glycoprotéine lysosomale CD63 (Cluster de différenciation 63, aussi appelé LAMP-3) et une accumulation de  $\text{H}^+$ -ATPases. (Pour revue, Flannagan et al., 2009).

## 2. Accumulation dans un compartiment non bactéricide

Classiquement, le macrophage phagocyte des particules afin de les amener vers un compartiment bactéricide, le phagolysosome. Ce compartiment résulte de la maturation du phagosome caractérisé par une succession d'évènements cellulaires ponctués par la fusion avec des vésicules endosomales pour aboutir à la formation successive d'un phagosome précoce, tardif et d'un phagolysosome (**Figure 11**) (Desjardins et al., 1994; Pour revue, Flannagan et al., 2009). Cette fusion fut longtemps considérée comme complète entre les différentes vésicules. Cependant, une théorie de « kiss and run » a par la suite été proposée, mettant en avant des évènements successifs de fusion partielle et de fission entre les compartiments phagosomaux et endosomaux au cours de la maturation (**Figure 11**). Les voies de signalisation régulant la maturation du phagosome sont bien décrites (**Figure 11**). Elles mettent en jeu des protéines telles que la GTPase Rab5 ou EEA1 (Early Endosome Antigen 1) qui dirige la fusion du phagosome avec les endosomes précoces. Par la suite, le phagosome perd Rab5 pour acquérir Rab7, elle aussi impliquée dans les fusions vésiculaires. Enfin, la maturation du phagosome aboutit à la formation d'un phagolysosome caractérisé par des membranes internes enrichies en PI<sub>3</sub>P, une teneur élevée en cathepsine, l'absence de mannose-6-phosphate, la présence à la membrane de la glycoprotéine lysosomale CD63 (Cluster de différenciation 63, aussi appelé LAMP-3) et une accumulation de H<sup>+</sup>-ATPase (**Figure 11**) (Pour revue, Flannagan et al., 2009).

Les mycobactéries sont capables de déjouer le rôle bactéricide du phagosome en agissant à différents niveaux au cours de la maturation. L'élément central de cette modulation est l'inhibition de la formation de PI<sub>3</sub>P par *M. tuberculosis*. Pour ce faire, *M. tuberculosis* est capable d'inhiber l'action de la sphingosine kinase (Malik et al., 2003), enzyme responsable de l'augmentation du Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> cytosolique (**Figure 12**). Le lipoarabinomannane (LAM), composé lipidique de l'enveloppe de *M. tuberculosis*, peut aussi agir sur la concentration en Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> cytosolique en bloquant le calcium par un mécanisme encore inconnu (Vergne et al., 2003). Par voie de conséquence, la cascade d'activation Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>/ Calmoduline/ hVps34 est perturbée et la synthèse de PI<sub>3</sub>P inhibée (Malik et al., 2000; Vergne et al., 2003). L'inhibition du PI<sub>3</sub>P est aussi provoquée par la sécrétion mycobactérienne de l'enzyme SapM, une phosphatase acide capable de déphosphoryler le PI<sub>3</sub>P du phagosome mycobactérien (Vergne et al., 2005) (**Figure 12**). De ce fait, l'absence d'accumulation du PI<sub>3</sub>P à la membrane du phagosome empêche le recrutement de la protéine EEA1, responsable de la poursuite de la maturation par la fusion du phagosome précoce avec les endosomes tardifs (Gaulhier et al., 2000; Lawe et al., 2000). Un autre moyen pour la mycobactérie d'inhiber la maturation du phagosome est à la fois de bloquer le recrutement de la protéine Rab7 mais aussi de maintenir la protéine Rab5 à la surface du phagosome.



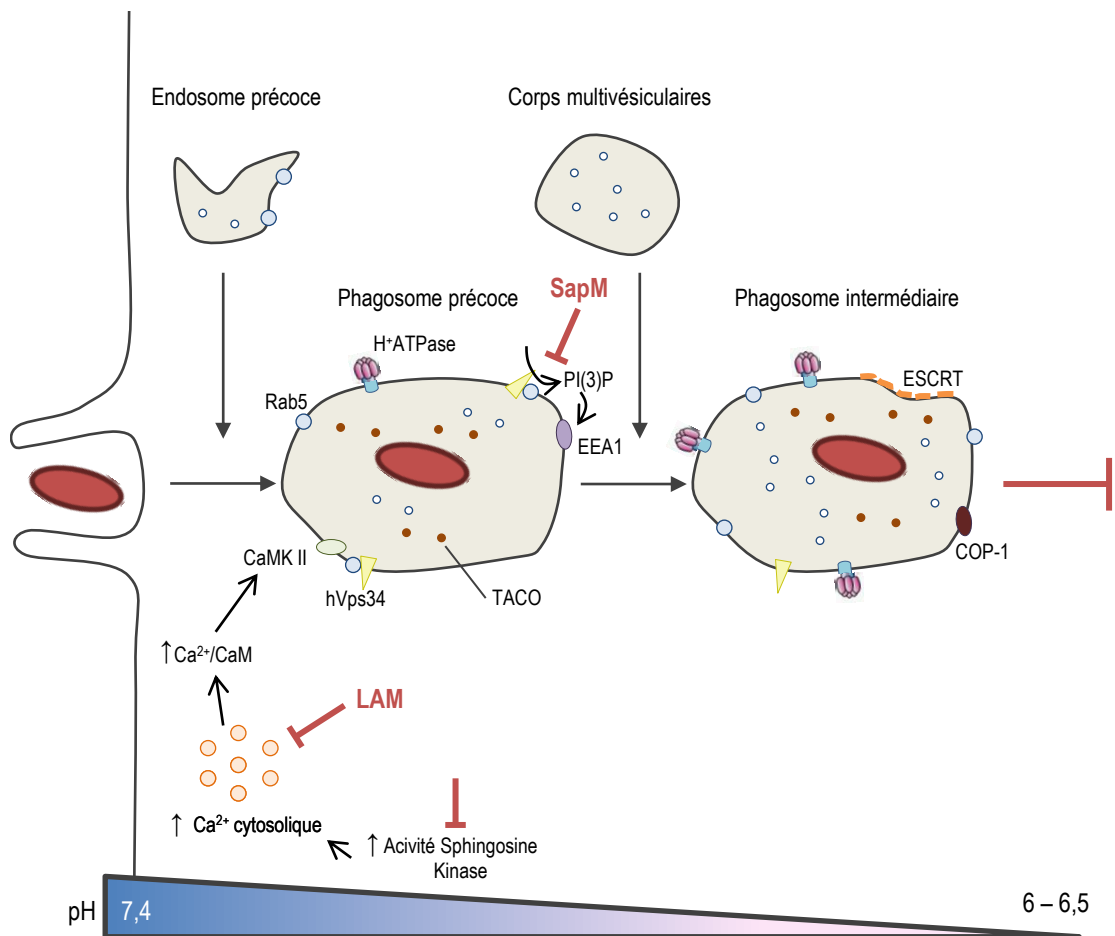


Figure 12 : Inhibition de la maturation du phagosome par *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* est capable de déjouer les mécanismes microbicides mis en place par le macrophage. Il est notamment capable d'interférer dans les différentes étapes de la maturation du phagosome afin d'empêcher la fusion avec les lysosomes et d'éviter ainsi un environnement défavorable à sa réplication.

Ce jonglage entre les protéines Rab permet d'éviter la fusion du phagosome tardif avec le lysosome, et ainsi maintenir les mycobactéries dans un phagosome précoce (Clemens et al., 2000; Via et al., 1997; Vieira et al., 2003). La fusion des phagosomes avec les lysosomes peut aussi être inhibée par *M. tuberculosis* en retenant la protéine TACO (tryptophan aspartate rich coated protein, également appelée coronin-1) à l'intérieur du phagosome (Ferrari et al., 1999). Enfin, la protéine kinase G (PknG), produite uniquement par les mycobactéries pathogènes dont *M. tuberculosis*, empêche la fusion phagosome-lysosome via un mécanisme encore non établi (Walburger et al., 2004).

### 3. Survie dans un environnement hostile

Malgré le blocage de la maturation du phagosome par *M. tuberculosis*, la bactérie est confrontée à des variations de pH entre le milieu extracellulaire et le phagosome, l'étape initiale d'internalisation s'accompagnant d'une acidification du compartiment (Rohde et al., 2007). De plus, dans certaines conditions, *M. tuberculosis* transite dans un phagolysosome avant de s'en échapper (van der Wel et al., 2007). L'acidification du compartiment phagosomal au cours de la maturation le long de la voie d'endocytose permet l'acquisition d'un environnement favorable aux activités antimicrobiennes de l'hôte face au pathogène internalisé. L'acidification du compartiment phagosomal est un phénomène provoqué par la présence de H<sup>+</sup>-ATPases, qui assurent l'entrée de protons dans le phagosome en hydrolysant l'ATP (**Figure 13**). L'acidification peut exercer une activité microbicide soit directement en agissant sur le métabolisme microbien, soit indirectement en modulant l'activité de peptides et d'enzymes antimicrobiens du macrophage. Ainsi, les défensines et les cathélicidines perméabilisent la membrane bactérienne (DeCoursey, 2004; Fang, 2004), alors que les cathepsines et le lysosome vont préférentiellement dégrader les composés bactériens (Pour revue, Flannagan et al., 2009) (**Figure 13**). L'acidification du phagosome favorise aussi la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (Jackett et al., 1978; Stuehr et al., 1989). Les enzymes impliquées dans ces voies sont la NADPH oxydase et la nitric oxyde synthase (iNOS), respectivement (**Figure 13**). Les ROS et les RNS peuvent agir de façon synergique et cibler plusieurs effecteurs microbiens, comme les groupements thiols, les résidus tyrosines, les acides nucléiques ou encore les lipides. Les protéines seront alors inactivées et les lipides oxydés. Des dommages sur l'ADN bactérien peuvent aussi être générés. De façon générale, l'action des ROS et RNS peut perturber le métabolisme bactérien, allant jusqu'à inhiber sa réplication (Fang, 2004).

La maturation du phagosome peut enfin induire un effet bactériostatique par la privation des pathogènes en nutriments (**Figure 13**). Deux mécanismes peuvent provoquer cette privation : la

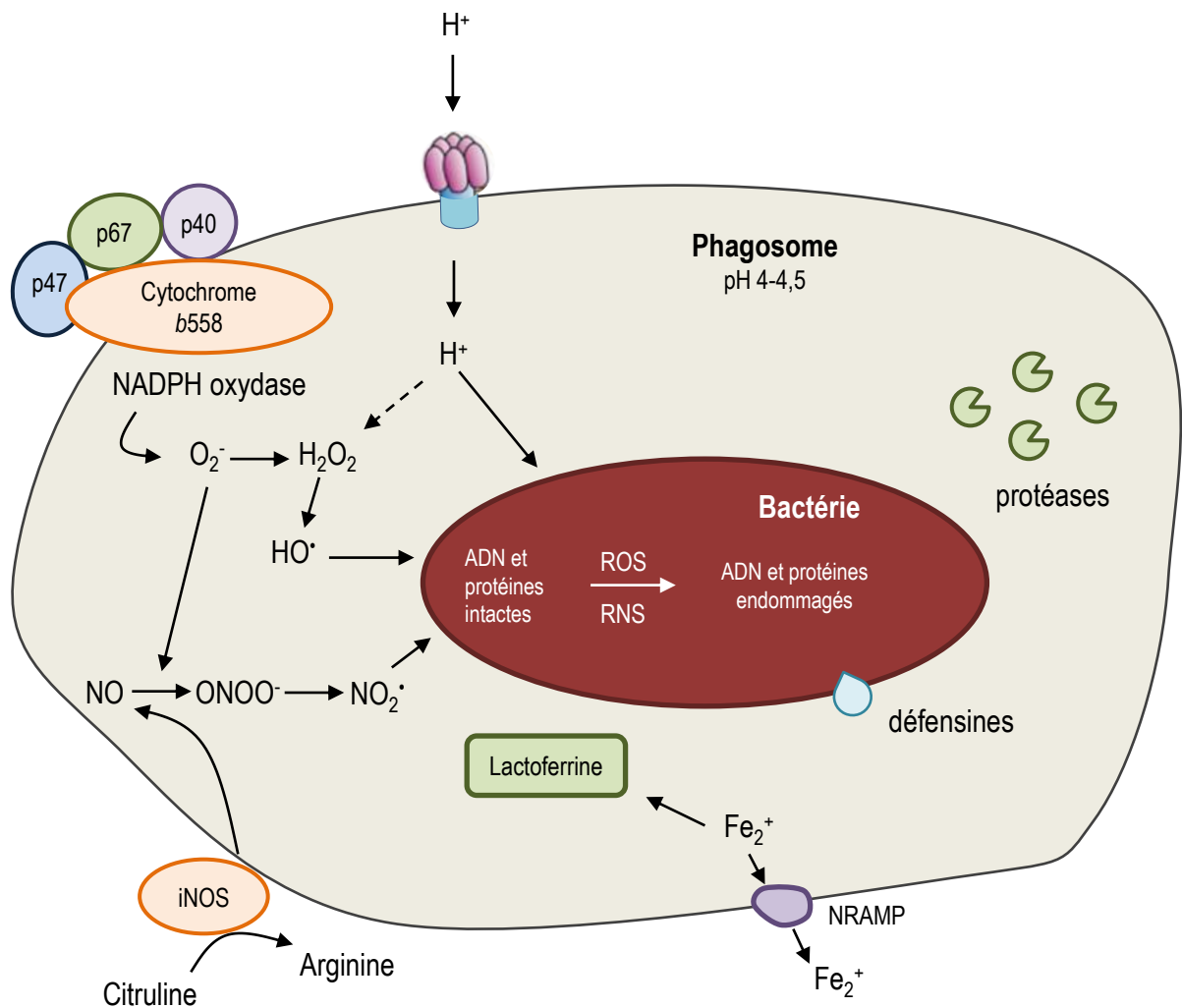


Figure 13 : Mécanismes antimicrobiens développés par la cellule au sein du phagosome.

Au sein du phagosome, la cellule est capable de développer un arsenal de mécanismes qui vont lui permettre de détruire le pathogène internalisé. Parmi ces mécanismes, la diminution du pH intraphagosomal joue un rôle central car il peut moduler le métabolisme microbien, mais aussi permettre l'activité d'enzymes actives à pH acide et la formation de radicaux oxygénés et azotés (Adapté de Flannagan et al., 2009).

séquestration des nutriments, avec pour exemple la lactoferrine qui une fois libérée dans la lumière du phagosome est capable de séquestrer le fer (Schaible et al., 2002), et l'extravasation de cations divalents via la protéine NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1) (Gunshin et al., 1997; Mackenzie and Hediger, 2004).

De la même manière que *M. tuberculosis* a mis en place une stratégie d'inhibition de la maturation du phagosome, elle a aussi développé une stratégie de protection contre ces mécanismes microbicides. Au cours de la maturation du phagosome, le pH phagosomal a beau diminuer, les mycobactéries réussissent à maintenir leur pH intracellulaire intact. Une analyse transcriptomique de *M. tuberculosis* a permis de mettre en évidence l'expression de gènes impliqués dans la résistance à un environnement acide pendant l'infection (Rohde et al., 2007). D'autre part, la génération de mutants de *M. tuberculosis* sensibles à un pH acide a permis de mettre en évidence l'implication de gènes codant des molécules impliquées dans les propriétés de l'enveloppe dans la résistance à un environnement acide, et notamment la synthèse du peptidoglycane ou des lipides de la paroi (Vandal et al., 2008; Vandal et al., 2009). L'implication de deux enzymes mycobactériennes dans la résistance à un pH acide a aussi été mise en évidence au cours de ce criblage. Ainsi, la protéine Rv3671c est une sérine-protéase associée à la membrane et la protéine Rv2136c serait l'homologue d'une protéine d'*Escherichia Coli* impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane (**Tableau 3**).

Il existe d'autres composés de la membrane qui participent à la résistance à l'acidité telle que la protéine membranaire OmpAtb (Raynaud et al., 2002) (**Tableau 3**). Cette protéine localisée sur la membrane externe de la mycobactérie est impliquée dans la formation de pores, dont le canal se fermerait à pH acide (Molle et al., 2006). Enfin, le transport du magnésium  $Mg^{2+}$  pourrait permettre à la mycobactérie de résister à l'acidification de son environnement en maintenant l'intégrité de l'enveloppe. Il aurait alors un rôle de cofacteur d'enzymes ou dans l'export de protons par la  $Mg^{2+}$ -ATPase (Cotter and Hill, 2003) (**Tableau 3**).

*M. tuberculosis* est aussi capable de lutter contre l'action des ROS et RNS en synthétisant des protéines qui permettent la détoxification de son environnement. En effet, le gène *katG* exprimé par *M. tuberculosis*, code une catalase-peroxidase qui permet la décomposition du peroxide d'hydrogène  $H_2O_2$  en eau et oxygène dans le phagosome (Ng et al., 2004) (**Figure 13, Tableau 3**). Aussi, les enzymes SodA et SodC sont des superoxide dismutases synthétisées par *M. tuberculosis* et localisées au niveau de l'enveloppe (Wu et al., 1998). Elles utilisent respectivement le fer et une association cuivre/zinc pour transformer l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  (Edwards et al., 2001; Piddington et al., 2001) (**Tableau 3**). L'action de KatG et SodA est due à la présence de la protéine SecA2 qui est un constituant d'un système de sécrétion et est indispensable à l'export

<b>Protéine</b>	<b>Rôle</b>	<b>Références</b>
<b>OmpAtb</b>	Formation de pores fermés à pH acide	(Raynaud et al., 2002) (Molle et al., 2006)
<b>Rv3671c</b>	Sérine-protéase Résistance à un pH acide	(Vandal et al., 2008)
<b>Rv2136c</b>	Biosynthèse du peptidoglycane Résistance à un pH acide	(Vandal et al., 2009)
<b>Transporteur de Mg<sup>2+</sup></b>	Cofacteur d'enzymes Export de H <sup>+</sup>	(Cotter and Hill, 2003)
<b>KatG</b>	Catalase peroxydase $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$	(Ng et al., 2004)
<b>SodA et SodC</b>	Superoxyde dismutase $O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2$	(Edwards et al., 2001) (Piddington et al., 2001)
<b>SecA2</b>	Composante du système de sécrétion nécessaire à l'export de KatG et SodA	(Braunstein et al., 2003) (Kurtz et al., 2006)
<b>Co-enzyme F420</b>	$NO_2 \rightarrow NO + O_2$	(Purwantini and Mukhopadhyay, 2009)
<b>Mycothiols</b>	antioxydants	(Senaratne et al., 2006)
<b>Peroxynitrite reductase</b>	Inhibe la formation de peroxynitrite	(Chen et al., 1998)
<b>Methioninsulfoxireductase</b>	Réduction de la méthionine sulfoxyde	(St John et al., 2001)

Tableau 3 : Mécanismes de lutte de *M. tuberculosis* à l'intérieur d'un phagosome.

de ces deux molécules (Braunstein et al., 2003; Kurtz et al., 2006). Cette protéine, en plus de l'export de molécules permettant la résistance aux ROS, pourrait exporter d'autres molécules impliquées dans la survie de la mycobactérie, notamment en ayant un rôle immunomodulateur (Kurtz et al., 2006). *M. tuberculosis* est aussi capable de développer des mécanismes permettant la diminution de RNS dans le phagosome. Ainsi, la localisation de l'enzyme iNOS au phagosome peut être inhibée, empêchant ainsi la production et l'accumulation de l'oxyde nitrique •NO (Miller et al., 2004) (**Figure 14**). D'autres évidences biochimiques de détoxification des RNS par *M. tuberculosis* via l'action du coenzyme F-420 qui convertit le dioxyde d'azote •NO<sub>2</sub> en NO et O<sub>2</sub> (Purwantini and Mukhopadhyay, 2009) (**Figure 14, Tableau3**). Cependant, cette activité n'est efficace qu'*in vitro* (Darwin et al., 2003; Darwin and Nathan, 2005).

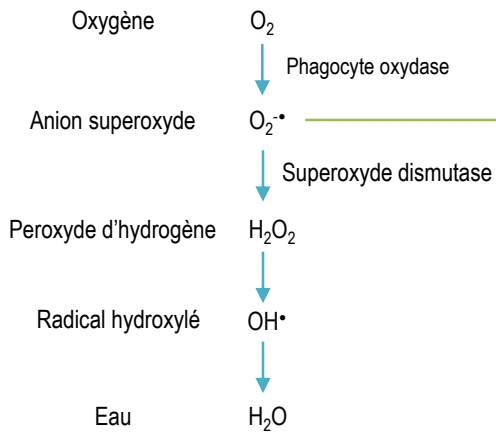
*M. tuberculosis* possède aussi des molécules aux propriétés antioxydantes permettant de la maintenir dans un environnement favorable. Ainsi, elles synthétisent du mycothiol, antioxydant qui va lui permettre de résister au stress oxydatif (**Tableau 3**). La synthèse de molécules comme les mycothiols nécessite entre autres l'action d'une réductase codée par le gène *CysH* (Carroll et al., 2005), et dont l'expression permet de lutter contre la mise en place de la réponse adaptative (Senaratne et al., 2006).

Une fois activés, les macrophages produisent du NO et de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, deux radicaux libres qui peuvent interagir pour former du peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>) (**Figure 14**). Afin de détoxifier son environnement, *M. tuberculosis* exprime une enzyme ayant à la fois une activité peroxydase dépendante du NADPH ainsi qu'une activité peroxyde réductase. Cette enzyme est formée par un complexe multiprotéique qui va permettre d'empêcher la formation de peroxyde d'azote et de peroxydes, diminuant ainsi les dommages protéiques (Chen et al., 1998) (**Figure14, Tableau 3**).

Il existe un autre mécanisme de défense contre les activités antimicrobiennes du macrophage qui a pour objectif, au lieu d'empêcher la dégradation des protéines, de réparer les dommages causés par les ROS et RNS. Ainsi, la génération de méthionine sulfoxyde, molécule capable d'interférer dans les fonctions protéiques, peut être réduite en méthionine par la méthionine sulfoxyde reductase (Msr) (St John et al., 2001). Enfin, le protéasome mycobactérien permet de lutter contre les stress oxydatif et nitrosatif en dégradant les protéines qui ont été oxydées, nitrées, ou encore nitrosylées de manière irréversible (Darwin et al., 2003).

*M. tuberculosis* a développé à la fois une stratégie d'inhibition en bloquant la maturation du phagosome, et aussi une stratégie de protection en développant des mécanismes de défense face aux activités antimicrobiennes. Un autre moyen d'éviter les fonctions bactéricides du phagosome est de s'en échapper pour se localiser dans le cytoplasme du macrophage.

### Espèces réactives de l'oxygène (ROS)



### Espèces réactives de l'azote (NOS)

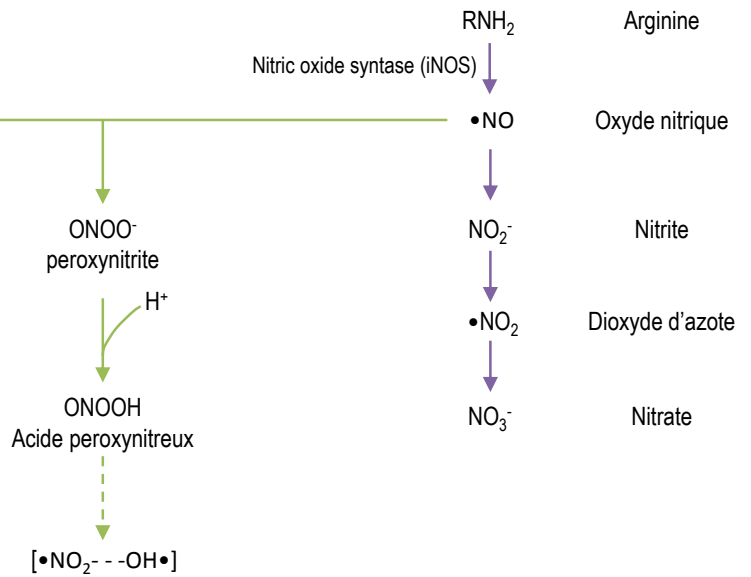


Figure 14 : Les différents radicaux oxygénés et azotés produits par le macrophage.

Le macrophage est capable de produire différents radicaux oxygénés et azotés en réponse à une infection par *M. tuberculosis*. Afin de survivre dans cet environnement hostile, les mycobactéries ont développé des mécanismes d'inhibition de production de ces molécules toxiques (Adapté de Fang, 2004).

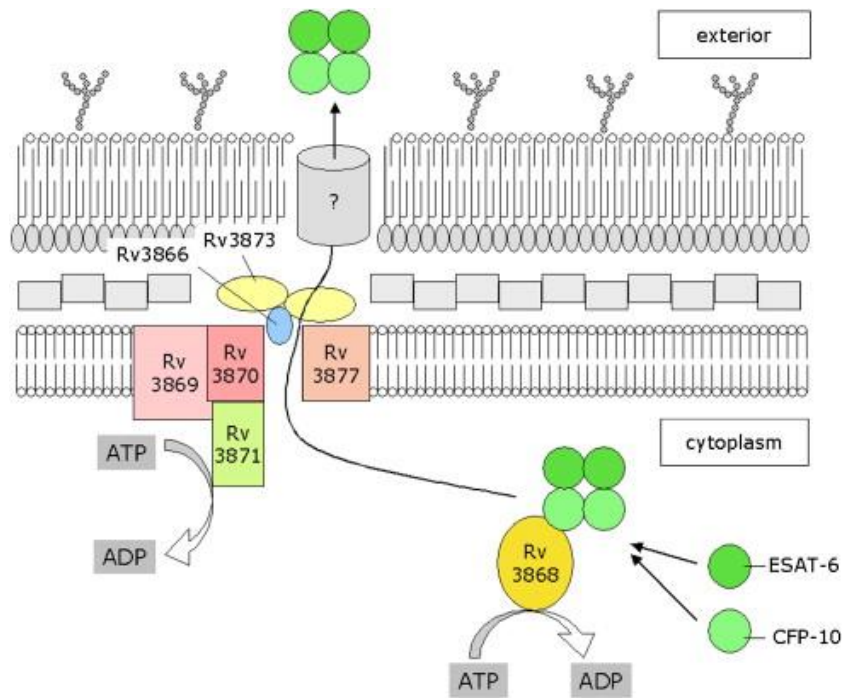


Figure 14 bis : Représentation schématique du système de sécrétion de type VII.

La protéine ESAT-6 complexée à CFP-10 utilise ce système de sécrétion afin d'être exportée dans l'environnement mycobactérien (Teutschbein et al., 2009).

#### 4. Echappement du phagosome

Très longtemps, *M. tuberculosis* a été perçu comme un pathogène exclusivement localisé dans une vacuole membranaire, et dont le seul accès vers l'extérieur, nécessaire notamment à l'apport de nutriments pour sa survie, se faisait via le trafic avec les endosomes (Welin and Lerm, 2012). En se basant sur les travaux réalisés sur *M. marinum*, il est maintenant clairement défini que *M. tuberculosis* est capable d'échapper au phagosome en sortant dans le cytosol (Simeone et al., 2012; Stamm et al., 2003; van der Wel et al., 2007). L'échappement dans le cytosol repose sur la production d'un système de sécrétion de type VII (**Figure 14bis**), nommé ESX-1, et codé par des gènes localisés dans la région de différence 1 (RD1). Ce système ESX-1 permet l'export des protéines ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6kDa), et CFP10 (Culture Filtrate Protein) sous forme hétérodimérique. Chez *M. marinum*, ESAT-6 serait capable de former des pores dans la membrane du phagosome afin de favoriser l'échappement de la mycobactérie dans le cytosol (Smith et al., 2008). Chez *M. tuberculosis*, RD1 et le gène codant la protéine ESAT-6 seraient indispensables à la translocation des mycobactéries dans le cytosol (Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007). Ce phénomène serait néanmoins différent de celui utilisé par *M. marinum* car il n'engagerait pas motilité liée à l'actine (Stamm et al., 2003).

L'échappement du phagosome permet à *M. tuberculosis* de se multiplier plus massivement au sein de la cellule hôte. Un autre intérêt qu'a *M. tuberculosis* de s'échapper du phagosome est qu'une fois dans le cytoplasme, il est capable d'induire la mort de la cellule, lui permettant de s'échapper afin de disséminer.

#### 5. Contrôle du programme de mort cellulaire.

La découverte de la régulation du programme de mort cellulaire après infection par un pathogène a permis de mettre évidence un mécanisme unique à la régulation de la réponse immunitaire et au contrôle de l'infection. Il existe deux principaux mécanismes de mort cellulaire que sont la nécrose et l'apoptose.

La nécrose est un mécanisme de mort cellulaire caractérisé par une perméabilisation de la membrane plasmique qui entraîne la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire (**Figure 15**). La libération du contenu cellulaire engendre le déclenchement d'une réponse inflammatoire. Depuis peu, la notion de nécrose programmée ou nécroptose a été étudiée (Cho et al., 2009; Golstein and Kroemer, 2007). Il s'agit d'une voie d'induction de la mort cellulaire sous différentes conditions, notamment la présence de dommages sur l'ADN ou encore la liaison du TNF $\alpha$  à son récepteur (Hitomi et al., 2008; Zhang et al., 2009).



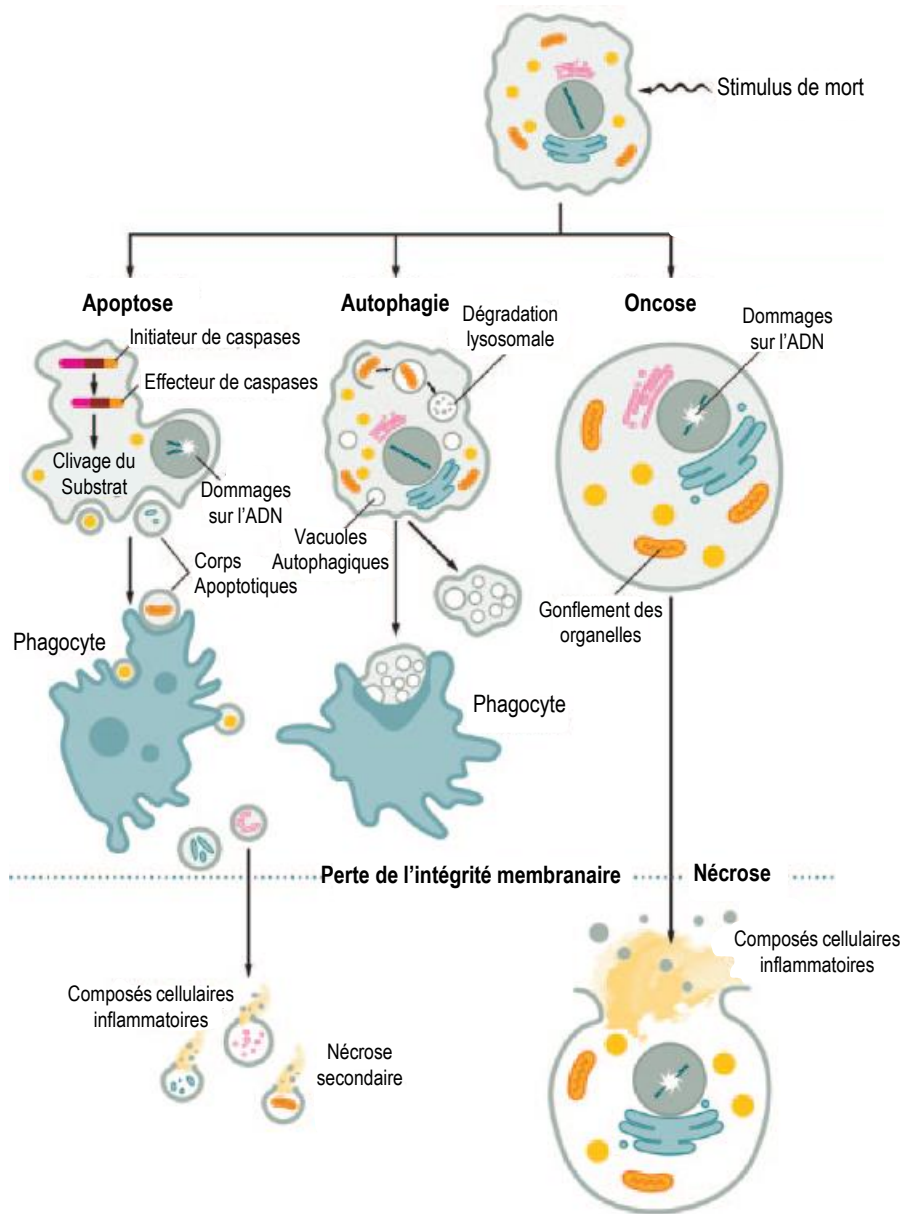


Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes de mort cellulaire.

Le programme de mort cellulaire regroupe l'apoptose, la nécrose, et la mort associée à une augmentation de l'autophagie (traduite de Fink and Cookson, 2005) .

L'apoptose est quant à elle un programme de mort cellulaire physiologique inductible par la cellule. A la différence de la nécrose, l'apoptose n'induit pas de réaction inflammatoire, et n'est donc pas associée à une atteinte tissulaire. Elle résulte en la déstructuration de la cellule par formation de plusieurs vésicules, appelées corps apoptotiques (**Figure 15**). Ces corps seront phagocytés par des phagocytes professionnels, mécanisme appelé l'efferocytose, pour être détruits ou servir d'antigènes afin d'être présentés aux LTs (Lee et al., 2009b; Martin et al., 2012). Il existe trois mécanismes d'induction de l'apoptose via l'activation de la voie dite des caspases.

Le premier mécanisme implique une voie extrinsèque d'induction de l'apoptose. Elle met en jeu l'interaction des récepteurs de la famille du TNF, tels que le TNFR1 ou encore Fas, et leurs ligands respectifs, *i.e.* TNF $\alpha$  et Fas ligand (FasL) (Chen and Wang, 2002). Cette interaction entraîne la formation d'un complexe signal de mort cellulaire DISC (Death-Inducing Signal Complex) qui va initier une cascade de réactions. Cette cascade aboutit à l'activation des caspases 3, 6 et 7.

Un second mécanisme met en jeu la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Ainsi, des facteurs de stress subis par la cellule vont induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et permettre la sortie de cytochrome C dans le cytoplasme de la cellule. Ce cytochrome C va se lier à la pro-caspase 9 ainsi qu'à d'autres protéines pour former un complexe appelé l'apoptosome (Riedl and Salvesen, 2007). Ce complexe va induire l'activation de la caspase 9, molécule participant à l'activation des mêmes caspases 3, 6 et 7. La prostaglandine eicosanoïde 2 (PGE<sub>2</sub>) et la lipoxine A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) sont deux molécules qui peuvent réguler l'apoptose intrinsèque (Chen et al., 2008). Ces deux molécules sont impliquées dans les réparations membranaires nécessaires à l'issue de la phagocytose, et protègent aussi des dommages mitochondriaux (Behar et al., 2011).

Enfin, un dernier mécanisme d'induction de l'apoptose est dépendent de la présence de LTs ainsi que de NKs dans l'environnement. Ces cellules produisent un couple de perforine/granzyme B, molécules capables de former des pores dans la membrane plasmique et d'activer la voie des caspases, et notamment la caspase 3 (Lee et al., 2009b).

Le dogme actuel consiste à dire que la nécrose est un mécanisme favorable au pathogène car même si elle engendre une réponse inflammatoire, elle permet une libération massive des mycobactéries dans le milieu extracellulaire favorable à l'infection de nouvelles cellules (**Figure 16**). A l'inverse, l'apoptose est un mécanisme silencieux où les mycobactéries sont retenues dans les corps apoptotiques qui sont phagocytés par un nombre restreint de cellules et donc moins favorable à la dissémination des mycobactéries mais plus favorable à l'hôte. En effet, le rôle de l'apoptose dans l'infection par *M. tuberculosis* serait de contenir le bacille en inhibant la réplication et évitant la dissémination, mais aussi de faciliter la présentation des antigènes aux LTs, le tout via

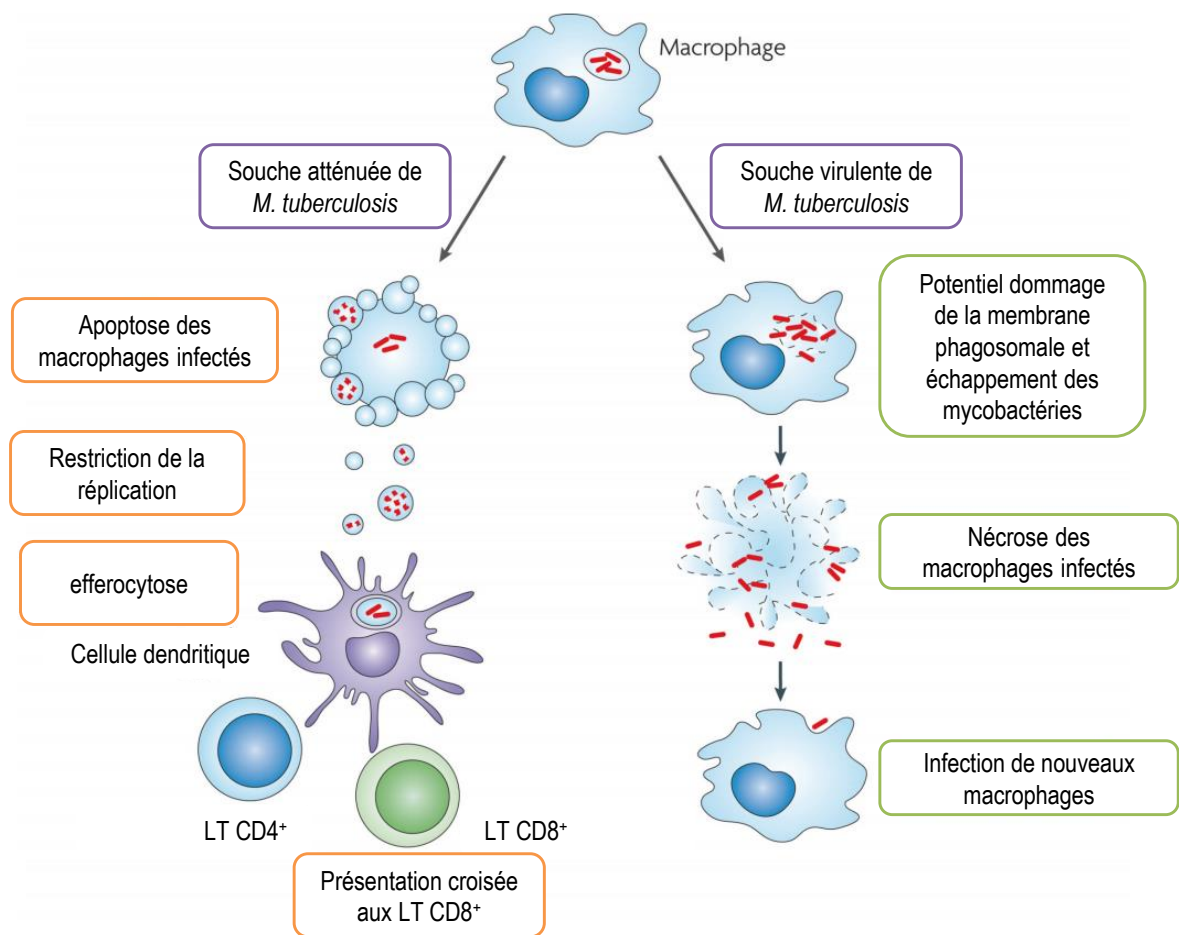


Figure 16 : *M. tuberculosis* est la mort cellulaire.

Les deux voies de mort cellulaires sont décrites suivant le dogme retrouvé dans la littérature. La nécrose serait favorable à une dissémination du bacille alors que l'apoptose serait favorable à la défense de l'hôte (Adapté de Behar et al., 2010)

l'efferocytose (**Figure 16**). Ce principe de mort cellulaire programmée en tant que mécanisme antimicrobien est relativement récent (Fratuzzi et al., 1997; Martin et al., 2012).

Jusqu'à présent pensée comme incontrôlée, le rôle de *M. tuberculosis* sur l'induction de la nécrose est très peu renseigné. Néanmoins, des travaux montrent un rôle de la protéine ESAT-6 sécrétée par *M. tuberculosis* dans la modulation de la nécrose (Simeone et al., 2012; Welin et al., 2011), et récemment, de nouveaux travaux sur *M. marinum* impliquent les mycobactéries dans la modulation de l'induction de la nécrose programmée (Roca and Ramakrishnan, 2013).

« Plus une souche de *M. tuberculosis* est virulente, moins elle induit d'apoptose » (Keane et al., 2000). *M. tuberculosis* est capable d'inhiber la mise en place de l'apoptose en agissant sur différentes voies. Par exemple la séquestration du TNF $\alpha$  par sécrétion d'un récepteur soluble en réponse à une augmentation d'IL-10 (Balcewicz-Sablinska et al., 1998), ou la modulation de la balance PGE<sub>2</sub>/LXA<sub>4</sub> sont des mécanismes qui inhibent l'induction de l'apoptose (Chen et al., 2008). *M. tuberculosis* exprime aussi des gènes dont les produits sont capables de moduler ce phénomène. Ainsi, NuoG, SecA2 ou la superoxyde dismutase sont des molécules impliquées dans l'inhibition de l'apoptose (Edwards et al., 2001; Hinchey et al., 2007; Velmurugan et al., 2007).

Ce dogme a été ébranlé par la description d'une induction de l'apoptose de macrophages infectés par des souches de *M. tuberculosis* (Lee et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs décrivent qu'une infection avec une forte quantité de mycobactéries au sein d'un macrophage infecté induit l'apoptose sans affecter la viabilité cellulaire. L'apoptose ne serait donc plus seulement un mécanisme de défense contre une infection mais pourrait être utilisée par *M. tuberculosis* afin de disséminer après s'être suffisamment répliqué.

Il existe un troisième mécanisme de mort cellulaire dit « programme de mort cellulaire par autophagie ». Il n'a cependant jamais été décrit à ce jour d'induction de la mort cellulaire par ce mécanisme. Toutefois, le programme de mort cellulaire a été associé à une augmentation du mécanisme autophagique de la cellule (Pour revue, Kroemer and Levine, 2008).

L'autophagie est un mécanisme d'homéostasie cellulaire au cours duquel les cellules phagocytent leur propre matériel cytoplasmique. Ce phénomène permet un recyclage constant de protéines comme d'organelles cytoplasmiques (Deretic, 2006). Trois étapes composent ce mécanisme : Une première étape d'initiation, suivi d'une étape d'élongation et enfin une étape de fusion avec les lysosomes (**Figure 17A**). Ce mécanisme cellulaire est régulé par de nombreuses protéines, aussi appelées facteurs de l'autophagie (Atg) et dont l'Atg 8 ou LC3 est utilisé comme marqueur de ce phénomène cellulaire. Au cours de la réponse immunitaire, l'autophagie peut être induite par la

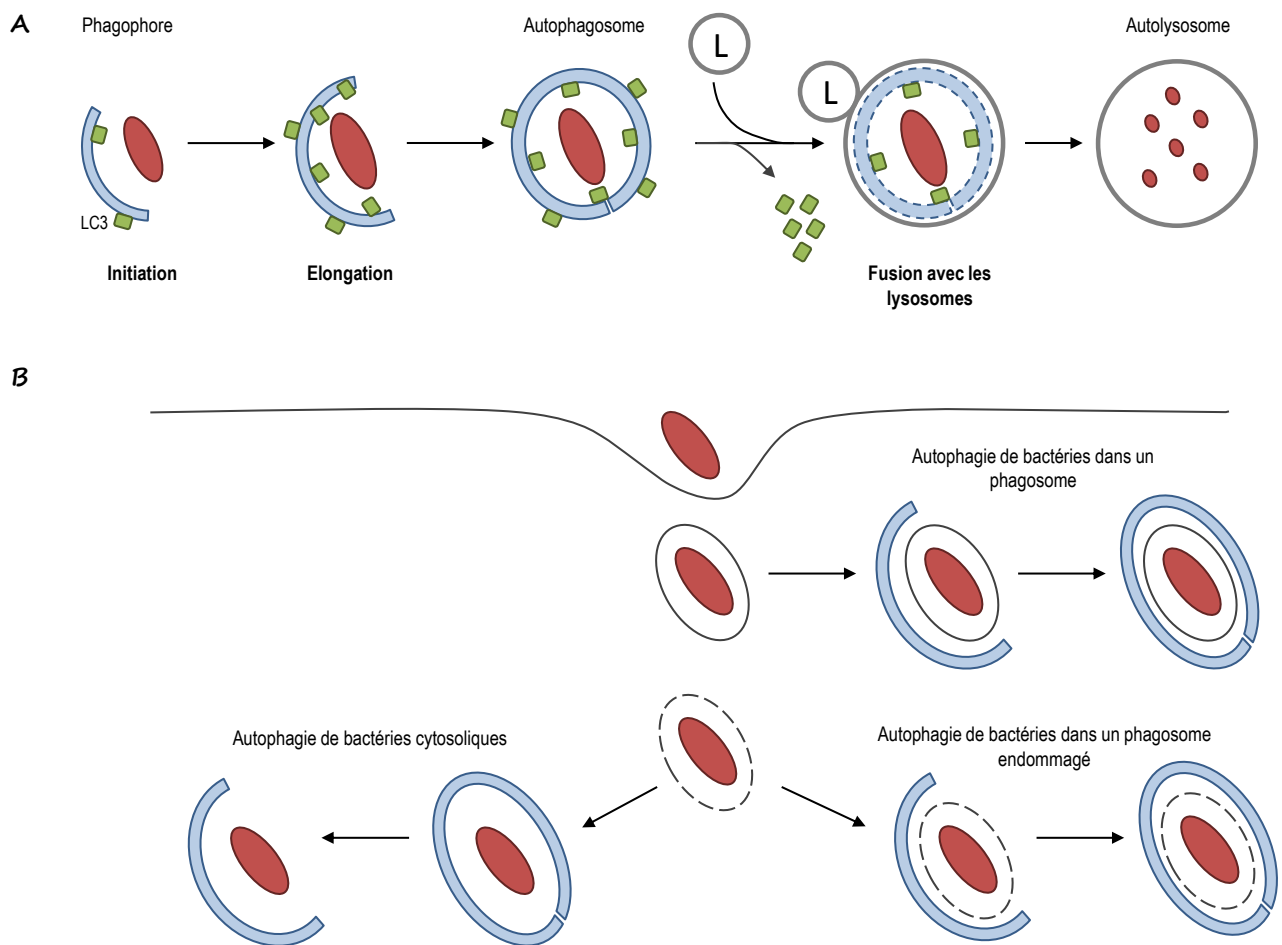


Figure 17 : L'autophagie, mécanisme physiologique utilisé pour lutter contre une infection.

(A) L'autophagie est un mécanisme qui comporte trois phases aboutissant à la formation d'autophagolysosome : une phase d'initiation, une phase d'élongation et une phase de fusion avec les lysosomes. Un marqueur de l'autophagie est la protéine LC3 (Atg8), molécule effectrice impliquée dans la formation de l'autophagophore. (B) Le mécanisme autophagique intervient dans plusieurs situations. Ainsi, qu'une mycobactérie soit à l'intérieur d'un phagosome endommagé ou non, ou directement localisée dans le cytosol de la cellule infectée, le mécanisme autophagique peut être mis en œuvre pour aboutir à la destruction de la bactérie (Pour revue, Mostowy and Cossart, 2012)

présence d'IFN- $\gamma$  et de TNF $\alpha$ , alors qu'elle va être inhibée par la présence de cytokines impliquées dans une réponse de type Th2, l'IL-4 et l'IL-13.

Ce mécanisme cellulaire est aussi un mécanisme de défense contre les pathogènes internalisés. Ainsi, qu'elles soient libres dans le cytosol ou bien localisées dans un phagosome, les bactéries présentes dans le macrophage peuvent être reconnues par la machinerie autophagique (**Figure 17B**). L'autophagie joue un rôle dans le contrôle de *M. tuberculosis* par le macrophage. En effet, l'induction de l'autophagie, que ce soit pharmacologiquement (rapamycine) ou physiologiquement (stimulation par IFN- $\gamma$ ), diminue la survie de *M. tuberculosis* dans le macrophage. Cette diminution est corrélée avec la maturation du phagosome et son acidification (Gutierrez et al., 2004). La raison pour laquelle *M. tuberculosis* est incapable de survivre dans un autophagolysosome alors qu'il le peut dans un phagolysosome reste à être découverte. Une possibilité serait l'utilisation d'ubiquitine, dont des fragments sont retrouvés dans l'autophagosome (Alonso et al., 2007; Ponpuak et al., 2010).

Comme pour la plupart des mécanismes de défense mis en place par le macrophage après infection, *M. tuberculosis* est là aussi capable de déjouer ce mécanisme (Jo, 2013). Ainsi, le gène *eis* (enhanced intracellular survival) code une protéine impliquée entre autres dans la modulation de l'autophagie. En effet, une souche mutée dans l'expression de ce gène induit une augmentation de la formation d'autophagosomes, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Shin et al., 2010). Un second moyen d'inhibition de l'autophagie par *M. tuberculosis* est la sécrétion de la protéine ESAT-6. En effet, cette protéine permettrait d'induire l'activation de l'inflammasome macrophagique, machinerie cellulaire qui inhibe l'induction du mécanisme autophagique (Jo et al., 2012; Mishra et al., 2010).

Outre les mécanismes intracellulaires que le macrophage est capable de développer pour lutter contre l'infection par *M. tuberculosis*, cette cellule a pour rôle d'alerter les autres cellules du système immunitaire. Ce signal se fait par sécrétion de médiateurs solubles dans l'environnement du site d'infection.

### *6. Modulation de la réponse inflammatoire*

Les médiateurs solubles sécrétés par le macrophage infecté sont composés à la fois de chimiokines, molécules indispensables au recrutement des cellules immunitaires par la formation d'un gradient chimiotactique, mais aussi de cytokines qui vont réguler les différentes fonctions bactéricides des cellules (**Figure 18**). Les macrophages seront alors activés, via une voie classique ou une voie alternative, en fonction de l'environnement cytokinique développé.

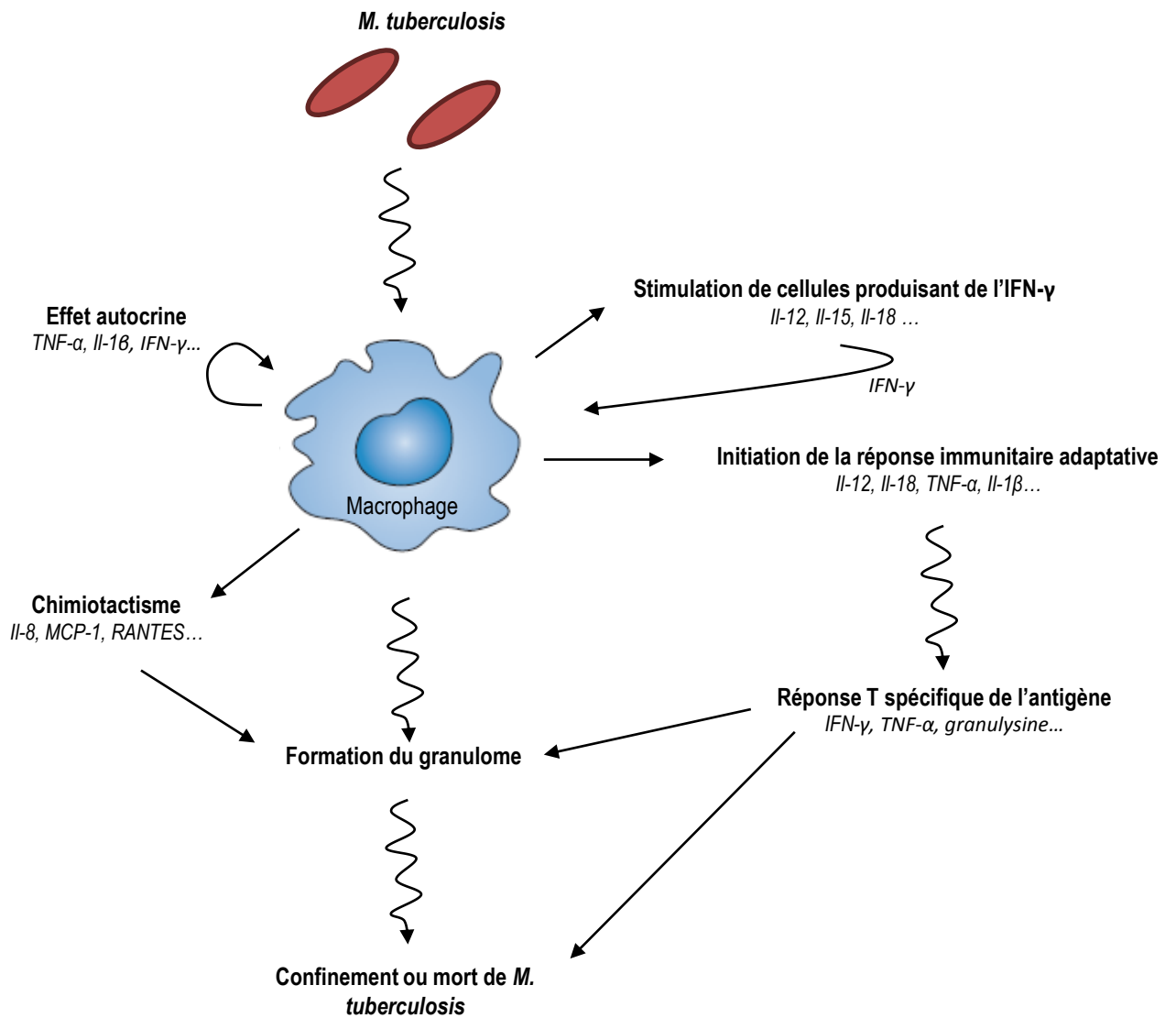


Figure 18 : Sécrétion de différents médiateurs solubles par le macrophage infecté.

En réponse à une infection par *M. tuberculosis*, le macrophage est capable de sécréter différents médiateurs solubles qui vont permettre le développement de la réponse immunitaire via le recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi que leur activation. Le macrophage peut aussi être induit par sa propre production de cytokines.



### Les chimiokines

Au cours de la réponse immunitaire face à une infection par *M. tuberculosis*, le recrutement des différentes populations cellulaires par les macrophages infectés s'effectue par l'intermédiaire de chimiokines, molécules solubles sécrétées par les cellules déjà présentes sur le site d'infection. La formation d'un gradient chimiotactique permet aux autres cellules immunitaires de converger vers le site d'infection. Les chimiokines jouent un rôle primordial au cours de l'infection par *M. tuberculosis*, notamment car le recrutement des cellules inflammatoires permet à la formation du granulome (Peters and Ernst, 2003).

L'interleukine 8 (Il-8 ou CXCL8), MCP-1 (protéine chimiotactique des monocytes 1, aussi appelée CCL2) et RANTES (Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted, aussi appelé CCL5) sont les principales chimiokines sécrétées par le macrophage au cours de l'infection (**Figure 18**). Ces molécules peuvent être induites par l'activation de cascades de signalisation après activation de récepteurs tels que les TLRs (Lee et al., 2009a), mais aussi par la sécrétion d'autres médiateurs solubles (Friedland et al., 1992; Zhang et al., 1995) (**Tableau 4**). Elles permettent le recrutement des différentes populations de la réponse immunitaire comme par exemple les neutrophiles (Il-8), ou les LTs (MCP-1 et RANTES) (**Tableau 4**). Leur rôle dans le recrutement des autres cellules de l'immunité en font des molécules primordiales à la mise en place du granulome (Mendez-Samperio, 2008; Vesosky et al., 2010). RANTES serait aussi impliquée dans le contrôle de la croissance de *M. tuberculosis* au sein des macrophages alvéolaires, mais le mécanisme d'action reste à ce jour méconnu (Saukkonen et al., 2002).

### Les cytokines

Une fois sur place, la communication entre les différentes populations cellulaires ainsi que leur activation se fait par l'action de cytokines. Au cours de la réponse immunitaire, les cytokines sont sécrétées dans le but de créer un environnement favorable au développement de la réponse immunitaire, facilitant les liens entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles vont aussi permettre la régulation, qu'elle soit autocrine ou paracrine, de la réponse induite (Cooper et al., 2011). Ces cytokines sont de deux types : pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, certaines pouvant être les deux à la fois.

L'interleukine 12 (Il-12), le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), ou encore l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) sont les principales cytokines pro-inflammatoires dans la réponse immunitaire après infection par *M. tuberculosis* (**Figure 18 ; Tableau 4**). L'Il-12 est une cytokine exprimée sous forme homodimérique Il-12p40, ou hétérodimérique avec les sous-unités Il-12p35 ou Il-23p19, liées de manière covalente à l'Il-12-p40 pour former respectivement l'Il-12p70 et l'Il-23 (**Tableau 4**). Ces cytokines sont



Médiateurs Solubles	Induction de Sécrétion	Rôle	Références
<b>CHIMIOKINES</b>			
<b>II-8</b>	Sécrétion TNF $\alpha$ et IL-1 $\beta$	Recrutement cellulaire, surtout neutrophiles	(Mendez-Samperio, 2008) (Rajaram et al., 2010)
	TLR2 $\rightarrow$ ROS	Formation du granulome	(Lee et al., 2009a)
	MR $\rightarrow$ PPAR- $\gamma$		
<b>MCP-1</b>	TLR2 $\rightarrow$ ROS	Recrutement de monocytes, DCs, et LTs CD4 <sup>+</sup> Th2	(Flores-Villanueva et al., 2005)
		Formation du granulome	(Lee et al., 2009a)
<b>RANTES</b>	Sécrétion d'IFN $\gamma$	Recrutement de LTs et cellules leucocytaires	(Vesosky et al., 2010)
		Formation du granulome	(Saukkonen et al., 2002)
		Contrôle de la croissance de <i>Mtb</i>	
<b>CYTOKINES</b>			
<b>II-12p40</b>	TLR2 et TLR9	<b>Pro-inflammatoire</b>	(Bafica et al., 2005)
		Induction de LTs CD4 <sup>+</sup> Th1	(Cooper and Khader, 2008)
		Activation des DCs et migration vers les organes lymphoïdes secondaires	(Khader et al., 2006)
<b>II-12p70</b>	TLR7 et TLR8 Macrophages activés	<b>Pro-inflammatoire</b>	(Gerosa et al., 2008)
		Induction et maintien des fonctions effectrices de LTs CD4 <sup>+</sup> Th1	(Khader et al., 2005)
<b>II-23</b>	TLR2 NOD2	<b>Pro-inflammatoire</b>	(Gerosa et al., 2008)
		Induction de LTs CD4 <sup>+</sup> Th17	(Khader et al., 2005)
		Induit une réponse dépendante de l'IFN $\gamma$	(Khader et al., 2007)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Autorégulation Phagocytose	<b>Pro-inflammatoire</b>	
		Action autocrine	(Roach et al., 2002)
		Induction chimiokinique	(Cooper et al., 2011)
		Maintien du granulome	(Mootoo et al., 2009)
		Action synergique avec IFN- $\gamma$	
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Sécrétion II-12	<b>Pro-inflammatoire</b>	(Zuniga et al., 2012)
		Activation des macrophages	(Cooper et al., 2002)
		Stimule la production de ROS et RNS	(Kaufmann, 2001)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Sécrétion II-10	<b>Anti-inflammatoire</b>	(Fargeas et al., 1992)
		Inhibe la prolifération des LTs	(Ding et al., 1990)
		Désactivation des macrophages par	(Toossi and Ellner, 1998)
		- inhibition de iNOS - régulation de TNF $\alpha$ et IFN $\gamma$	(Othieno et al., 1999)
<b>II-10</b>	Phagocytose	<b>Anti-inflammatoire</b>	(Shaw et al., 2000)
		↓ TNF $\alpha$ , IL-12 et IFN $\gamma$	(Sendide et al., 2005)
		Inhibe l'action des Cathepsines S	(Zuniga et al., 2012)
<b>II-6</b>		<b>Pro- &amp; Anti- inflammatoire</b>	
		Modulation de l'activation des macrophages	(Nagabhushanam et al., 2003)
		Différentiation LTs CD8 <sup>+</sup> & CD4 <sup>+</sup> Th17	(Khader et al., 2007)

Tableau 4 : Différents médiateurs solubles sécrétés par le macrophage au cours de l'infection.

produites en réponse à l'activation de récepteurs, à la sécrétion d'autres cytokines ou sont autorégulées (**Tableau 4**) (Bafica et al., 2005; Gerosa et al., 2008; Zuniga et al., 2012). Ces cytokines sont impliquées dans l'induction et le maintien des fonctions effectrices des LTs CD4<sup>+</sup> Th1, l'induction d'une réponse dépendante de la sécrétion d'IFN $\gamma$ , ainsi que l'activation des cellules dendritiques et des macrophages (Cooper and Khader, 2008; Khader et al., 2005; Zhang et al., 1999). Certaines, comme les TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  ont une action synergique dans le contrôle de l'infection en stimulant les mécanismes microbicides impliqués dans le contrôle de la multiplication bactérienne. Le TNF $\alpha$  joue un rôle particulier dans le maintien de la formation granulomateuse en induisant la sécrétion de chimiokines nécessaires au recrutement des différentes cellules de l'immunité, ainsi que celui de fibroblastes constituant la matrice fibreuse du granulome mycobactérien (Roach et al., 2002) ; (Cooper et al., 2011; Mootoo et al., 2009).

A l'inverse, deux cytokines anti-inflammatoires régulent la réponse immunitaire : le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) et l'interleukine 10 (Il-10) (**Tableau 4**). Ces deux molécules agissent en coopération sur la modulation de la réponse immunitaire (Othieno et al., 1999) et leur sécrétion peut être bénéfique au devenir de l'infection (Rosas-Taraco et al., 2011). La sécrétion d'Il-10 est induite après phagocytose de *M. tuberculosis*, et la sécrétion de cette cytokine est capable d'induire la sécrétion de TGF $\beta$  (Shaw et al., 2000). Ces cytokines sont principalement impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire en inhibant les réponses pro-inflammatoires et en stimulant les réponses anti-inflammatoires (Fargeas et al., 1992) ; (Ding et al., 1990; Toossi and Ellner, 1998).(Sendide et al., 2005). (Zuniga et al., 2012).

Enfin, l'interleukine 6 (Il-6) est une cytokine ayant à la fois des effets pro- et anti- inflammatoires. Sa sécrétion peut être induite par des lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* et elle est impliquée dans le développement d'une réponse cellulaire adéquate à l'infection, notamment dans la modulation de l'activation des macrophages et la différenciation des LTs cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, ainsi que des LTs CD4<sup>+</sup> en Th17 (**Tableau 4**) (Cooper and Khader, 2008).

Malgré la mise en place de tous les moyens possible pour lutter contre l'infection de *M. tuberculosis*, ce dernier a su développer des stratégies de défenses contre les mécanismes de l'hôte. *M. tuberculosis* est capable d'interférer dans la sécrétion de médiateurs solubles afin de moduler la réponse immunitaire. L'intérêt s'est principalement porté sur le rôle des composants de l'enveloppe mycobactérienne dans la modulation de la sécrétion. Ainsi, on peut rendre compte d'un effet majoritairement anti-inflammatoire via l'inhibition de la production de TNF $\alpha$ , d'Il-6 et/ou d'Il-12p40 (Dahl et al., 1996; Knutson et al., 1998; Lee et al., 2007; Rousseau et al., 2004); (Reed et al., 2004); (Stadthagen et al., 2006). Toutefois, certains composés de l'enveloppe mycobactérienne joueraient un rôle pro-inflammatoire en augmentant la sécrétion de ces

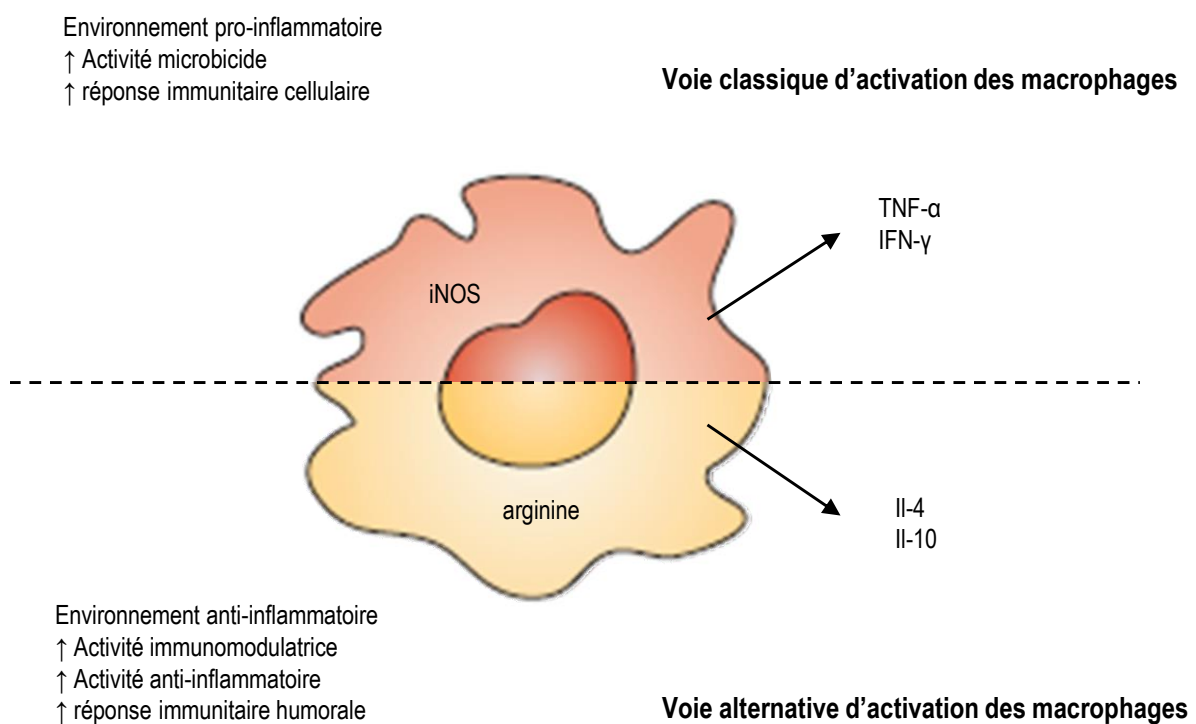


Figure 19 : Polarisation macrophagique.

Fonction de leur état d'activation, les macrophages possèdent des caractéristiques spécifiques, que ce soit dans l'expression de récepteurs à la surface, de sécrétion de cytokines ou encore d'activité antimicrobienne.

cytokines (Lima et al., 2001; Welsh et al., 2008), et la structure de ces composants serait essentielle pour garantir les fonctions immunomodulatrices (Dao et al., 2008; Rao et al., 2005; Rao et al., 2006).

### Activation des macrophages

Au cours de l'infection, le recrutement des différentes populations cellulaires de la réponse immunitaire se fait par sécrétion de médiateurs solubles. Une fois sur le site d'infection, ces cellules sécrètent à leur tour de nouvelles cytokines qui participent entre autres à l'activation des macrophages présents. Deux types d'activation sont décrits, l'activation dite classique ou M1 des macrophages, et l'activation dite alternative ou M2 (**Figure 19**) (Pour revue, Lugo-Villarino et al., 2011).

En réponse à une infection par *M. tuberculosis*, les cellules immunitaires recrutées sur le site d'infection développent un environnement pro-inflammatoire. Cet environnement est favorable à l'activation des macrophages via la génération et la sécrétion de cytokines et notamment d'IFN- $\gamma$ , induisant une activation dite classique ou M1 des macrophages (**Figure 19**). Cette polarisation des macrophages vers la voie classique est décrite chez l'animal mais est aussi retrouvée au niveau clinique (Benoit et al., 2008). Au niveau granulomateux, des macrophages activés de façon classique sont retrouvés entre 7 et 30 jours après infection (Redente et al., 2010). Cette activation des macrophages entraîne une potentialisation de l'effet microbicide ainsi qu'une restriction de la réplication bactérienne (Ehrt et al., 2001). En effet, elle se caractérise par une augmentation des capacités phagocytaires du macrophage via l'augmentation de l'expression de récepteurs à la surface de la cellule, mais aussi le développement d'un environnement toxique pour la bactérie au sein du phagosome aboutissant à la fusion avec les lysosomes (Ehrt et al., 2001; Martinez et al., 2009; Murray and Wynn, 2011). L'environnement néfaste à *M. tuberculosis* généré par la polarisation M1 des macrophages a engendré le développement par les mycobactéries de mécanismes permettant la modulation de la mise en place de ces mécanismes. Ainsi, *M. tuberculosis* est capable d'inhiber l'activation des macrophages induite par l'IFN- $\gamma$  via la production de facteurs de virulence, tels que ESAT-6 (Deretic et al., 2004).

La polarisation des macrophages est un phénomène réversible. Ainsi, dès 3 semaines après infection par *M. tuberculosis*, une réponse anti-inflammatoire se développe dont les chefs de file sont la sécrétion d'Il-4 et d'Il-10, favorisant une activation des macrophages vers la voie alternative ou M2 (**Figure 19**). La voie d'activation alternative des macrophages possède des propriétés immunomodulatrices permettant de générer un environnement anti-inflammatoire, favorable au développement des mycobactéries (Martinez et al., 2009; Raju et al., 2008). Cette activation entraîne une diminution de l'effet microbicide et est bénéfique à la réplication mycobactérienne.



En effet, les macrophages M2 produisent moins de NO et rendent l'accessibilité au fer plus permissive, la privation en fer étant un mécanisme clé du bactériostatisme (Forbes and Gros, 2001; Kahnert et al., 2006). *M. tuberculosis* est capable de promouvoir cet état d'activation permissif à la croissance mycobactérienne, notamment en modulant la sécrétion d'Il-10 (Chieppa et al., 2003; Schreiber et al., 2009). Au niveau du granulome tuberculeux, la transition d'une activation des macrophages depuis la voie classique M1 vers la voie alternative M2 pourrait être délétère au granulome en tant que mécanisme de défense de l'hôte. En effet, l'instauration d'un environnement anti-inflammatoire ne permettrait plus le confinement des mycobactéries, et leur réplication entrainerait l'apoptose des cellules infectées, engendrant la formation des centres caséux, représentatif d'une réactivation.

Le macrophage joue un rôle central dans la réponse immunitaire de l'hôte après infection par *M. tuberculosis* en permettant le développement d'un arsenal intracellulaire de mécanismes antimicrobiens afin d'éradiquer l'infection, mais aussi en ayant la capacité de recruter et activer les autres populations cellulaires de la réponse immunitaire. Malgré tout, les mycobactéries sont capables de déjouer ces mécanismes dans le but de se multiplier et disséminer. A l'interface entre l'hôte et le pathogène, l'enveloppe mycobactérienne a une position stratégique dans la mise en place de ces mécanismes subversifs. L'étude de la structure de l'enveloppe de *M. tuberculosis* permet de comprendre comment l'agent responsable de la tuberculose bouleverse, contourne ou/et neutralise les mécanismes cellulaires antimicrobiens.

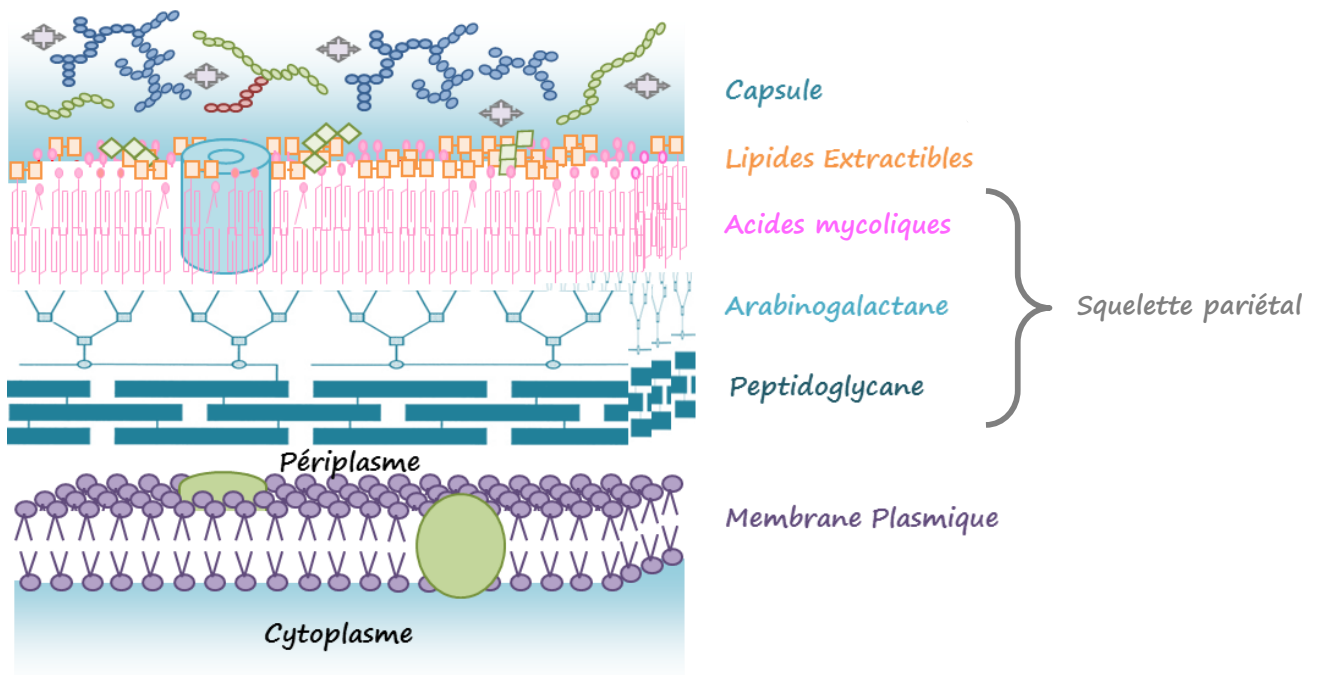


Figure 20 : Structure de l'enveloppe de mycobactérienne.

Constitution de l'enveloppe mycobactérienne. La membrane plasmique est séparée du squelette pariétal par un espace périplasmique. Le squelette pariétal comprend le peptidoglycane lié covalamment à l'arabinogalactane, au-dessus duquel s'insèrent les acides mycoliques. Les lipides extractibles sont ancrés dans la couche d'acides mycoliques, et le tout est surmonté d'une capsule composée principalement de sucres et de protéines.

### C. L'enveloppe mycobactérienne.

L'enveloppe mycobactérienne est une structure complexe au rôle prépondérant dans la physiologie de *M. tuberculosis* en tant que barrière de protection face à son environnement. Elle se compose d'éléments essentiels à sa viabilité (acides mycoliques, arabinogalactane), et contrôle les échanges avec l'extérieur (Jankute et al., 2012; Takayama et al., 1972). La forte composante hydrophobe de l'enveloppe mycobactérienne lui confère une faible perméabilité, pouvant être jusqu'à 100 fois inférieure à celle d'autres espèces (Jarlier and Nikaido, 1990). Cette caractéristique rend les échanges de nutriments difficiles, ayant pour conséquence une croissance moins rapide que d'autres espèces. Sa fonction première en tant que barrière face à son environnement rend l'accessibilité des antibiotiques à leurs cibles potentielles ainsi que l'altération par les mécanismes de défenses de l'hôte difficiles (Daffe, 2008).

L'enveloppe est constituée, depuis le cytoplasme vers l'extérieur, d'une membrane plasmique caractérisée par une bicouche lipidique principalement composée de phospholipides et de protéines, semblable aux membranes plasmiques d'autres organismes vivants (Daffe, 2008; Kaur et al., 2009) (**Figure 20**).

Un espace périplasmique sépare la membrane plasmique du squelette pariétal, organisé en trois couches superposées. Une première couche est constituée de peptidoglycane, ensemble d'unités répétées d'acides N-acétylglucosamine et de N-acétyl/glycolylmuramique, liés par des peptides courts. Le peptidoglycane est lié covalamment à la deuxième couche, l'arabinogalactane, un complexe d'hétéro-polysaccharides. La dernière couche est quant à elle composée d'acides mycoliques, acides gras à très longues chaînes  $\alpha$ -ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés, liés aussi covalamment à l'arabinogalactane (**Figure 20**).

La surface hydrophobe que constitue la couche d'acides mycoliques permet l'ancrage d'autres lipides, dits extractibles car ils peuvent être récupérés après traitements par des solvants organiques du fait de l'absence de liaisons covalentes. L'ensemble des acides mycoliques et des lipides extractibles forment la membrane externe de la paroi mycobactérienne. Par une analyse en CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections), la taille de la membrane externe composée des acides mycoliques et des lipides extractibles dans les solvants a pu être établie. Si la mesure de l'épaisseur de la membrane n'est pas discutée, deux groupes s'opposent en revanche sur l'agencement des acides mycoliques (Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008). Zuber et collaborateurs proposent un repliement de la chaîne méromycolique dans le feuillet interne de la membrane, alors que Hoffmann et collaborateurs proposent que cette chaîne



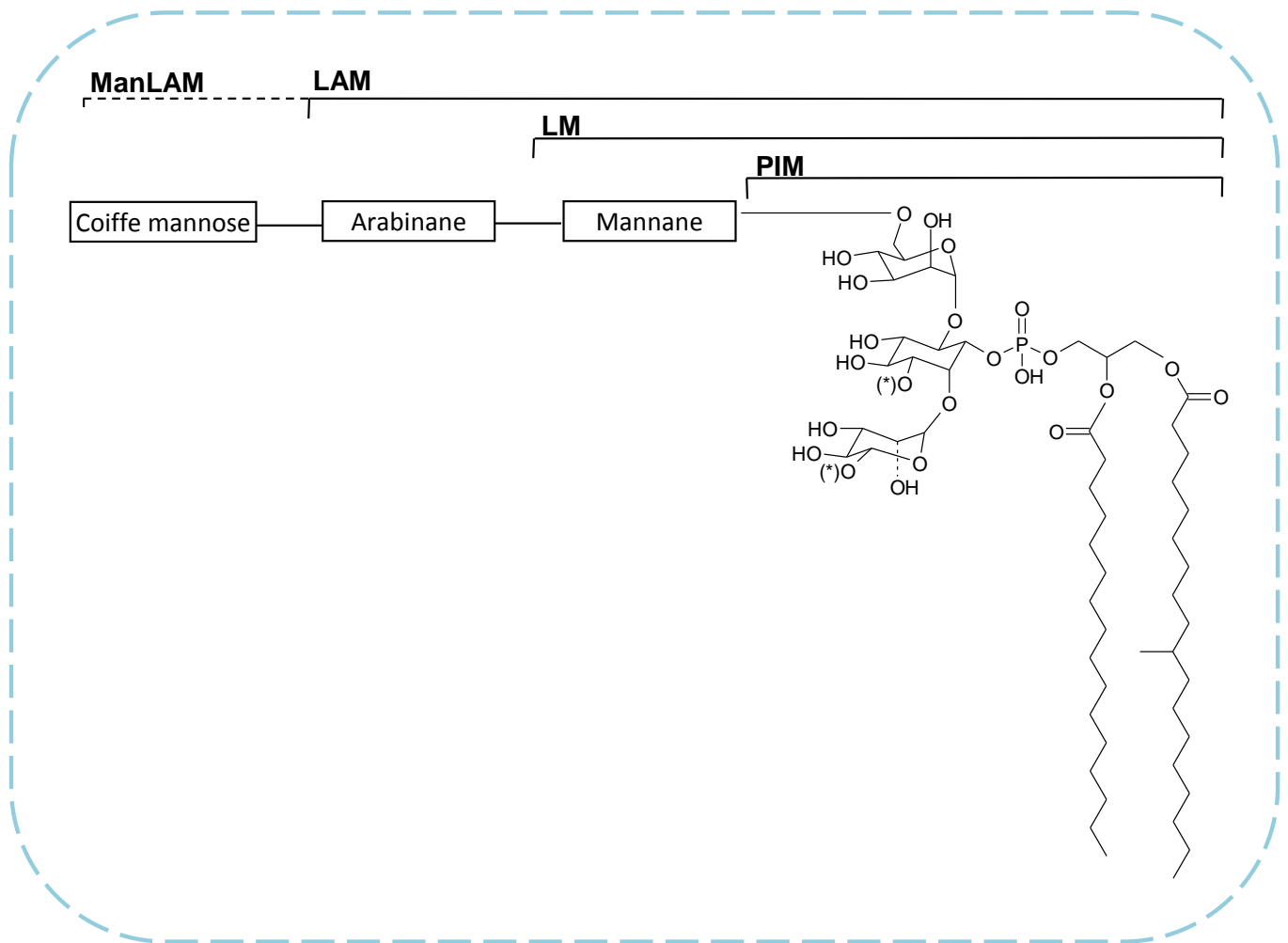


Figure 21 : Les lipides dérivés de phosphatidylinositols.

PIM: phosphatidylinositol mannosides, LM: Lipomannane, LAM: lipoarabinomannane. ManLAM: chez les mycobactéries à croissance lente, le LAM présente des unités mannosylées, (\*) sites potentiel d'acylation.

méromycolique s'étende sur les deux feuilletts de la membrane ou bien que les acides mycoliques se retrouvent en partie dans les couches inférieures, ce qui permettraient l'ancrage de la chaîne méromycolique uniquement dans le feuillet interne de la membrane externe. Dans les deux cas, l'analyse est réalisée sur *M. bovis* BCG, mais la ressemblance avec l'enveloppe de *M. tuberculosis* laisse penser que la structure est la même.

Les deux composantes de l'enveloppe sont surmontées d'une structure appelée la capsule (**Figure 20**). Cette structure se compose principalement de polysaccharides (glucanes, arabinanes et arabinomannanes) et de protéines chez *M. tuberculosis* (Daffe and Draper, 1998).

De par la structure de son enveloppe, *M. tuberculosis* répond positivement à la coloration de Gram. Néanmoins, son organisation rend la coloration de Ziehl-Nielsen la plus adaptée à sa reconnaissance. L'enveloppe mycobactérienne a pour spécificité une composition particulièrement riche en lipides, avec plus de 60% de sa masse sèche, en comparaison aux autres bactéries Gram positive (<5%) et Gram négative (<10%) (Daffe, 2008). Cette particularité lui confère une faible perméabilité.

### *1. Les lipides de l'enveloppe mycobactérienne.*

L'abondance des lipides d'enveloppe, tant dans la quantité que dans la qualité, est spécifique des mycobactéries (Pour revue, Neyrolles and Guilhot, 2011). La classification établie dans la revue d'Olivier Neyrolles et Christophe Guilhot permet de distinguer trois catégories de lipides, tous impliqués dans la pathogénie de *M. tuberculosis* : les lipoglycanes dérivés de phosphatidylinositols, les lipides dérivés de mycocérosates et les lipides dérivés de tréhaloses.

#### *1. Les lipoglycanes dérivés de phosphatidylinositols*

Les lipoglycanes dérivés de phosphatidylinositols sont des lipides essentiels retrouvés dans toutes les espèces mycobactériennes et leurs structures sont relativement conservées. Ce sont les glycophospholipides liés de manière non covalente les plus abondants dans l'enveloppe mycobactérienne (Jankute et al., 2012).

Parmi eux, les phosphatidylinositols mannosides (PIMs) sont des lipides composés de phosphatidylinositols comportant entre 1 et 6 mannoses sur l'inositol (**Figure 21**). Leur localisation est éparse, à la fois dans la membrane plasmique et dans la couche externe de l'enveloppe mycobactérienne (Ortalo-Magne et al., 1996). Chez *M. tuberculosis*, les PIMs les plus communs

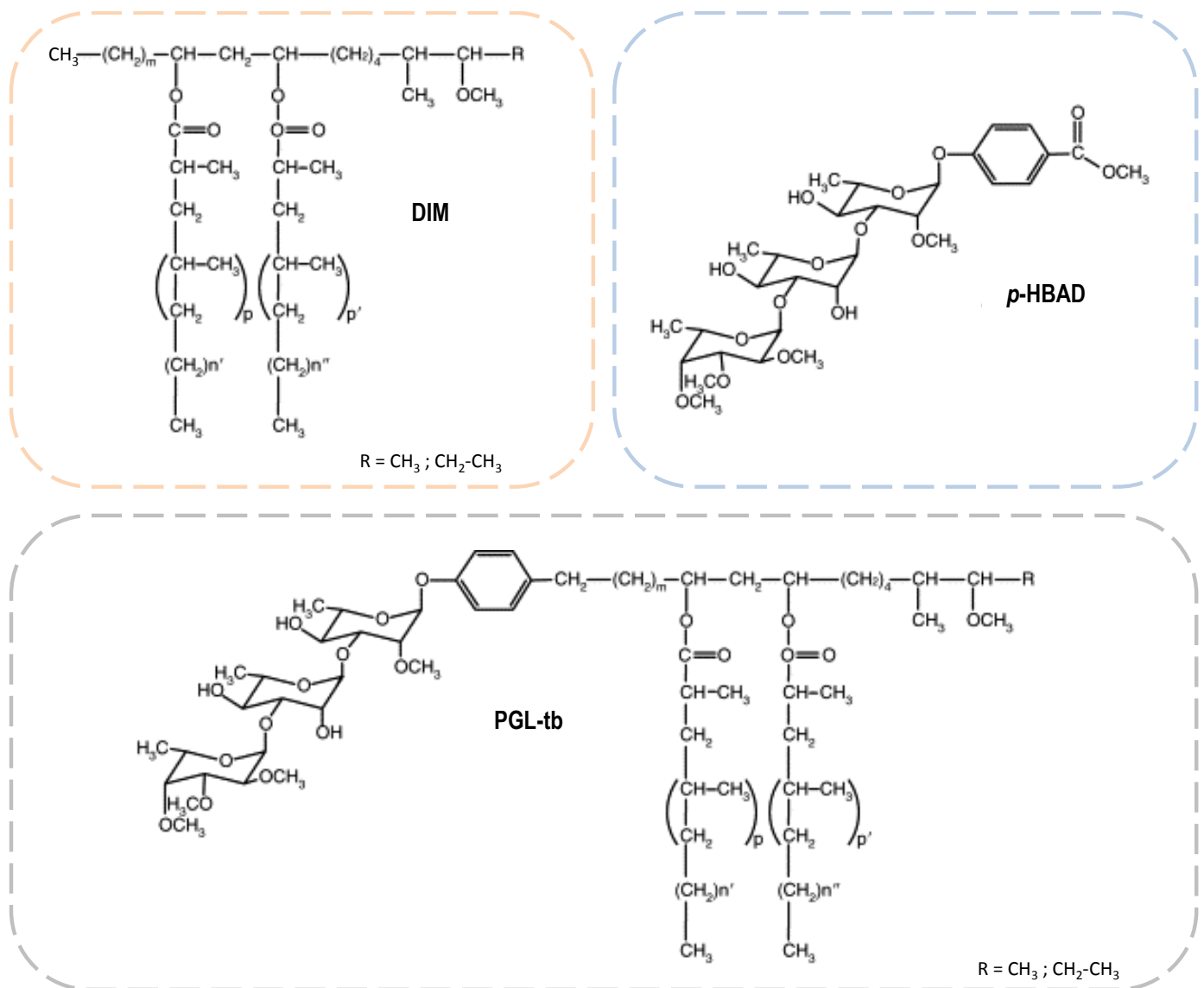


Figure 22 : Les lipides dérivés de mycocérosates.

Parmi les lipides dérivés de mycocérosates, on retrouve les dimycocérosates de phthiocérol (DIMs), les phénolglycolipides (PGLs), et l'acide para-hydroxybenzoïque (*p*-HBAD).

sont ceux comportant deux et six mannoses, aussi appelés respectivement PIM<sub>2</sub> et PIM<sub>6</sub> (Khoo et al., 1995). Le lipomannane (LM) est une extension du PIM contenant une chaîne mannane composée de 21 à 35 résidus (Jankute et al., 2012) (**Figure 21**)

Enfin, le lipoarabinomannane (LAM), est un LM coiffé d'un arabinnane. Le LAM peut présenter différentes coiffes osidiques à l'extrémité de l'arabinnane (Pour revue, Nigou et al., 2003). Chez *M. tuberculosis*, il s'agit d'un mannose, d'où l'appellation lipoarabinomannane manosylé (Man-LAM) (**Figure 21**).

### 2. Les lipides dérivés de mycocérosates

Les dérivés de mycocérosates, *i.e.* les dimycocérosates de phthiocérols (DIMs), les phénolglycolipides (PGLs) et les dérivés de l'acide para-hydroxybenzoïque (*p*-HBADs), sont synthétisés par les mycobactéries du complexe *MTBC* mais aussi par d'autres mycobactéries qui, à l'exception de *M. gastri*, sont toutes des mycobactéries pathogènes.

Les DIMs sont des molécules composées d'une longue chaîne de  $\beta$ -diol ou phthiocérol, à laquelle sont estérifiés deux acides gras méthyl-branchés appelés acides mycocérosiques (**Figure 22**). Des variants structuraux de la chaîne de phthiocérol existent chez *M. tuberculosis* : les DIMs A, forme majoritaire, possèdent une fonction méthoxyl alors que les DIMs B, forme minoritaire et intermédiaire dans la synthèse des DIMs A, possèdent une fonction cétone (Daffe and Draper, 1998). La quasi-totalité des souches cliniques du *complexe MTBC* étudiées à ce jour synthétisent des DIMs, ce qui suggère un rôle important de ces lipides dans la virulence des mycobactéries.

Les PGLs ont une structure proche de celle des DIMs (**Figure 22**). En effet, ils sont composés de deux acides mycocérosiques greffés à une chaîne de phthiocérol, elle-même fixée à une chaîne saccharidique via un groupement phénol. Cette partie saccharidique peut être composée de 1 à 3 sucres et est spécifique de l'espèce. Comme les DIMs, les décorations des acides mycocérosiques peuvent varier. Soit les PGLs possèdent une fonction méthoxyl (PGL-tb), soit ils possèdent une fonction cétone et on parle alors de phénolphthiodolone. Les PGLs sont synthétisés par les mycobactéries du *complexe MTBC*. Toutefois, toutes les souches cliniques de *M. tuberculosis* étudiées ne synthétisent pas de PGLs. Les souches déficientes dans la synthèse des PGLs sont mutées sur le gène codant une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de ce lipide : la polykétide synthase 15/1 (Pks15/1) (Constant et al., 2002).

Enfin, les *p*-HBADs sont des composés dont la structure est semblable à la partie saccharidique des PGLs (**Figure 22**). Il existe deux formes de *p*-HBADs : le *p*-HBAD I, composé minoritaire chez

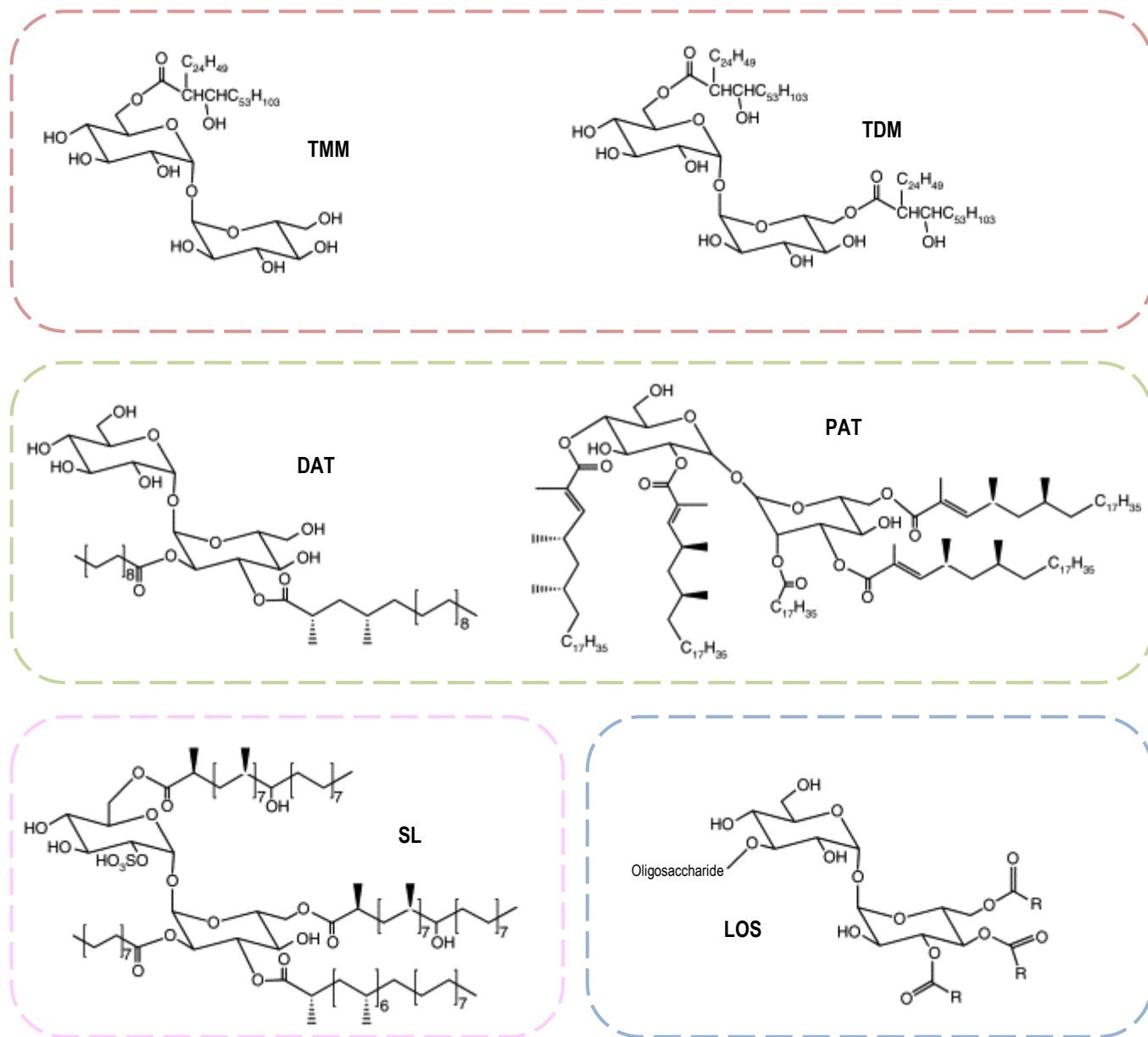


Figure 23 : Les lipides dérivés de tréhaloses.

La famille des lipides dérivés de tréhaloses se compose de : tréhaloses mono- et di- mycolates (TMMs et TDMs, respectivement), di- et poly- acyltréhaloses (DATs et PATs, respectivement), sulfolipides (SLs) et lipooligosaccharides (LOS).

*M. tuberculosis* et ne possédant qu'un seul sucre, et le *p*-HBAD II, composé majoritaire qui lui possède 3 sucres (Constant et al., 2002).

### 3. Les lipides dérivés de tréhalose.

Les lipides à tréhalose sont des lipides dont la synthèse varie en fonction de l'espèce étudiée. Certains, comme les monomycolates (TMMs) et les dimycolates de tréhalose (TDMs) sont des lipides retrouvés dans toutes les espèces de mycobactéries. D'autres, comme les diacyltréhaloses (DATs), les triacyltréhaloses (TATs), les polyacyltréhaloses (PATs) et les sulfolipides (SLs) sont restreints à certaines espèces du *complexe MTBC*. Enfin, les lipooligosaccharides (LOSs), sont synthétisés par une seule souche du complexe *MTBC* : *M. canettii* (Daffe et al., 1991).

Les TMMs sont des lipides composés d'un tréhalose sur lequel est acylé un acide mycolique en position 6 ou 6'. En ce qui concerne les TDMs, aussi connus sous le nom de « Cord Factor », ce sont des TMMs sur lesquels sont acylés un acide mycolique supplémentaire sur la position 6 ou 6' restée libre (**Figure 23**). Ce sont des lipides essentiels aux mycobactéries mais qui peuvent varier en fonction de la longueur de chaîne ainsi que les groupements chimiques fonctionnels des acides mycoliques (Barry et al., 1998; Marrakchi et al., 2008).

Les DATs, TATs, et PATs sont des lipides contenant constitutionnellement un tréhalose acylé en position 2 par un acide palmitique ou stéarique. D'autres acylations sont possibles sur différentes positions du tréhalose (2', 3', 4 et 6'), par des acides mycosanoïque, mycolipénique ou mycolipanolique. Ainsi, on peut distinguer deux formes de DAT : DAT<sub>1</sub> qui a pour acide gras un acide mycosanoïque, et DAT<sub>2</sub> un acide mycolipanolique. Les PATs sont des lipides possédant un tréhalose sur lequel sont estérifiés notamment un acide mycolipénique insaturé et un acide mycolipanolique saturé et hydroxylé respectivement en positions 2 et 3 (**Figure 23**) (Daffe and Draper, 1998). Les DATs/PATs sont des lipides synthétisés par *M. tuberculosis* et *M. canettii*.

Les SLs sont des lipides contenant un tréhalose-sulfate multiacylé. Les SLs sont présents sous différentes formes dans l'enveloppe mycobactérienne. La forme majoritaire est tétra-acylée par un acide palmitique, un acide phtiocéranique et deux acides hydroxyphtiocéraniques, spécifiques du genre *Mycobacterium* (**Figure 23**). Il existe d'autres formes minoritaires de SL multiacylés, dont les sulfolipides diacylés, forme intermédiaire acylée par un acide palmitique et un acide hydroxyphtiocéranique. De la même manière que les DATs/PATs, les SLs ne sont synthétisés que par *M. tuberculosis* et *M. canettii*.

Enfin, les LOSs, lipides retrouvés, parmi les membres du *complexe MTBC*, exclusivement chez *M. canettii*, sont des lipides dont la structure chimique n'a pas encore été complètement élucidée.



Néanmoins, il semble que l'acide gras et la structure oligosaccharidique soient spécifiques de l'espèce (**Figure 23**).

La matrice lipidique de l'enveloppe mycobactérienne peut jouer différents rôles au sein de cette structure complexe. Certains sont essentiels à la viabilité *M. tuberculosis*, d'autres sont impliqués dans la barrière de perméabilité face aux molécules thérapeutiques ainsi qu'aux agents microbicides produits par l'hôte, et d'autres n'ont pas encore de fonctions définies (Pour revue, Neyrolles & Guilhot, 2011).

### II. Rôle des lipides dans l'organisation de l'enveloppe.

Tous ces lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* en façonnent l'architecture. Néanmoins, tous n'ont pas la même importance dans l'organisation structurale et fonctionnelle de l'enveloppe mycobactérienne.

Parmi les lipides de *M. tuberculosis*, les TDMs sont essentiels à la viabilité du bacille de par leur composition en acides mycoliques. De plus, les différentes formes de TDMs chez *Mycobacterium* (*i.e.* acides mycoliques et acides mycoliques oxygénés) sont associées à la fonction de barrière de perméabilité de l'enveloppe. Ainsi, des modifications structurales de ces lipides ont pour conséquence une modification de la perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne. En effet, une souche mutée dans le gène *hma*, codant les premières étapes de l'oxygénation des acides mycoliques, possède un phénotype moins perméable à certaines molécules lipophiles ainsi qu'au glycérol connu pour diffuser au travers des membranes mycobactériennes via des domaines lipidiques. La souche mutée sur le gène *hma* est aussi plus sensible aux radicaux oxygénés tel que l' $H_2O_2$  (Dubnau et al., 2000).

Les lipoglycanes dérivés de phosphatidylinositols, autres lipides essentiels pour *M. tuberculosis*, sont aussi impliqués dans le rôle de barrière de perméabilité. En effet, des mutants de structure de ces lipides montrent une modification de la susceptibilité à certains antibiotiques ainsi qu'une diminution de la perméabilité associée aux molécules lipophiles (Fukuda et al., 2013).

D'autres lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* ne sont pas essentiels, mais contribuent à la barrière de perméabilité de l'enveloppe (Camacho et al., 2001; Simeone et al., 2007). Ainsi, si les DIMs ne semblent pas jouer de rôle dans la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques, ils sont en revanche impliqués dans la sensibilité à certains détergents comme le sodium dodécylsulfate (SDS) (Camacho et al., 2001). De plus, leur contribution à cette barrière de perméabilité les positionne comme de bons acteurs de la résistance des mycobactéries aux espèces réactives oxygénées et nitrées produites au sein du phagosome,





(Camacho et al., 2001; Rousseau et al., 2004). En effet une souche mutée dans la synthèse des DIMs se réplique moins bien que la souche sauvage dans des macrophages de souris activés par la présence d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , et cette diminution de la capacité de réplication est associée au développement des mécanismes microbicides, tels que la formation de RNS (Rousseau et al., 2004).

Le rôle des DATs/PATs, des SLs et des PGLs en tant que barrière de perméabilité n'a pas été étudié. Néanmoins, un rôle éventuel des DATs/PATs dans la perméabilité a déjà été suggéré aux vues des différences de morphologie entre la culture d'une souche sauvage de mycobactéries ou une souche mutée sur un gène codant une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de ces lipides (Dubey et al., 2002).

Outre le rôle de certains lipides dans la perméabilité de l'enveloppe, leur localisation à la surface des mycobactéries leur prédit un rôle dans l'interaction hôte/pathogène et les positionne comme des candidats potentiels en tant que facteur de virulence.

### III. Rôle des lipides en tant que facteurs de virulence

Afin d'étudier un rôle des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la pathogénèse de la tuberculose, de nombreux travaux ont été réalisés notamment grâce au développement d'outils moléculaires permettant une analyse de la virulence par la génération de souches mutées sur des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des lipides d'intérêts.

L'essentialité des lipides tels que les TDMs, ou encore les lipoglycannes, a ralenti l'étude de leur rôle *in situ*. Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés *in vitro* avec des molécules purifiées, mais la construction de mutants structuraux permet depuis peu d'étudier les fonctions biologiques de ces lipides (Pour revues, Hunter et al., 2006; Mishra et al., 2011). Ainsi les TDMs, composants majeurs de l'enveloppe mycobactérienne, ont particulièrement été étudiés pour leur pathogénicité (Pour revue, Hunter et al., 2006). L'analyse de mutants structuraux des TDMs a permis de montrer le rôle de ces lipides dans la virulence du bacille. En effet, *in vivo*, l'absence des fonctions cyclopropanes de la chaîne méromycolique ou encore la longueur des acides mycoliques entraînent une diminution de la virulence de *M. tuberculosis* (Bhatt et al., 2007; Glickman et al., 2000; Rao et al., 2006). L'étude du rôle des TDMs s'est aussi faite en travaillant avec des mycobactéries préalablement traitées avec de l'éther de pétrole afin d'extraire les TDMs de l'enveloppe. Cependant, avec cette technique, les TDMs ne sont vraisemblablement pas les seuls



lipides à être extraits (Indrigo et al., 2002; Lima et al., 2001). Il a aussi récemment été décrit que la construction de mutants structuraux de lipoglycannes et leur étude dans la virulence engendrait un phénotype atténué chez la souris (Fukuda et al., 2013).

Parmi les lipides qui composent l'enveloppe mycobactérienne, ceux dont la présence est essentielle sont impliqués à la fois dans l'organisation structurale et fonctionnelle de l'enveloppe mais aussi dans la virulence du bacille. D'autres ne sont pas essentiels à la structure de l'enveloppe et sa fonction de barrière. Parmi ces lipides, la synthèse des DIMs, PGLs, DAT/PATs ainsi que des SLs étant quasi-exclusivement associée à des souches de mycobactéries pathogènes, ces lipides ont été étudiés pour leur rôle en tant que facteur de virulence.

Il a été proposé que l'expression des PGLs soit la raison pour laquelle les souches de *M. tuberculosis* appartenant à la famille Pékin sont hypervirulentes (Reed et al., 2004). La réalisation d'expériences de « Time to Death » a montré que les souches ne synthétisant plus de PGLs étaient atténuées chez la souris (Reed et al., 2004). Toutefois, ces expériences n'ont pas pu être confirmées en utilisant une souche de *M. tuberculosis* naturellement déficiente en PGLs et dont la synthèse a été restaurée (Sinsimer et al., 2008).

Les DIMs sont des lipides prépondérants dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*. Ils sont synthétisés par des souches virulentes, et notamment celles du complexe *MTBC*. Ils agissent en tant que facteur de virulence en modulant la réponse immunitaire de plusieurs manières. Des travaux *in vivo* ont démontré que l'absence de DIMs est corrélée à une diminution de la multiplication du bacille au niveau pulmonaire chez l'animal (Camacho et al., 1999; Cox et al., 1999; Goren et al., 1974; Rousseau et al., 2004). Cependant, l'étude de la dissémination du bacille au niveau splénique montre des effets contradictoires probablement dû aux modes d'infection (Cox et al., 1999; Rousseau et al., 2004).

L'étude des DATs/PATs et des SLs en tant que facteur de virulence via la construction de souches mutées dans la biosynthèse de chacun de ces lipides n'a pas de phénotype *in vivo*, que ce soit concernant la répllication du bacille dans les poumons, ou sa dissémination dans la rate ou le foie, et ce indépendamment du mode d'infection ou de l'animal infecté (Converse et al., 2003; Dubey et al., 2002; Kumar et al., 2007; Rousseau et al., 2003a; Rousseau et al., 2003b; Sirakova et al., 2001).



Individuellement, les DAT/PATs et les SLs ne joueraient donc pas de rôle dans la virulence du bacille *in vivo*. Leur proximité structurale a cependant mené certains scientifiques à étudier leur rôle coopératif dans la virulence de *M. tuberculosis*, laissant sous-entendre un potentiel mécanisme de redondance. L'étude dans la virulence d'une souche doublement mutée dans les voies de biosynthèse respectives des DATs/PATs et des SLs n'a pour autant pas mis en évidence de rôle de ces lipides dans la virulence du bacille (Chesne-Seck et al., 2008).

*In vivo*, ces lipides ne semblent pas impliqués dans la virulence. Pourtant, ils sont associés à des souches pathogènes et leur analyse avec des molécules isolées a permis de mettre en évidence un rôle de ces lipides dans la pathogénie.

*Ex vivo*, les DATs/PATs semblent moduler la phagocytose du bacille induite par des récepteurs de surface (Rousseau et al., 2003a). En effet, la souche mutée ne synthétisant plus de DATs/PATs possède une capacité d'internalisation supérieure à celle de la souche sauvage. Toutefois, une fois internalisé, ce même mutant se réplique dans les macrophages murins, activés ou non, de la même façon que la souche sauvage (Rousseau et al., 2003a). La présence de DATs purifiés, soit seul en contact avec des macrophages, soit en pré-traitement avant leur infection par *M. tuberculosis*, entraîne une diminution de la sécrétion de cytokines pro inflammatoires que sont le TNF- $\alpha$ , l'Il-6 et l'Il-12p40 (Lee et al., 2007; Saavedra et al., 2006). Le mécanisme d'inhibition de la sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires par les DATs serait dépendant de la voie des MAP-kinase (Palma-Nicolas et al., 2010). Les DATs sont aussi impliqués dans le contrôle de l'infection via l'inhibition de la multiplication des lymphocytes T, et notamment des LTs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène (Saavedra et al., 2001; Saavedra et al., 2006). Cette diminution de la prolifération est une conséquence de l'inhibition de l'expression de marqueurs d'activation des LTs par les DATs (Saavedra et al., 2006). Toujours par une technique de purification des lipides, les DATs sont décrits comme directement impliqués dans l'inhibition de la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs pour Peripheral Blood Mononuclear Cells), indépendamment de la mort cellulaire (Saavedra et al., 2006).

En ce qui concerne le rôle des SLs dans l'internalisation du bacille, en comparaison aux macrophages, les neutrophiles internaliseraient les SLs en plus grande quantité (Zhang et al., 1988). Les SLs ont été décrits comme des molécules antigéniques capables de stimuler la prolifération des LTs via leur présentation par les molécules CD1b (Gilleron et al., 2004). Concernant le devenir des mycobactéries après internalisation, les SLs ont été décrits comme agissant sur la fusion phagolysosomale (Goren et al., 1976). Les SLs ont aussi été décrits comme modulant négativement l'activation des macrophages (Pabst et al., 1988). Plus



récemment, un criblage a mis en évidence le rôle des SLs dans le blocage de la maturation du phagosome (Brodin et al., 2010).

L'ensemble de ces données reflète la controverse basée sur le rôle des DATs/PATs et des SLs en tant que facteurs de virulence.





*Projet de Recherche*

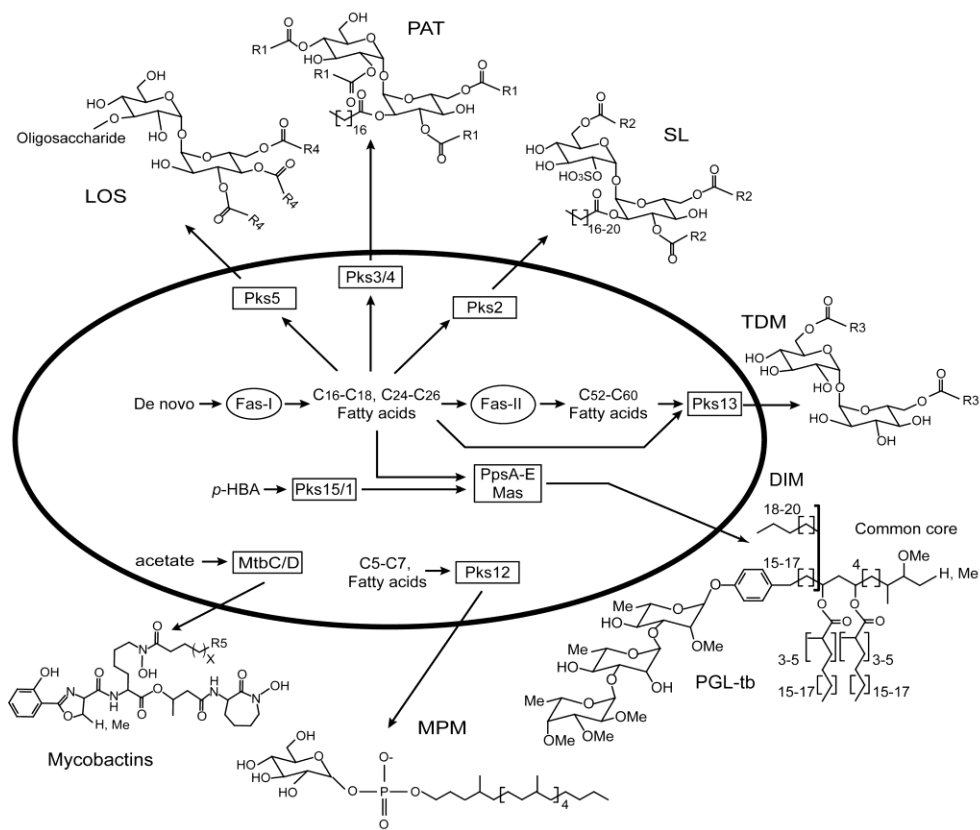


Figure 24: Lipides dérivés de polykétides de l'enveloppe de *M. tuberculosis*

Différentes polykétides synthases impliquées dans la biosynthèse des lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* (Adapté de Chalut et al., 2006)

En 2012, la tuberculose a tué 1,4 millions de personnes dans le monde et 8,7 millions de nouveaux cas ont été déclarés, faisant de cette pathologie l'une des plus importantes maladies infectieuses (WHO, 2012). La faible efficacité du vaccin B.C.G et l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques qui contaminent 490 000 individus par an, souligne l'échec des thérapies actuelles. L'OMS estime qu'entre 2000 et 2020, près d'un milliard de personnes seront nouvellement infectées et que 200 millions d'entre elles développeront la maladie, dont 35 millions mourront de tuberculose si aucune amélioration n'est apportée dans le contrôle de cette infection (<http://www.pasteur.fr>).

La tuberculose est la conséquence d'interactions complexes entre les différents composants immunologiquement actifs du bacille de la tuberculose, *M. tuberculosis* et des cellules de la réponse immunitaire de l'hôte. L'enjeu actuel dans la lutte contre la tuberculose est donc de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place au cours de l'infection en identifiant notamment les déterminants mycobactériens qui sont impliqués.

Située à l'interface entre l'hôte et le pathogène, l'enveloppe bactérienne joue un rôle prépondérant dans le devenir des infections. Une de ses caractéristiques remarquables est sa richesse en lipides uniques, qui représentent plus de la moitié de cette structure et dont la plupart sont des dérivés de polykétides (**Figure 24**). Leur localisation dans les couches les plus externes de l'enveloppe mycobactérienne leur confère une position idéale pour jouer un rôle majeur dans l'interaction avec l'hôte et le développement de la pathogénie. Certains, tels que les acides mycoliques sont des lipides majeurs de l'enveloppe mycobactérienne et essentiels pour la survie du bacille. D'autres sont produits par un nombre limité d'espèces mycobactériennes, dont la plupart sont pathogènes pour l'homme ou les animaux, comme les dimycocérosates de phthiocérols (DIMs), ou spécifiques d'une espèce pathogène ou d'un complexe, comme les sulfolipides (SLs) et les di- et les poly- acyltréhaloses (DATs/PATs). Ces lipides ne sont pas requis pour la croissance *in vitro* du bacille mais ils contribueraient à la mise en place du processus infectieux.

L'équipe de Christophe Guilhot s'attache à déterminer la contribution précise des lipides d'enveloppe des mycobactéries au processus pathogénique notamment de la tuberculose et de la lèpre, en étudiant leurs voies de biosynthèse et en analysant leur implication dans l'interaction avec l'hôte. Dans ce contexte, il a été établi que les DIMs sont des lipides importants pour la pathogénie de la tuberculose. A l'inverse, le rôle d'autres lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis*, tels que les DATs/PATs et les SLs, sont sujets à controverse (Pour revue, Astarie et al., 2010). Individuellement, ces molécules n'auraient pas de rôle dans la virulence de *M. tuberculosis*. En effet, des mutants affectés



dans la biosynthèse de l'un ou l'autre de ces lipides ne présentent pas d'atténuation dans des modèles animaux en comparaison avec la souche sauvage. Cependant, ces lipides exercent des effets *in vitro* qui seraient importants pour la pathogénie, telle que l'inhibition de la formation du phagolysosome, la production de cytokines ou la prolifération des lymphocytes T. Cette différence entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* pourrait être la conséquence d'un effet de ces lipides qui serait masqué par un mécanisme de compensation ou l'effet prédominant d'un facteur de virulence.

**L'objectif de mon projet de thèse vise à évaluer la contribution individuelle et collective des DIMs, DATs/PATs et SLs dans la pathogénèse de la tuberculose. Dans ce but, une souche sauvage et des souches déficientes dans la synthèse d'un ou plusieurs de ces lipides sont comparées pour leur virulence, *in vivo* chez la souris. Les souches mutantes induisant une réponse différente de la souche sauvage sont retenues et caractérisées plus en détails pour leur capacité à moduler *ex vivo* les réponses immunitaires des macrophages humains, cibles cellulaires privilégiées du bacille et partenaires essentiels de la réponse immunitaire de l'hôte face à la tuberculose.**



**RESULTATS**

**&**

**DISCUSSION**





## A. Identification du rôle des lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la pathogénie tuberculeuse.

### 1. Contexte de l'étude

Dans le but de mieux comprendre la physiopathologie de la tuberculose et le rôle du bacille dans le processus infectieux, nous nous sommes intéressés à l'enveloppe de *M. tuberculosis* qui joue un rôle essentiel dans la virulence du bacille. La forte proportion de lipides qui composent l'enveloppe et leur localisation à l'interface avec l'hôte font de ces molécules des facteurs de virulence potentiels.

Au démarrage de ma thèse, nous avons fait le bilan des différentes activités biologiques des lipides d'enveloppe dans la revue « The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis ». Comme nous l'avons souligné, certains lipides sont essentiels à la bactérie, d'autres comme les DIMs sont des facteurs de virulence majeurs, mais le rôle des DATs/PATs et des SLs dont la synthèse est pourtant limitée à quelques souches mycobactériennes, est encore très discuté.

En effet, des études ont montré que l'infection de souris par des souches mutées dans les voies de biosynthèse de ces lipides, que ce soit individuellement (Rousseau et al., 2003a; Rousseau et al., 2003b) ou collectivement (Chesne-Seck et al., 2008), ne révélaient pas de rôle de ces lipides dans la virulence, alors que l'étude de ces lipides sous forme isolée rapportait une activité immunomodulatrice (Goren et al., 1976; Rousseau et al., 2003a). Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la différence entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* soit une conséquence d'un effet de redondance ou de hiérarchisation fonctionnelle entre les différents lipides de l'enveloppe.

### Revue

#### « The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis »

Catherine ASTARIE-DEQUEKER, Jerome NIGOU, **Charlotte PASSEMAR** and Christophe GUILHOT.

Drug Discovery Today Diseases Mechanisms, Volume 7, Issue 1, Spring 2010, Pages e33–e41





Editors-in-Chief

Toren Finkel – National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, USA  
Charles Lowenstein – University of Rochester Medical Center, Rochester, NY.

Mycobacterial infections

# The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis

Catherine Astarie-Dequeker\*, J. Nigou, C. Passemar, C. Guilhot

Département « Mécanismes Moléculaires des Infections Mycobactériennes », Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR 5089 du CNRS et de L'Université Paul Sabatier, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France

Several mycobacteria are remarkably successful human pathogens that cause wellknown infections such as tuberculosis and leprosy or emerging diseases such as Buruli ulcer. On encountering the virulent mycobacteria, the host develops a strong immune response which is dedicated to combat the invasion while bacilli have evolved several strategies to counteract and adapt to this hostile environment. Being positioned at the bacterial surface, mycobacterial lipids contribute to the interplay between host and pathogen. This review will briefly discuss some unusual mycobacterial lipids that have been identified, focusing on their immunomodulatory properties.

## Introduction

The genus Mycobacteria comprises pathogenic and non-pathogenic species. Pathogenic mycobacteria include *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*, which cause tuberculosis and leprosy, respectively, *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, a major opportunistic pathogen associated with AIDS, and *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, an emerging infectious disease of major concern. Mycobacteria synthesize a large variety of unique lipids which have primarily a structural role in the cell envelope, and contribute to its low permeability to many hydrophilic molecules. Being positioned at the bacterial surface [1], lipids are also able to interact with cells and contribute to the interplay between host and pathogen. This

## Section editor:

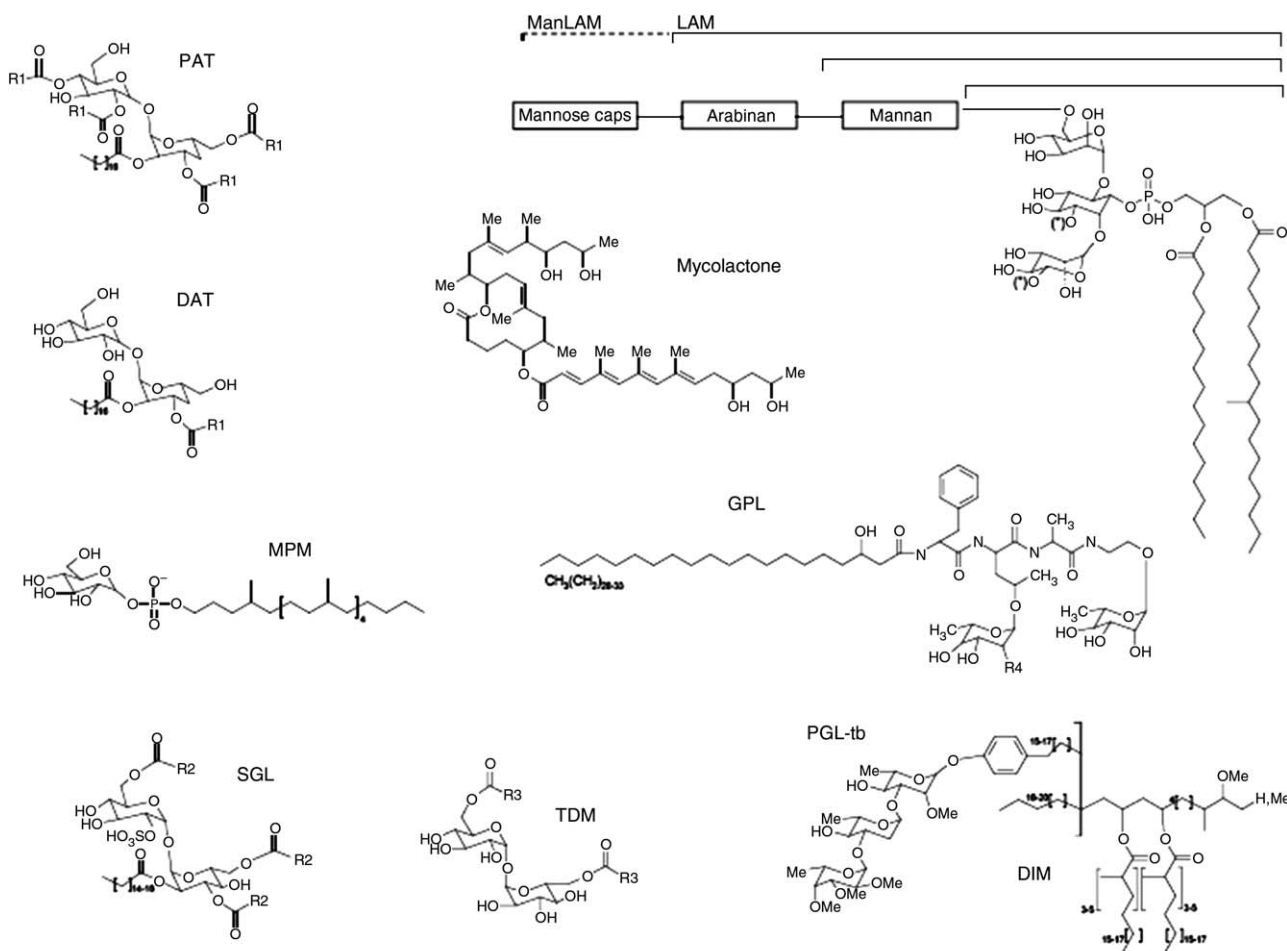
Helena Ingrid Boshoff – NIAID, National Institutes of Health  
Bethesda, Maryland, United States

review will briefly discuss some unusual mycobacterial lipids that have been identified, focusing on their immunomodulatory properties.

The mycobacterial cell envelope is composed of a plasma membrane surrounded by the cell wall skeleton, which itself is surrounded by an outer layer, called the capsule [2,3]. The mycobacterial plasma membrane has a typical bacterial membrane composition. The cell wall skeleton is made up of a thick peptidoglycan layer covalently linked to the heteropolysaccharide arabinogalactan which is esterified by massive amounts of mycolic acids. A unique repertoire of structurally complex, free, extractable lipids are associated with the cell wall skeleton but not covalently attached to it. Together with a matrix of polysaccharides and proteins, these form a capsule. Up to 60% of the dry mass of the cell envelope consists of a variety of lipids with highly diverse structures (Fig. 1). Some lipids are present in all of the cultivable mycobacterial species that have been examined to date, for example trehalose dimycolate (TDM), phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIM), lipomannan (LM), lipoarabinomannan (LAM). Others are present only in a few or a single mycobacterial species. For instance, several non-tuberculous mycobacteria including pathogenic species such as the *M. avium* complex or *Mycobacterium abscessus* produce glycopeptidolipids (GPL), but these lipids are not produced by the *M. tuberculosis* complex (such as *M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii* or *Mycobacterium bovis*) or *M. leprae*. Instead, *M. tuberculosis* complex and

\*Corresponding author: C. Astarie-Dequeker (Catherine.astarie-dequeker@ipbs.fr)





Drug Discovery Today: Mechanisms

**Figure 1.** Structures of various cell wall lipids synthesized by mycobacteria PAT: polyacyl trehalose, R1 are methyl-branched fatty acid residues (containing 3 methyl ramifications) of the phthienoic acid series [6]. DAT: diacyl trehalose, R1 is a C20-C21 fatty acid of the phthienoic acid series. SGL: sulfoglycolipids, R2 are either phthioceranic or hydroxyphthioceranic acid residues; that is highly methyl-branched fatty acids (4–8 methyl ramifications). Various forms of SGL containing either one or two R2 chains may be found in *M. tuberculosis* lipid extract. In all cases, the first acylation is at the 2' position and involved a linear chain fatty acid. The second acylation is at the 3' position and involves either a hydroxyphthioceranic or a phthioceranic acid. TDM: trehalose dimycolate. R3 are mycolic acid residues. MPM: mannosyl- $\beta$ -l-phosphomycoketide. DIM: phthiocerol dimycocerosates. PGL-tb: phenolic glycolipids from *M. tuberculosis*. GPL: glycopeptidolipid, R4 are 2,3-dimethylrhamnose or oligosaccharide-2,3-dimethylrhamnose (*M. avium*), R5 are methyl or 2,3,4-trimethylrhamnose or 2-succinyl 3,4-dimethylrhamnose (*M. smegmatis*, *M. abscessus*). LM: lipomannan, PIM: phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides and LAM: lipoarabinomannan. ManLAM: in slow growing mycobacteria, LAM is capped with mannosyl units, (\*) potential acylation sites.

*M. leprae* mycobacteria produce lipids characteristic of the phthiocerol dimycocerosate (DIM) and phenoglycolipids (PGL) families (Daffe and Draper [2]). More extremely, sulfoglycolipids (SGL) and mycolactones are synthesized only by *M. tuberculosis* and *M. ulcerans*, respectively. However, even though lipid families such as TDM, GPL, or PGL are produced by several mycobacterial species, there are some subtle structural variations which may be specific to a limited number of species. For example, the saccharidic extension of PGL is species-specific. Similarly, the nature of mycolates found in TDM is not the same for all mycobacteria (for review, [4]).

For over 60 years, studies have investigated the function and role of mycobacterial lipids in pathogenesis. Most of these studies have been performed with purified compounds

or have tried to establish correlations between the cell-envelope composition of clinical strains and their pathogenicity in animal models. In 1985, Silva *et al.* showed that the viability of delipidated *M. bovis* BCG was significantly lower than native *M. bovis* BCG after infection of mice [5]. More recently, the development of powerful genetic tools and the availability of many mycobacterial species genome sequences have led to the identification of genes involved in lipid biosynthesis and enabled their targeted disruption (for review, [6]). Infection using animal models with defined mutant strains has helped to establish the role of cell wall lipids in virulence (Table 1). The main issue now is whether individual cell-envelope components act as direct effectors of pathogenesis, notably during the cross-talk of pathogenic mycobacteria



**Table 1. Mycobacterial cell wall lipids and virulence in animal models.**

Lipids	Strain	Mutant	Animal model	In vivo phenotype	References
<b>DIM</b>	H37Rv	Spontaneous DIM-less mutant	Guinea pig	Decreased bacterial load in spleen, Decreased lung lesions	[72]
	Mt103 Erdman	Transposon mutant deficient in DIM synthesis	Mice	Decreased bacterial load in lung	[73,74]
<b>PGL</b>	HN878	Allelic exchange mutant deficient in PGL synthesis	Mice	Increased survival of mice	[49]
<b>Mycolate</b>	H37Rv	Allelic exchange mutant deficient in Oxygenated mycolate synthesis	Mice	Decreased bacterial load in lung, spleen and liver	[75]
	Erdman	Allelic exchange mutant deficient in cyclopropanated mycolate synthesis	Mice	Decreased bacterial load in lung, increased survival of mice	[38]
<b>SL</b>	H37Rv	Allelic exchange mutant deficient in SL synthesis	Mice	No phenotype	[76]
	Erdman	Allelic exchange mutant deficient SL transport	Mice	Decreased bacteria load in lung, spleen and liver	[77]
<b>ManLAM</b>	<i>M. bovis</i> BCG	Allelic exchange mutant deficient in mannose capping of LAM	Mice	No phenotype	[10]
<b>Mycolactone</b>	<i>M. ulcerans</i>	Spontaneous mycolactone-less mutant	Guinea pig	No ulcer formation	[56]

The references were chosen as the most representative works concerning the role of mycobacterial cell wall lipids in the virulence.

with phagocytic host cells (macrophages and dendritic cells (DC)) which are crucial for the local containment of infection, and the subsequent immune responses. The following sections discuss the consequences of lipid recognition on immune host cell responses.

### Mycobacterial lipids and establishment of an intracellular niche

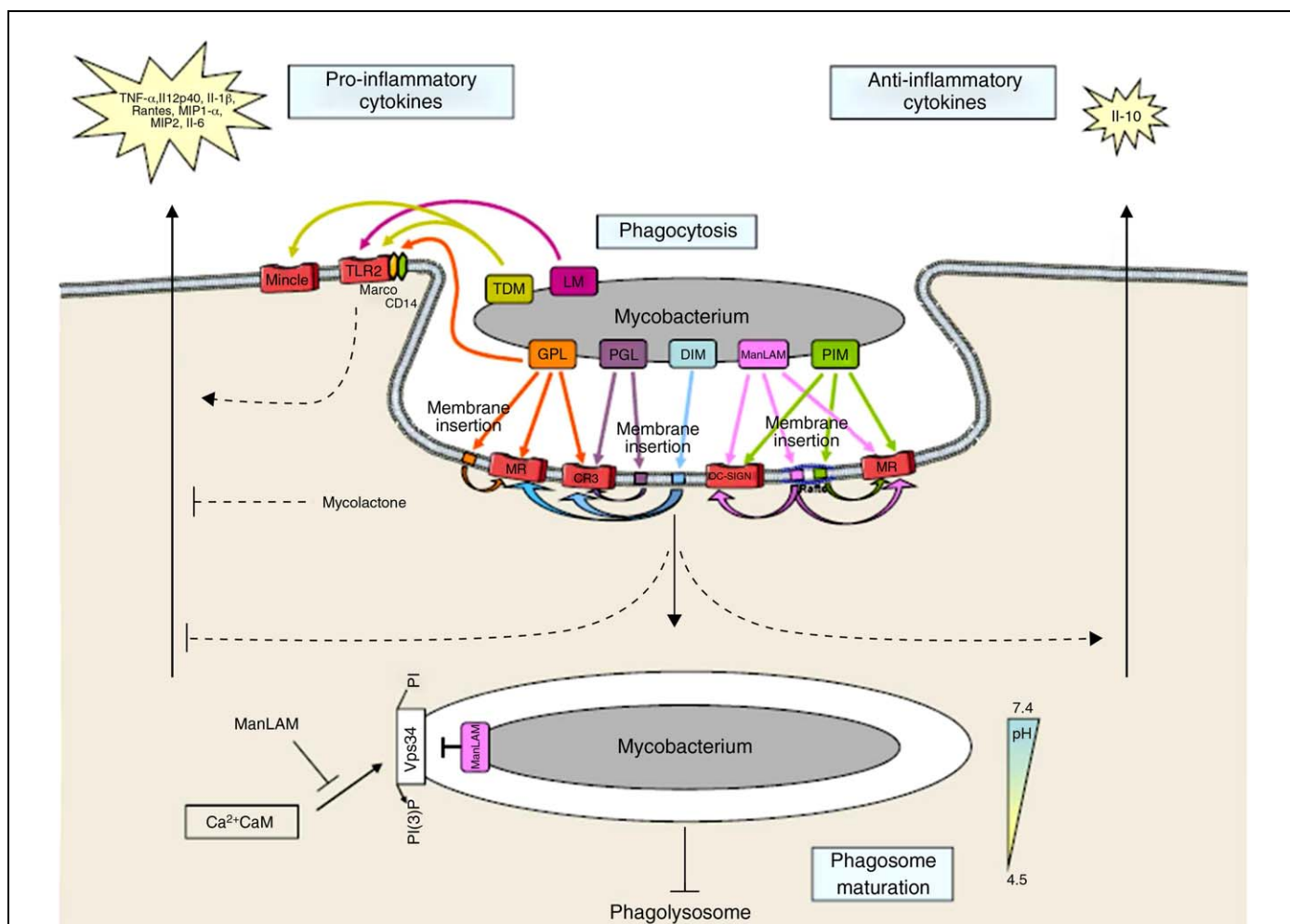
#### *Invasion of macrophages and dendritic cells*

Several mycobacterial cell-envelope lipids modulate the initial step of cell entry and control the outcome of bacteria within host phagocytic cells (Fig. 2). Lipids such as lipoglycans (LM, mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM), PIM) are able to associate *via* their terminal mannosyl units and potentially signal through phagocytic receptors, particularly the C-type lectins, mannose receptor (MR) and DC-SIGN [7–9] (Fig. 2). *M. bovis* BCG mutants which are deficient for mannose caps on LAM (e.g. the LAM structural motifs recognized by the receptor) or PIM are only marginally altered in their capacity to bind DC-SIGN [10,11]. This suggests that mycobacterial recognition by the receptor involves the cooperative binding of several ligands, including lipoglycans and glycoproteins [12]. However, lower amounts of ManLAM and PIM on the cell surface of some *M. tuberculosis* clinical isolates have been associated with a decreased recognition by MR and altered phagocytosis by human macrophages [13]. Lipids can also participate in cell infection by altering the membrane properties of host cells. Indeed, lipoglycans can directly insert into lymphocytic cell plasma membranes *via* their phosphatidyl-*myo*-inositol anchor, especially into membrane rafts, without having to

bind to other receptors [14]. This is likely to alter host cell functions by interfering with raft/microdomain signalling [15]. DIM also has physical effects on host plasma membranes that interfere with the receptor-mediated internalization of *M. tuberculosis* in human macrophages [16]. Mutant strains with deletion of the genes involved in the biosynthesis of DIM have reduced a capacity to infect human macrophages compared to wildtype strains [16]. Detailed investigations into the mechanisms by which DIM mediated this effect indicate that DIM is involved in decreasing the core polarity of the host plasma membrane following the binding of live mycobacteria to macrophages [16]. The authors proposed a model in which the contact of bacteria with macrophages favours the insertion of DIM into the host cell membrane, leading to lipid reorganization and a rise in the efficiency of receptor-mediated phagocytosis of bacilli [16] (Fig. 2). Its structurally related compound, PGL might also affect mycobacterial entry into macrophages [17]. The precise molecular determinants are yet to be elucidated but PGL may act through physical membrane effects like DIM and/or through interactions with phagocytic receptors. For example, PGL-1 purified from *M. leprae* binds the complement component C3, thereby potentially promoting *M. leprae* phagocytosis through complement receptors (CR) [17]. In addition, we observed that the production of PGL-1 from *M. leprae* in *M. bovis* BCG increases the capacity of the recombinant strain to exploit CR3 for efficient invasion (unpublished results). This interaction might occur through the recognition of the terminal 3,6-di-*O*-Me-Glcp of PGL-1 by the lectin site of the CR3 which binds various sugar moieties including methyl-glucoside.







Drug Discovery Today: Mechanisms

**Figure 2.** Effects of lipids on the immune responses of phagocytic cells. This schema summarizes several data reported in the literature to draw a scenario. Several lipids at the surface of mycobacteria are recognized by phagocytic receptors: complement receptor 3 (CR3), mannose receptor (MR) or DC-SIGN. They act either directly as ligands or indirectly by insertion into the host cell membrane, notably into raft domains (LAM or PIM), leading to a rise in the efficiency of receptor-mediated phagocytosis. Once internalized, pathogenic mycobacteria accumulate in pathogen-friendly phagosomes which do not mature toward a fusion with lysosomes. These vacuoles are characterized by an incomplete luminal acidification and poor bactericidal functions. Phagosome maturation arrest includes the action of ManLAM, TDM, DIM. ManLAM interferes with membrane trafficking initiated by  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes. The block includes a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent recruitment of the phosphatidylinositol 3-kinase hVPS34 to the phagosome which participates in an effective inhibition of recruitment to the phagosome of the membrane tethering molecule EEA1 and subsequent maturation into a phagolysosome. The infection of host cells by mycobacteria also modulates their cytokine responses. Mycobacterial lipids participate actively in this process either through the engagement of phagocytic receptors or the recognition of activation receptors such as TLR2. The cartoon has been performed using Powerpoint image bank from Servier Medical Art.

Another lipid proposed to participate in the invasion of macrophages is GPL from non-tuberculous mycobacteria [18,19]. For instance, Villeneuve *et al.* demonstrated that polar GPL isolated from the outmost layer of *Mycobacterium smegmatis* decreased the non-opsonic phagocytosis of *M. avium* [19]. Further analysis indicated that structural features of GPL play a crucial role [19]. Indeed, an alkali treatment of polar GPL from *M. smegmatis*, which removes the succinyl group from the rhamnosyl unit (Fig. 1), abolished its inhibitory activity [19]. This suggests a specific recognition of structurally related partners at the surface of macrophages. In agreement with this notion, GPL coated on latex beads

directed particle entry through CR3 and MR implying that GPL act as ligands for these phagocytic receptors [20] (Fig. 2). However, GPL insert into the phospholipid monolayer [21] and disturb membrane properties [22]. The precise molecular determinant of GPL-receptor interactions is therefore yet to be fully elucidated.

#### Arrest of phagosome maturation

One of the main features of mycobacterial infection of host cells is the ability to block the maturation of its phagosome by preventing its acidification and fusion with lysosomes (Fig. 2). The observation that delipidated mycobacteria lose



their capacity to arrest phagosome maturation strongly suggests that mycobacterial lipids interfere with this process [23]. ManLAM has been the most investigated lipid with respect to its role in the arrest of mycobacterial phagosome maturation. Coating of latex beads with *M. tuberculosis* ManLAM inhibits phagosome-lysosome fusion, suggesting that ManLAM may play a role in the inhibition of phagolysosome biogenesis during *M. tuberculosis* infection [24,25]. ManLAM prevents the activation of calmodulin and decreases the recruitment of PI3K on the phagosome thereby inhibiting the increase in phosphoinositol-3 phosphate (PI3P) in the membranes [24,26] (Fig. 2). This step is crucial for recruitment of the membrane tethering molecule, early endosomal antigen 1 (EEA1) and for conversion of phagosomes into phagolysosomes (Fig. 2). The inhibitory activity of ManLAM appears to be associated with its ability to bind the MR [27].

A second lipid proposed to interfere with phagosome maturation is TDM. Its insertion into liposomes has been shown to prevent their fusion following addition of  $\text{Ca}^{2+}$  at a concentration which otherwise induced massive liposome fusion [28]. Similarly, delipidated or heat killed *M. tuberculosis* and latex beads rapidly traffic to acidic compartments, but coating with TDM drove particles toward a less acidic compartment [29] by increasing bead retention in early phagosomes [30]. Although these data clearly demonstrate that purified TDM exerts biological effects, they do not predict the role of TDM on the surface of bacteria.

Other lipids that contribute to phagosome maturation block are DIM. Two recent studies identified mutants with insertion into DIM biosynthesis genes which failed to block the acidification of their phagosome and acquire late endosomal markers [31,32]. In agreement with this finding, DIM-deficient mutants of *M. tuberculosis* acquired the acidotropic dye, lysotracker and the  $\text{H}^+$ -ATPase [16] and fuse with HRP-containing lysosomes (C. de Chastellier, personal communication). In addition, coating of particles with PGL from *Mycobacterium marinum*, a molecule closely related to DIM, is sufficient to inhibit maturation of model phagosomes [33]. Thus, blocking of phagosome maturation may be mediated by the common lipid component of DIM and PGL.

These data clearly establish that lipids on the surface of mycobacteria interfere with their early interaction with phagocytes. However, with the exception of lipoglycans [25,26], the molecular mechanisms of action involved in this process remain to be identified. Biophysical effects on the host membrane have been proposed for TDM [22,34] and DIM [16]. Although DIM and LAM affect the trafficking of phagosomes, they do not seem to control the growth of bacteria within macrophages. For example DIM-deficient mutants grow normally within acidified phagosomes [16,31]. This implies either a capacity of lipid deficient mutants to withdraw from a lysosomal environment or a delivery to a lysosomal compartment with poor bactericidal properties. By

contrast, a mutant deficient in trans-cyclopropanation of mycolates is affected in its survival within macrophages, thereby indicating that fine modifications of TDM affect intracellular bacterial survival [35]. Therefore, mycobacteria may use cell wall lipids with different properties to transform phagosomes in a hospital niche.

## Mycobacterial lipids and manipulation of the host immune response

### Modulation of cytokine responses

The cytokine profile produced by infected macrophages or dendritic cells within the first days or weeks following mycobacterial infection determines the effectiveness of host immunity in controlling mycobacterial infection. As presented in Fig. 2, several mycobacterial lipids participate in the modulation of cytokine responses of infected macrophages. Signalling pathways engage either phagocytic receptors or activation receptors, with Toll like receptors (TLR) as the best characterized (for review, [36]). TDM is the most studied mycobacterial cell wall molecule involved in immunomodulation, and as isolated molecule triggers many of the immune responses described in *M. tuberculosis* infection including granuloma formation with the production of pro-inflammatory cytokines (for review [37]). However, because both pathogenic and non-pathogenic mycobacteria produce TDM, its role in pathogenesis has remained unclear, until Glickman *et al.* reinvestigated its contribution [38]. Using a  $\Delta pcA$  mutant of *M. tuberculosis*, the authors demonstrated that proximal cyclopropane modification of the meromycolate chain of mycolic acids, a process absent from non-pathogenic mycobacteria is necessary for lethal chronic *M. tuberculosis* infection and severe pulmonary damage [38]. The same group later suggested that cyclopropanated mycolic acids directly modulate the innate immune activation of macrophages by modulating TNF production [39]. Moreover, modified TDM from  $\Delta pcA$  mutant is a much less potent inducer than wild-type TDM of pulmonary granuloma after intravenous injection [39]. A similar study was performed using an *M. tuberculosis* mutant containing a mutation in the *cmaA2* gene which abolishes *trans*-cyclopropanation of both methoxy- and keto-mycolates [40]. The  $\Delta cmaA2$  mutant grows in mice at similar rate to the parental strain but was hypervirulent in time-to-death experiments [40]. Infection of macrophages with the  $\Delta cmaA2$  mutant induced early inflammatory cytokine release [40]. Accordingly, a mutant of the *mmaA4* (methoxy mycolic acid synthase 4) gene, which encodes the methyl transferase that introduces oxygen-containing modifications of cell wall mycolic acids, was associated with higher production of IL-12p40 and TNF- $\alpha$  compared with wildtype *M. tuberculosis* [41]. However, in contrast to the  $\Delta cmaA2$  mutant, the strain deficient in oxygenated mycolates was attenuated in mice [41]. These studies highlight the complex relationship between the fine struc-



ture of lipids at the surface of *M. tuberculosis* and innate immune responses and virulence. TDM, has been proposed to activate macrophages through a TLR2 dependent pathway in combination with other receptors (MARCO/CD14) (Fig. 2), raising the possibility that TLR2 might recognize mycolate containing lipids [42]. More recently, the C-type lectin Mincle has been reported to be an essential receptor for TDM-dependent macrophage activation [43,44] (Fig. 2) possibly through recognising its trehalose [45].

ManLAM inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  [8,46] and increases the production of IL-10 by LPS-stimulated human dendritic cells [47]. This anti-inflammatory activity, proposed to favour pathogen survival inside the infected host, has been correlated with the ability of ManLAM to bind with the C-type lectins DC-SIGN and MR [8,47]. However, the *M. bovis* BCG mutant which is deficient for LAM mannose caps is able to stimulate IL-10 production *in vitro* and induces a cytokine profile in mice that is similar to that of the wildtype strain [10]. This challenges the initial conclusion that ManLAM modulates the inflammatory response in mycobacterial infection. Clearly, data with an *M. tuberculosis* mutant are required to fully define the role of ManLAM in the subversion of host immune responses by the pathogen. Conversely, LM induces the production of pro-inflammatory cytokines via a TLR2/TLR1 depending signalling pathway [48].

A clinical *M. tuberculosis* strain of the Beijing family, HN878 is hypervirulent in mice (Table 1) and produce PGL through preservation of an intact *pks15/1* gene [49]. Disruption of the *pks15/1* gene resulted in a mutant strain which was able to multiply and persist in mouse lung and spleen after aerosol infection but was compromised in its ability to kill infected mice [49]. The authors reported that the production of *M. tuberculosis* PGL (PGL-tb) inhibits the production of macrophage pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , which have a key role in the anti-bacterial and inflammatory host response against mycobacteria [49]. Consistent with these findings, human monocytes stimulated with HN878 lipid extract containing PGL-tb, preferentially induced cytokines that deactivate phagocytes [50]. These data indicate that PGL-tb modulates host immune responses by impairing inflammatory responses of macrophages. The anti-inflammatory effects of PGL-tb were dependent on the saccharide domain because PGL from *M. bovis* BCG and DIM had no such effect [49]. In line with this, lack of production of *p*-hydroxybenzoic acid derivatives (*p*-HBAD II) which contained the same glycosylated phenol moiety as PGL-tb increases secretion of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , compared with the *M. tuberculosis* parental strain producing these molecules [51]. We have also shown that production of PGL-1 from *M. leprae* in *M. bovis* BCG represses CR3-dependent TNF- $\alpha$  secretion in human macrophages (unpublished results). However, the lipid core of PGL that it shares with DIM may also play a crucial role in the regulation of cytokine secretion. Indeed,

DIM-deficient mutant induced a greater secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6 compared with wildtype *M. tuberculosis* [52]. Clearly, the mechanisms involved in PGL and DIM modulation of immune responses need to be further examined.

Several studies using purified GPL suggest that this lipid has also immunomodulatory properties (for review, [53]). However, its role in the context of whole bacteria remains largely unclear due to the limited ability to perform genetic manipulation on *M. avium*. Nevertheless, Krzywinska *et al.* have reported that deletion of the methyltransferase D (*mtfD*) gene in *M. avium* 104 results in a mutant that expresses only a precursor of GPL [54]. Compared with the parental strain, the *mtfD* mutant exhibits decreased ability to survive in mouse liver and lung and increased capacity to induce secretion of TNF- $\alpha$  and RANTES in human macrophages [54]. In another study, a  $\Delta$ *rtfA* mutant of a smooth variant of *M. avium*, which lacks the serotype 8 GPL but produces a normal non-serotype GPL, induced less TNF- $\alpha$  production than cells infected with wildtype strain or *rtfA* complemented mutant [55]. Therefore, changing the pattern of GPL expression in *M. avium* can modulate macrophage inflammatory responses.

Mycolactone toxin (Fig. 1) which plays a key role in virulence of *M. ulcerans* [56] (Table 1) has potent immunosuppressive properties that lead to impaired cellular immune responses (for review [57]). Mycolactone is a potent inhibitor of TNF- $\alpha$  secretion in macrophages [58–60] and inhibits both *in vitro*, at nanomolar ranges, and *in vivo* the migration and maturation of DC as well as their ability to produce pro-inflammatory molecules, with selective effects on inducible chemokines [61]. On the basis of these findings, Coutanceau *et al.* propose that mycolactone limits both the initiation of primary immune responses and the recruitment of inflammatory cells at the site of infection [61].

#### Modulation of antigen presentation

DC present mycobacterial antigens to T cells within regional lymph nodes and antigen-specific T cells home back to the site of infection, where they recognize antigens presented by infected macrophages. Presentation of protein antigens occurs through classical MHC class I and MHC class II systems and of lipid antigens via non-classical CD1. Inhibition of antigen presentation by MHC class II molecules via TLR2 stimulation of macrophages is one of the multiple mechanisms that contribute to the ability of *M. tuberculosis* to survive in the host (for recent review [62]). Indeed, whereas a short stimulation of TLR2 allows cytokine production, chronic infection of macrophages favours a prolonged stimulation of the receptor, resulting in the inhibition of MHC class II molecule expression. The *M. tuberculosis* TLR2 ligands that are involved in this process include lipoproteins as well as lipoglycans, PIM [63], and most probably LM, which is as an efficient TLR2 agonist as lipoproteins [48].



Another way in which T lymphocytes are modulated during mycobacterial infection is through presentation of lipid antigens by CD1 molecules. Until now, only a few bacterial CD1 ligands have been identified and most of them are glycolipids derived from mycobacteria such as mycolic acid [64], glucose monomycolate [65], glycerolmonomycolate [66] and phosphoglycolipids, such as LAM. However, these classes of lipids are present both in avirulent and in virulent mycobacteria. Using a panel of T cell clones with different specificities to mycobacterial lipids, Gilleron *et al.* have identified a sub-family of sulfoglycolipid (Ac<sub>2</sub>SLG) specific to *M. tuberculosis* and presented by CD1b molecules [67]. Ac<sub>2</sub>SLG activate CD8<sup>+</sup>-restricted T cells which then exert two strong immunoprotective functions: a release of pro-inflammatory cytokines and a strong bactericidal activity on the mycobacteria-infected cell [67]. The group has recently determined that TCR recognition and lymphocyte activation are governed by the fatty acyl units of sulphoglycolipids [68]. Another antigenic mycobacterial lipid originally identified as Mannosyl- $\beta$ -1-phosphoisoprenoid (MPI) [69] and recently characterized as Mannosyl- $\beta$ -1-phosphomycoketide (MPM) [70] is of particular interest. Indeed, MPM contains a Mannosyl- $\beta$ -1-phosphate part that is found in Mannosyl- $\beta$ -1-phosphodolichol from mammalian cells. However, its unusual lipid portion represents a pathogen-associated molecular pattern, which allows mycobacteria to be recognized as foreign by the host immune system. Notably, the lipid moiety of MPM is essential for the activation of CD1c-restricted cells [69]. Moreover, it is produced by a Pks12 dependent lipid biosynthesis pathway present in medically important mycobacteria such as *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG, but lacking in mammalian species [70].

These data demonstrate that mycobacterial lipids participate in the paradoxes of the host–pathogen interaction during mycobacterial infection. On the one hand, they contribute to host resistance as pro-inflammatory molecules and antigens. However, on the other hand, they facilitate immune evasion by repressing pro-inflammatory responses and downregulating antigen presentation in a subset of antigen-presenting cells and T-effector cell responses.

### Concluding remarks

The data presented in this review demonstrate the prominent role played by mycobacterial lipids in pathogenesis, notably in tuberculosis. Most of the studies that we have described were performed in mice. However, mice and other currently used animal models only partially reflect important aspects of human infection including ability of bacilli to persist for a long time in tuberculosis granuloma and reactivate. The use of a human model, for example *in vitro* human granuloma [71] should help to reveal currently unknown functions of these lipids. Moreover, the study of the molecular mechanisms of action of mycobacteria lipids is still in its infancy. This

includes the identification of the host cellular partners of these lipids, the characterization of their interactions and the signals induced by these interactions, and deciphering the consequences of these combined signals. Resolving these questions may uncover the links between the nature of the compounds exposed at the *M. tuberculosis* cell surface and the specific features of pathogenic mycobacteria.

### References

- Ortalo-Magne, A. *et al.* (1996) Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J. Bacteriol.* 178, 456–461
- Daffe, M. and Draper, P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203
- Sani, M. *et al.* (2010) Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog.* 6, e1000794
- Marrakchi, H. *et al.* (2008) A comprehensive overview of mycolic acid structure and biosynthesis. In *The Mycobacterial Cell envelope* (Daffe, M.R.J., ed.), pp. 41–62, ASM Press
- Silva, C.L. *et al.* (1985) Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Am. J. Pathol.* 118, 238–247
- Guilhot, C. and Daffe M. (2008). In *Polyketides and Polyketide-Containing Glycolipids of Mycobacterium tuberculosis: Structure, Biosynthesis and Biological Activities* (Drubin, S.H.E.Ka.E., ed.), pp. 21–51, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Schlesinger, L.S. *et al.* (1994) Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J. Immunol.* 152, 4070–4079
- Nigou, J. *et al.* (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol.* 166, 7477–7485
- Tailleux, L. *et al.* (2003) DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 121–127
- Appelmelk, B.J. *et al.* (2008) The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the Mycobacterium–host interaction. *Cell Microbiol.* 10, 930–944
- Driessen, N.N. *et al.* (2009) Role of phosphatidylinositol mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN. *Infect. Immun.* 77, 4538–4547
- Pitarque, S. *et al.* (2005) Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity. *Biochem. J.* 392, 615–624
- Torrelles, J.B. *et al.* (2008) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 283, 31417–31428
- Ilangumaran, S. *et al.* (1995) Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes. *J. Immunol.* 155, 1334–1342
- Shabaana, A.K. *et al.* (2005) Mycobacterial lipoarabinomannans modulate cytokine production in human T helper cells by interfering with raft/microdomain signalling. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 179–187
- Astari-Dequeker, C. *et al.* (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog.* 5, e1000289
- Schlesinger, L.S. and Horwitz, M.A. (1991) Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1031–1038
- Kano, H. *et al.* (2005) Serotype-specific modulation of human monocyte functions by glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 335–339
- Villeneuve, C. *et al.* (2003) Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J. Biol. Chem.* 278, 51291–51300

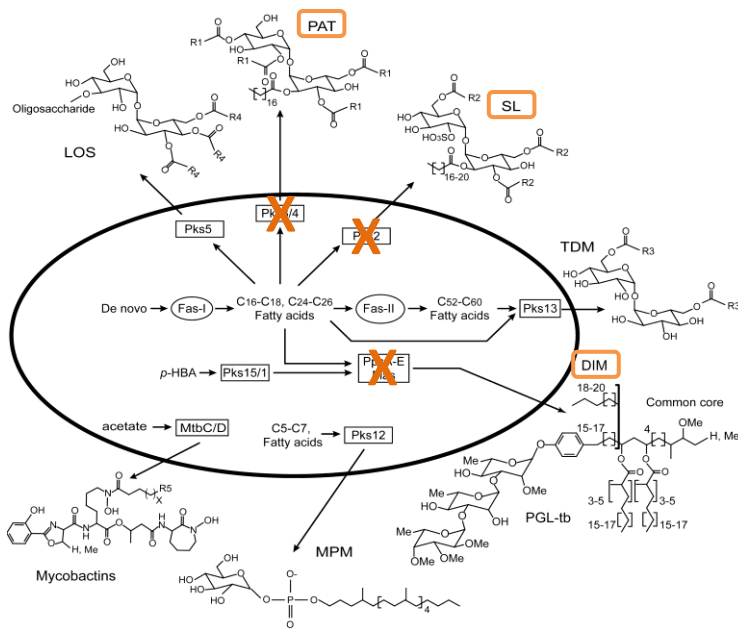




- 20 Villeneuve, C. *et al.* (2005) Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *J. Lipid Res.* 46, 475–483
- 21 Vergne, I. *et al.* (1995) Mycobacterial glycopeptidolipid interactions with membranes: a monolayer study. *FEBS Lett.* 375, 254–258
- 22 Sut, A. *et al.* (1990) Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: alteration of model and natural membranes. *Biochemistry* 29, 8498–8502
- 23 Indrigo, J. *et al.* (2002) Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* 148, 1991–1998
- 24 Fratti, R.A. *et al.* (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.* 154, 631–644
- 25 Fratti, R.A. *et al.* (2003) Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5437–5442
- 26 Vergne, I. *et al.* (2004) Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol. Biol. Cell* 15, 751–760
- 27 Kang, P.B. *et al.* (2005) The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J. Exp. Med.* 202, 987–999
- 28 Spargo, B.J. *et al.* (1991) Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 737–740
- 29 Indrigo, J. *et al.* (2003) Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* 149, 2049–2059
- 30 Axelrod, S. *et al.* (2008) Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol.* 10, 1530–1545
- 31 Pethe, K. *et al.* (2004) Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13642–13647
- 32 Stewart, G.R. *et al.* (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog.* 1, 269–278
- 33 Robinson, N. *et al.* (2008) Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response. *Traffic* 9, 1936–1947
- 34 Almog, R. and Mannella, C.A. (1996) Molecular packing of cord factor and its interaction with phosphatidylinositol in mixed monolayers. *Biophys. J.* 71, 3311–3319
- 35 Rengarajan, J. *et al.* (2005) Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8327–8332
- 36 Takeda, K. *et al.* (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376
- 37 Ryll, R. *et al.* (2001) Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids – a review. *Microbiol. Immunol.* 45, 801–811
- 38 Glickman, M.S. *et al.* (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Cell* 5, 717–727
- 39 Rao, V. *et al.* (2005) Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J. Exp. Med.* 201, 535–543
- 40 Rao, V. *et al.* (2006) Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses Mycobacterium tuberculosis-induced inflammation and virulence. *J. Clin. Invest.* 116, 1660–1667
- 41 Dao, D.N. *et al.* (2008) Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of M. tuberculosis modulates IL-12 production. *PLoS Pathog.* 4, e1000081
- 42 Werninghaus, K. *et al.* (2009) Adjuvant activity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J. Exp. Med.* 206, 89–97
- 43 Ishikawa, E. *et al.* (2009) Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J. Exp. Med.* 206, 2879–2888
- 44 Schoenen, H. *et al.* (2010) Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvant activity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J. Immunol.* 184, 2756–2760
- 45 Matsunaga, I. and Moody, D.B. (2009) Mincle is a long sought receptor for mycobacterial cord factor. *J. Exp. Med.* 206, 2865–2868
- 46 Nigou, J. *et al.* (2002) Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes Infect.* 4, 945–953
- 47 Geijtenbeek, T.B. *et al.* (2003) Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 197, 7–17
- 48 Nigou, J. *et al.* (2008) Mannan chain length controls lipoglycans signaling via and binding to TLR2. *J. Immunol.* 180, 6696–6702
- 49 Reed, M.B. *et al.* (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431, 84–87
- 50 Manca, C. *et al.* (2004) Differential monocyte activation underlies strain-specific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Infect. Immun.* 72, 5511–5514
- 51 Stadthagen, G. *et al.* (2006) Comparative investigation of the pathogenicity of three Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the synthesis of p-hydroxybenzoic acid derivatives. *Microbes Infect.* 8, 2245–2253
- 52 Rousseau, C. *et al.* (2004) Production of phthiocerol dimycocerosates protects Mycobacterium tuberculosis from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.* 6, 277–287
- 53 Schorey, J.S. and Sweet, L. (2008) The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* 18, 832–841
- 54 Krzywinska, E. *et al.* (2005) Mycobacterium avium 104 deleted of the methyltransferase D gene by allelic replacement lacks serotype-specific glycopeptidolipids and shows attenuated virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 56, 1262–1273
- 55 Irani, V.R. and Maslow, J.N. (2005) Induction of murine macrophage TNF-alpha synthesis by Mycobacterium avium is modulated through complement-dependent interaction via complement receptors 3 and 4 in relation to M. avium glycopeptidolipid. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 221–228
- 56 George, K.M. *et al.* (1999) Mycolactone: a polyketide toxin from Mycobacterium ulcerans required for virulence. *Science* 283, 854–857
- 57 Demangel, C. *et al.* (2009) Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of Mycobacterium ulcerans. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 50–60
- 58 Coutanceau, E. *et al.* (2005) Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of Mycobacterium ulcerans: the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cell Microbiol.* 7, 1187–1196
- 59 Pahlevan, A.A. *et al.* (1999) The inhibitory action of Mycobacterium ulcerans soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF-kappa B function. *J. Immunol.* 163, 3928–3935
- 60 Torrado, E. *et al.* (2007) Mycolactone-mediated inhibition of tumor necrosis factor production by macrophages infected with Mycobacterium ulcerans has implications for the control of infection. *Infect. Immun.* 75, 3979–3988
- 61 Coutanceau, E. *et al.* (2007) Selective suppression of dendritic cell functions by Mycobacterium ulcerans toxin mycolactone. *J. Exp. Med.* 204, 1395–1403
- 62 Harding, C.V. and Boom, W.H. (2010) Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 296–307
- 63 Banaiee, N. *et al.* (2006) Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J. Immunol.* 176, 3019–3027
- 64 Beckman, E.M. *et al.* (1994) Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372, 691–694
- 65 Sieling, P.A. *et al.* (1995) CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269, 227–230
- 66 Layre, E. *et al.* (2009) Mycolic acids constitute a scaffold for mycobacterial lipid antigens stimulating CD1-restricted T cells. *Chem. Biol.* 16, 82–92
- 67 Gilleron, M. *et al.* (2004) Diacylated sulfolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with Mycobacterium tuberculosis. *J. Exp. Med.* 199, 649–659



- 68 Guiard, J. *et al.* (2009) Fatty acyl structures of *Mycobacterium tuberculosis* sulfoglycolipid govern T cell response. *J. Immunol.* 182, 7030–7037
- 69 Moody, D.B. *et al.* (2000) CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. *J. Exp. Med.* 192, 965–976
- 70 Matsunaga, I. *et al.* (2004) *Mycobacterium tuberculosis* pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. *J. Exp. Med.* 200, 1559–1569
- 71 Puissegur, M.P. *et al.* (2004) An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cell Microbiol.* 6, 423–433
- 72 Goren, M.B. *et al.* (1974) Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid. *Infect. Immun.* 9, 150–158
- 73 Camacho, L.R. *et al.* (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 34, 257–267
- 74 Cox, J.S. *et al.* (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 79–83
- 75 Dubnau, E. *et al.* (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* 36, 630–637
- 76 Rousseau, C. *et al.* (2003) Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infect. Immun.* 71, 4684–4690
- 77 Converse, S.E. *et al.* (2003) MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6121–6126



Profil lipidique des souches analysées			
	DIM	SL	DAT/PAT
H37Rv ATCC	X	X	X
H37Rv STC	X	X	
PMM 57	X		
PMM 135		X	X
PMM 56 / 174		X	
PMM 127			

Figure 25 : Stratégie de construction des souches mutées dans les voies de biosynthèse des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* et profil lipidique de la collection.

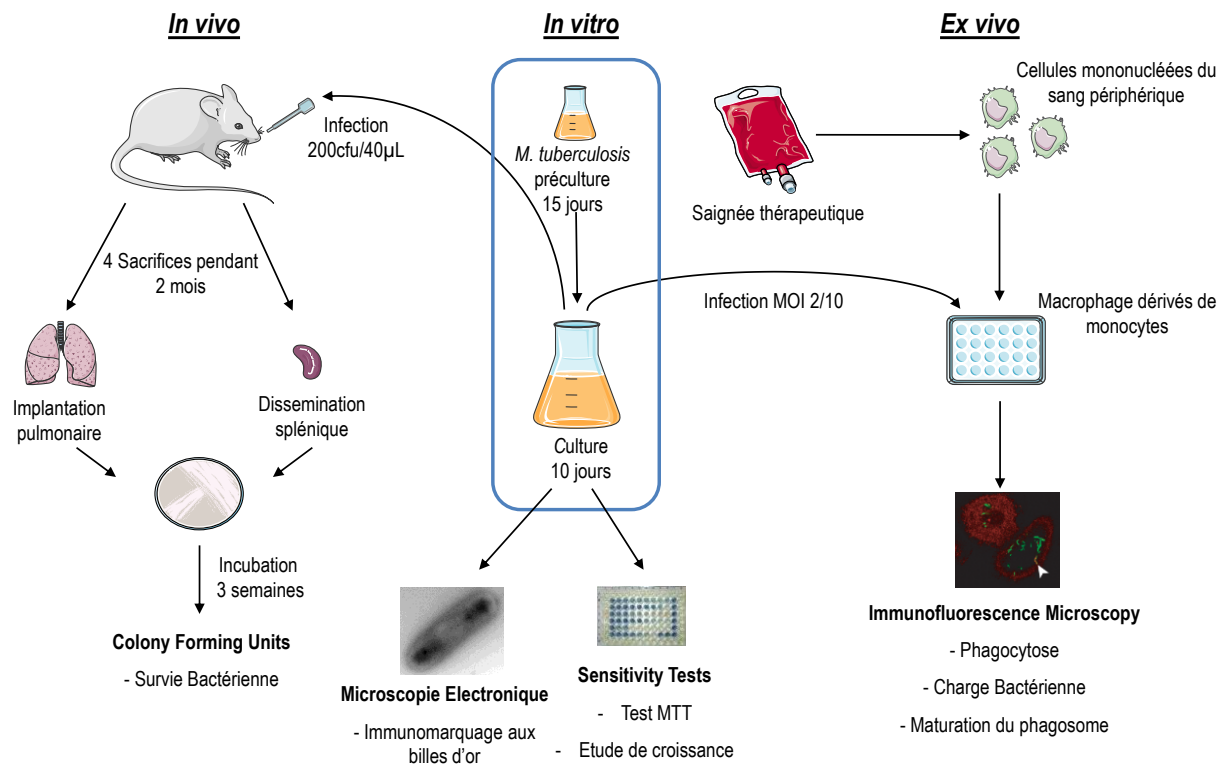


Figure 26 : Stratégie de l'étude.

### 2. Objectif & Stratégie

**L'objectif de la première partie de ma thèse a été de déterminer la contribution respective des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la pathogénie de la tuberculose.**

La connaissance des voies de biosynthèse de ces lipides d'enveloppe a permis de développer une stratégie basée sur la construction d'une collection de souches mutées sur des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des DIMs, DATs/PATs et SLs (**Figure 25A ; Annexes 1,2,3**). L'originalité de l'approche réside dans la production de souches déficientes dans la synthèse d'un seul ou de plusieurs de ces lipides, dans le but d'aborder leur fonction individuelle ou collective dans la pathogénie (**Figure 25B**).

Nous avons ensuite étudié la conséquence de ces mutations simples ou multiples sur l'interaction du bacille avec l'hôte en effectuant une étude comparative des mutants et de leur souche contrôle (**Figure 26**). La virulence est examinée *in vivo* chez la souris car ce modèle animal permet de travailler sur des périodes d'infection relativement longues, et ce dans un système biologique « complet ». Nous évaluons la capacité des souches à s'implanter dans les poumons et à se multiplier, puis à disséminer et persister dans d'autres organes tels que la rate. Les souches sont également testées *ex vivo* pour leur capacité à moduler les réponses immunitaires des macrophages humains.

Dans un second temps, les souches mutées induisant une réponse différente de la souche sauvage sont retenues et leur activité fonctionnelle est caractérisée plus en détails.

### 3. Méthodologie & Résultats

#### Article:

**« Multiple deletions in the polyketide synthase repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelop lipids in host-pathogen interactions ».**

**Charlotte PASSEMAR, Ainhoa ARBUES, Wladimir MALAGA, Ingrid MERCIER, Flavie MOREAU, Laurence LEPOURRY, Olivier NEYROLLES, Christophe GUILHOT and Catherine ASTARIE-DEQUEKER.**

*Cellular Microbiology*. avril 2013, soumis.



# Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host–pathogen interactions

Charlotte Passemar,<sup>1,2</sup> Ainhoa Arbués,<sup>1,2</sup>  
Wladimir Malaga,<sup>1,2</sup> Ingrid Mercier,<sup>1,2</sup>  
Flavie Moreau,<sup>1,2</sup> Laurence Lepourry,<sup>1,2</sup>  
Olivier Neyrolles,<sup>1,2</sup> Christophe Guilhot<sup>1,2\*\*</sup> and  
Catherine Astarie-Dequeker<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), BP 64182, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France.

<sup>2</sup>UPS, IPBS, Université de Toulouse, F-31077 Toulouse, France.

## Summary

Several specific lipids of the cell envelope are implicated in the pathogenesis of *M. tuberculosis* (*Mtb*), including phthiocerol dimycocerosates (DIM) that have clearly been identified as virulence factors. Others, such as trehalose-derived lipids, sulfolipids (SL), diacyltrehaloses (DAT) and polyacyltrehaloses (PAT), are believed to be essential for *Mtb* virulence, but the details of their role remain unclear. We therefore investigated the respective contribution of DIM, DAT/PAT and SL to tuberculosis by studying a collection of mutants, each with impaired production of one or several lipids. We confirmed that among those with a single lipid deficiency, only strains lacking DIM were affected in their replication in lungs and spleen of mice in comparison to the WT *Mtb* strain. We found also that the additional loss of DAT/PAT, and to a lesser extent of SL, increased the attenuated phenotype of the DIM-less mutant. Importantly, the loss of DAT/PAT and SL in a DIM-less background also affected *Mtb* growth in human monocyte-derived macrophages (hMDMs). Fluorescence microscopy revealed that mutants lacking DIM or DAT/PAT were localized in an acid

compartment and that bafilomycin A1, an inhibitor of phagosome acidification, rescued the growth defect of these mutants. These findings provide evidence for DIM being dominant virulence factors that mask the functions of lipids of other families, notably DAT/PAT and to a lesser extent of SL, which we showed for the first time to contribute to *Mtb* virulence.

## Introduction

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), the causative agent of tuberculosis, is a pathogen that infects one third of the world's population and kills more than 1.4 million people annually (WHO, 2012). Its pathogenicity is mainly due to its capacity to manage the hostile environment encountered within the host in order to survive and replicate. *Mtb* has evolved mechanisms of resistance to overcome the defence functions of macrophages; these involve the use of receptors for cell invasion, the modulation of normal progression of the phagosome into an acid and hydrolytically active phagolysosome, the regulation of local modulators of the immune response and the control of cell apoptosis. Despite the scale of the public health problem, our understanding of the survival strategies of *Mtb* remains elusive. In particular, the factors important for tuberculosis pathogenesis and their modes of action are far from being identified.

At the interface between the host and the pathogen, the mycobacterial cell envelope, and especially the outermost layer, constitutes its interface with the host. It contains unique cell-surface lipids, whose biosynthesis involves a family of enzymes known as polyketide synthases. These lipids can be classified into distinct categories according to their importance for *Mtb* biology (Neyrolles and Guilhot, 2011). On the one hand, some of them (e.g. mycolates) are major constituents of the mycobacterial outer membrane and their synthesis is essential for bacterial growth. On the other hand, non-covalently associated lipids located in the outermost part of the cell envelope, including mycocerosate-containing lipids [phenolic glycolipids (PGL) and phthiocerol dimycocerosates (DIM)] and

Received 8 April, 2013; revised 4 September, 2013; accepted 5 September, 2013. For correspondence. \*E-mail Catherine.Astarie-Dequeker@ipbs.fr; Tel. (+33) 561 17 54 55; Fax (+33) 561 17 59 94; \*\*E-mail Christophe.Guilhot@ipbs.fr; Tel. (+33) 561 17 58 45; Fax (+33) 561 17 59 94.





trehalose-derived glycolipids [sulfolipids (SL) and di- and poly-acyl trehaloses (DAT, PAT)], do not seem to have major structural roles. Indeed, the loss of DIM is frequent after serial passages of *Mtb* *in vitro*, and is associated with a slight increase in the growth rate (Domenech and Reed, 2009; Kirksey *et al.*, 2011), and clinical isolates deficient in PGL, SL or PAT synthesis have been isolated (Constant *et al.*, 2002; Gonzalo Asensio *et al.*, 2006). Nevertheless, the distribution of DIM, PGL, DAT/PAT and SL in the *Mycobacterium* genus is consistent with these lipids contributing to pathogenesis: DIM and PGL family lipids are synthesized by a limited number of mycobacterial species, including the major human pathogens *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium ulcerans* and *Mtb*; DAT/PAT have only been isolated from species of the *Mtb* complex; and SL have been isolated from *Mtb* and *Mycobacterium canettii*, but not from other members of the *Mtb* complex. While the role of DIM and PGL in virulence is well documented (for review, see Guilhot and Daffe, 2008), that of SL and DAT/PAT is still unclear. At the individual level, their role appears to be questionable based on the lack of attenuation in animal models displayed by the genetically engineered strains (impaired for the production of SL or DAT/PAT) in comparison to the parental strains (Rousseau *et al.*, 2003a,b). Also, their production differs between clinical isolates (our unpublished results). Moreover, SL and DAT/PAT together do not seem to contribute to bacterial virulence because the absence of both, in a *Mtb* H37Rv double mutant, does not significantly affect the growth of tubercle bacillus in a mouse model of infection (Chesne-Seck *et al.*, 2008). Nonetheless, these glycolipids, when purified, exhibit biological activities relevant to the interaction between *Mtb* and host cells. For instance, purified SL have been described as modulating phagosome-lysosome fusion (Goren *et al.*, 1976; Brodin *et al.*, 2010) and the cytokine response of human phagocytes (Brozna *et al.*, 1991). Similarly, DAT/PAT are potent inhibitors of leucocyte migration (Husseini and Elberg, 1952) and T cell proliferation (Saavedra *et al.*, 2001), and participate in early interactions between *Mtb* and phagocytes (Rousseau *et al.*, 2003a). Also, most clinical isolates of the various *Mtb* lineages produce these molecules (our unpublished data) suggesting that they contribute to the adaptation of *Mtb* to its pathogenic way of life. Therefore, the true importance of SL and DAT/PAT in the pathogenesis of tuberculosis remains unclear.

The discrepancy between data obtained *in vivo* and data obtained *ex vivo* can be reconciled if *Mtb* possesses compensatory virulence factors that complement the absence of trehalose-derived lipids. An alternative explanation is that trehalose-derived lipids have a subtle activity that is masked by the large effects of major virulence factors. We therefore re-examined the individual

and collective contributions of SL, DAT/PAT and DIM to the pathogenesis of tuberculosis. We developed a genetic strategy involving sequential disruption of the biosynthesis pathways for these various lipids. We investigated the consequences of these single and multiple mutations for the interaction between *Mtb* and both an animal model and human cells. We demonstrated that there is functional overlap between DIM and DAT/PAT and SL in the virulence of *Mtb*, both families of molecules contributing to counteract the immune responses of human macrophages.

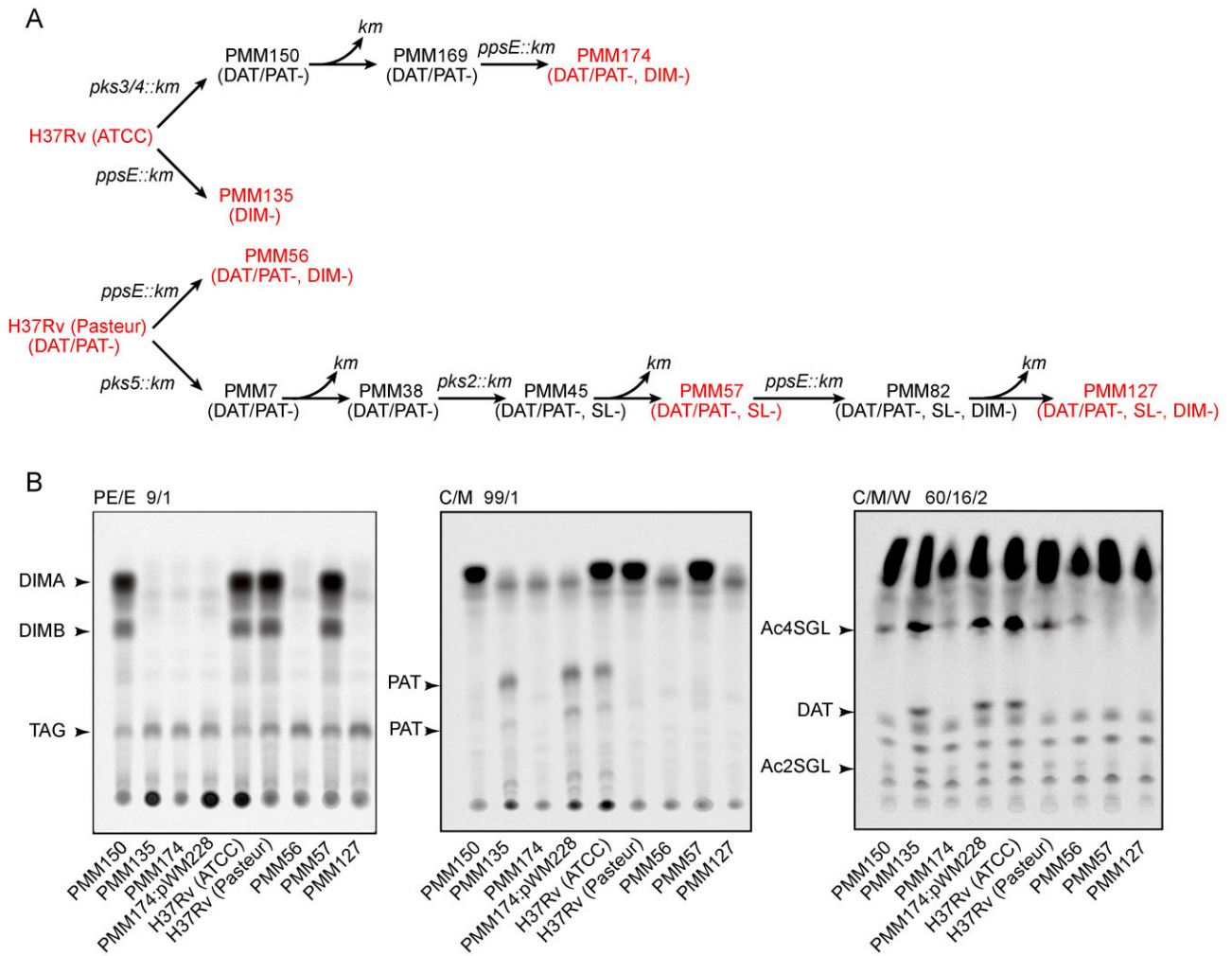
## Results

### *Construction and characterization of lipid-deficient mutants*

The strategy used for sequential disruption of SL, DAT/PAT and DIM biosynthesis is depicted in Fig. 1A. A set of polyketide synthases (PKSs) is required for the formation of the various and specific fatty acids incorporated into SL, PAT/DAT and DIM (for review see Mohanty *et al.*, 2011). This includes: Pks2, a catalyser for the formation of phthioceranic and hydroxyphthioceranic acids found in SL; Pks3/4, an enzyme required for the formation of both phthienoic acids (also called mycolipenic acids) and their structurally saturated and dienolic analogues (mycolipanoic or mycolipodienic acids) present in DAT and PAT; and PpsA-E and Mas, proteins required for the synthesis of the structural units (the phthiocerol chain and mycocerosic acids respectively) constituting DIM. We also included Pks5 in this deletion strategy. Pks5 is highly similar to Pks2, Pks3/4 and Mas, and was found to be involved in the formation of the methyl-branched fatty acid incorporated into the lipooligosaccharide (LOS) of mycobacteria (Etienne *et al.*, 2009). Although this compound has not been found in strains of the *Mtb* complex, with the exception of *M. canettii*, we suspected that minor forms of DAT may contain these specific methylated fatty acids. Indeed, mutations in the genomic locus dedicated to LOS synthesis, and containing *pks5*, alter the synthesis of some DAT forms (Brodin *et al.*, 2010).

To facilitate the sequential deletion strategy, we exploited an existing pair of H37Rv strains: the H37Rv ATCC strain, producing the three families of lipids analysed in this study; and the H37Rv Pasteur strain, containing a spontaneous single base substitution that introduces a stop codon into the *pks3/4* gene (Cole, 1999). This mutation disrupts the polyketide synthase encoding gene *pks3/4* and causes DAT/PAT deficiency (Fig. 1B). We used allelic exchange mutagenesis to delete an internal fragment from the targeted *pks* gene and insert a *res-km-res* cassette (see *Experimental procedures* for descriptions of the constructs). The antibiotic resistance marker was sub-





**Fig. 1.** Construction and lipid profile of polyketide-derived lipid-deficient mutants.

A. Strategy for sequential disruption of the biosynthetic pathways of SL, PAT/DAT and DIM and construction of lipid-deficient mutants.

B. TLC analysis of the lipid content of H37Rv ATCC and H37Rv Pasteur WT strains and polyketide-derived lipid deficient mutants. Lipids were radiolabelled with [1-<sup>14</sup>C]-propionate. The TLC was run in petroleum ether/diethylether (90/10, v/v), chloroform/methanol (99/1, v/v) or chloroform/methanol/water (60/16/2, v/v/v).

sequentially excised following expression of the  $\gamma\delta$  resolvase gene, leading to an unmarked mutation with a scar corresponding to one *res* sequence. Each mutant strain was tested by PCR using sets of primers designed to differentiate between strains with insertion of the disrupted allele by single cross over, illegitimate recombination or allelic exchange. A clone with the appropriate PCR profile was isolated and used for lipid analysis and subsequent gene disruption. The lipids produced by the various mutant strains were labelled with [1-<sup>14</sup>C] propionate and analysed by thin layer chromatography (Fig. 1B). The lipid profiles observed were consistent with the previously described functions of the various PKS: strains mutated for the *pks3/4* gene were deficient in DAT/PAT synthesis; strains with a disruption of *pks2* did not synthesize SL, and *ppsE* knock-

out abolished DIM formation. Analysis of the H37Rv Pasteur-derived *pks5* mutant failed to identify any lipid abnormality.

We evaluated the effect of cumulative lipid loss on the production of the remaining lipids of the outermost layer of the cell envelope. Exponentially growing strains producing either the three families of targeted lipids (DIM, SL, DAT/PAT), just two (DIM, SL) or none, were incubated with [1-<sup>14</sup>C] acetate or [1-<sup>14</sup>C] propionate for 24 h to label the total lipids or preferentially those containing methyl-branched fatty acids (notably DIM, SL and DAT/PAT). Lipids were then extracted and analysed by thin layer chromatography (Fig. S2). Spots corresponding to the major lipids of the outer layers of the mycobacterial cell envelope were quantified relative to total lipids and com-

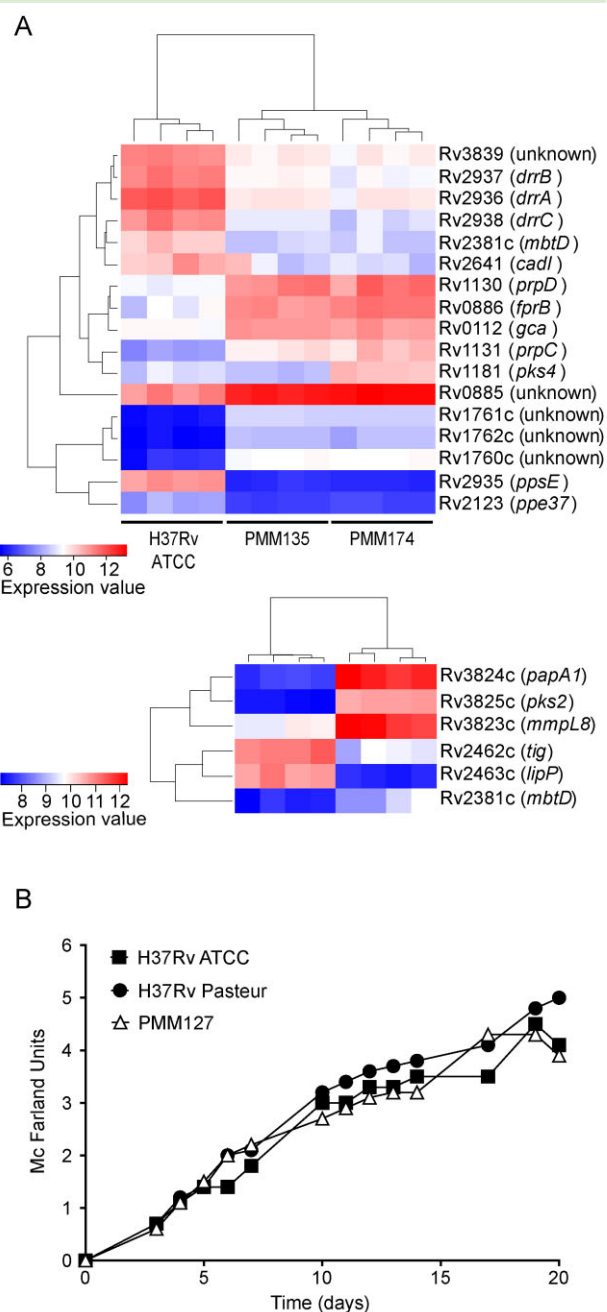


pared (see Fig. S2, table). No major change was observed in the lipid profile of strains deficient in the production of the different families of polyketide-derived lipids: there was no variation in the amount of DIM, SL, trehalose dimycolate (TDM) or trehalose monomycolate (TMM), associated with the loss of DAT/PAT (H37Rv ATCC versus Pasteur); nor in the amount of trehalose dimycolate (TDM) or trehalose monomycolate (TMM), in the strain deficient for DIM, SL and DAT/PAT synthesis (PMM127). However, the production of triacylglycerol (TAG) increased upon the loss of DIM, SL and DAT/PAT.

Furthermore, DIM-, DAT/PAT- and SL-deficient mutants were subjected to genome-wide transcriptomic analysis. As shown in Fig. 2A, only 17 genes were found to be differentially expressed in mutants deficient in either DIM (PMM135) or DIM and DAT/PAT (PMM174), and their wild-type (WT) counterpart (H37Rv ATCC); there was differential expression of only six genes for the pair PMM127 and WT H37Rv Pasteur. Impaired expression of eight genes, *ppsE*, *drvA*, *drvB*, *drvC*, *pk33/4*, *mmpL8*, *papA1* and *pk32* in the mutant strains was probably the direct result of the genetic disruption of *ppsE*, *pk33/4* and *pk32*.

Interestingly, two genes expressed at higher level in PMM135 and PMM174 mutants than in the WT strain, namely *Rv1130* and *Rv1131*, encode homologues to the methylcitrate synthase (PrpC) and the methylcitrate dehydratase (PrpD), respectively, in other mycobacteria including *M. smegmatis* and *M. marinum* (Upton and McKinney, 2007). These enzymes belong to the methylcitrate cycle and are involved in succinate formation from propionyl-CoA. This suggests that impaired utilization in the mutant strains of propionyl-CoA for the synthesis of the methyl-branched fatty acids present in DIM and DAT/PAT results in the induction of another pathway for propionyl-CoA metabolism, as previously suggested (Upton and McKinney, 2007; Rhee *et al.*, 2011). Another interesting result is the upregulation of the triacylglycerol synthase-encoding gene, *Rv1760* (Daniel *et al.*, 2004) in PMM135 and PMM174. This may account for the increased production of TAG by these mutant strains (Fig. 1B). The expression of the *mbtD* gene, involved in synthesis of the iron-chelating polyketide mycobactin, was downregulated in the mutant strains with reference to WT *Mtb*. The mycobactin synthesis pathway shares common substrates with the methyl-branched fatty acid synthesis pathway. Metabolic cross-talk between these two pathways has not previously been documented, but our results suggest that perturbation of polyketide-derived lipid synthesis may influence the formation of other polyketide-derived products, such as mycobactin. Finally, nine of the genes differentially expressed in PMM135, PMM174 and PMM127 strains are of unknown function.

Overall, the results of these transcriptome comparisons suggest that the loss of several polyketide-derived lipids



**Fig. 2.** Further characterization of lipid-deficient mutants. A. Hierarchical clustering of expression profiles of differentially expressed genes in H37Rv ATCC, PMM135 (DIM-) and PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) or H37Rv Pasteur (DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-). Red-blue display showing *Mtb* genes identified to be significantly and differentially expressed in the H37Rv ATCC, PMM135 and PMM174 or H37Rv Pasteur and PMM127 strains. Genes are ordered in rows, strains in columns (with four biological replicates per strain). Colouring indicates normalized expression values (Log<sub>2</sub>). B. *In vitro* growth of H37Rv ATCC, H37Rv Pasteur (DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) strains. Bacteria were grown in liquid Middlebrook 7H9 broth and bacterial growth was monitored by measuring the McFarland turbidity. Data are representative of two independent experiments.



**Table 1.** A collection of single and multiple lipid-deficient mutants and WT H37Rv strains.

	DIM	DAT/PAT	SL
H37Rv ATCC	+	+	+
H37Rv Pasteur	+	-	+
PMM57	+	-	-
PMM135	-	+	+
PMM174 228H	-	+	+
PMM56	-	-	+
PMM174	-	-	+
PMM127	-	-	-

does not cause substantial metabolic perturbations, at least in our *in vitro* growth conditions. This observation was confirmed by the comparison of the growth kinetics of mutants and control strains in standard growth medium. As depicted on Fig. 2B, there were no major differences in the growth behaviours of WT strains and the most-delipidated mutant, PMM127.

These results indicate that DAT/PAT, SL and DIM are individually and collectively dispensable for growth of *Mtb*. In addition, their loss is not associated with any major remodelling of the lipid composition of the mycobacterial cell envelope or of the cell metabolism.

#### *Polyketide-derived lipids collaborate to mediate the in vivo growth of Mtb*

We next examined the effects of the loss of several polyketide-derived lipids on the virulence of *Mtb*. We compared the ability of the WT strains and lipid-deficient mutants (Table 1) to replicate and survive in lungs and spleen of BALB/c mice after intranasal infection. For H37Rv ATCC, the numbers of colony-forming units (cfu) increased to 4–5 logs both in lungs and spleen on day 28 post infection (Fig. 3A and C). The bacillary load then stabilized in both organs, and the cfu counts were maintained until the end of the experiment on day 56. The three mutant strains deficient for DIM synthesis (Table 1: PMM135, PMM56 and PMM127) grew less well than the DIM-containing controls (Table 1: H37Rv ATCC, H37Rv Pasteur and PMM57) in both lungs (Fig. 3B versus A) and spleen (Fig. 3D versus C). This is consistent with the role reported for DIM in the replication of *Mtb in vivo* (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999). In contrast, loss of DAT/PAT or DAT/PAT plus SL did not affect the capacity of *Mtb* to multiply and persist; over a period of 56 days, the bacterial loads in both lungs and spleen of H37Rv ATCC, H37Rv Pasteur (DAT/PAT-) and PMM57 (SL-, DAT/PAT-) were comparable (Fig. 3A and C). These results agree with previous reports that deficiency in SL and/or DAT/PAT has no significant consequence for the virulence of *Mtb* (Rousseau *et al.*, 2003a,b; Chesne-Seck *et al.*, 2008). However, when we tested the effect of the loss of DAT/

PAT and SL combined with DIM deficiency, we observed a synergistic effect on the multiplication (Fig. 3B and D). Mice infected with PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) had significantly lower bacterial loads in their lungs than those infected with strain PMM135 (DIM-) (Fig. 3B). After 28 days of infection, the loads were about 50-fold lower for PMM56 than for PMM135. The DAT/PAT deficiency also further decreased the capacity of the DIM-less strain to persist in the spleen although the difference did not reach statistical significance (Fig. 3D). Similarly, the cfu counts in lungs of PMM127 (DIM-, SL-, DAT/PAT-) infected mice were significantly lower than those from PMM135 (DIM-) infected mice on days 14, 28 and 56 post infection (Fig. 3B). The differences between cfu counts for PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, SL-, DAT/PAT-) were significant only at day 56; this may have been due to the small difference in the sizes of the inocula (Fig. 3B). To confirm the effects of DAT/PAT deficiency in strains unable to synthesize DIM, we independently constructed a second strain (PMM174) containing mutations in *pkc3/4* and *ppsE* (Fig. 1A). We then compared the growth kinetics of PMM135 (DIM-) and PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) in mice (Fig. 4). The cfu counts in both lungs and spleen were lower for the double DIM and DAT/PAT deficient mutant than the single DIM deficient mutant on day 14 and at subsequent time-points, confirming the findings for PMM135/PMM56 pair. Transformation of PMM174 with a plasmid carrying a functional *pkc3/4* gene (pWM228H) and resuming the production of DAT/PAT (Fig. 1B), restored growth in lungs and spleen of infected mice to a level comparable to that of PMM135 (Fig. 4).

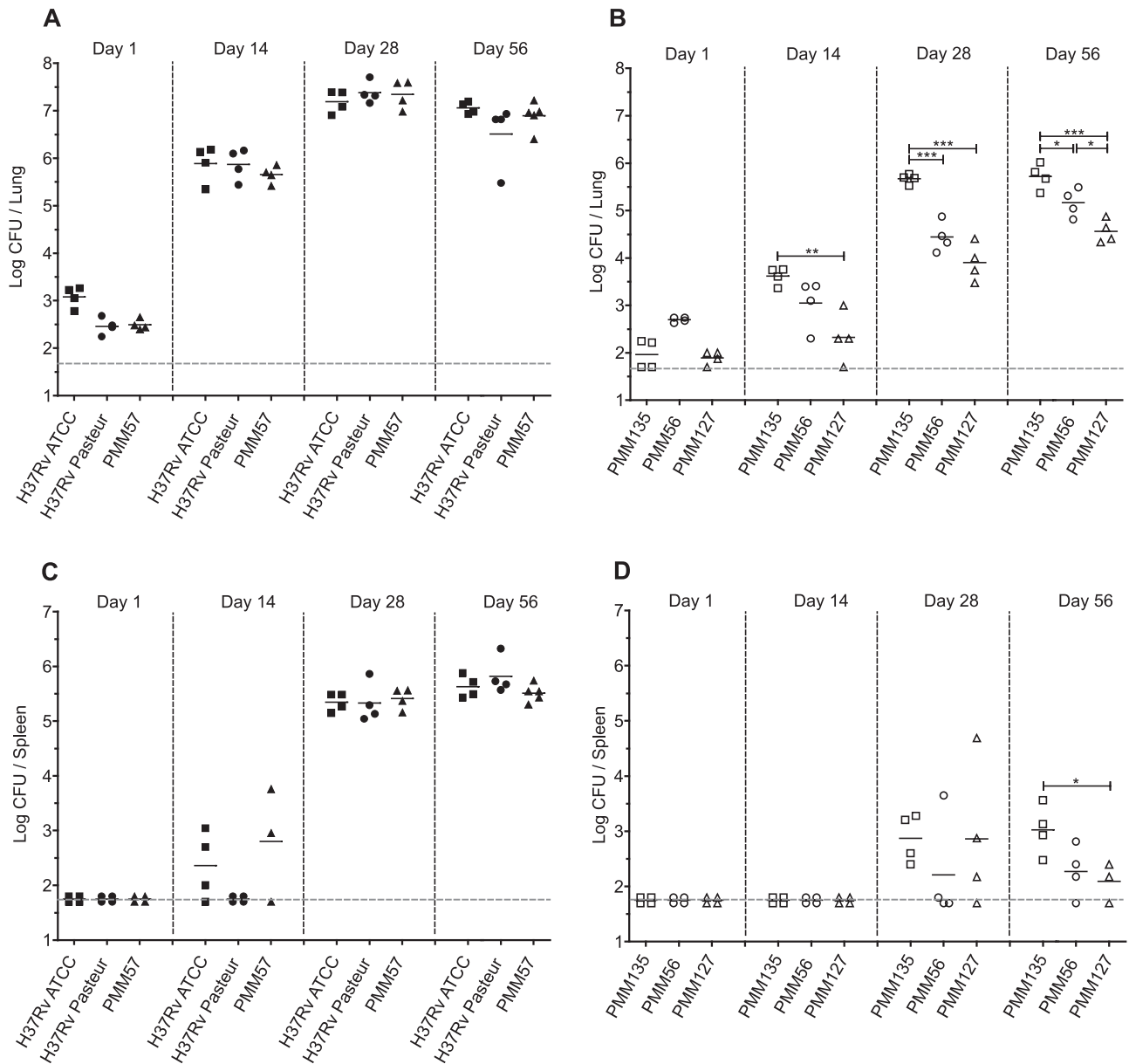
These findings indicate that DIM are dominant virulence factors, which mask the functions of other families of extractable lipids in the cell envelope. This makes it difficult to analyse the roles of these lipids *in vivo*. While the construction of lipid-deficient mutants in a DIM-less background allowed us to demonstrate that DAT/PAT are also important for the pathogenesis of tuberculosis by contributing to the growth of bacilli *in vivo*, they also show that SL play a minimal role, if not any.

#### *The loss of polyketide-derived lipids has no major impact on the functional integrity of the cell wall of Mtb*

One of the factors that contribute to the success of *Mtb* as a pathogen is its ability to resist the bactericidal defences of the host. This is in part due to the structural properties of the cell envelope that forms a low permeability barrier, preventing the penetration of toxic metabolites. We previously reported that DIM deficiency affects cell wall function (Camacho *et al.*, 2001), so we examined whether the most delipidated mutant, PMM127, is affected in its sensitivity to toxic compounds. When exposed to increasing concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), PMM127







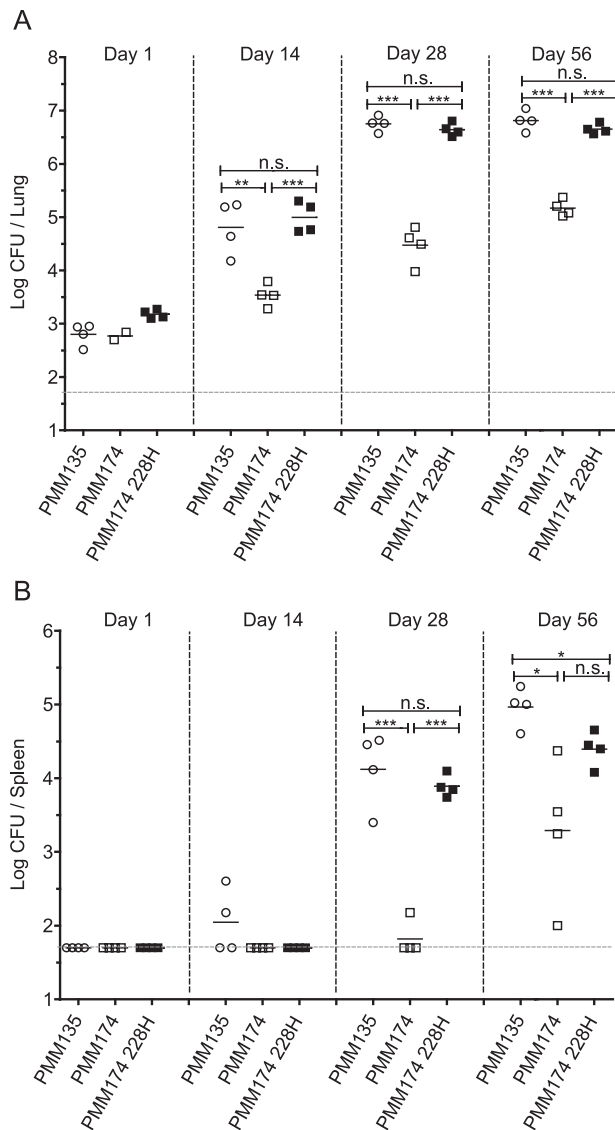
**Fig. 3.** Polyketide-derived lipid deficiency decreases *Mtb* growth in BALB/c mice. A collection of single and multiple lipid-deficient mutants and the WT H37Rv were used to infect mice and data are presented as: (A, C) DIM-containing strains (H37Rv ATCC, H37Rv Pasteur, PMM57) or (B, D) DIM-less mutants (PMM135, PMM56, PMM127). Numbers of cfu in (A, B) lungs and (C, D) spleen were determined on days 1, 14, 28 and 56 by plating dilutions of homogenized tissues on Middlebrook 7H11 agar containing OADC. The dashed line corresponds to the detection limit. When counts in infected mice were below the detection limit, the number of cfu scored was 50 cfu per organ (1.7 log). Values are means  $\pm$  SEM of cfu counts for four infected mice. The significance of differences between strains was evaluated: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ .

(DIM-, SL-, DAT/PAT-) as the WT H37Rv ATCC were killed in a dose-dependent manner between 8 and 24 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and there was no obvious difference between the relative sensitivities of the two strains (Fig. 5A). In addition, H37Rv ATCC and PMM127 (DIM-, SL-, DAT/PAT-) grew similarly when exposed to various pH *in vitro* (Fig. 5B), indicating that the lipid deficiency did not affect the acid tolerance of *Mtb*. H37Rv Pasteur and mutants defective

for the production of a more limited set of lipids were similarly tested and results were comparable with those for H37Rv ATCC and PMM127 (data not shown).

We also assessed whether polyketide-derived lipid loss impaired the bacterial susceptibility to the antibiotic, ceftriaxone, a  $\beta$ -lactam that targets enzymes involved in peptidoglycan assembly and located in the periplasm (Chambers *et al.*, 1995). Ceftriaxone killed both H37Rv





**Fig. 4.** DAT/PAT are required for *Mtb* growth in BALB/c mice. Mice were infected with either PMM135 (DIM-) (circles), PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) (open squares) or the complemented strain PMM174 228H (DIM-) (solid squares). The numbers of cfu in (A) lungs and (B) spleen were determined on days 1, 14, 28 and 56 by plating dilutions of homogenized tissues on Middlebrook 7H11 agar containing OADC. The dashed line corresponds to the detection limit. When counts in infected mice were below the detection limit, the number of cfu scored was 50 cfu per organ (1.7 log). Values are means  $\pm$  SEM of cfu counts for three or four infected mice. The significance of differences between strains was evaluated: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ .

ATCC and PMM127 (DIM-, SL-, DAT/PAT-) in a dose-dependent manner, but the mutant exhibited a greater susceptibility to the antibiotic (Fig. 5C). A threefold higher concentration of antibiotic was required for a similar decrease in cell viability of strains containing DIM than for DIM-less mutants. In contrast, no difference in ceftriaxone sensitivity was specifically associated with

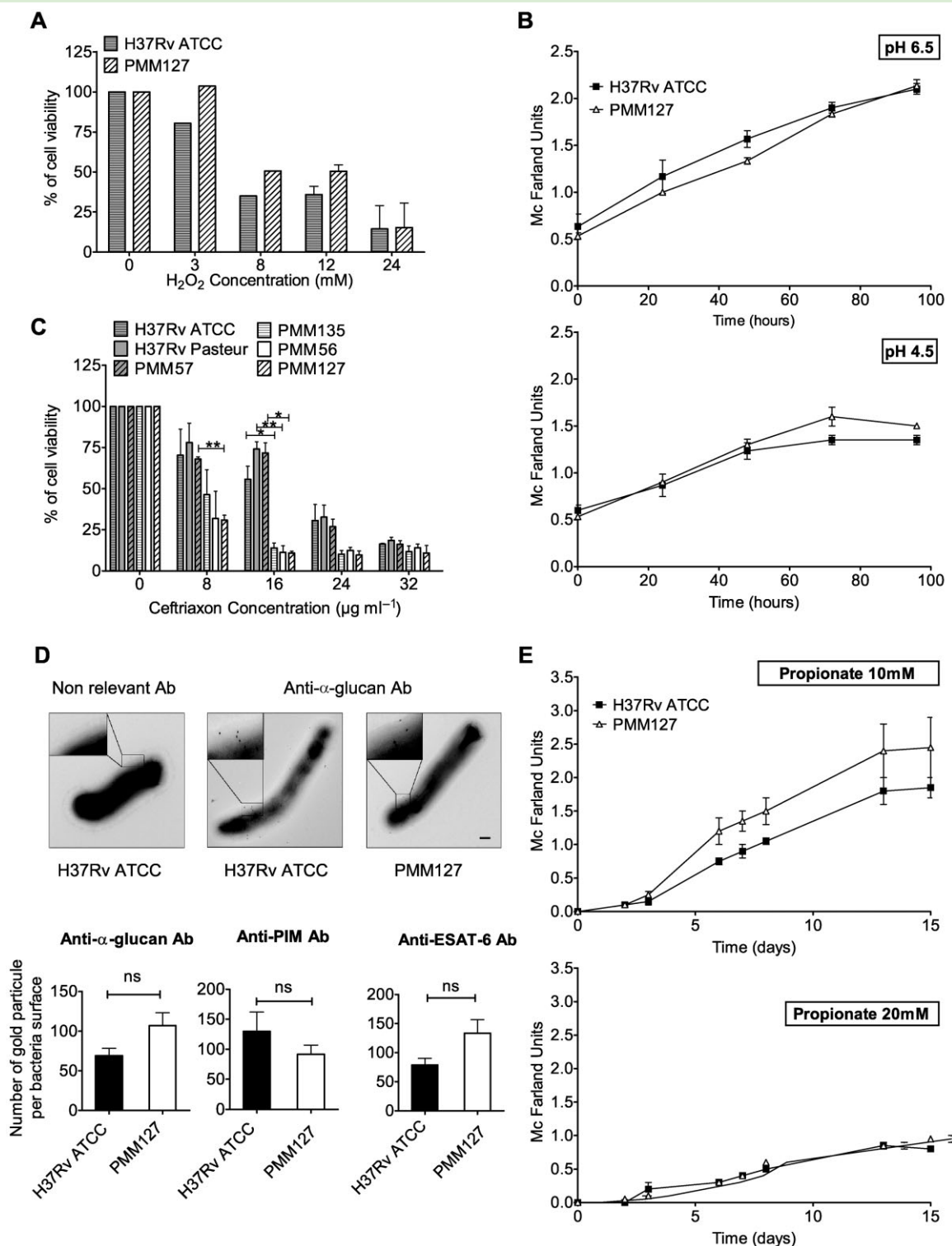
absence of SL and DAT/PAT irrespective of the DIM context (Fig. 5C). Therefore, the absence of DIM increased the sensitivity to a  $\beta$ -lactam antibiotic, consistent with a previous report indicating that DIM contribute to the permeability barrier formed by the cell envelope (Camacho *et al.*, 2001).

The outermost layer of the mycobacterial cell envelope is a capsular layer that contains polysaccharides, proteins and small amounts of lipids, some of which contribute to pathogenesis (for review, see Forrellad *et al.*, 2013). The suggestion that the absence of DAT/PAT affects the capsule attachment (Dubey *et al.*, 2002) prompted us to examine whether the absence of polyketide-derived lipids affected exposure at the bacterial surface of capsular molecules contributing to mycobacterial pathogenicity. We examined the surface expression of phosphatidylinositol mannosides (PIM),  $\alpha$ -glucan and the ESX-secreted protein (ESAT-6), which are all involved in pathogenesis (Forrellad *et al.*, 2013), by labelling intact bacteria with antisera and examination by immunogold-EM (Sani *et al.*, 2010). The bacterial surfaces of H37Rv ATCC and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) were labelled homogeneously with the monoclonal antibody specific for  $\alpha$ -glucan (Geurtsen *et al.*, 2009), and there was no quantitative difference in labelling between the two strains (Fig. 5D). Likewise, the lipid deficiency did not affect labelling by antibodies directed against an epitope of the glycolipid PIM<sub>6</sub> or the protein ESAT-6 (Fig. 5D). Importantly, the presence of the detergent Tween-80 in the bacterial culture medium, previously shown to remove the mycobacterial capsule (Sani *et al.*, 2010), decreased cell surface labelling by these antibodies (data not shown). Therefore, the absence of DIM or SL or DAT/PAT did not significantly affect PIM,  $\alpha$ -glucan, and ESAT-6 exposure on the mycobacterial cell surface. In all likelihood, these lipid deficiencies do not have major effects on the structure of the cell envelope.

Given that *Mtb* can adapt to metabolic stresses associated with the accumulation of potentially toxic intermediates of propionate by incorporating them into methyl-branched lipids of the cell wall (Lee *et al.*, 2013), we next examined whether the lipid-defective mutant PMM127 grew on propionate as the sole carbon source. Increasing the propionate concentration in the medium from 10 to 20 mM severely impaired the growth of H37Rv ATCC, as expected, and also of PMM127 (DIM-, SL- and DAT/PAT-) (Fig. 5E). However, no difference in sensitivity to propionate between the two strains was detected (Fig. 5E).

Taken together, these data argue against a model in which the *in vivo* attenuation of these mutants, deficient in lipids and notably in trehalose-derived lipids, is due to substantial abnormalities in the cell envelope structure or to greater sensitivity to propionate.





**Fig. 5.** Polyketide-derived lipid deficiency does not substantially affect the functional integrity of the cell wall of *Mtb* or its sensitivity to propionate. H37Rv ATCC and lipid-deficient mutants, including PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-), were grown in liquid Middlebrook 7H9 medium. The toxicities of (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (B) pH, (C) ceftriaxone and (E) sodium propionate were evaluated at various doses and times of incubation, by the MTT assay (A, C) or by measuring McFarland turbidity (B, E). Data from two independent experiments are reported as means ± SEM of duplicate or triplicate samples. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. (D) Exponentially growing H37Rv ATCC and PMM127 were fixed and probed with non-relevant Ab or Ab directed against α-glucan, PIM or ESAT 6. Bacteria were examined using a JEOL 1200 EX transmission electron microscope. The results are expressed as the number of gold beads per bacterial surface and values are means ± SEM for ten bacteria on two grids. Images were acquired using a digital camera. Bar: 100 nm.



### *Polyketide-derived lipids contribute to the outcome of Mtb in human macrophages*

The attenuation *in vivo* of the mutants deficient for multiple polyketide-derived lipid synthesis may reflect an altered interaction with human macrophages (hMDMs), the main target cell of *Mtb*. We therefore evaluated the consequences of polyketide-derived lipid deficiency on the capacity of *Mtb* to infect hMDMs. As expected, the percentage of infected cells after 1 h with the DIM-less mutant PMM56 [multiplicity of infection (moi) 10:1] was 25% lower than the WT strain H37Rv Pasteur ( $33 \pm 5$  versus  $43 \pm 4$  %,  $P < 0.03$ ,  $n = 3$ ) (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). By contrast, there was no difference between the three mutants PMM135 (DIM-), PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) in the ability to infect hMDMs, suggesting that SL and DAT/PAT do not contribute to macrophage infection (data not shown).

We then examined the consequences of lipid deficiency on the capacity of *Mtb* to grow within hMDMs. We previously reported that, at an moi of 10:1, there is no difference in bacterial loads between WT strain and DIM-less mutant after 96 h of infection (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). A recent study shows that hMDMs restrict *Mtb* growth more effectively at an moi of 1:1 than 10:1 (Welin *et al.*, 2011). For this reason, we revisited the role for DIM using a lower moi of 2:1, and followed the intracellular bacterial growth for 24 h and 168 h by counting the number of fluorescent bacteria per cell. Under these conditions, the bacterial count per macrophage at 168 h was significantly lower for DIM-less mutants (PMM135 and PMM56) than WT controls (H37Rv ATCC and H37Rv Pasteur) (Fig. 6A). Accordingly, we then tested the intracellular load for the PMM135 (DIM-), PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) mutant strains over time. Interestingly, while the three mutants grew at a similar rate for the first 48 h, the PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) replicated more slowly than PMM135 (DIM-) at a later time point (Fig. 6B). Of note, the replication of PMM127 (DIM-, SL-, DAT/PAT-) in macrophages was consistently slightly slower, albeit non-significantly, than that of PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) (Fig. 6B). To confirm the phenotype associated with DAT/PAT deficiency, we performed additional experiments with PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) and the *pk3/4*-complemented strain called PMM174 228H. Similar to PMM56 (DIM-, DAT/PAT-), the growth of PMM174 was slower than that of PMM135 (DIM-) (Fig. 6C), and complementation with a functional copy of *pk3/4* restored both the production of DAT/PAT (Fig. 1B) and the intracellular growth capacity approaching that of PMM135 (Fig. 6C). The loss of DIM (Fig. 6D) and DAT/PAT (Fig. 6E–F) decreased simultaneously the percentage of infected macrophages at 168 or 144 h, strongly suggest-

ing that lipid deficiency affects also the capacity of *Mtb* to propagate infection into new macrophages. Of note, H37Rv ATCC and the PMM135 and PMM174 mutants induced a weak cell death, which averaged 2–4% of total macrophages (Fig. S3B), as evaluated by using 7-actinomycin D (7-AAD) to assess cell membrane permeability (Fig. S3A). However, when data are expressed as the percentage of 7-AAD-positive cells among GFP-positive macrophages (i.e. infected cells), H37Rv ATCC induced significantly higher cell death than PMM135 and PMM174 (Fig. S3C). This makes it likely that the observed differences in percentage of infected macrophages were due to variability in cell death.

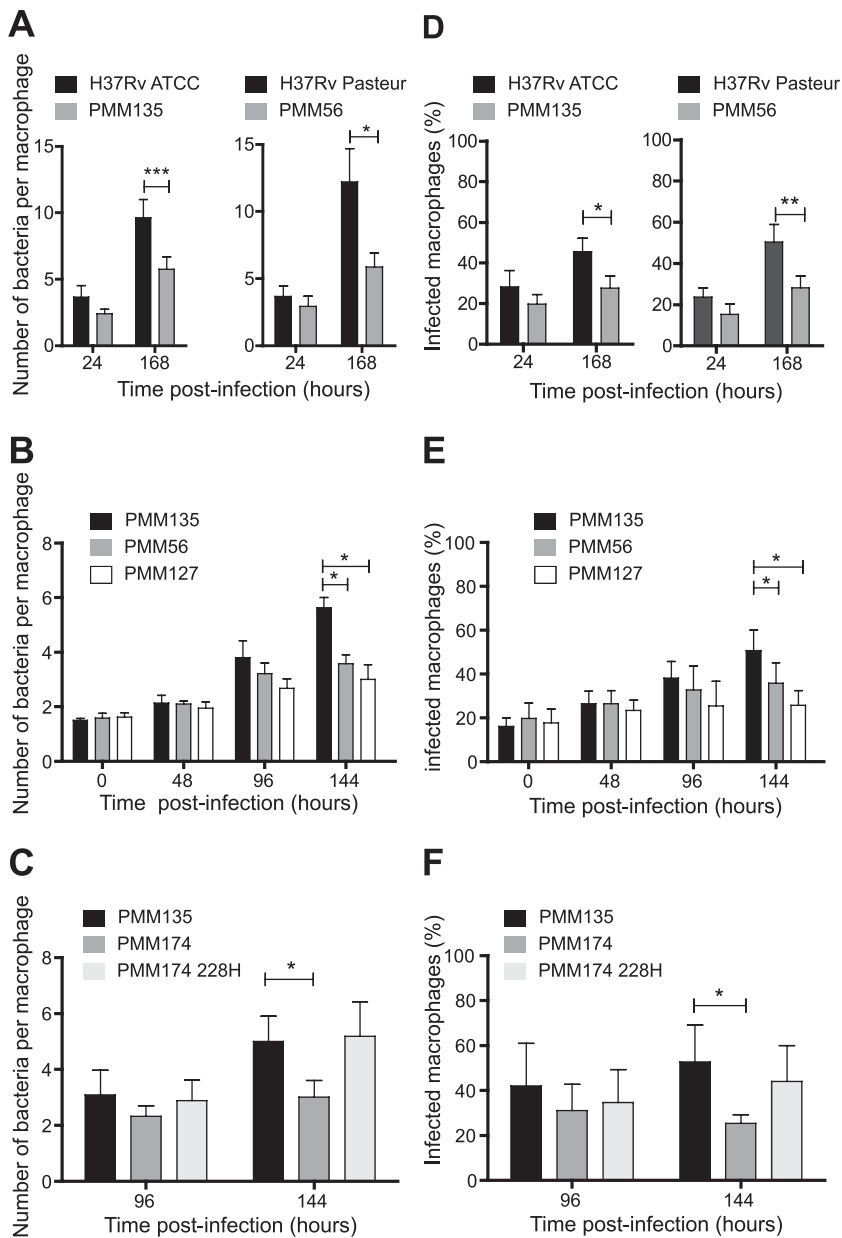
This set of data demonstrates that DIM and DAT/PAT are important for the outcome of *Mtb* in hMDMs. A similar trend was observed for SL but the effect was very modest and not statistically significant. However, this observation is consistent with the slight attenuation observed in mice for the PMM127 (DIM-, SL-, DAT/PAT-) mutant relative to PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) (Fig. 3B).

### *Polyketide-derived lipids are required to drive Mtb in a poorly acidic phagosome*

DIM contribute to the control of phagosomal pH (Fig. S4) consistent with our previous report (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009) and with a mutant library screening approach, which previously identified mutations in DIM biosynthesis genes as being associated with failure to block phagosomal acidification (Pethe *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005; Brodin *et al.*, 2010). Interestingly, none of these genetic screens identified mutations in DAT/PAT or SL biosynthetic genes. However, Brodin *et al.* reported that mutations affecting the balance of SL and DAT synthesis altered the capacity of *Mtb* to remodel its phagosome (Brodin *et al.*, 2010). To determine if the advantage conferred by polyketide-derived lipids to bacterial growth is associated with control of phagosomal pH, hMDMs were infected with our single and multiple mutants. The numbers of bacilli colocalizing with the acidotropic dye, LysoTracker, were counted. A large proportion of phagosomes containing PMM135 (DIM-) colocalized with LysoTracker during the early stage of infection (Fig. 7A), consistent with previous finding (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009); this proportion then decreased gradually over the following 144 h. In comparison, the two double DIM and DAT/PAT-deficient mutants, PMM56 and PMM174, accumulated in phagosomes that were significantly more frequently labelled with LysoTracker (Fig. 7A and B), and this phenotype was lost when PMM174 was complemented with a functional *pk3/4* gene (Fig. 7B). The triple lipid-deficient mutant PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) also accumulated in phagosomes that were more acid than those containing







**Fig. 6.** The loss of polyketide-derived lipids impairs *Mtb* growth in human macrophages. hMDMs were put in contact for 1 h with (A, D) H37Rv ATCC or H37Rv Pasteur and the corresponding DIM-less mutants, (B, E) PMM135 (DIM-), PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-), or (C, F) PMM135, PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) and the complemented strain PMM174 228H (DIM-) at an moi of 2:1. Once infected, the cells were washed and further incubated in the presence of serum. At various times thereafter, cells were fixed and processed to quantify the number of bacteria per macrophage (A–C) and the percentage of infected cells (D–F). For each set of conditions, duplicate experiments were performed, and at least 100 cells were counted per slide. The values reported are means  $\pm$  SEM of three to eight independent experiments. The significance of differences between strains was evaluated. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ .

PMM135 (DIM-) (Fig. 7A). A larger, but non-significant, proportion of PMM127 than PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) was also found in LysoTracker-positive phagosomes.

Infected hMDMs were immunostained for the vacuolar type proton-transporting ATPase ( $H^+$ -ATPase), an enzyme contributing to phagosomal acidification (Lukacs *et al.*, 1990), and for CD63, a marker of fusion with late endosomes/lysosomes (Astarie-Dequeker *et al.*, 2002). The greater accumulation of PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) in acidified phagosomes than PMM135 (DIM-) (Fig. 7B) correlated with more  $H^+$ -ATPase in the phagosomal membrane (Fig. 7C); again, this phenotype was reversed in the complemented strain PMM174 228H (Fig. 7C). In

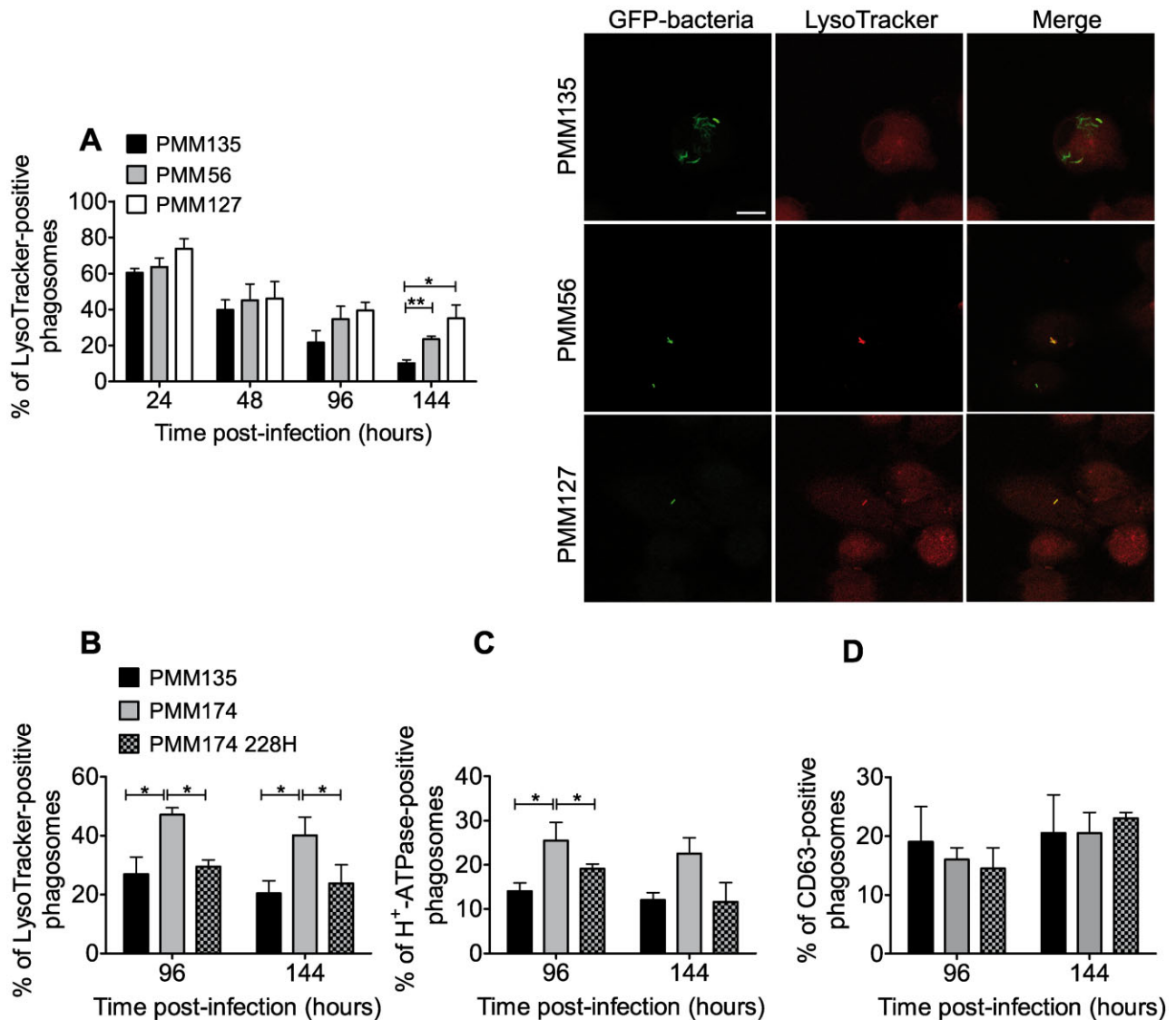
contrast, PMM135 and PMM174 similarly colocalized with CD63 (Fig. 7D).

Our data strongly suggest that DAT/PAT share with DIM the capacity to prevent the recruitment of the  $H^+$ -ATPase to the phagosomal membrane and thereby inhibit the acidification of the bacterial environment.

*Polyketide-derived lipids contribute to the intracellular growth of Mtb by preventing phagosome acidification*

We had established that mutants deficient in DIM or DAT/PAT synthesis exhibited a growth defect and a higher association with LysoTracker. We therefore investigated





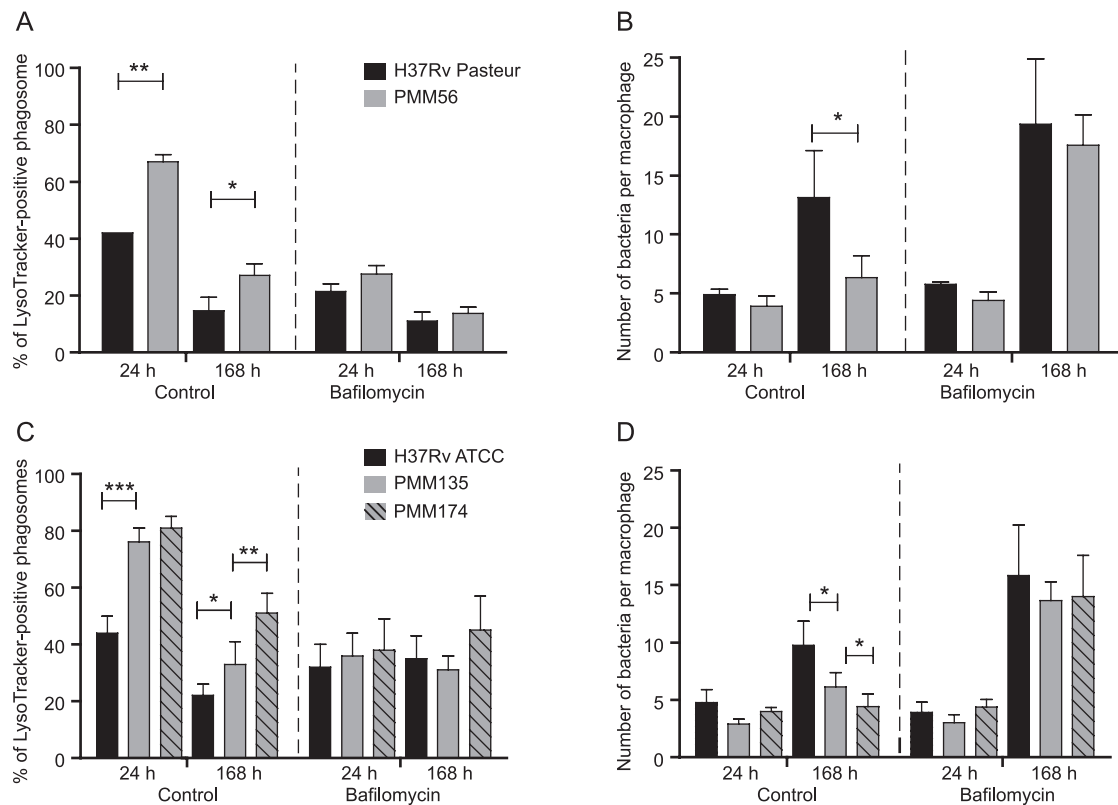
**Fig. 7.** Polyketide-derived lipid deficiency induces acidification of *Mtb*-containing phagosomes. hMDMs were infected for 1 h with GFP-expressing DIM-less mutants deficient in one or more lipids at a moi of 2:1: (A) PMM135 (DIM-), PMM56 (DIM-, DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-) or (B–D) PMM135 (DIM-), PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) and the complemented strain PMM174 228H (DIM-). At various times after infection, (A, B) cells were incubated with LysoTracker for 1 h, fixed and processed for microscopy or (C, D) were fixed, permeabilized, and immunostained with polyclonal anti-serum against H<sup>+</sup>-ATPase (C) or MAb against CD63 (D) and processed for fluorescence microscopy. (A) A representative micrograph of infected cells collected at 144 h and analysed by confocal microscopy. Bar: 11  $\mu$ m. For each marker, 100 phagosomes from at least 10 different fields were counted in duplicate. The values reported are means  $\pm$  SEM of three experiments. The significance of differences between strains was evaluated. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

whether the absence of lipid-dependent manipulation of phagosomal pH was responsible for the intracellular growth defect. We tested if the prevention of phagosomal acidification by the H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor bafilomycin A1 (Drose and Altendorf, 1997) rescued the growth defect associated with DIM or DAT/PAT deficiency. Pretreatment with bafilomycin A1 reduced the early acidification of phagosomes containing H37Rv Pasteur and PMM56 (DIM-), and abolished the difference between their percentage of lysotracker-positive phagosomes at 24 and

168 h post infection (Fig. 8A). Interestingly, the bacterial growth at 168 h was greater in the presence than absence of bafilomycin A1 for both strains; furthermore, the growth defect in untreated macrophages of PMM56 (DIM-) with reference to the DIM-producing strain H37Rv Pasteur was abolished by bafilomycin A1 (Fig. 8B). Similar results were obtained for PMM135 (DIM-) and PMM174 (DIM-, DAT/PAT-) (Fig. 8C and D).

Therefore, early inhibition of H<sup>+</sup>-ATPase activity prevents acidification of phagosomes and rescues the





**Fig. 8.** Inhibition of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase by bafilomycin A1 prevented phagosomal acidification and rescued the growth defect associated with polyketide-derived lipid deficiency. hMDMs were pretreated for 1 h with 100 nM bafilomycin A1 or vehicle control (DMSO) and for the first 24 h after infection. Cells were then infected with GFP-expressing (A, B) H37Rv Pasteur and PMM56, or (C, D) H37Rv ATCC, PMM135 and PMM174, at an moi of 10:1 for 24 h infection or 2:1 for 168 h. Cells collected after 24 or 168 h were incubated, or not with LysoTracker for 1 h, fixed and processed to quantify (A, C) the number of LysoTracker-positive phagosomes, or (B, D) the number of bacteria per macrophage. 100 phagosomes from at least 10 different fields were counted in duplicate (A, C) and at least 100 cells were counted per slide (B, D). The values reported are means ± SEM of three to four experiments performed in duplicate. The significance of the effect was assessed by comparing data for lipid-deficient mutants to those for parental control strains: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.005.

growth defects of DIM and DAT/PAT-deficient mutants. This strongly suggests that DAT/PAT and DIM contribute to the intracellular growth of *Mtb* by provoking an exclusion of the H<sup>+</sup>-ATPase from the phagosome membrane, thereby providing a non-acidified compartment for bacterial proliferation.

## Discussion

For years, the discrepancies between *in vitro* and *in vivo* data have long interfered with our understanding of the role of polyketide-derived lipids in *Mtb* pathogenicity. Indeed, the biological activities described for polyketide-derived lipids were consistent with their contribution to the interaction between *Mtb* and its host and to its virulence: for example, SL can modulate host cell responses, including phagosome–lysosome fusion and cytokine production (Goren *et al.*, 1976; Pabst *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1988; Brozna *et al.*, 1991), and DAT/PAT can strongly inhibit the proliferation of T cells (Saavedra *et al.*, 2001), and the production of pro-inflammatory cytokines (Lee *et al.*,

2007). However, investigations *in vivo* showing no phenotype for *Mtb* mutants deficient in the synthesis of SL or DAT/PAT, or both (Converse *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2003a,b; Chesne-Seck *et al.*, 2008) did not support a role in pathogenesis of *Mtb*. In this study, we established that: (i) polyketide-derived lipids from *Mtb* (including, SL, DAT/PAT and DIM) have overlapping functions during the interaction between the bacteria and the host, thereby explaining, at least in part, the absence of phenotype of SL and/or DAT/PAT deficient mutants; (ii) these molecules contribute to *Mtb* fitness during the acute phase of the infection, probably through phagosome remodelling and blockade of H<sup>+</sup>-ATPase recruitment; and (iii) the effects of DIM are dominant over those of SL and DAT/PAT. Therefore, our findings reconcile previously *in vitro* and *in vivo* data for these molecules and substantially advance our understanding of the role of polyketide-derived lipids as virulence factors of *Mtb*.

It is emerging that functional overlap, redundancy and buffering relationships are major features of biological processes where they may confer robustness to systems



(Hartman *et al.*, 2001). The importance of these phenomena has been illustrated in host/pathogen interactions (Kvitko *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2011; 2012). For instance, the intracellular bacterial pathogen, *Legionella pneumophila*, may tolerate deletion of 31% of its effectors, known to be translocated into host cell during infection, without being significantly affected for its capacity to invade and replicate within mouse macrophages (O'Connor *et al.*, 2011). Functional overlap of this type may reinforce the robustness of pathogens and thereby allows them to deal with genetic variation of the putative host and to expand the repertoire of targetable host cells (Kvitko *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2012). Our results with *Mtb* establish that there is such functional overlap among polyketide-derived lipids exhibiting related (SL and DAT/PAT) or unrelated (DIM versus SL or DAT/PAT) structures. We found that all these compounds contribute to remodelling the *Mtb*-containing phagosome and to prevent its acidification. The lack of attenuation phenotype associated with the loss of SL or DAT/PAT in animal and cellular models was initially interpreted as indicating that these molecules had no role in pathogenicity or that their activity was restricted to human cells (Converse *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2003a,b; Chesne-Seck *et al.*, 2008). However, we believe that the analysis of the roles of DAT/PAT and SL in virulence using lipid-deficient mutants was uninformative because of the presence of DIM, which exert a functionally dominant effect. Our study in mice confirmed that DIM-deficiency caused a reduction of about 2-log in bacterial titres in lungs and spleen; the loss of DAT/PAT and/or SL alone had no effect. However, the absence of DIM and both DAT/PAT and SL led to a more severely attenuated phenotype. The effect could be mostly attributed to DAT/PAT because, although SL deficiency tended to impair bacterial growth in DIM-less background in all cellular and animal models used, the differences were not statistically significant. These observations contradict those described recently by Gillmore *et al.*, whose study reported that the loss of SL-1 in an *stfO*-deleted mutant slightly enhanced *Mtb* survival in human macrophages (Gillmore *et al.*, 2012). The authors ascribe this effect to a decrease in mutant sensitivity to a human cationic antimicrobial peptide (Gillmore *et al.*, 2012). At this point, we do not have an explanation for the discrepancy between these results.

Cell envelope lipids could contribute to the pathogenesis of *Mtb* in several ways: they may have a structural role in the bacterial cell envelope; a 'sink' activity important for sequestering toxic compounds produced during intracellular growth; or induce modulatory effects of the host immunity. These various possibilities are not mutually exclusive. We confirm here that DIM have a role in the permeability of the envelope (Camacho *et al.*, 2001), and DIM are also partners in the interaction with the host

(Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). A *pks3/4* mutant has been reported to have a severely affected morphology (Dubey *et al.*, 2002) and to be more efficient than the WT strain for infecting phagocytic and non-phagocytic cells (Rousseau *et al.*, 2003a). This implicates trehalose-containing lipids in maintaining the integrity of the cell envelope structure. However, our data do not support this conclusion and provide compelling evidence that deficiency in trehalose-containing lipids does not cause major modifications of the cell envelope structure. Indeed, mutants defective in SL or DAT/PAT alone or both in combination displayed the same sensitivity to toxic compounds including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the antibiotic, ceftriaxone. The absence of DIM increased the sensitivity to ceftriaxone, but additional removal of DAT/PAT and SL had no additional effect. The absence of DIM, DAT/PAT and SL did not affect either the arrangement of components exposed on the cell envelope surface, such as PIM6, ESAT-6 and  $\alpha$ -glucan, all involved in *Mtb*-host interactions (Forrellad *et al.*, 2013).

Methyl-branched fatty acid anabolism was proposed to relieve the toxicity of propionate, which accumulates during growth on odd-chain fatty acids as a carbon source (Jain *et al.*, 2007; Upton and McKinney, 2007). Our data strongly suggest that the alternative mechanisms for alleviating this metabolic pressure are sufficiently effective for the loss of methyl-branched fatty acid biosynthetic pathways to be tolerated. Indeed, the (DIM, DAT/PAT, SL)-deficient mutant and the control strain, H37Rv ATCC, grew similarly on various propionate concentrations. Consistent with this idea, our transcriptome analysis revealed that the genes *prpC* and *prpD*, encoding the first two specific steps of methylcitrate cycle, are upregulated in DIM and DIM, DAT/PAT mutants. Lee *et al.* demonstrated that shutting down the methylcitrate cycle makes *Mtb* dependent on either methyl-branched fatty acid synthesis or the methylmalonyl pathway for propionyl-CoA detoxification (Lee *et al.*, 2013). Our results do not contradict this conclusion but indicate that the methylcitrate cycle may compensate for the loss of the main PKSs utilizing propionyl-CoA. These findings illustrate a buffering relationship between these pathways for a key process of *Mtb* biology.

Our data are consistent with a role of polyketide-derived lipids as effectors of *Mtb* virulence. We establish that these molecules are essential for *Mtb* to control the intraphagosomal pH and as a consequence to survive and multiply in human macrophages. The absence of DIM drove bacteria into phagosomes that accumulated an acidotropic dye early in infection (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009) and impaired growth (present study). These phenotypes were exacerbated by the additional removal of DAT/PAT and SL. The difference in intracellular survival between lipid-deficient mutants and control strains cannot be attributed to different intrinsic sensitivities to the pH





encountered in phagosomes because they were found to be equally acid-sensitive *in vitro*. Consistent with this, searches for *Mtb* mutants more sensitive to acidic pH failed to identify any mutation in DIM, SL or DAT/PAT biosynthetic pathways (Vandal *et al.*, 2008). We suggest that polyketide-derived lipids participate in the intracellular growth of *Mtb* by blocking phagosome acidification. Indeed, blocking the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase with bafilomycin A1 prior to and throughout the first 24 h of infection, dramatically impairs the early and/or late acidification of phagosomes containing DIM- or DAT/PAT-less mutants and simultaneously rescued their intracellular growth defect.

How these lipids control the phagosomal pH remains to be established. Following the contact between *Mtb* and phagocytes, the biophysical properties of the host cell membrane change, probably because of the insertion of DIM into this structure (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). We are currently investigating whether this mechanism is responsible for H<sup>+</sup>-ATPase exclusion and whether other polyketide-derived lipids, such as SL and DAT/PAT, act in the same way. Interestingly, our collection of multiple deletion mutants and our results provide the microbiological tools and conceptual framework for deciphering, in greater detail, the biological activities of the polyketide-derived lipids in the *Mtb* cell envelope.

## Experimental procedures

### Antibodies, fluorescent probes and reagents

The mouse antibody (MAb) anti-PIM<sub>6</sub> and anti-capsule monoclonal antibodies were generous gifts from B. Appelmek (Amsterdam, The Netherlands). MAb against ESAT-6 was from R. Brosch (Institut Pasteur, Paris, France). Rabbit polyclonal anti-serum against the human H<sup>+</sup>-ATPase proton pump and mouse monoclonal anti-body against human CD63 were purchased from Synaptic Systems (Göttingen, Germany) and Caltag Laboratories (Burlingame, USA) respectively. Anti-mycobacteria rabbit serum (1:50) was obtained as previously described (N'Diaye *et al.*, 1998). Secondary antibodies and Lyso-Tracker Red DND-99 were purchased from Molecular Probes (Eugene, USA). Goat anti-MAb labelled with gold beads was purchased from Aurion (Wageningen, The Netherlands).

Except when specified in the text, other chemicals were obtained from Sigma Chemical (USA).

### Bacterial strains and growth conditions

*Mtb* H37Rv ATCC (ATCC), *Mtb* H37Rv Pasteur (the sequenced strain from Institut Pasteur) and lipid-deficient mutants (Table S1 and Fig. 1A) were cultured at 37°C in liquid Middlebrook 7H9 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with ADC (Becton Dickinson, Sparks, USA) or on Middlebrook 7H11 agar containing OADC (ADC and 0.005% oleic acid) (Becton Dickinson). Kanamycin, hygromycin and Tween-80 were added as required at concentrations of 40 µg ml<sup>-1</sup>, 50 µg ml<sup>-1</sup> and 0.05% (v/v) respectively.

### Construction of *M. tuberculosis* mutant strains

The *Mtb* mutants were constructed either using the thermosensitive counterselectable (*ts/sacB*) plasmid pPR27 (Pelicic *et al.*, 1997) or the thermosensitive bacteriophage phAE87 as described by Bardarov *et al.* (2002). The main features of the strains and plasmids used are summarized in Table S1. Briefly, an approximately 2 kb DNA fragment containing part of the targeted gene was amplified by PCR from genomic DNA using specific oligonucleotides (Table S2) and inserted into a cloning vector. An internal fragment was excised using restriction enzymes and substituted by the *res-Ωkm-res* cassette (Malaga *et al.*, 2003), generating an allelic exchange substrate (AES) composed of the Km cassette flanked by two arms of approximately 1 kb specific of the targeted gene. This AES was inserted either into the *ts/sacB* plasmid pPR27 or into the bacteriophage phAE87. The resulting plasmid or bacteriophage was transferred into the recipient *M. tuberculosis* strain, and allelic exchange mutants were selected on 7H11 agar plates as described previously (Pelicic *et al.*, 1997; Bardarov *et al.*, 2002).

Clones were analysed with primers *res1* and *res2*, specific for the Km cassette, and primers located within the small internal DNA fragment substituted by the Km cassette in the AES and oligonucleotides hybridizing to regions located outside the AES. An example of the mutation strategy and genetic characterization of the mutants is provided in Fig. S1. One clone giving the pattern corresponding to allelic exchange was isolated and retained for further analysis.

The *res-Ωkm-res* cassette was recovered by transferring pWM19, containing the resolvase gene of transposon γδ, into the Km-resistant mutant and by screening for Km<sup>r</sup> clones among transformants (as described in Malaga *et al.*, 2003). Km<sup>r</sup> clones were tested by PCR, as illustrated in Fig. S1, and for each construct, one clone displaying a PCR profile consistent with excision of the *res-Ωkm-res* cassette was isolated and retained for further analysis.

### Complementation of *M. tuberculosis pks3/4* mutants

The *pks3/4* gene is organized as an operon with the downstream genes *papA3* and *mmpL10*. Therefore, we cloned these three genes to complement the *pks3/4* gene disruption. A 11 kb DNA region covering these three genes was assembled from four smaller DNA fragments obtained by PCR amplification (using primers 3A-3B, 3C-3D, 3E-10B and 10A-10C) with H37Rv ATCC genomic DNA as the template. This piece of DNA was inserted into a derivative of pMV361, from which the original *phsp60* promoter had been deleted (Stover *et al.*, 1991), and a hygromycin resistance gene was inserted. The resulting plasmid was named pWM228H.

### Lipid extraction and analysis

Each *Mtb* strain was grown to exponential growth phase in 10 ml 7H9 liquid medium supplemented with ADC and 0.05% Tween, and labelled by incubation with 0.4 µCi ml<sup>-1</sup> [1-<sup>14</sup>C] propionate (specific activity of 54 Ci mol<sup>-1</sup>) or 0.4 µCi ml<sup>-1</sup> [1-<sup>14</sup>C] acetate (specific activity of 56 Ci mol<sup>-1</sup>) for 24 h. Lipids were extracted as described elsewhere (Constant *et al.*, 2002). The lipid profiles were compared by spotting equivalent amounts of crude extracts



(resuspended in  $\text{CHCl}_3$  at a final concentration of  $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) on TLC plates, which were then run in various solvent systems [petroleum ether/diethyl ether 9:1 (v/v) for DIM;  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  60:16:2 (v/v/v) for DAT and SL;  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  99:1 (v/v) for PAT]. Labelled lipids were visualized and analysed with a Typhoon Phosphorimager (Amersham Biosciences). Counts per minute corresponding to each lipid spot were quantified and divided by the total amount of radioactivity in the corresponding lane to give the relative amount of the analysed lipid.

### Microarray hybridization and data analysis

Mycobacteria were grown to mid-log phase in liquid Middlebrook 7H9-ADC medium containing 0.02% Tween-80. Samples were centrifuged for 5 min at  $2500 g$ , and the bacteria resuspended in lysis buffer (RNeasy mini kit, Qiagen) containing 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, and lysed using a bead beater. Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit, and DNA contaminants were removed using DNase 1 (Ambion, Austin, TX, USA). The amount and purity of RNA was measured using a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific); RNA integrity was assessed using a 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France) and the RNA Nano 6000 kit (Agilent Technologies). Only samples showing RIN-values  $\geq 9$  were used.

Double-stranded cDNA was synthesized from  $2 \mu\text{g}$  of total RNA using random primers and the cDNA SuperScript One-Cycle cDNA synthesis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. cDNA was labelled with Cy3 using Cy3-dCTP and the One-Color DNA labelling kit (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA).

Gene expression was analysed using a  $12 \times 135\text{K}$  custom-designed microarray (Roche NimbleGen) covering 3951 open reading frames of *Mtb* H37Rv with six 60-mer oligonucleotide probes per gene. Each hybridization mixture contained  $2 \mu\text{g}$  Cy3-cDNA and the hybridization cocktail of the Hybridization kit (Roche NimbleGen). Samples were incubated for 5 min at  $65^\circ\text{C}$  and 5 min at  $42^\circ\text{C}$  prior to loading. Hybridization was performed for 17 h at  $42^\circ\text{C}$  using the Roche NimbleGen Hybridization System 4. Microarrays were washed according to the Roche NimbleGen Arrays User's Guide and scanned using an MS200 microarray scanner (Roche NimbleGen). The resulting xys files, which were extracted using Deva Software (Roche NimbleGen), were imported into R (Bioconductor). The microarray datasets were corrected for background and normalized by summarizing the intensity values of the probes in a probe set using the robust multi-array average (RMA) algorithm. Genes were considered to be significantly differentially expressed if they displayed at least a  $1.5 \text{ Log}_2$ -fold difference in expression ratio between conditions and an adjusted *P*-value of  $\leq 0.05$ .

### Immunogold-electron microscopy

Bacteria were grown and fixed in paraformaldehyde (PFA) and glutaraldehyde (Delta Microscopies, Ayguevives, France) as described previously (Sani *et al.*, 2010), and incubated for 15 min with nickel coated formvar/carbon grids (Delta Microscopies). Grids were then floated on drops of PBS to wash off the overflow, and aldehyde groups were neutralized by incubating twice for 15 min with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Grids were then blocked for 15 min with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) (Euromedex,

Souffelweyersheim, France), and incubated first with the primary MAb directed against PIM<sub>6</sub> (1:150), capsular  $\alpha$ -glucan (1:5) or ESAT6 (1:500) and next with the secondary goat anti-MAb labelled with gold beads (1/50). Grids were examined with a JEOL 1200 EX transmission electron microscope (JEOL, Peabody, MA, USA) at 80 kV and the number of gold beads per bacterial surface was determined. Images were acquired using a digital camera (AMT, Woburn, MA, USA) at 40–300 000 $\times$  magnification.

### Bacterial sensitivity to oxygen radicals and ceftriaxone

Bacterial sensitivity was assessed using the dimethylthiazolyl diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as described previously (Mosmann, 1983). A suspension of exponentially growing bacteria was adjusted to a final optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) of 0.05 and aliquot was added to wells in microtitre plates and incubated for 6 days at  $37^\circ\text{C}$  each of a series of concentrations of hydrogen peroxide (up to 24 mM) or ceftriaxone (up to  $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Triplicate wells were used for each experimental condition. MTT (Sigma, St Louis, MO) was then added to each well and incubation continued at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h. A lysis buffer containing 20% sodium dodecyl sulfate in 50% *N,N*-dimethylformamide (pH 4.7) was then added, and the plates were incubated overnight. Cell viability was determined by measuring absorbance at a wavelength of 600 nm using a microplate reader (Asys Expert Plus, Biochrom, Cambridge, UK). Results are reported as percentages of viable cells for treated and untreated bacteria.

### Bacterial growth assays under various conditions of pH or various propionate concentrations

For each assay, bacteria were grown in 7H9 liquid medium supplemented with ADC to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.5. To test the effect of pH, the cultures were diluted 1 in 10 in 5 ml 7H9 medium containing ADC, previously adjusted to a pH in the range 6.5 to 4.5 with 37% hydrochloric acid, and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for up to 4 days. To test for propionate toxicity, cultures were diluted (1 in 100) in 5 ml 7H9 medium supplemented with 0.5% albumin, 0.085% NaCl, 0.05% Tween 80, and 10 mM or 20 mM sodium propionate as the carbon source, and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for up to 15 days. Bacterial growth was monitored by measuring the McFarland turbidity. Duplicate flasks were used for each experimental condition.

### Mouse infection

Animal studies were conducted following the CNRS guidelines for housing and care of laboratory animals. All protocols were reviewed and approved by the relevant ethics committee (Comité d'Éthique Midi-Pyrénées; reference MP/10/12/02/11). Female BALB/c mice, 7 to 8 weeks old, were purchased from Centre d'Élevage Janvier (Le Genest St Isle, France) and housed in the IPBS ASB3 animal facilities. Each mouse was infected with approximately  $2 \times 10^2$  bacteria in PBS via the intranasal route. At the indicated times post infection, bacterial load was evaluated in spleen and lungs as follows. Aseptically removed lungs and spleen were homogenized in 5 ml of PBS containing 0.05% Tween 80 using a gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec, Mercoeur,



France) and serial dilutions of the organ homogenates were plated onto solid 7H11 medium. The numbers of cfu were enumerated 21 days later.

### Human cell cultures and infection

Human blood samples, procured by the Etablissement Français du Sang of Toulouse (France), were collected from fully anonymous non-tuberculous control donors. Peripheral blood monocytes were isolated as previously described (Astarie-Dequeker *et al.*, 1999), and cultured for 7 days on sterile glass coverslips in 24-well tissue culture plates ( $5 \times 10^5$  cells per well) containing RPMI 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2 mM glutamine (Gibco) and 7% heat-inactivated human AB serum. The culture medium was renewed on the third day. Human macrophages derived from monocytes (hMDMs) were washed twice with fresh RPMI medium before use.

The infection assay was performed as previously described (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Exponentially growing GFP-expressing mycobacteria were dispersed using glass beads. Macrophages were then infected with bacteria at the appropriate moi in RPMI 1640 and infection was allowed to proceed for 1 h at 37°C under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Extracellular bacteria were then removed by three successive washes with fresh medium.

### Phagocytosis and bacterial load assays

Phagocytosis was assessed as previously described (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). After being infected, hMDMs were fixed with 3.7% PFA and extracellular mycobacteria were labelled with rabbit anti-mycobacteria Ab (1:50), which was detected by a Rhodamine Red-conjugated goat anti-rabbit secondary Ab (1/100). Preparations were visualized under a Leica DM-RB epifluorescence microscope and the number of intracellular bacteria per macrophage and the percentage of cells having ingested at least one bacterium were determined. For each set of conditions, duplicate experiments were performed, and at least 100 cells were counted per slide.

### Colocalization experiments with LysoTracker, H<sup>+</sup>-ATPase and CD63

Colocalization of markers with bacteria-containing phagosomes was evaluated as previously described (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). At the end of the infection time, hMDMs were thoroughly washed and incubated with fresh RPMI 1640 supplemented with 7% heat-inactivated human serum at 37°C under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. After various times, hMDMs were washed and incubated with the acidotropic dye LysoTracker Red (1:2000) in RPMI 1640 for 1 h, fixed with 3.7% PFA for 1 h, washed and mounted on slides with DAKO mounting medium. For H<sup>+</sup>-ATPase or CD63 analysis, fixed hMDMs were permeabilized by incubation with 0.3% Triton X-100 for 10 min at room temperature (RT), blocked by incubation with 0.3% BSA and incubated with rabbit polyclonal antiserum against H<sup>+</sup>-ATPase (1/100) or mouse anti-CD63 Ab (1:100) for 1 h at RT, and then with Rhodamine-Red-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse Ab (1/1000), washed and mounted on slides. Coverslips were viewed with a Leica DM-RB fluorescence microscope or a Leica TCS-SP2 confocal

scanning microscope. All images were processed with Adobe Photoshop software. Colocalization was determined as the fraction of phagosomes with GFP fluorescence that was associated with markers. For each marker, 100 phagosomes from at least 10 different fields, in duplicate, in at least three independent experiments were counted for each time.

### Statistics

Results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the indicated number of experiments (*n*) performed at least in triplicate. The data were analysed by Student's *t*-test using the GRAPHPAD PRISM 5-00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P* < 0.05 was used as the limit of statistical significance.

### Acknowledgements

We are grateful to B. Appelmek (VU University Medical Center, Amsterdam) and R. Brosch (Institut Pasteur, Paris) for the gift of antibodies, and to F. Laval and M. Daffé (IPBS) for the help with the mass spectrometry analyses. We thank the Genotoul platforms TRI (IPBS) for epifluorescence and confocal microscopy imaging, TRI (IBCG, Toulouse), notably S. Balor, for the electron microscopy imaging, and ANEXPLO (IPBS) for the animal experiments. We thank F. Viala (Photographer, IPBS, Toulouse) for help with graphical work. We also thank I. Vergne and G. Lugo-Villarino for critical reading of the manuscript. C.P. is recipient of a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Fondation pour la Recherche Médicale ('Equipe FRM' DEQ20090515399), the ANR (2010-PATH-007-01/GeMoA) in the frame of ERA-Net PathoGenoMics and by European Structural Funds (FEDER) and the Région Midi-Pyrénées (CPER 2007–2013) for the scientific project and for the ASB3 animal facility.

### References

- Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E.N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J., and Maridonneau-Parini, I. (1999) The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* **67**: 469–477.
- Astarie-Dequeker, C., Carreno, S., Cougoule, C., and Maridonneau-Parini, I. (2002) The protein tyrosine kinase Hck is located on lysosomal vesicles that are physically and functionally distinct from CD63-positive lysosomes in human macrophages. *J Cell Sci* **115**: 81–89.
- Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F.K., Chalut, C., Lopez, A., and Guilhot, C. (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog* **5**: e1000289.
- Bardarov, S., Bardarov, S., Jr, Pavelka, M.S., Jr, Sambandamurthy, V., Larsen, M., Tufariello, J., *et al.* (2002) Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disrupt-





- tions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* **148**: 3007–3017.
- Brodin, P., Poquet, Y., Levillain, F., Peguillet, I., Larrouy-Maumus, G., Gilleron, M., *et al.* (2010) High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling. *PLoS Pathog* **6**: e1001100.
- Brozna, J.P., Horan, M., Rademacher, J.M., Pabst, K.M., and Pabst, M.J. (1991) Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. *Infect Immun* **59**: 2542–2548.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **34**: 257–267.
- Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Triccas, J.A., Gicquel, B., *et al.* (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* **276**: 19845–19854.
- Chambers, H.F., Moreau, D., Yajko, D., Miick, C., Wagner, C., Hackbarth, C., *et al.* (1995) Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2620–2624.
- Chesne-Seck, M.L., Barilone, N., Boudou, F., Gonzalo Asensio, J., Kolattukudy, P.E., Martin, C., *et al.* (2008) A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Bacteriol* **190**: 1329–1334.
- Cole, S.T. (1999) Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* **452**: 7–10.
- Constant, P., Perez, E., Malaga, W., Laneelle, M.A., Saurel, O., Daffe, M., and Guilhot, C. (2002) Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. *J Biol Chem* **277**: 38148–38158.
- Converse, S.E., Mougous, J.D., Leavell, M.D., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., and Cox, J.S. (2003) MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6121–6126.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R., Jr (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**: 79–83.
- Daniel, J., Deb, C., Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Morbidoni, H.R., and Kolattukudy, P.E. (2004) 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* **186**: 5017–5030.
- Domenech, P., and Reed, M.B. (2009) Rapid and spontaneous loss of phthiocerol dimycocerosate (PDIM) from *Mycobacterium tuberculosis* grown *in vitro*: implications for virulence studies. *Microbiology* **155**: 3532–3543.
- Drose, S., and Altendorf, K. (1997) Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* **200**: 1–8.
- Dubey, V.S., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2002) Disruption of msl3 abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Mol Microbiol* **45**: 1451–1459.
- Etienne, G., Malaga, W., Laval, F., Lemassu, A., Guilhot, C., and Daffe, M. (2009) Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in mycobacteria. *J Bacteriol* **191**: 2613–2621.
- Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffre, A., Sabio, Y.G.J., Morbidoni, H.R., Santangelo Mde, L., *et al.* (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **4**: 3–66.
- Geurtsen, J., Chedammi, S., Mesters, J., Cot, M., Driessen, N.N., Sambou, T., *et al.* (2009) Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. *J Immunol* **183**: 5221–5231.
- Gilmore, S.A., Schelle, M.W., Holsclaw, C.M., Leigh, C.D., Jain, M., Cox, J.S., *et al.* (2012) Sulfolipid-1 biosynthesis restricts *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *ACS Chem Biol* **7**: 863–870.
- Gonzalo Asensio, J., Maia, C., Ferrer, N.L., Barilone, N., Laval, F., Soto, C.Y., *et al.* (2006) The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**: 1313–1316.
- Goren, M.B., D'Arcy Hart, P., Young, M.R., and Armstrong, J.A. (1976) Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2510–2514.
- Guilhot, C., and Daffe, M. (2008) Polyketides and polyketide-containing glycolipids of *Mycobacterium tuberculosis*: structure, biosynthesis and biological activities. In *Handbook of Tuberculosis Molecular Biology and Biochemistry*. Kaufmann, S.H.E., and Rubin, E. (eds). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., pp. 21–51.
- Hartman, J.L., Garvik, B., and Hartwell, L. (2001) Principles for the buffering of genetic variation. *Science* **291**: 1001–1004.
- Husseini, H., and Elberg, S. (1952) Cellular reactions to phthienoic acid and related branch ed-chain acids. *Am Rev Tuberc* **65**: 655–672.
- Jain, M., Petzold, C.J., Schelle, M.W., Leavell, M.D., Mougous, J.D., Bertozzi, C.R., *et al.* (2007) Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 5133–5138.
- Kirksey, M.A., Tischler, A.D., Simeone, R., Hisert, K.B., Uplekar, S., Guilhot, C., and McKinney, J.D. (2011) Spontaneous phthiocerol dimycocerosate-deficient variants of *Mycobacterium tuberculosis* are susceptible to gamma interferon-mediated immunity. *Infect Immun* **79**: 2829–2838.
- Kvitko, B.H., Park, D.H., Velasquez, A.C., Wei, C.F., Russell,





- A.B., Martin, G.B., *et al.* (2009) Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathog* **5**: e1000388.
- Lee, K.S., Dubey, V.S., Kolattukudy, P.E., Song, C.H., Shin, A.R., Jung, S.B., *et al.* (2007) Diacyltrehalose of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits lipopolysaccharide- and mycobacteria-induced proinflammatory cytokine production in human monocytic cells. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 121–128.
- Lee, W., Vandervan, B.C., Fahey, R.J., and Russell, D.G. (2013) Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* exploits host-derived fatty acids to limit metabolic stress. *J Biol Chem* **288**: 6788–6800.
- Lukacs, G.L., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. (1990) Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem* **265**: 21099–21107.
- Malaga, W., Perez, E., and Guilhot, C. (2003) Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiol Lett* **219**: 261–268.
- Mohanty, D., Sankaranarayanan, R., and Gokhale, R.S. (2011) Fatty acyl-AMP ligases and polyketide synthases are unique enzymes of lipid biosynthetic machinery in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **91**: 448–455.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55–63.
- N'Diaye, E.N., Darzacq, X., Astarie-Dequeker, C., Daffe, M., Calafat, J., and Maridonneau-Parini, I. (1998) Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol* **161**: 4983–4991.
- Neyrolles, O., and Guilhot, C. (2011) Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)* **91**: 187–195.
- O'Connor, T.J., Adepoju, Y., Boyd, D., and Isberg, R.R. (2011) Minimization of the *Legionella pneumophila* genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 14733–14740.
- O'Connor, T.J., Boyd, D., Dorer, M.S., and Isberg, R.R. (2012) Aggravating genetic interactions allow a solution to redundancy in a bacterial pathogen. *Science* **338**: 1440–1444.
- Pabst, M.J., Gross, J.M., Brozna, J.P., and Goren, M.B. (1988) Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **140**: 634–640.
- Pelcic, V., Jackson, M., Reyrat, J.M., Jacobs, W.R., Jr, Gicquel, B., and Guilhot, C. (1997) Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10955–10960.
- Pethe, K., Swenson, D.L., Alonso, S., Anderson, J., Wang, C., and Russell, D.G. (2004) Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13642–13647.
- Rhee, K.Y., de Carvalho, L.P., Bryk, R., Ehrt, S., Marrero, J., Park, S.W., *et al.* (2011) Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. *Trends Microbiol* **19**: 307–314.
- Rousseau, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.C., *et al.* (2003a) Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. *Cell Microbiol* **5**: 405–415.
- Rousseau, C., Turner, O.C., Rush, E., Bordat, Y., Sirakova, T.D., Kolattukudy, P.E., *et al.* (2003b) Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infect Immun* **71**: 4684–4690.
- Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L.A., and Lopez-Marin, L.M. (2001) Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells *in vitro*. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 1081–1088.
- Sani, M., Houben, E.N., Geurtsen, J., Pierson, J., de Punder, K., van Zon, M., *et al.* (2010) Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog* **6**: e1000794.
- Stewart, G.R., Patel, J., Robertson, B.D., Rae, A., and Young, D.B. (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog* **1**: 269–278.
- Stover, C.K., Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., *et al.* (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**: 456–460.
- Upton, A.M., and McKinney, J.D. (2007) Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **153**: 3973–3982.
- Vandal, O.H., Pierini, L.M., Schnappinger, D., Nathan, C.F., and Ehrt, S. (2008) A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **14**: 849–854.
- Welin, A., Raffetseder, J., Eklund, D., Stendahl, O., and Lerm, M. (2011) Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages. *J Innate Immun* **3**: 508–518.
- WHO (2012) Global Tuberculosis Report 2012. World Health Organisation, pp. 1–89.
- Zhang, L., Goren, M.B., Holzer, T.J., and Andersen, B.R. (1988) Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect Immun* **56**: 2876–2883.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig. S1.** Strategy for construction and analysis of marked and unmarked *pks3/4* mutants.

A. Schematic representation of the genetic structures obtained during the various step of the construction procedure. The black box indicates the region amplified with primers A and B and used for the allelic exchange. The white box indicates the *pks3/4* gene. The light grey region shows the *pks3/4* fragment deleted and replaced by the *res- $\Omega$ km-res* cassette during the production of the allelic exchange substrate. The dark grey box represents the *res- $\Omega$ km-res* cassette. Locations and generic names of primers



used for cloning of the *pkc3/4* internal fragment (primers A and B) and for the PCR analyses of the marked and unmarked mutants are indicated by the arrow heads. The expected PCR products for the parental strain and *pkc3/4* mutants with various primer couples are indicated below each genetic structures.

B. Result of the PCR analysis of parental strain (WT), marked *pkc3/4* mutant (PMM150) and unmarked *pkc3/4* mutant (PMM169).

**Fig. S2.** Analysis of total lipid content of mutants. TLC analysis of the total lipid content of H37Rv ATCC, H37Rv Pasteur (DAT/PAT-) and PMM127 (DIM-, DAT/PAT-, SL-). Bacteria were incubated with [ $^{14}\text{C}$ ] acetate or [ $^{14}\text{C}$ ] propionate for 24 h to label either the total lipids or preferentially those containing methyl-branched fatty acids, notably DIM, SL and DAT/PAT. Spots corresponding to the main lipids from the outer layers of the mycobacterial cell envelope were quantified relative to total lipid and compared (inserted table gives the mean  $\pm$  SD of two independent experiments).

**Fig. S3.** Polyketide-derived lipids contribute to cell death induction by *Mtb*. hMDMs were infected for 1 h with GFP-expressing DIM-less mutants deficient in one or more lipids at an moi of 2:1. At 144 h post infection, cells were stained with 7-AAD and per-

centage of permeabilized (7-AAD+) cells was analysed by flow cytometry.

A. Dot-plot diagrams of a representative experiment show the percentage of 7-AAD+ total (upper panels) or GFP-positive cells (lower panels).

B and C. Graphs represent the mean  $\pm$  SEM of the percentage of 7-AAD+ cells analysed in both total (B) and infected (GFP-positive) cells (C), evaluated in four independent experiments. The significance of differences between strains was evaluated. \* $P < 0.05$ .

**Fig. S4.** DIM-deficiency induces acidification of *Mtb* containing phagosomes. hMDMs were infected for 1 h with GFP-expressing H37Rv ATCC or Pasteur and DIM-less mutants, PMM135 and PMM56. At various times after infection, cells were incubated with LysoTracker for 1 h, fixed and processed for microscopy. The values reported are means  $\pm$  SEM of six experiments. The significance of differences between strains was evaluated. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.005$ .

**Table S1.** Names and main features of strains and plasmids used in this study.

**Table S2.** Oligonucleotides used in this study for the construction of recombinant strains.



#### 4. Discussion

Les travaux réalisés ont permis de démontrer que les lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* sont des facteurs de virulence, et que la contribution des lipides à la pathogénie de la tuberculose est variable d'une molécule à l'autre. Certains, comme les DIMs, exercent un rôle dominant qui masque celui plus discret d'autres lipides, tels que les DATs/PATs et dans une moindre mesure, les SLs. Ces résultats soulignent une hiérarchisation fonctionnelle remarquable entre ces molécules, car elle pourrait conférer au bacille une robustesse dans le cadre d'une adaptabilité à l'environnement. Observée *in vivo*, cette hiérarchisation fonctionnelle est retrouvée *ex vivo* dans les étapes précoces de l'interaction entre le bacille et sa cellule hôte, le macrophage humain. La survie du bacille au sein des macrophages implique une modulation des activités bactéricides de celui-ci par les lipides d'intérêt, faisant de ces facteurs de virulence de potentielles cibles thérapeutiques.

Jusqu'à présent, les études du rôle des lipides spécifiques de l'enveloppe des mycobactéries dans la pathogénie de la tuberculose ont montré des résultats contradictoires entre les résultats *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'analyse de ces molécules leur attribuait une activité modulatrice de la réponse immunitaire de l'hôte, que ce soit les DATs/PATs dans le contrôle de la réponse immunitaire via la modulation de la sécrétion de cytokines (Lee et al., 2007; Saavedra et al., 2006) et la prolifération de lymphocytes T (Saavedra et al., 2001; Saavedra et al., 2006), ou les SLs dans la modulation de la réponse du macrophage notamment via la modulation de la fusion phagolysosomale (Goren et al., 1976; Pabst et al., 1988).

L'identification et la caractérisation des voies de biosynthèse des lipides a permis de développer de nouveaux outils d'investigation. En effet, la mutation de gènes impliqués dans ces voies de biosynthèse a permis d'étudier le rôle de ces lipides dans la virulence, et ce au sein d'un système complexe qu'est la bactérie. L'utilisation de souches mutées n'a pourtant pas permis de confirmer leur rôle dans la virulence de *M. tuberculosis*. Que ce soit concernant les DATs/PATs (Rousseau et al., 2003a) ou les SLs (Rousseau et al., 2003b), l'inhibition de leur synthèse n'a eu aucune répercussion sur le devenir du bacille *in vivo*. De la même manière, l'inhibition cumulée de la synthèse de ces lipides n'a pas eu d'effet sur la réplication ou la dissémination du bacille dans le modèle animal (Chesne-Seck et al., 2008).

L'approche utilisée durant ma thèse de mutations simples ou cumulées sur les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des lipides de l'enveloppe a permis de mettre en évidence un rôle des DATs/PATs, et dans une moindre mesure des SLs, dans la virulence. De plus, l'étude du rôle de ces lipides dans la structuration de l'enveloppe et sa fonctionnalité suggère que les DATs/PATs



et les SLs n'engendrent pas de modifications majeures dans l'organisation de la membrane ni dans la perméabilité aux agents microbicides. Nous sommes donc en mesure d'attribuer le phénotype obtenu *in vivo* uniquement à la fonction de ces lipides dans la virulence et non dans le maintien des propriétés protectrices de l'enveloppe face à l'environnement bactéricide développé par l'hôte. Nos résultats sont en faveur d'un rôle des SLs car leur absence dans les souches mutées tend à atténuer la survie de *M. tuberculosis* à la fois *in vivo* et *ex vivo*. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour le démontrer définitivement. Pour cela nous souhaitons réintroduire le gène fonctionnel *pks2*, impliqué dans la biosynthèse des SLs, dans la souche PMM127 délipidée. De plus, nos résultats laissent sous-entendre une hiérarchisation du rôle des lipides d'enveloppe dans la virulence de *M. tuberculosis*.

L'ensemble des résultats laissent sous-entendre une hiérarchisation fonctionnelle des lipides dans leur rôle en tant que facteur de virulence. Toutefois, le rôle des SLs n'a pas pu être validé statistiquement, mais les résultats suggèrent une tendance constante du rôle de ces lipides dans la virulence du bacille..

La hiérarchisation fonctionnelle des lipides définie dans ce travail met en exergue un effet majeur des DIMs, masquant le rôle des DATs/PATs. Cette hiérarchisation peut être due à un chevauchement fonctionnel, une redondance ou encore un effet tampon, processus biologiques impliqués dans le maintien des fonctions biologiques au-delà des variations mutationnelles et environnementales, conférant une robustesse au système. Ces processus biologiques développés chez la plupart des organismes sont particulièrement important au cours de l'interaction entre l'hôte et son pathogène (O'Connor et al., 2012). En effet, d'un point de vue du pathogène, ils permettent entre autres d'assurer sa survie au sein de l'hôte. Ainsi, *Legionella pneumophila* synthétise des protéines injectées dans le cytoplasme des cellules hôte afin de promouvoir la croissance intracellulaire des bactéries. Ces protéines possèdent des fonctions redondantes avec d'autres protéines paralogues sécrétées (Luo and Isberg, 2004). Cette bactérie est de plus capable de supporter plus de 30% d'inhibition de synthèse de ces facteurs de virulence sans pour autant que sa capacité d'invasion et de réplication au sein de macrophages ne soit atteinte (O'Connor et al., 2011). Aussi, le pathogène végétal *Pseudomonas syringae* synthétise plus d'une vingtaine d'effecteurs protéiques collectivement impliqués dans la virulence du pathogène mais individuellement incapables de promouvoir la croissance bactérienne et de déjouer les mécanismes de défense de l'hôte (Kvitko et al., 2009).

Chez *M. tuberculosis*, différentes fonctions protéiques ont précédemment été décrites comme redondantes. Ainsi, la délétion du gène *pimB* codant une mannosyltransferase impliquée dans la





synthèse des PIM<sub>2</sub>, lipides à l'origine de la formation du LM et du Man-LAM et impliqués dans la virulence de *M. tuberculosis* (Schaeffer et al., 1999) n'affecte pas la synthèse de ces lipides, suggérant une redondance fonctionnelle dans leur synthèse (Torrelles et al., 2009). D'autres protéines de *M. tuberculosis* présentent ces propriétés de redondance, comme les protéines liant la fibronectine (Fbps pour fibronectin-binding protein). Ces protéines forment le complexe Antigène 85 impliqué dans la pathogénie de la tuberculose (Abou-Zeid et al., 1991; Abou-Zeid et al., 1988; Wiker and Harboe, 1992). Les protéines Fbps sont des enzymes partiellement redondantes permettant l'ajout de résidus mycoloyl nécessaires à la formation des trehaloses dimycolates (TDMs) de l'enveloppe mycobactérienne (Belisle et al., 1997; Puech et al., 2002). Ces protéines s'organisent suivant une hiérarchisation de leur fonction, dominée par la protéine FbpC qui à elle seule inhibe 60% de la mycoloylation des tréhaloses monomycolates (TMMs) nécessaire à la formation des TDMs (Puech et al., 2002).

La structure voisine des DIMs, DATs/PATs et SLs est compatible avec la notion de redondance, mais dans ce cas elle ne serait que partielle. Elle est aussi compatible avec la notion de chevauchement fonctionnel. Se pose alors la question des mécanismes moléculaires de ces lipides. De précédents travaux au sein de l'équipe ont permis de mettre en évidence un rôle des DIMs dans le devenir des mycobactéries au sein de macrophages humains (Astarie-Dequeker et al., 2009). L'absence de synthèse de ces lipides mène les mycobactéries vers un compartiment phagosomal au pH acide. Il a été proposé que les DIMs modulent l'acidification intraphagosomale grâce à leur capacité de modification des propriétés biophysiques de la membrane plasmique du macrophage. Cette capacité des DIMs a été mise en évidence lors de l'étude de la phagocytose, étape au cours de laquelle ces lipides s'inséreraient dans la membrane plasmique des macrophages afin de moduler l'entrée des mycobactéries (Astarie-Dequeker et al., 2009). Cette hypothèse a déjà été vérifiée sur d'autres lipides de l'enveloppe des mycobactéries. En effet, l'insertion du Man-LAM au sein des rafts lipidiques de la membrane plasmique du macrophage grâce à son ancre-GPI (glycosylphosphatidylinositol) permet la régulation de la maturation du phagosome (Welin et al., 2008).

Les DATs/PATs, les SLs et les DIMs partagent une partie lipidique ramifiée avec des groupements méthyl, et notre approche révèle un rôle potentialisateur des DATs/PATs et des SLs sur celui des DIMs dans le contrôle de la maturation du phagosome au sein de macrophages humains infectés. S'il est vérifié que l'activité modulatrice des fonctions microbicides du macrophage est causée par la partie lipidique de ces molécules, alors le même mécanisme de modulation des propriétés biophysiques de la membrane cellulaire pourrait être envisagé.



Un rôle du groupement saccharidique formé par un tréhalose substitué et qui est commun aux DATs/PATs et aux SLs pourrait aussi être envisagé, favorisant par exemple l'interaction de ces lipides avec des récepteurs membranaires comme les récepteurs de types lectine décrits comme interagissant avec des unités saccharidiques. L'idée d'une interaction avec des récepteurs de phagocytose n'est pas retenue car ces lipides n'influent pas sur l'internalisation du bacille dans le macrophage, mais leur rôle peut être envisagé dans l'interaction avec des récepteurs de signalisation, comme les TLRs.

L'ensemble de ces résultats ouvre donc les portes à de nouvelles investigations sur les mécanismes moléculaires d'action des lipides spécifiques de l'enveloppe des mycobactéries dans la modulation de la réponse immunitaire du macrophage à une infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

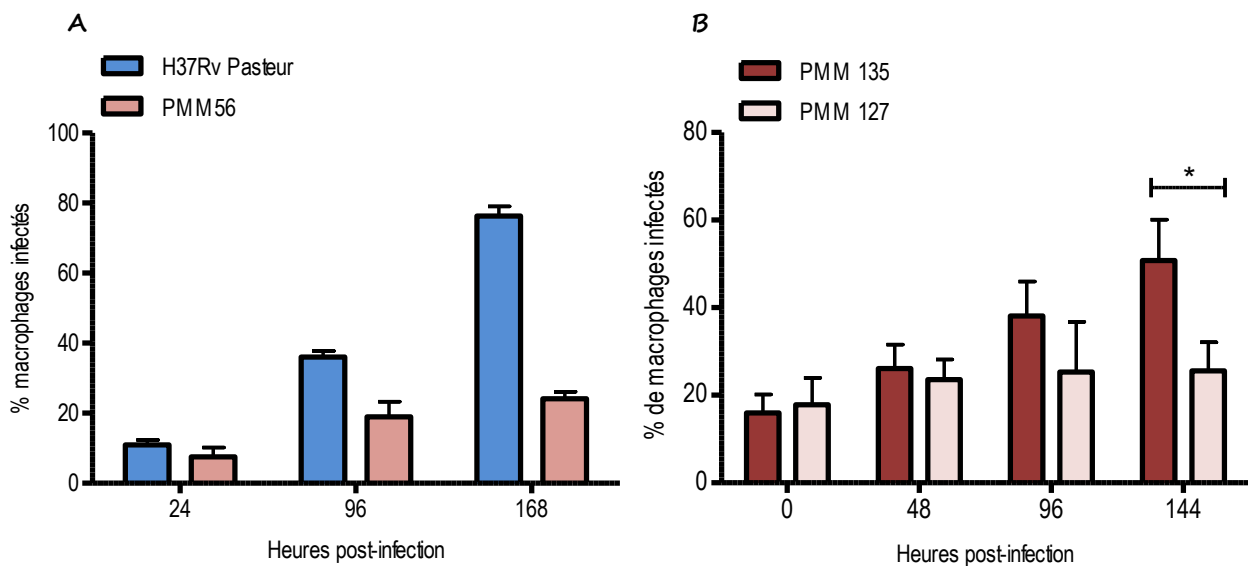


Figure 27: Dissémination de *M. tuberculosis* à des macrophages adjacents.

Après 6 jours de culture, les macrophages dérivés de monocytes sont infectés avec les différentes souches de la collection et les cellules sont lavées et maintenues en culture. A différents temps après infection, ces cellules sont fixées et marquées afin que soit comptabilisé le pourcentage de macrophages infectés. Ces résultats indiquent que le pourcentage de macrophages infectés augmente au cours du temps, et que dans des temps relativement longs (6/7 jours après infection) les souches déficientes en lipides d'intérêt infectent un pourcentage plus faible de macrophages que les souches contrôles ( $19,3\% \pm 3$  Vs  $76,3\% \pm 5$ ,  $n=2$  ; et  $25,5\% \pm 5$  Vs  $50,8 \pm 7$ ,  $n=3$ ,  $p<0.05$ , respectivement). Ces résultats suggèrent donc un rôle des DIMs et des DATs/PATs dans la survie du bacille et la dissémination. Cependant, les SLs ne semblent pas être impliqués dans ce processus de dissémination car la souche PMM56 synthétisant uniquement des SLs et la souche PMM127 ont un profil comparable ( $24,15\% \pm 1$  Vs  $19,3\% \pm 3$  ;  $35,45\% \pm 7$  Vs  $25,5\% \pm 5$ ).

## *B. Etude du rôle des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la programmation de la mort cellulaire et la réponse inflammatoire.*

### *1. Contexte de l'étude*

La première partie de ma thèse montre que les DATs/PATs et les SLs, comme les DIMs, contribuent à la survie de *M. tuberculosis* au sein du macrophage. Nous avons également constaté que le nombre de macrophages infectés par *M. tuberculosis* augmente au cours du temps de post-infection et que cette augmentation est fonction de la présence des lipides à la surface du bacille (**Figure 27**). Ainsi, 6/7 jours après infection, le pourcentage de macrophages infectés par la souche déficiente en DIMs (PMM56) (**Figure 27A**), ou en DATs/PATs et SLs (PMM127) (**Figure 27B**) est inférieur au pourcentage de cellules respectivement infectées par la souche contrôle, H37Rv Pasteur ou la souche de référence déficiente en DIMs (PMM135).

Puisqu'à l'issue de la période d'infection, les mycobactéries extracellulaires sont éliminées par plusieurs lavages successifs, cette augmentation du pourcentage de macrophages infectés dans le temps suivant l'infection par *M. tuberculosis* doit refléter l'infection de nouveaux macrophages par des bacilles qui se sont échappés de macrophages précédemment infectés. Ceci nous a naturellement conduit à nous intéresser aux différentes cellules impliquées dans le programme de mort cellulaire qui représente l'une des stratégies d'échappement de *M. tuberculosis* (Pour revue, Behar et al., 2010).

La mort cellulaire est un processus physiologique inductible par de nombreux mécanismes, et qui regroupent des processus cellulaires tels que la nécrose, l'apoptose et l'autophagie (Galluzzi et al., 2012) (**Figure 15, introduction**). Le programme de mort cellulaire est étroitement régulé et est fonction des stimuli perçus, du contexte métabolique et de l'environnement cellulaires. Ce programme joue également un rôle essentiel dans le contrôle des infections et peut être déjoué par les agents pathogènes. Concernant l'infection par *M. tuberculosis*, les données présentées dans la littérature indiquent que les mycobactéries sont capables de moduler le programme de mort cellulaire pour faciliter leur survie dans les macrophages. Il a été montré que *M. tuberculosis* inhibe l'apoptose et favorise la nécrose des macrophages, favorisant ainsi sa dissémination aux cellules adjacentes (Pour revue, Behar et al., 2010). Mais l'analyse de la littérature souligne aussi l'existence de travaux contradictoires montrant que *M. tuberculosis* induit une réponse



apoptotique. Différentes explications sont alors envisagées comme notamment les modèles cellulaires utilisés, les souches mycobactériennes ou encore les protocoles d'infection.

L'analyse des données souligne l'existence de résultats conflictuels. Nous avons donc souhaité dans un premier temps réexaminer le programme de mort cellulaire des macrophages humains en réponse à l'infection par *M. tuberculosis*. Dans un second temps, nous avons recherché un rôle des lipides spécifiques de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la modulation de ce programme.

### 2. Objectif & Stratégie

**L'objectif de cette deuxième partie de ma thèse a été de vérifier l'hypothèse selon laquelle les lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* sont impliqués dans la programmation de la mort des macrophages en favorisant la dissémination du bacille aux macrophages avoisinants.**

Pour mener à bien cette étude, nous avons réalisé une analyse comparative de la mort cellulaire par apoptose, nécrose, et autophagie, en infectant des macrophages humains avec la souche sauvage H37Rv Pasteur et le mutant PMM127 déficient en DIMs, DATs/PATs et SLs. Dans le cas où PMM127 engendre une réponse différentes de celle induite par la souche sauvage, la fonction affectée est par la suite examinée en réponse aux différentes souches mutées dans les voies de biosynthèse d'un seul lipide afin d'identifier la contribution individuelle de chacun des lipides concernés. Aux vues des résultats obtenus dans la première partie de mes travaux de thèse et des résultats présentés en figure 3, nous avons volontairement choisi de nous focaliser sur les DIMs et les DATs/PATs.

### 3. Méthodologie

Des macrophages dérivés de monocytes humains sont mis en culture 6 jours dans un milieu RPMI complété à 7% avec du sérum humain, puis infectés avec la ou les souche(s) d'intérêt transformée(s) avec la Green Fluorescent Protein (GFP) à différentes Multiplicity Of Infection (MOI). Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du milieu de culture propre avant d'être incubées à 37°C dans du RPMI complété. Pour chaque temps analysé, les cellules sont traitées différemment en fonction de l'expérience en cours. Pour les expériences de mort cellulaire, les plaques d'incubation des macrophages possèdent un revêtement spécifiques afin de les rendre moins adhérentes.



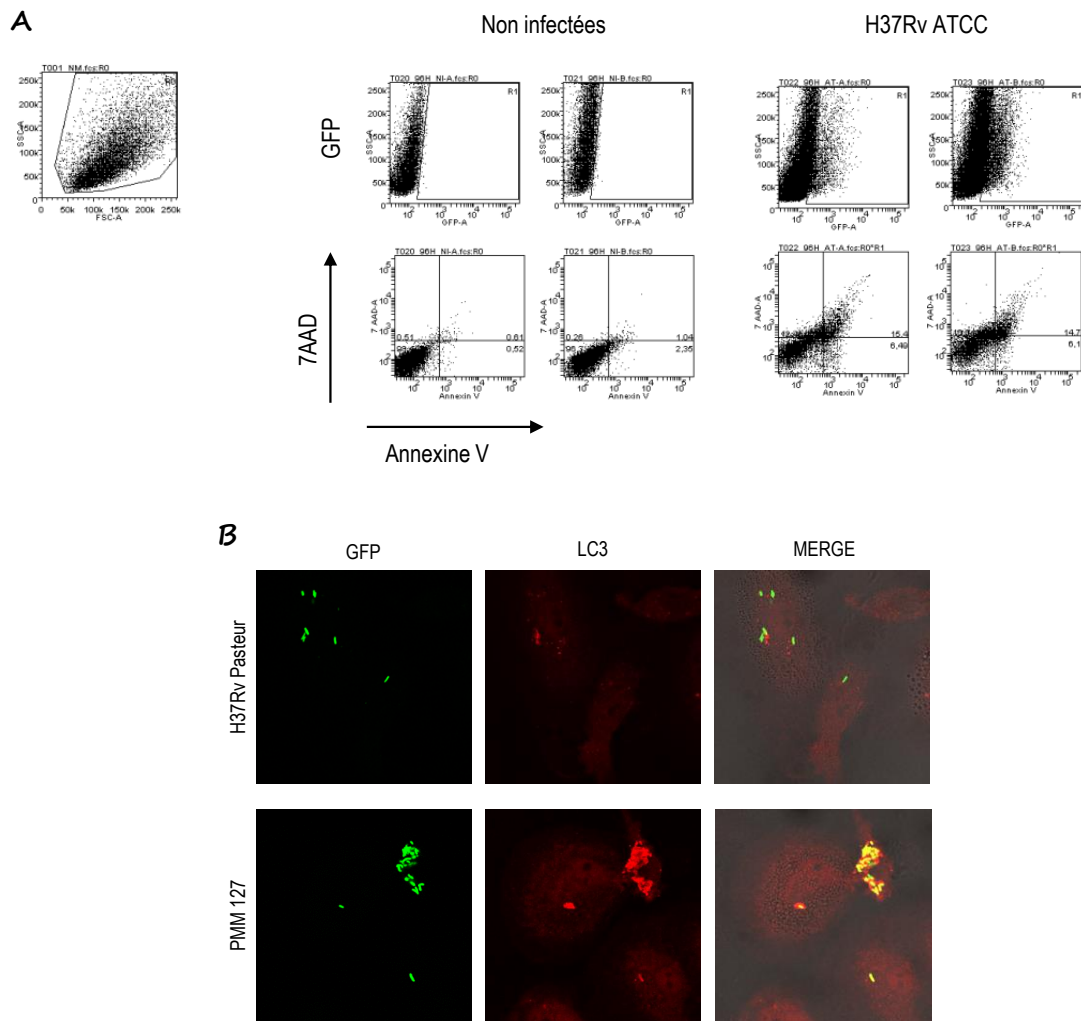


Figure 28 : Méthodologie de l'étude du programme de mort cellulaire.

(A).Analyse en cytométrie de flux de macrophages totaux. Les macrophages infectés avec les mycobactéries GFP sont sélectionnés et analysés pour leurs marquages Annexine V et/ou 7AAD. (B) Analyse en microscopie confocale du marquage individuel GFP pour les mycobactéries et Rhodamine Red pour le LC3, et visualisation de la colocalisation.

### Apoptose / Nécrose

Les surnageants cellulaires sont mis de côté et les cellules sont décollées par un mélange de trypsine-EDTA (Gibco) pendant 10 minutes à température ambiante (RT). Les surnageants sont ensuite restitués et les échantillons centrifugés 30 secondes à 850g. Les culots cellulaires sont resuspendus, selon les recommandations du fabricant, 15 minutes à RT dans le tampon de marquage « Annexin Binding Buffer » en présence de l'Annexine V couplée au fluorochrome APC (BD Biosciences), une protéine qui réagit avec les phosphatidylserines de la membrane plasmique transloquées sur sa couche externe au cours du phénomène apoptotique, et du 7-AAD (7-AminoActinomycine D), un composé chimique fluorescent qui va s'intercaler à l'ADN dont l'accessibilité est rendue possible à cause de la perméabilité des membranes des cellules nécrotiques (BD Biosciences). Après une nouvelle centrifugation 30 secondes à 850g, les cellules sont fixées 1 heure à RT dans 4% de paraformaldéhyde (PFA) et analysées en cytométrie de flux avec un cytomètre LSR II (BD Biosciences). Les cellules infectées marquées avec la GFP sont sélectionnées et leurs marquages Annexine V et 7AAD sont analysés (**Figure 28A**).

### Autophagie

Les cellules sont fixées pendant 1 heure à RT avec 4% de PFA, puis traitées avec 50mM de NH<sub>4</sub>Cl (Sigma Aldrich) pendant 5 minutes afin de bloquer les groupements aldéhydes libres. Elles subissent 3 lavages successifs avant d'être perméabilisées avec du triton X100 (Euromedex) et incubées 1 heure avec un anticorps dirigé contre la protéine LC3 (anticorps de lapin dirigé contre le LC3, 1/200 à RT, Sigma-Aldrich), marqueur membranaire spécifique des autophagosomes. Après une seconde série de lavages, l'anticorps primaire est révélé avec un anticorps secondaire couplé à la Rhodamine incubé 1 heure (anticorps de chèvre dirigé contre le lapin, 1/1000, Molecular Probes). L'analyse du pourcentage de colocalisation GFP/LC3 est ensuite réalisée en microscopie confocale (**Figure 28B**).

### Sécrétion de médiateurs solubles

Afin d'analyser les médiateurs solubles sécrétés par les macrophages infectés, les surnageants de cultures sont récupérés et doublement filtrés afin de prévenir la présence de mycobactéries. La quantification est réalisée grâce à l'utilisation de Human Cytokine Antibody Array III (RayBiotech, Tebu-Bio) (**Annexe 4**). Les membranes sont incubées avec les surnageants de macrophages infectés suivant les instructions du fournisseur. Les résultats d'hybridation sont révélés par détection améliorée de la chimioluminescence (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Fairfield, Connecticut, USA) et la quantification est faite grâce au densitomètre GS-800 (BioRad). Le bruit de fond est soustrait aux données avant qu'elles ne soient normalisées par rapport au

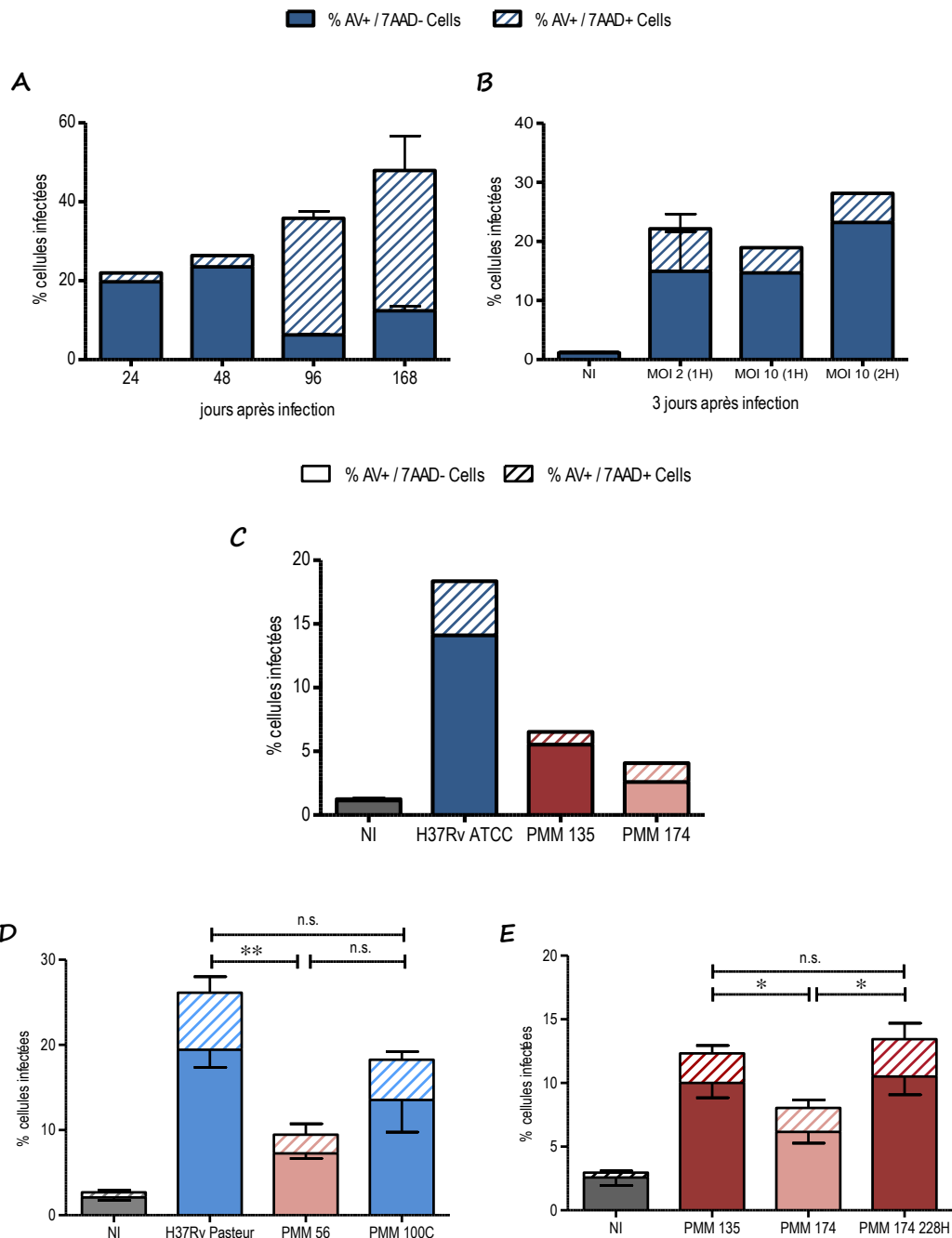


Figure 29 : Rôle des lipides spécifiques des mycobactéries dans le phénomène apoptose/nécrose.

Analyse de la modulation de la programmation de l'apoptose (□) et de la nécrose (▨) des macrophages infectés par les différentes souches de la collection. (A,B) Etape de mise au point par l'analyse de macrophage infectés avec la souche H37Rv ATCC à différents temps d'infection et de post-infection, et différentes MOI (C) Etude du rôle individuel des lipides spécifiques de l'enveloppe des mycobactéries sur l'induction de la mort cellulaire par une analyse comparative des souches H37Rv ATCC (bleu foncé), PMM135 (rouge) et PMM174 (rose). (D) Etude du rôle des DIMs dans l'induction de la mort cellulaire, par analyse de la souche sauvage H37rv Pasteur, de la souche mutée PMM56 et de la souche complétée PMM 100C. (E) Etude du rôle des DATs/PATs dans l'induction de la mort cellulaire en absence de DIMs, par analyse de la souche PMM135, de la souche mutée PMM174 ainsi que de la souche complétée PMM 174 228H.

témoin positif de chacune des membranes. Les résultats sont exprimés en ratio de sécrétion. A partir de ces mêmes surnageants, un dosage direct est aussi réalisé à l'aide d'un kit ELISA (R&D Systems). Dans ce cas, le protocole utilisé est aussi celui recommandé par le fournisseur. Les résultats sont obtenus par lecture de la densité optique à 570nm après révélation de l'interaction par l'action du substrat de la HRP (HorseRadish Peroxidase) couplé aux anticorps.

Les résultats exprimés sont les moyennes de 2 à 6 expériences indépendantes. Les analyses statistiques sont réalisées avec un test-*t* de Student.

### 4. Résultats

#### ✓ *Impact des lipides sur la réponse Apoptose/Nécrose*

##### Etape de mise au point

Aux vues des données de la littérature, différentes conditions expérimentales sont utilisées et les données varient en fonction de la MOI, du temps d'incubation et du modèle cellulaire (Chen et al., 2006; Lee et al., 2006). Nous avons donc décidé de tester différents temps d'infection et de post-infection ainsi que différentes MOI sur notre modèle cellulaire : le macrophage humain (**Figure 29A**). Les expériences de mise au point avec la souche H37Rv ATCC révèlent une augmentation de la mort cellulaire dans le temps. La quantification de l'induction de l'apoptose est réalisable jusqu'à 4 jours post-infection. Passé ce temps, la proportion de cellules apoptotiques diminue alors que la proportion de cellules nécrotiques augmente (**Figure 29A**). Ces résultats laissent penser à l'induction d'une nécrose secondaire (Lee et al., 2006) liée à un phénomène apoptotique, plutôt qu'à une nécrose primaire directement induite par le bacille car la cinétique de la nécrose est inversement proportionnelle à l'apoptose. La modulation de la MOI (2 :1 ou 10 :1) ou du temps d'infection (1h ou 2h d'infection) n'influent pas de façon significative sur la mort des cellules infectées par H37Rv ATCC (**Figure 29B**). Sur la base de ces résultats, nous avons fixés les conditions expérimentales à 1 heure d'infection à une MOI de 10 :1 et les analyses sont effectuées 3 jours après infection afin de travailler avec un pourcentage de cellules apoptotiques qui soit suffisamment important pour que toute modification de sa valeur soit quantifiable.

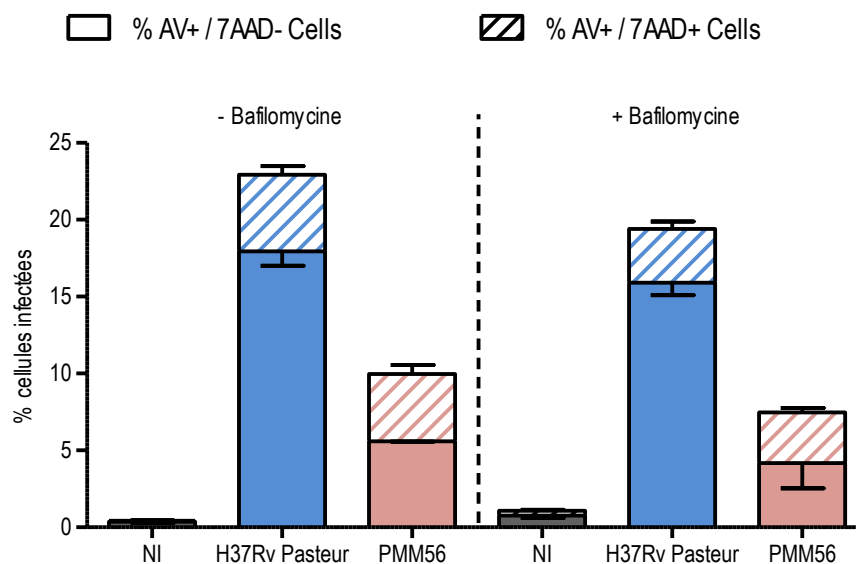


Figure 30 : Etude du lien entre les capacités de survie et de modulation de l'apoptose des mycobactéries.

Les macrophages sont traités ou non avec la bafilomycine A1, molécule impliquée dans le blocage de la maturation du phagosome, puis infectés avec la souche sauvage H37Rv Pasteur ou la souche PMM56. Les résultats montrent que la présence de bafilomycine A1 n'influe pas sur l'induction du programme de mort cellulaire de la cellule par *M. tuberculosis*. MOI10, 1heure d'infection. Analyse des résultats 3 jours après infection.

### Résultats

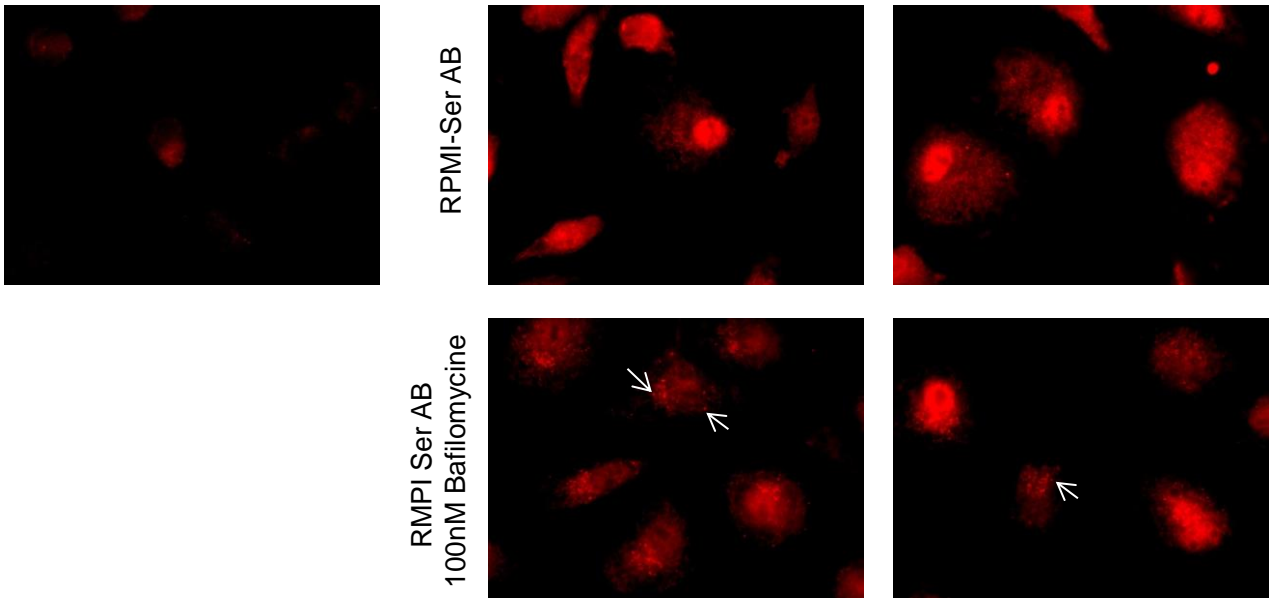
Une première série d'expérience montre que l'infection par le mutant délipidé PMM127 induit moins de mortalité cellulaire que la souche sauvage H37Rv Pasteur ( $9,1\% \pm 1$  Vs  $17,1\% \pm 1,2$ ,  $n=3$ ,  $p<0,01$ ), soutenant ainsi notre hypothèse selon laquelle les lipides spécifiques de l'enveloppe étudiés sont impliqués dans la modulation de l'induction de la mort cellulaire.

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes intéressés à la contribution individuelle de chacun de ces lipides en nous focalisant essentiellement sur les DIMs et les DAT/PATs. L'infection par la souche H37Rv ATCC déclenche une mortalité cellulaire nettement plus marquée que la souche PMM135 (DIM<sup>-</sup>), elle-même légèrement plus importante que celle observée avec PMM174 (DIM<sup>-</sup>, DAT/PAT<sup>-</sup>) (**Figure 29C**).

Afin de confirmer ces résultats, des expériences de complémentations ont été réalisées. De la même manière que dans le fond génétique de la souche H37Rv ATCC, une déficience en DIMs dans le fond génétique H37Rv Pasteur diminue fortement la capacité du mutant PMM56 (DIM<sup>-</sup>, DAT/PAT<sup>-</sup>) à induire une mort cellulaire par rapport à sa souche de référence H37Rv Pasteur (**Figure 29D**). La complémentation de la souche PMM56 avec le gène *ppsE* permet, du moins en partie, de restaurer une réponse comparable à celle induite par la souche de référence H37Rv Pasteur (**Figure 29D**). En ce qui concerne le rôle des DATs/PATs dans l'induction de la mort cellulaire, la complémentation de la souche mutée PMM174 avec le gène *pks3/4* (PMM174 228H) permet de restaurer la synthèse des DATs/PATs ainsi que le phénotype obtenu avec la souche de référence PMM135 (**Figure 29E**).

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer une contribution des DIMs et des DATs/PATs dans l'induction de la mort cellulaire de macrophages infectés avec *M. tuberculosis*. Ces analyses nous permettent aussi de suggérer que cette modulation découle de l'induction d'une réponse pro-apoptotique. Il ne nous est pas possible à ce stade de définir la contribution de ces lipides dans le contrôle de la nécrose. Pour ce faire, il faudrait mettre au point l'inhibition de la voie apoptotique afin d'étudier spécifiquement l'induction de la nécrose primaire tout en s'affranchissant du phénomène de nécrose secondaire. Dans un second temps, l'analyse de la nécrose primaire programmée pourra se faire via l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette voie : la nécrostatine. Il reste également à étudier la contribution des SLs dans l'induction de la mort cellulaire, mais les expériences préliminaires réalisées ne semblent pas mettre en évidence un rôle de ces lipides dans l'induction d'un processus apoptotique. En effet, l'étude comparative des souches PMM56 (DIM<sup>-</sup>, DAT/PAT<sup>-</sup>) et PMM127 (DIM<sup>-</sup>, DAT/PAT<sup>-</sup>, SL<sup>-</sup>) montrent une induction similaire de l'apoptose.

A



B

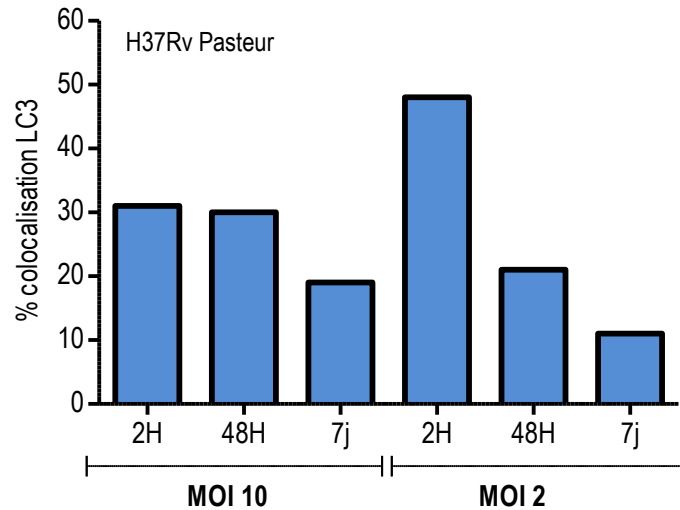


Figure 31 : Mise au point de l'analyse du mécanisme autophagique.

(A) Macrophages humains mis en culture en présence ou non de Bafilomycine A1, marqués uniquement avec un anticorps secondaire ou bien avec un anticorps reconnaissant le LC3 et révélé avec un anticorps couplé à la Rhodamine. Visualisation en microscopie confocale. (B) Mise au point de l'étude du processus autophagique en analysant une cinétique d'induction après infection des macrophages par la souche sauvage H37Rv Pasteur à MOI 10 ou MOI 2. Analyse du pourcentage de mycobactéries qui co-localise avec le marqueur LC3, spécifique des autophagosomes.

Forts de ces observations, nous avons cherché à savoir si le rôle pro-apoptotique des lipides était une conséquence de leur capacité à contribuer à la survie de *M. tuberculosis*. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisés les propriétés de la bafilomycine A1, molécule qui inhibe l'activité de la H<sup>+</sup>ATPase du phagosome et permet ainsi la survie du bacille par son maintien dans un environnement favorable. Nos résultats antérieurs montrent que le prétraitement des macrophages avec la bafilomycine A1 restaure la croissance des souches déficientes en DIMs (PMM56) à un niveau comparable à celui de leurs souches de référence H37Rv Pasteur. En revanche, ce prétraitement n'affecte pas la mort cellulaire induite par PMM56 qui reste toujours plus faible que celle induite par H37Rv Pasteur (**Figure 30**).

L'induction de l'apoptose ne serait donc pas une conséquence de la capacité de *M. tuberculosis* à survivre au sein des macrophages mais bien un évènement cellulaire maîtrisé par le bacille et notamment via la production des lipides de l'enveloppe. Ces résultats nous ont conduits à poursuivre l'étude du rôle de ces lipides sur le programme de mort cellulaire en examinant leur impact sur la voie autophagique.

### ✓ *Impact des lipides sur la réponse autophagique*

#### Etape de mis au point

En collaboration avec I. Vergne (Equipe de M. Daffé), nous avons mis au point l'analyse par immunofluorescence de l'autophagie dans les macrophages humains infectés par *M. tuberculosis*. Nous avons choisi d'étudier la translocation au phagosome bactérien de la protéine Atg8 ou LC3, protéine recrutée au niveau du phagophore afin de contribuer à la formation de l'autophagosome (Tanida et al., 2008). Le protocole expérimental de marquage que nous avons utilisé est adapté de celui mis au point par I. Vergne dans les macrophages de souris (Vergne et al., 2009).

L'étape de mise au point montre que le LC3 fluorescent est distribué de façon homogène dans le cytosol des macrophages humains en accord avec une expression majoritaire de la forme libre de la protéine (LC3 de type I) (**Figure 31A**). Le traitement des macrophages par un inducteur de l'autophagie la bafilomycine A1, induit une relocalisation du signal de fluorescence dans des structures agrégées, compatible avec une conversion du LC3 de type I en LC3 de type II actif, et le recrutement de cette protéine à la membrane du phagophore.

Dans des macrophages infectés, le LC3 colocalise comme attendu avec H37Rv Pasteur (**Figure 31B**). La quantification de cette colocalisation, exprimée en pourcentage de bactéries localisées dans un autophagosome LC3 positif, révèle que l'infection par *M. tuberculosis* s'accompagne d'une réponse autophagique d'environ 30% à 2heures post-infection et qui diminue dans le temps.



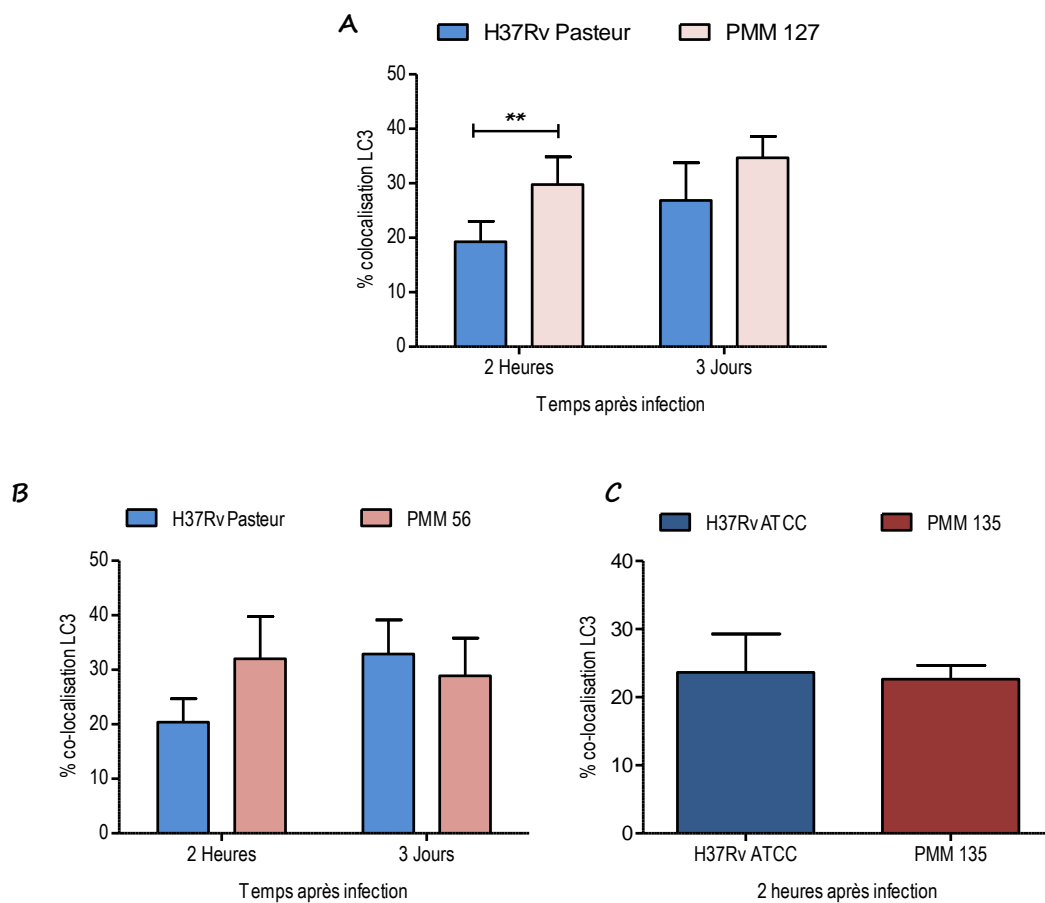


Figure 32 : Rôle des lipides dans la modulation du processus autophagique.

(A) Etude comparative du pourcentage de mycobactéries localisées dans un autophagosome entre la souche sauvage H37Rv Pasteur et la souche mutée PMM127. Les résultats montrent une différence significative d'induction de l'autophagie par ces souches ( $30\% \pm 5$  Vs  $19\% \pm 4$ ,  $n=4$ ,  $p<0.01$ ) (B,C) Analyse du rôle des DIMs dans l'induction de l'autophagie en comparant le pourcentage de mycobactéries localisées dans un autophagosome en présence ou en absence de DIMs, et ce dans deux fonds génétiques différents.

Nous avons fait le choix de travailler avec une MOI de 10 :1 à 2 heures et 3 jours après infection afin d'étudier l'induction de l'autophagie dans des conditions expérimentales comparables à celles utilisées pour nos expériences de maturation du phagosome et d'induction de la mort cellulaire apoptotique.

### Résultats

Dans ces conditions, l'étude comparative de la souche H37Rv Pasteur et de la souche mutée PMM127 montre que dès les deux premières heures post-infection, le pourcentage de mutant qui s'accumule dans un compartiment enrichi en LC3 est supérieur à celui de la souche sauvage ( $30\% \pm 5$  Vs  $19\% \pm 4$ ,  $n=4$ ,  $p<0.01$ ). A 3 jours post-infection, la tendance est similaire mais les résultats ne sont pas significativement différents ( $35\% \pm 4$  pour PMM127 Vs  $27\% \pm 7$  pour H37Rv Pasteur). Ces résultats préliminaires indiquent que l'absence des DIMs, DATs/PATs et SLs favorise l'accumulation des mycobactéries dans un autophagosome à des temps précoces d'infection (**Figure 32A**).

Nous avons cherché alors à analyser plus finement la contribution individuelle de chacun de ces lipides en comparant en premier lieu les deux souches sauvages (H37Rv ATCC et H37Rv Pasteur) à leurs souches correspondantes mutées dans la voie de biosynthèse des DIMs (PMM 135 et PMM 56, respectivement). Si l'absence des DIMs dans un fond génétique H37Rv Pasteur tend à favoriser l'accumulation de la souche mutée PMM56 dans un phagosome enrichi en LC3 2 heures après infection, ce n'est pas le cas dans un fond génétique H37Rv ATCC. Cette tendance n'est pas non plus retrouvée 3 jours après infection (**Figure 32B,C**).

L'ensemble de ces résultats suggère que *M. tuberculosis* déclenche une réponse autophagique de faible amplitude (<30%) qui diminue dans le temps. Ceci est en accord avec la récente proposition de Zullo et collaborateurs selon laquelle *M. tuberculosis* aurait la propriété d'inhiber la réponse autophagique des macrophages par rapport à une souche non pathogène (Zullo and Lee, 2012). Nos premiers résultats indiquent que les lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* contribuent collectivement à cet effet, tout du moins dans les étapes précoces de l'infection. Afin de confirmer ces études préliminaires, une autre méthode de mesure de l'autophagie reposant sur la détection de la conversion du LC3 dans sa forme de type II par western-blot et des expériences de complémentation seront réalisées. Si notre hypothèse est confirmée, le rôle individuel des lipides sera exploré. Nos premières données suggèrent que les DIMs seuls n'exercent pas d'effet. Les analyses doivent cependant être approfondies car leur effet peut être masqué par la présence d'autres lipides.

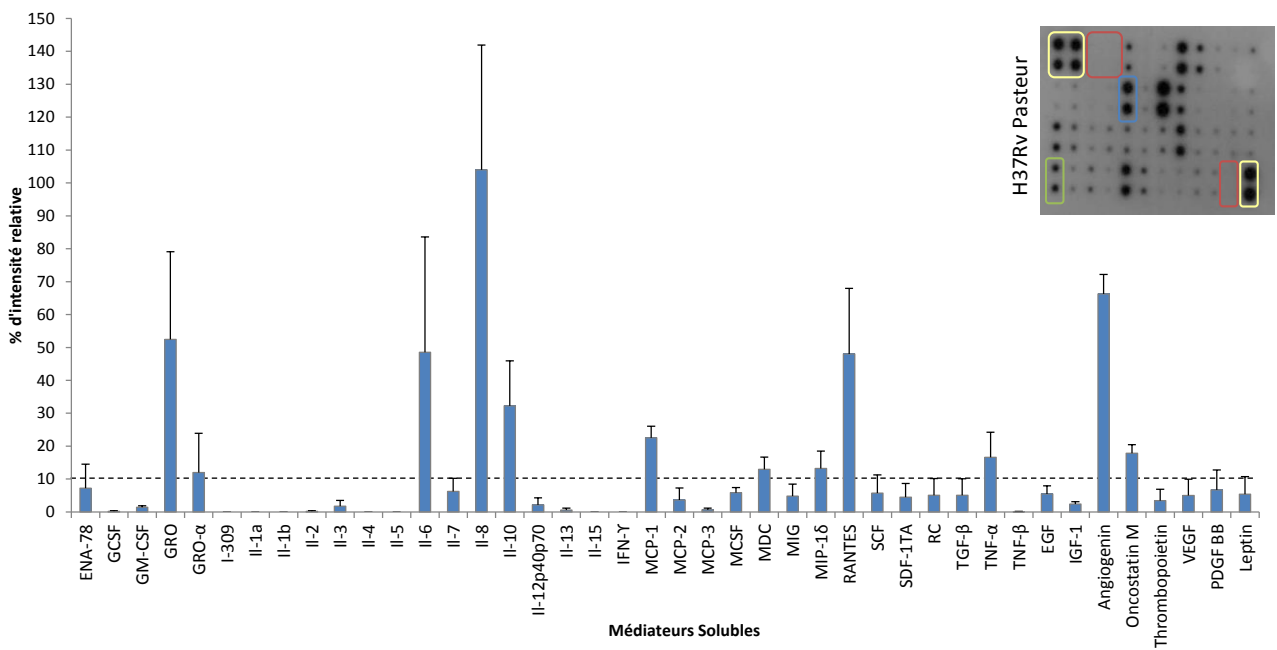


Figure 33 : Dosage semiquantitatif de la sécrétion de médiateurs solubles par des macrophages humains après infection par *M. tuberculosis*.

### ✓ *Impact des lipides sur la sécrétion de médiateurs solubles*

Au cours de l'infection des macrophages par *M. tuberculosis*, l'induction de la mort cellulaire peut être reconnue par le système immunitaire grâce à la sécrétion de médiateurs solubles dans le milieu extracellulaire. Ainsi, au cours du processus nécrotique, la libération du contenu cellulaire génère un épisode inflammatoire en activant la sécrétion de médiateurs solubles capables d'influer sur la réponse immunitaire afin de lutter contre l'infection déclarée (Krysko et al., 2006). De la même manière, l'induction de l'autophagie régule positivement sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, l'induction du processus apoptotique, qu'il soit physiologique ou pathologique, n'induit pas de réaction inflammatoire. Dans certaines études, il semblerait même que ce processus cellulaire soit à l'origine d'effets anti-inflammatoires (Pour revue, Martin et al., 2011).

Les résultats précédents suggèrent que les lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* modulent le programme de mort cellulaire via l'induction de l'apoptose et l'inhibition de l'autophagie. De plus, les données de la littérature relatant une modulation de la réponse inflammatoire par ces mécanismes. Nous avons donc cherché à approfondir le rôle de ces lipides dans la modulation de la sécrétion de médiateurs solubles par les macrophages après infection par *M. tuberculosis*. Pour ce faire, nous avons infectés des macrophages humains afin de caractériser leur réponse inflammatoire en dosant une sélection de médiateurs solubles dont la sécrétion est potentiellement induite par les macrophages au cours de la réponse immunitaire. Dans un second temps, les molécules présentant un intérêt sont analysées plus finement par un dosage ELISA. Nous avons choisi de faire cette analyse 24 heures après infection des macrophages par *M. tuberculosis* afin d'obtenir le maximum de signal et ce quel que soit la molécule dosée.

#### Etape de mise au point

L'utilisation de Membrane Array nous a permis de réaliser le criblage d'un grand nombre de médiateurs solubles potentiellement modulés en réponse à une infection par *M. tuberculosis*. Le dosage de ces médiateurs solubles est réalisé par quantification de l'interaction entre chaque médiateur spécifique et son anticorps chargé sur la membrane.

L'analyse de la sécrétion de médiateurs solubles par des macrophages infectés avec la souche H37Rv Pasteur révèle que l'infection par *M. tuberculosis* engendre la sécrétion de nombreuses molécules (**Figure 33**). Ces résultats sont compatibles avec la réponse inflammatoire classique d'une infection par *M. tuberculosis* décrite dans la littérature (van Crevel et al., 2002). Les intensités relatives supérieures à 10% ont été sélectionnées et analysées selon l'étude

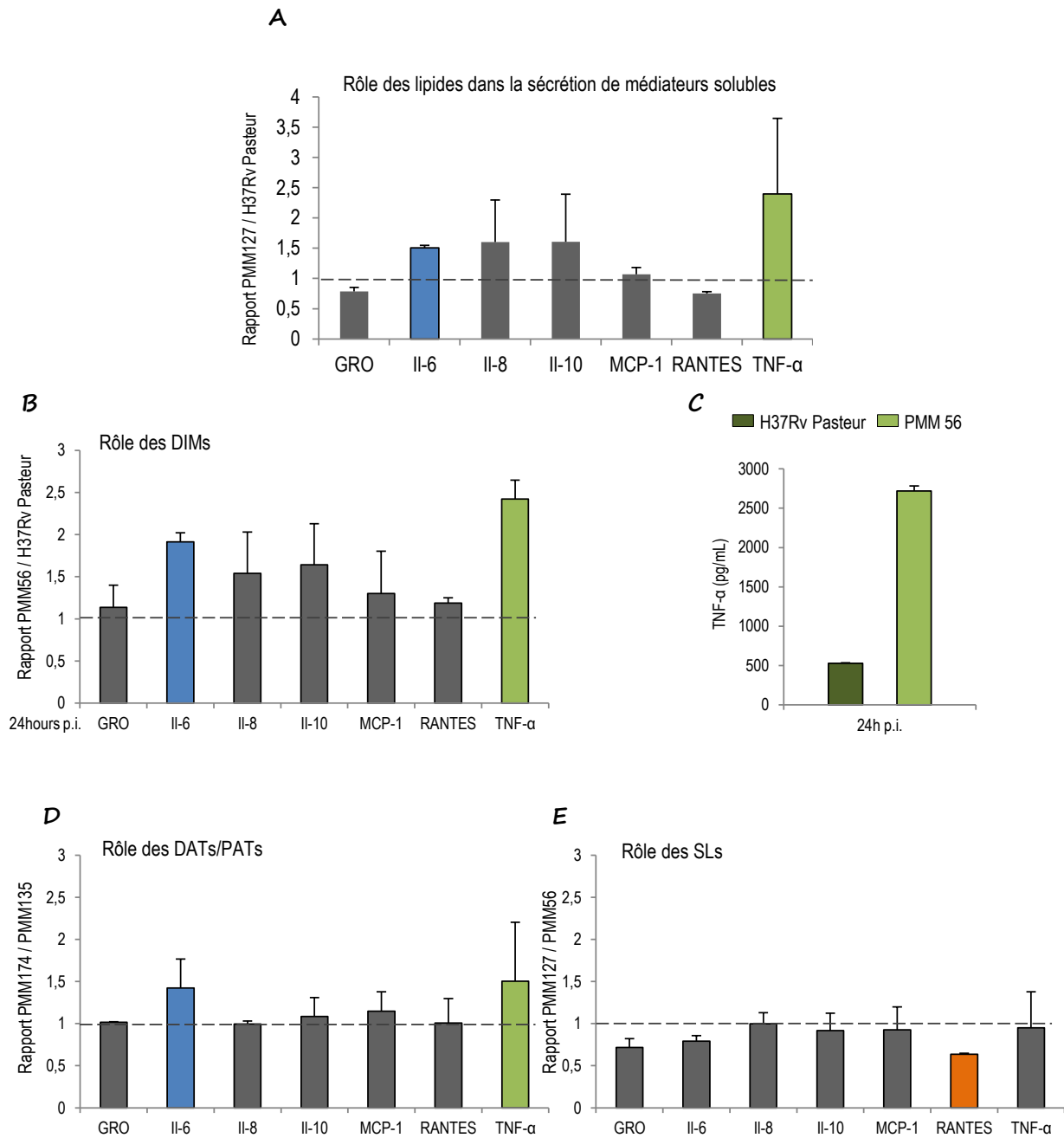


Figure 34: Rôle des lipides dans la sécrétion de médiateurs solubles par les macrophages infectés.

Expériences de Human Cytokine Antibody Array. (A) Modulation de la sécrétion de médiateurs solubles par les lipides d'intérêt en analysant le ratio de sécrétion des macrophages infectés par le triple mutant (PMM 127) par rapport à la souche sauvage (H37Rv Pasteur). (C) Dosage du TNF- $\alpha$  24heures après infection de macrophages par la souche sauvage et la souche mutée. (B, D, E) Rôle des DIMs (B), DATs/PATs (D) et des SLs (E) dans la sécrétion de médiateurs solubles par les macrophages infectés.  $2 \leq n \leq 3$ .

comparative établie. Parmi les molécules retenues, celles dont la variabilité coïncidait avec le seuil de 10% (GRO $\alpha$ , MDC, MIP-1 $\delta$ ) ainsi que les molécules non liées à l'inflammation (angiogénine et oncostatine M) ont été écartées.

### Résultats

L'étude du rôle des lipides est réalisée en effectuant un rapport de sécrétion de chacune des molécules entre la souche déficiente en lipides et sa souche contrôle. L'étude comparative des souches H37Rv Pasteur et PMM127 ne montre pas de modification majeure dans l'induction de la sécrétion de médiateurs solubles. Une légère augmentation de la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'Il-6 est observée mais n'est statistiquement pas significative. Ces résultats suggèrent que l'absence combinée des DIMs, DATs/PATs et SLs n'engendre pas de modifications remarquable de la réponse induite par *M. tuberculosis* à l'exception d'une tendance à l'augmentation de TNF- $\alpha$  et d'Il-6 (**Figure 34A**).

Dans un second temps, nous avons regardé la contribution individuelle de chacun de ces lipides. La comparaison de l'infection de macrophages par la souche PMM56 et la souche contrôle H37Rv Pasteur montre que l'absence de DIMs entraîne une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et dans une moindre mesure d'Il-6 (valeurs respectives des rapports PMM56/H37Rv Pasteur,  $2,4 \pm 0,4$  et  $1,9 \pm 0,1$ ) (**Figure 34B**). Les résultats obtenus pour le TNF- $\alpha$  ont été confirmés par un dosage quantitatif précis en ELISA et sont en accord avec les données de la littérature (Rousseau et al., 2004) (**Figure 34C**). Ces expériences doivent être poursuivies afin de quantifier en ELISAs la variation de sécrétion de l'Il-6.

L'analyse comparative des deux autres lipides d'intérêt ne permet pas de conclure sur un rôle potentiel des DATs/PATs dans la modulation de cette sécrétion (**Figure 34D**). En ce qui concerne les SLs, il semblerait que la présence augmente la sécrétion de la chimiokine RANTES, molécule impliquée dans le recrutement d'autres populations cellulaires sur le site d'infection et la formation du granulome (**Figure 34E**). L'hypothèse de l'implication des SL dans la formation du granulome a déjà été évoquée dans la littérature (Okamoto et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats semble nous orienter vers un rôle des lipides spécifiques des mycobactéries dans la modulation de la sécrétion de médiateurs solubles par les macrophages. Des expériences complémentaires sont indispensables à l'analyse plus fine du rôle respectif de chacun de ces lipides dans la modulation de la sécrétion. Par la suite, un lien entre la modulation de la programmation de la mort cellulaire et la sécrétion de médiateurs solubles pourra être analysé, notamment en étudiant la sécrétion de ces médiateurs dans des conditions d'induction ou d'inhibition de chacun des mécanismes décrits précédemment.



### 5. Discussion

Le travail réalisé dans la deuxième partie de ma thèse a eu pour objectif premier d'étudier la contribution des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la programmation de la mort cellulaire. Nous observons que *M. tuberculosis* module le programme de mort des macrophages humains en induisant un processus apoptotique suivi d'un évènement de nécrose et probablement une autophagie de faible amplitude. Dans ces conditions, les DIMs et les DATs/PATs seraient impliqués dans le contrôle de ces évènements.

Il est de plus en plus évident que la modulation de l'apoptose ou de l'autophagie de la cellule hôte par les agents pathogènes joue un rôle important dans la modulation des pathologies associées (Pour revue, Labbe and Saleh, 2008). L'induction des programmes de mort cellulaire constitue un déterminant important dans les interactions entre le pathogène et son hôte, et joue un rôle essentiel dans la persistance ou l'élimination des agents infectieux et dans le développement d'une pathologie.

Chez certains pathogènes tels que *Yersinia pestis* ou *Listeria monocytogenes*, la modulation du programme de mort cellulaire par induction du processus apoptotique permet aux bactéries d'infecter des cellules adjacentes qui phagocytent les corps apoptotiques contenant les agents pathogènes sans générer d'inflammation, et de ce fait utilisant la cellule comme un véritable « Cheval de Troie » en permettant la dissémination du pathogène sans pour autant déclencher de réaction du système immunitaire (Pour revue, Weinrauch and Zychlinsky, 1999). A l'inverse, d'autres pathogènes tels que *Legionella pneumophila* inhibent le processus apoptotique et induisent un épisode nécrotique favorable à une dissémination massive ainsi qu'à l'échappement aux mécanismes bactéricides mis en place par la cellule infectée, mais qui provoque une réponse inflammatoire et permet le recrutement et l'activation des autres cellules du système immunitaire. D'un autre côté, l'autophagie a elle aussi été décrite comme modulée par des agents pathogènes. Ainsi, certains pathogènes comme *Salmonella enterica* induiraient la mort du macrophage associée à l'induction d'un processus autophagique (Levine and Yuan, 2005).

Le contrôle du programme de mort cellulaire par *M. tuberculosis* joue un rôle important dans l'initiation et le devenir de l'infection. Dans un premier temps, en favorisant la survie de la cellule hôte, *M. tuberculosis* maintient un environnement favorable à sa multiplication. Dans un second temps, le déclenchement de la mort cellulaire permet au bacille de s'échapper et de se propager. Nos résultats montrent que l'induction de la mort cellulaire dans les macrophages humains par *M. tuberculosis* passe par le déclenchement de l'apoptose, et sont en accord avec les travaux de Lee et collaborateurs dont les résultats démontrent que *M. tuberculosis* peut induire un processus





apoptotique du macrophage, favorisant ainsi sa dissémination selon un processus d'échappement silencieux (Lee et al., 2006). A ce stade de nos travaux, les résultats doivent être approfondis car dans la littérature, outre la thèse allant dans le sens d'une apoptose favorable à *M. tuberculosis*, une autre thèse acte quant à elle contre ce phénomène, faisant de l'induction de l'apoptose un processus controversé. En effet, l'échappement silencieux de *M. tuberculosis* lui serait défavorable car l'efferocytose induit une phagocytose bactéricide par les cellules phagocytaires environnantes, dirigeant *M. tuberculosis* vers un phagolysosome (Martin et al., 2012).

Au cours du temps post-infection, nos travaux montrent que la diminution de l'apoptose coïncide avec une augmentation de la nécrose. Il reste à déterminer s'il s'agit d'une nécrose primaire induite par *M. tuberculosis* ou d'une nécrose secondaire à l'apoptose. Le groupe de Remold démontre que l'infection par une souche virulente module le programme de mort cellulaire en induisant l'instauration d'une nécrose secondaire à partir du déclenchement d'un processus apoptotique (Chen et al., 2006; Gan et al., 2008). Cette transition est due à une instabilité de la membrane plasmique, associée à une inhibition du processus de réparation modulée par les médiateurs lipidiques de l'hôte (Divangahi et al., 2009). Les auteurs proposent que le mécanisme d'échappement des mycobactéries dans le cytosol de la cellule pourrait être impliqué dans la formation de ces dommages membranaires (Pour revue, Behar et al., 2010).

L'utilisation de la souche mutée PMM127 nous a permis de mettre en évidence un rôle collectif des lipides spécifiques de l'enveloppe des mycobactéries dans le contrôle de la mort cellulaire. Individuellement, ces résultats préliminaires suggèrent un rôle des DIMs et des DATs/PATs dans l'apoptose et la nécrose. Nos travaux concernant le processus apoptose/nécrose sont cohérents avec de précédents résultats indiquant que le candidat vaccin SO2 est incapable d'induire l'apoptose. Cette souche est mutée dans la voie de biosynthèse des DIMs ainsi que sur le gène *phoP* codant une partie du système à deux composantes PhoP/R qui régule entre autres les voies de biosynthèses des DATs/PATs ainsi que des SLs (Arbues et al., 2012, communication personnelle). C'est la première fois qu'un travail met en évidence l'expression par *M. tuberculosis* de facteurs ayant des propriétés d'induction de l'apoptose. *M. tuberculosis* est décrite pour inhiber les processus apoptotique et autophagique (Pour revue, Behar et al., 2010). En effet, *M. tuberculosis* synthétise deux protéines, Eis et ESAT-6, qui sont des facteurs mycobactériens modulant négativement l'autophagie (Pour revue, Jo, 2013). De la même manière, *M. tuberculosis* est capable d'inhiber les différentes voies d'induction de l'apoptose. Ainsi, la synthèse de facteurs mycobactériens tels que SecA2, NuoG ou PknE inhibe le processus d'induction de l'apoptose (Pour revue, Briken and Miller, 2008; Kumar and Narayanan, 2012; Velmurugan et al., 2007). L'inhibition de ces deux mécanismes contribue à l'induction de la nécrose de la cellule infectée, phénomène qui serait plus favorable aux mycobactéries car cela leur permettrait de disséminer



massivement, mais serait aussi favorable à l'hôte car l'induction de ce mécanisme est associée à une réponse inflammatoire (Iyer et al., 2009; Scaffidi et al., 2002).

Aux vues de ces données, il apparaît donc essentiel de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des voies apoptotique et autophagique au cours de l'infection par *M. tuberculosis*. Nos résultats préliminaires actant en faveur d'un rôle de ces lipides dans l'induction de l'apoptose et l'inhibition de l'autophagie, il serait intéressant de rechercher si un lien physiologique d'inhibition mutuelle existe entre ces deux processus cellulaires. L'utilisation d'inhibiteurs de chacune de ces voies permettrait de répondre à cette question (Figure 10). Dès lors, il sera possible de chercher à identifier les voies de signalisation communes à ces deux processus cellulaires potentiellement mises en jeu au cours de l'infection. Une de ces voies est particulièrement intéressante, médiée par la protéine Beclin-1, car elle est impliquée à la fois dans l'induction de l'autophagie et l'inhibition de l'apoptose comme observé lors de l'infection des macrophages par *M. tuberculosis* (Pour revue, Kang et al., 2011).

L'approche pharmacologique et l'utilisation des lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* comme modulateurs naturels de l'apoptose et de l'autophagie nous permettrait de progresser dans la caractérisation des voies de signalisation associées au contrôle de la mort cellulaire par *M. tuberculosis*, et par conséquent également associée à la propagation du bacille.



CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

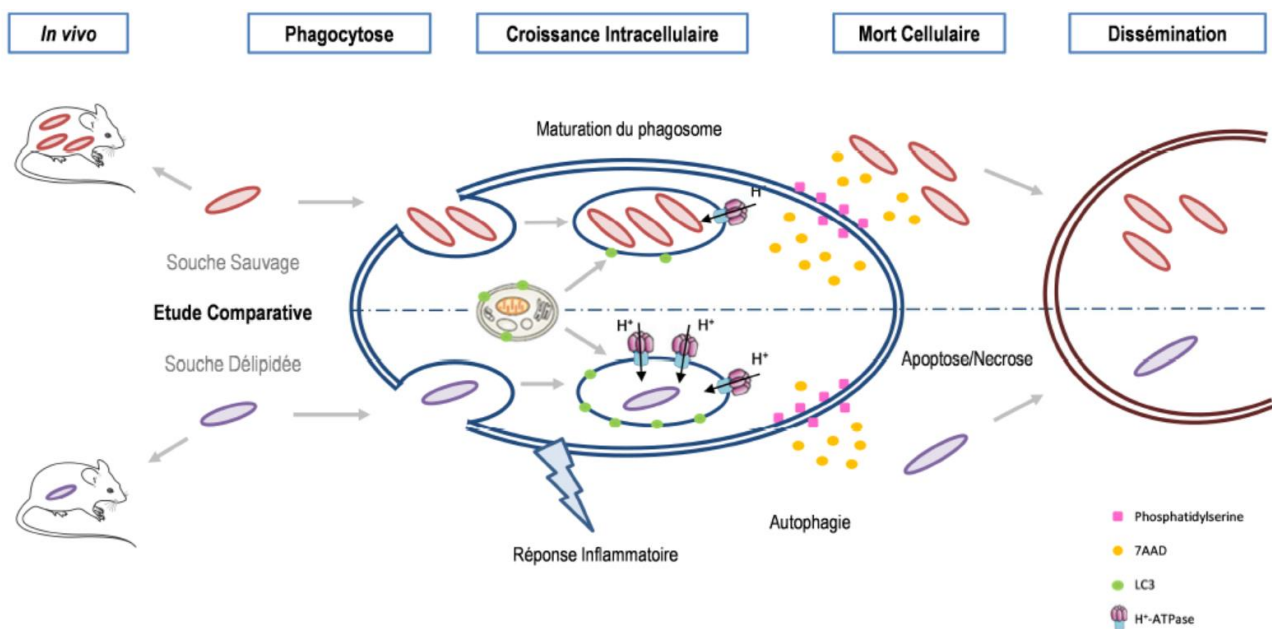


Figure 35 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des données présentées dans ce manuscrit.

Il est maintenant clairement admis que la pathogénie de la tuberculose est conditionnée par la rencontre du bacille avec le macrophage, sa capacité à survivre et se multiplier au sein de son hôte, ainsi qu'à s'en échapper pour se disséminer. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse ouvre de nombreuses perspectives de recherche en ce qui concerne le rôle des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la virulence et la pathogénie de la tuberculose.

L'objectif premier de mon travail de thèse était de mettre en évidence un rôle des DATs/PATs et/ou des SLs dans la virulence de *Mycobacterium tuberculosis*. Les résultats antérieurs obtenus lors d'études individuelle ou collective de ces deux lipides d'enveloppe ne permettaient pas, *in vivo* dans un modèle murin, de mettre en évidence leur rôle dans la virulence du bacille. Cependant, l'étude de ces molécules sous forme purifiée avait permis de leur attribuer un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire lors d'une infection par *M. tuberculosis*. Mon travail de thèse a permis démontrer pour la première fois un rôle des DATs/PATs et dans une moindre mesure les SLs en tant que facteurs de virulence, et ce grâce à une approche de mutations simples ou cumulées sur les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des lipides de l'enveloppe. Cette approche unique m'a aussi permis de mettre en évidence une collaboration entre les lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* selon une hiérarchisation fonctionnelle, avec un rôle majeur des DIMs masquant celui des DATs/PATs et des SLs. Cette hiérarchisation pourrait s'étendre à d'autres lipides d'enveloppe connus pour jouer un rôle majeur dans la virulence, comme les dimycolates de tréhalose (TDMs). La construction d'une souche PMM127 (souche ne synthétisant plus aucun de nos trois lipides d'intérêt) délétée du gène *hma* impliqué dans la décoration des acides mycoliques, composants des TDMs, a permis de montrer que la modification structurale de ces acides mycoliques aggrave l'atténuation de la souche PMM127 en comparaison avec la souche sauvage H37Rv Pasteur (**Annexe 6**). Il pourrait être intéressant, après caractérisation de la souche, de la tester pour sa virulence *in vivo* dans un modèle murin car la recherche d'une souche atténuée est d'actualité dans les stratégies de prévention de la tuberculose.

Les lipides contribuent à la fois à la virulence du bacille *in vivo* dans un modèle murin et *ex vivo* dans les macrophages humains (**Figure 35**). Si ce travail s'est principalement focalisé sur la cellule centrale de la réponse immunitaire à une infection par *M. tuberculosis* qu'est le macrophage, on peut néanmoins se demander si les seules modulations des mécanismes





macrophagiques sont la cause de l'impact des lipides sur la virulence. Il est possible d'envisager de nouvelles expériences *ex vivo* nous permettant d'analyser l'effet de ces lipides sur les capacités d'interaction entre les macrophages et les autres cellules de l'immunité, et notamment leur action sur les capacités de différenciation et de migration des cellules dendritiques, cellules clés de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

La collection de souches en notre possession est un outil intéressant nous permettant aussi d'envisager des expériences *in vivo* afin de replacer le rôle de ces lipides dans un système entier et complexe. Des analyses histologiques comparatives entre des poumons de souris infectées avec la souche sauvage ou avec la souche mutée PMM127 ne synthétisant plus aucun des lipides d'intérêt permettraient d'étudier le rôle de ces lipides dans le recrutement des différentes populations cellulaires.

Le second objectif de mon travail de thèse était d'explorer le rôle de ces lipides dans la pathogénie de la tuberculose. En me focalisant sur le macrophage humain, j'ai montré que les lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* jouent un rôle à la fois dans le devenir du bacille au sein de la cellule en contrôlant le pH intraphagosomal, mais qu'ils jouent aussi un rôle dans le devenir de la cellule elle-même en contrôlant l'induction du programme de mort cellulaire.

Nous montrons que ces lipides participent à la régulation de la réponse bactéricide du macrophage en contrôlant l'acidification du phagosome, et notamment en modulant le recrutement de H<sup>+</sup>-ATPases à la surface du compartiment phagosomal. Une analyse plus profonde de la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu a été amorcée dans l'équipe. En se basant sur la mise en évidence de la modulation des propriétés biophysiques de la membrane plasmique du macrophage humain par les DIMs au cours de la phagocytose des mycobactéries (Astarie et al., 2009), nous proposons que les DIMs seraient capables de moduler l'acidification du phagosome grâce à ces mêmes capacités. Les DIMs sont composés d'une partie lipidique ramifiée avec des groupements méthyl semblable à celle des DATs/PATs et les SLs, et l'ensemble des résultats obtenus met en évidence un rôle potentialisateur des DATs/PATs et des SLs sur celui des DIMs. Il serait intéressant de déterminer si la partie lipidique commune est responsable des activités modulatrices des fonctions microbicides du macrophage, auquel cas un même mécanisme moléculaire de modulation des propriétés biophysiques des membranes cellulaires pourrait être envisagé.



Des résultats récents indiquent que *M. tuberculosis* transite dans un compartiment lysosomal avant de s'en échapper pour s'accumuler dans le cytosol (Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007). En collaboration avec R. Siméone (Institut Pasteur, Paris), nous avons entrepris des expériences préliminaires dans les macrophages humains qui montrent que la souche PMM127 délipidée s'échappe moins du phagosome que la souche contrôle H37Rv Pasteur (**Annexe 5**). Il est donc envisageable que les lipides d'enveloppe participent à la faculté de *M. tuberculosis* de s'échapper du phagosome.

Ces premières observations doivent être reproduites et confirmées par d'autres approches mais elles sont prometteuses et ouvrent sur des perspectives d'investigations intéressantes. En effet, *M. tuberculosis*, localisée dans le cytoplasme de la cellule hôte, a potentiellement accès à d'autres mécanismes cellulaires impliqués dans le contrôle de l'infection. Il est donc envisageable que *M. tuberculosis* puisse moduler la réponse immunitaire de l'hôte en régulant la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Ce phénomène a déjà été chez d'autres pathogènes. Par exemple, il a récemment été montré qu'au cours d'une infection par *Listeria monocytogenes*, les bactéries internalisées sécrètent un facteur de virulence capable de pénétrer dans le noyau afin d'interagir avec un complexe protéique responsable de la modulation de l'expression de gènes codant des molécules pro-inflammatoires (Lebreton et al., 2011). *M. tuberculosis* est décrit comme régulant le récepteur nucléaire PPAR- $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Factor Gamma) par une cascade de signalisation issue d'une interaction entre les mycobactéries et le récepteur au mannose (Rajaram et al., 2010). PPAR- $\gamma$  est un récepteur lipidique nucléaire agissant comme un facteur de transcription complexé de façon hétérodimérique. Le complexe induit la modulation de l'expression de gènes inflammatoires (Jiang et al., 1998) ainsi que l'apoptose des macrophages (Chinetti et al., 1998). Son activation est aussi possible directement par la liaison de ligands lipidiques. L'ensemble de ces données étant compatibles avec nos résultats, il serait donc intéressant d'étudier l'éventuel effet des lipides spécifiques des mycobactéries sur l'activation de ce récepteur, et les conséquences inflammatoires qui en découlent.

D'après les données bibliographiques, Les lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* partagent certaines de leurs activités biologiques avec un autre facteur de virulence : la protéine ESAT-6 (Yu and Xie, 2012) parmi lesquels un contrôle de l'échappement du bacille dans le cytosol (Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007). Ces auteurs ont montré que *M. bovis* BCG naturellement déficiente en ESAT-6 ne s'échappe pas du cytosol. En revanche, l'expression d'ESAT-6 dans *M. bovis* BCG lui confère une capacité d'échappement (Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007) mais si et seulement si la



souche synthétise des DIMs (R. Brosch, communication personnelle). Ces deux molécules ayant été décrites pour exercer des effets membranaires, l'une en formant des pores et l'autre en modifiant les propriétés biophysiques, il serait possible d'envisager que la présence des lipides conditionne l'activité d'ESAT-6 et la formation de pores afin de favoriser l'échappement dans le cytosol. Ces hypothèses sont en cours de vérification dans l'équipe.

*Mycobacterium tuberculosis* est non seulement capable de contrôler son devenir au sein de la cellule hôte, mais aussi de contrôler le devenir de la cellule elle-même. En effet, les mycobactéries contrôlent le programme de mort cellulaires des macrophages humains. Au cours de ma thèse, nous avons entrepris l'étude du rôle des lipides de l'enveloppe dans ce phénomène. Les résultats préliminaires obtenus montrent un rôle des DIMs et des DATs/PATs dans le contrôle de la mort cellulaire via une induction du processus apoptotique et une inhibition du processus autophagique. Après avoir confirmés l'ensemble de ces résultats, il serait intéressant de déterminer s'il existe un lien physiologique entre ces deux processus cellulaires, permettant de définir une ou des voies de signalisations associées à ce mécanisme de contrôle, et de propagation de l'infection *par M. tuberculosis*.

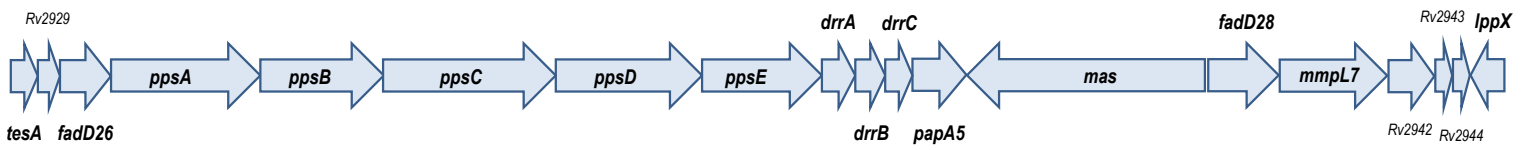
**En conclusion, ce travail aura permis de mettre en évidence un phénomène de hiérarchisation fonctionnelle des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* permettant de comprendre un peu mieux comment le bacille contrôle son devenir au sein de la cellule hôte, mais contrôle aussi le devenir de cette cellule hôte dans un objectif global de maintien d'un environnement favorable à sa réplication. L'ensemble des résultats présentés ouvre la voie à de nouveaux axes de recherche dont l'objectif ultime est de mieux comprendre les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires afin de développer de nouveaux axes thérapeutiques.**



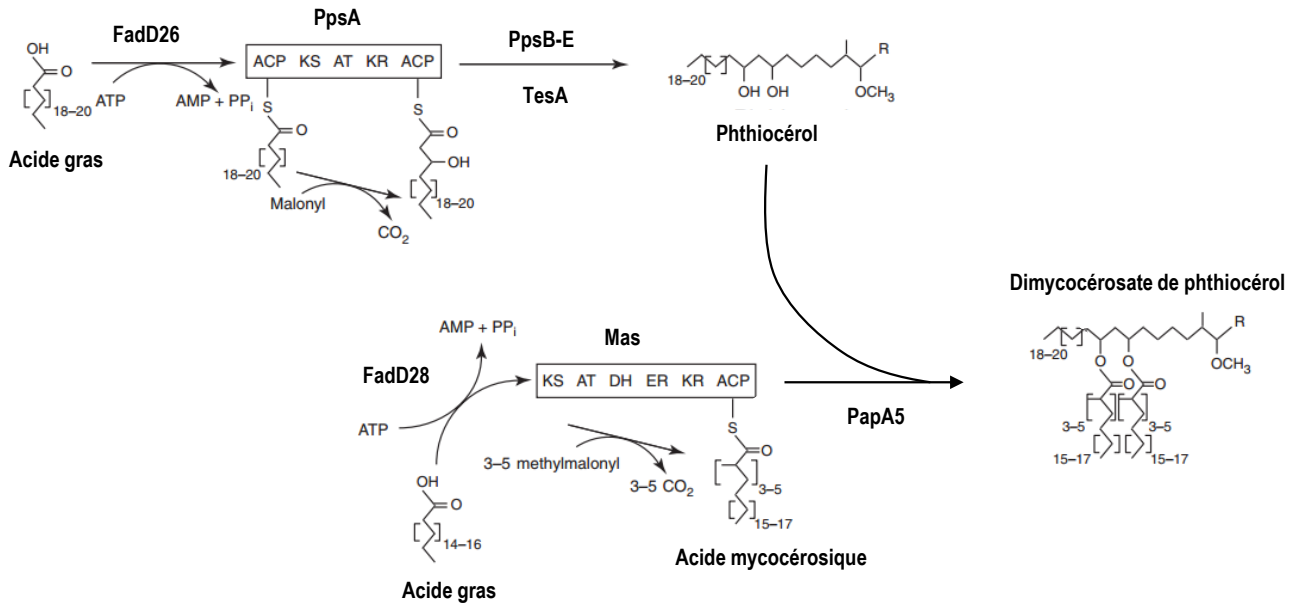
# *ANNEXES*



**A**



**B**



## ANNEXE 1 : Voie de biosynthèse des DIMs

Chez *M. tuberculosis*, les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des DIMs sont regroupés dans un cluster d'environ 50Kb (**A**). Leur structure consiste en une chaîne de phthiocérol estérifiée par deux acides mycocérosiques.

La synthèse de la chaîne de phthiocérol démarre par l'activation, via la Fatty acid-AMP ligase (FAAL) FadD26, d'une chaîne d'acide gras (**B**). Cette activation est réalisée par transfert d'un groupement phosphate grâce à l'utilisation d'ATP (Trivedi et al., 2004). Une fois l'acide gras activé, il est ensuite transféré successivement sur les Pks PpsA à PpsE (Phenol Phthiocerol Synthesis A-E), permettant son allongement par condensations successives. Ces condensations se font grâce aux sous-domaines fonctionnels des PpsA à E (Trivedi et al., 2005). La chaîne de phthiocérol néoformée est libérée de PpsE par l'action de la thioestérase de type II TesA (Rao and Ranganathan, 2004; Waddell et al., 2005).

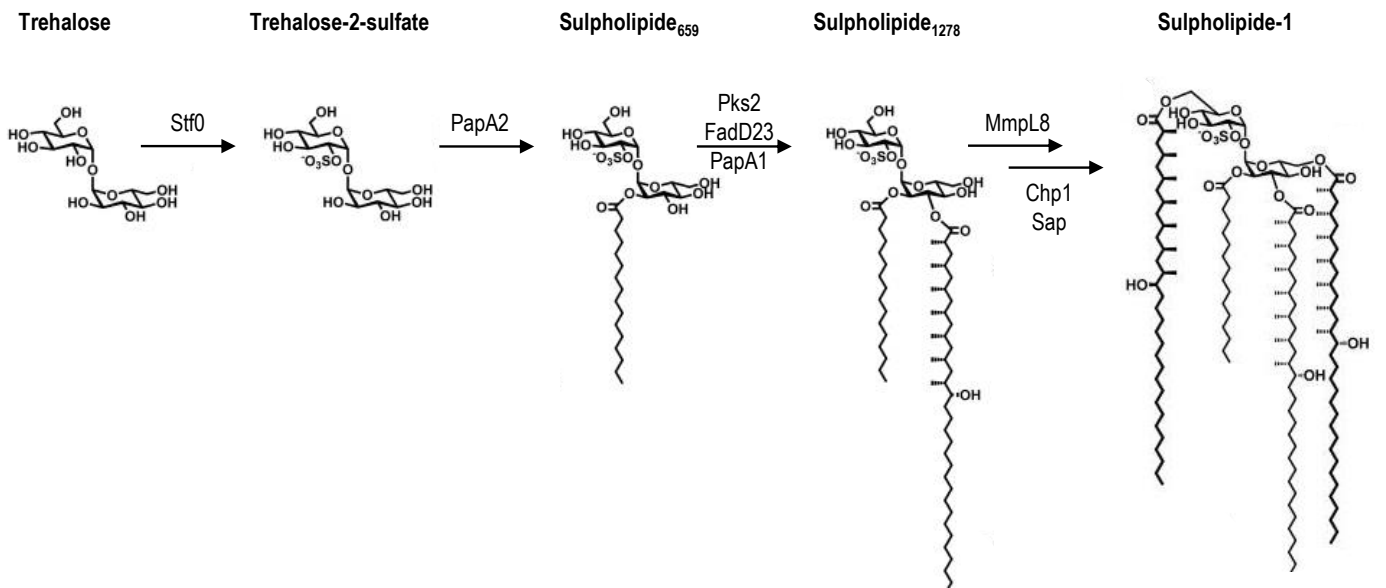
De la même manière, les deux acides mycocérosiques sont formés à partir d'acides gras activés par la protéine FadD28 et transférés sur la Pks Mas (Mycocerosic Acid Synthase) qui pourra permettre leurs élongations respectives par condensation. Comme pour les Pps, Mas est constituée de sous-domaines fonctionnels responsables de la condensation des acides mycocérosiques. Enfin, la liaison de la chaîne  $\beta$ -diol aux deux acides mycocérosiques se fait par une acyltransférase, la protéine PapA5 (Polyketide-associated protein A5) (Onwueme et al., 2004; Trivedi et al., 2005).

Une fois synthétisés, les DIMs sont transportés à la surface de la bactérie. Trois protéines sont impliquées dans ce transport : MmpL7 (Camacho et al., 2001; Cox et al., 1999), LppX (Sulzenbacher et al., 2006), et la sous-unité DrrC d'un transporteur de type ABC (Camacho et al., 2001). L'interaction potentielle entre PpsE et MmpL7 permettrait de localiser la biosynthèse des DIMs à l'interface entre le cytosol et la membrane plasmique (Jain and Cox, 2005).

A



B



## ANNEXE 2 : Voie de biosynthèse des SLs

La forme majoritaire des sulfolipides, SL-1, est composée d'un tréhalose sur lequel sont greffés quatre acides gras. Les gènes codant les protéines impliquées dans la biosynthèse des SLs sont localisés sur le génome de *M. tuberculosis*, dans une région chromosomique d'environ 17kb (A).

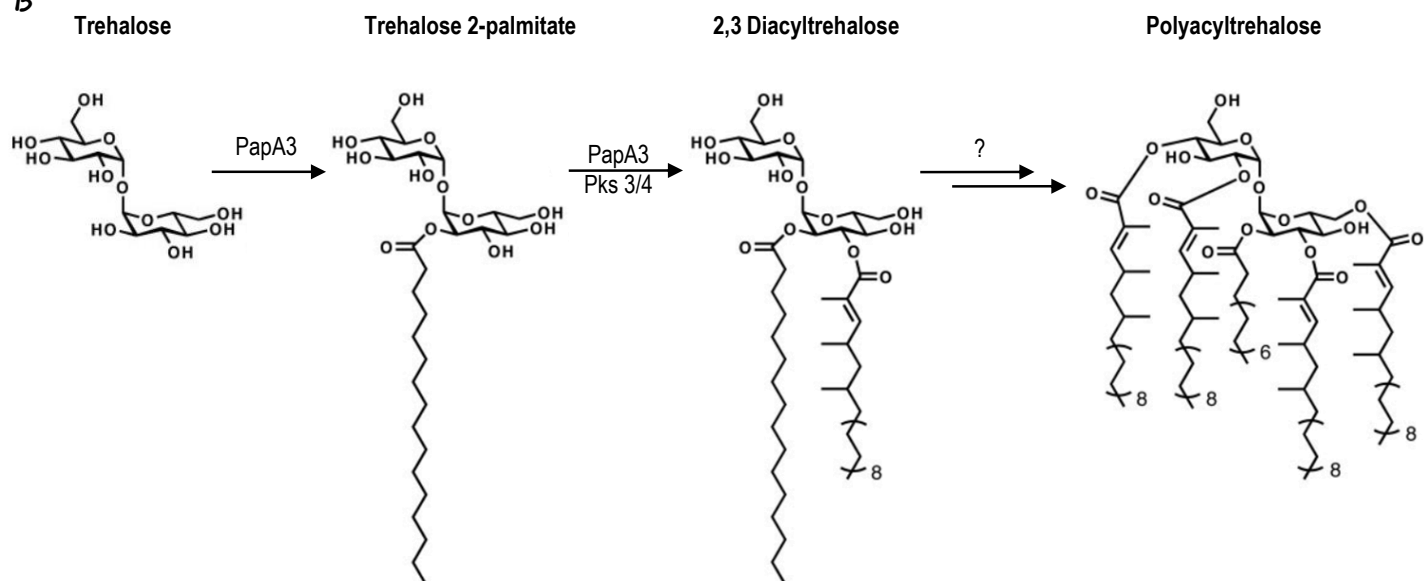
L'étape initiale de la biosynthèse des SLs est le transfert d'un sulfate en position 2 d'un tréhalose par la sulfotransférase Sft0 (Mougous et al., 2004) (B). A partir de ce tréhalose-2-sulfate (T2S), deux acyltransférases, PapA1 & PapA2, vont intervenir dans l'acylation de ce T2S (Bhatt et al., 2007). L'acyltransférase PapA2 permet la fixation d'un acide gras sur le tréhalose-2-sulfate néoformé (Kumar et al., 2007). Parallèlement, l'enzyme Pks2 synthétise une chaîne hydroxy-phthiocérannique méthyl-branchée (Sirakova et al., 2001), acide gras ensuite activé par l'acyl-AMP ligase FadD23 (Lynett and Stokes, 2007). T2S est acylé par le produit de Pks 2 via l'action de la protéine PapA1 (Kumar et al., 2007). Le produit formé est alors un sulfolipide diacylé.

D'autres protéines ont récemment été impliquées dans la biosynthèse des SLs. La protéine Chp1 est responsable des deux autres acylations nécessaires à l'élaboration du lipide majoritaire SL-1. Cette activité enzymatique est complétée par l'activité de la protéine MmpL8 (Seeliger et al., 2011). Cette protéine joue par ailleurs un rôle essentiel dans le transport du SL-1 formé depuis la membrane plasmique jusque dans les couches externes de l'enveloppe mycobactérienne. Une seconde protéine, Sap, est elle aussi essentielle pour le transport des SL (Seeliger et al., 2011). Le double rôle de MmpL8, à la fois dans la biosynthèse et dans le transport, permet de localiser la biosynthèse de ce lipide à l'interface entre la membrane plasmique et le cytosol.

**A**



**B**



### ANNEXE 3 : Voie de biosynthèse des DATs/PATs

Dans le *Complexe MTBC*, les DATs/PATs sont des lipides exclusivement synthétisés par *M.tuberculosis* et *M.canettii*, et dont la voie de biosynthèse est la moins bien renseignée. Le cluster de gènes codant cette voie est très comparable à celui des SLs, mais de taille plus restreinte, ne mesurant que 7,6 kb (**A**).

Toujours à partir d'un tréhalose, la protéine PapA3 permet la liaison d'un acide palmitique à ce dernier pour former un trehalose-2-palmitate (T2P) (**B**). Dans un second temps, elle transfère le produit de la Pks 3/4, pour former un 2,3-diacyltrehalose (Dubey et al., 2002; Hatzios et al., 2009). Ce lipide est alors soit exporté comme tel à la surface de la mycobactérie, soit utilisé comme intermédiaire dans la voie de biosynthèse des PATs. Dans ce cas, trois autres acides gras sont greffés aux DATs. Par homologie avec la biosynthèse des SLs, la protéine MmpL10 est définie comme potentiellement impliquée dans le transport des DATs/PATs à la surface des mycobactéries.



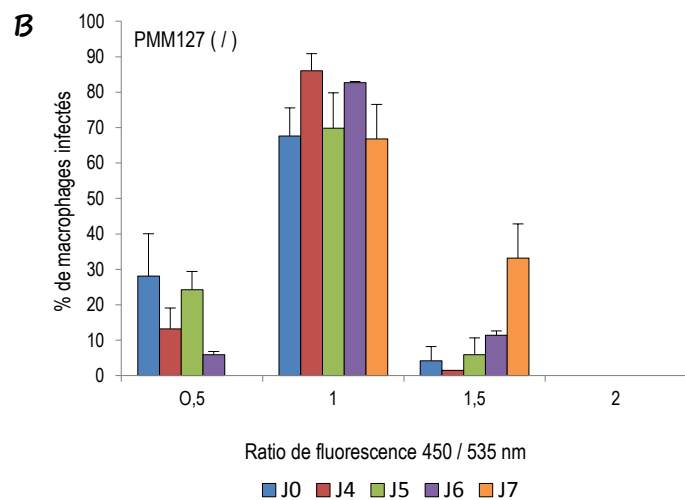
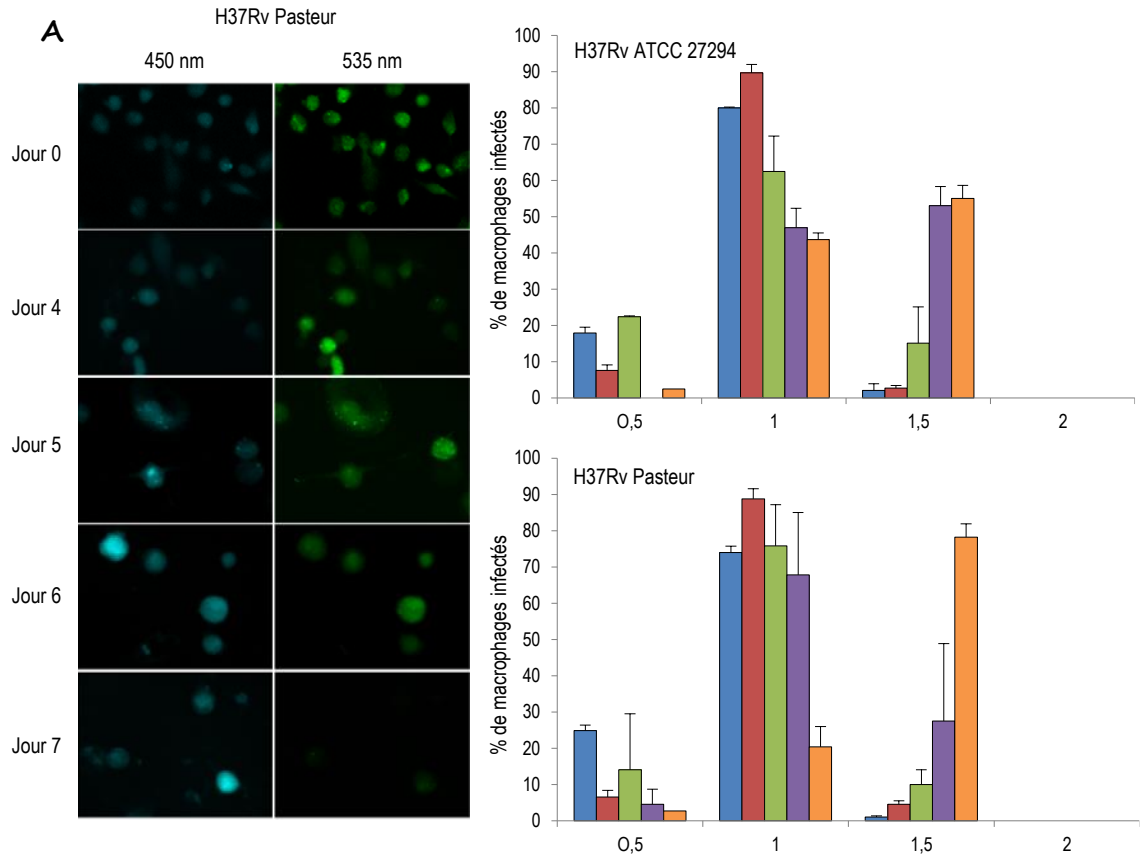
## ANNEXE 4 : Membrane Arrays

Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- $\alpha$	I-309	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-79	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- $\alpha$	I-309	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12p40p70	IL-13	IL-15	IFN- $\gamma$
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12p40p70	IL-13	IL-15	IFN- $\gamma$
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 $\delta$	RANTES	SCF	SDF-1TA	RC	TGF- $\beta$ 1
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 $\delta$	RANTES	SCF	SDF-1TA	RC	TGF- $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	EGF	IGF-1	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos
TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	EGF	IGF-2	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos

### Composition des Membranes Arrays.

Pour chaque membrane, 12 contrôles internes sont réalisés (rouge) : 6 contrôles négatifs et 6 contrôles positifs. Chaque molécule est analysée en duplica. 42 molécules sont analysées simultanément.





### *Etude du rôle des lipides de l'enveloppe de *M. tuberculosis* dans l'échappement dans le cytosol.*

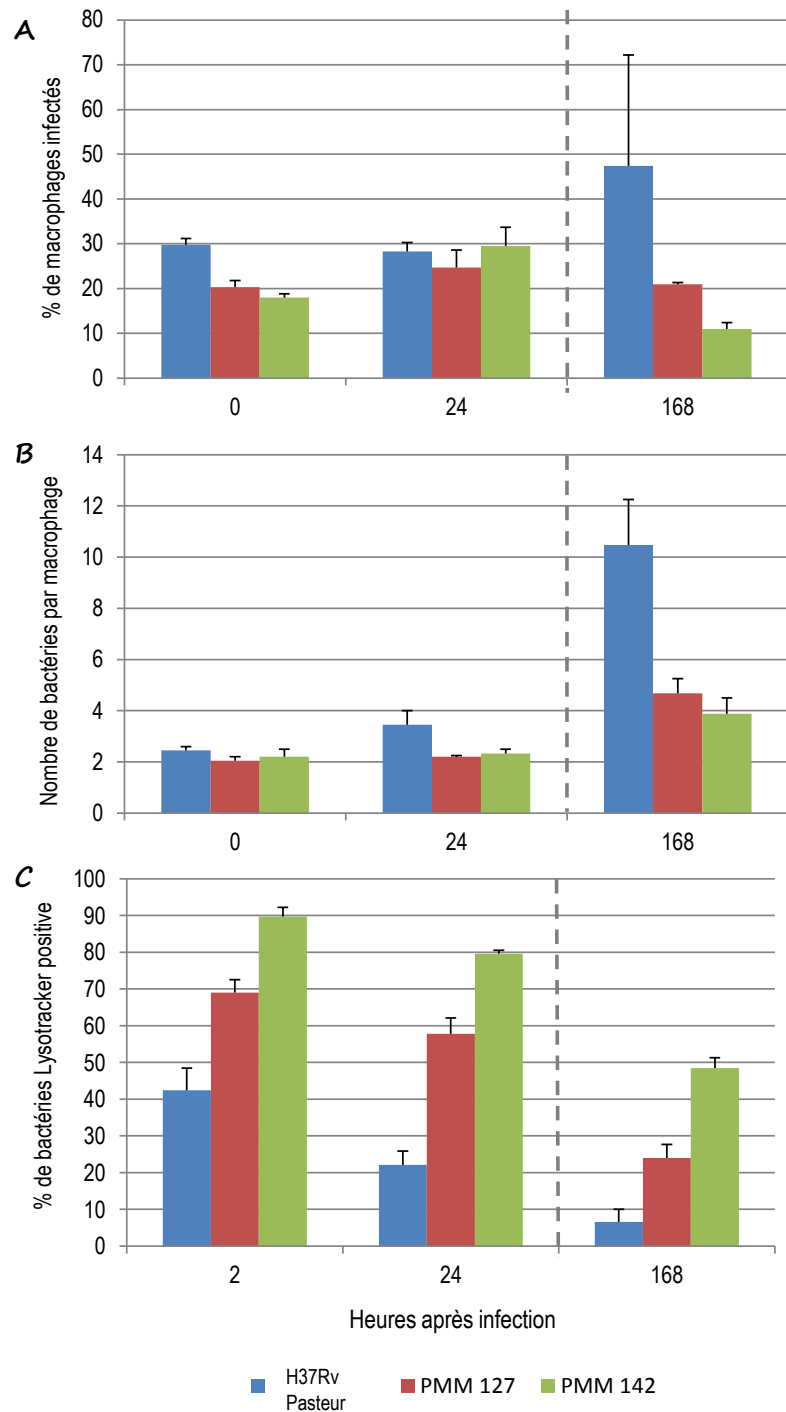
Selon le protocole utilisé dans Simeone et al., 2012, des cellules THP-1 sont mises en culture puis infectées avec la souche d'intérêt avant d'être analysées en fonction de leur capacité de fluorescence à 450nm (visualisation des mycobactéries dans le cytosol de la cellule) et à 535nm (visualisation des mycobactéries dans les phagosomes)(A). Le rapport de fluorescence 450/535 nm permet de définir une cinétique d'échappement des mycobactéries, que ce soit avec les souches sauvages (A) ou la souche PMM127 (B). Les auteurs considèrent qu'à partir d'un rapport de 1,5, il y a échappement dans le cytosol des cellules infectées. Les images de fluorescence sont issues de Simeone et al., 2012.

## ANNEXE 5 : Echappement dans le cytosol

En collaboration avec Roxane Siméone (R. Brosch, Institut Pasteur, Paris), une étude de la contribution des lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* dans le mécanisme d'échappement du phagosome est réalisée.

Brièvement, des cellules de la lignée monocyttaire THP-1 sont incubées avec le substrat de  $\beta$ -lactamase CCF-4-AM (Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein-4-AcetoxyMethyl). Cette molécule lipophile diffuse passivement au travers des membranes plasmiques. Une fois dans la cellule, elle est clivée par des estérases cytosoliques qui piègent le produit CCF-4, chargé négativement, dans le cytosol. La molécule CCF-4-AM est composée de deux fluorochromes (coumarine et fluoresceine) liés par un groupement  $\beta$ -lactame, et est sensible au FRET. Les molécules intactes de CCF-4 émettent à une longueur d'onde de 535 nm, alors que celles ayant subi l'activité enzymatique des  $\beta$ -lactamases qui va découpler les deux fluorochromes, synonyme de la présence des mycobactéries dans le cytosol, émettent à 450nm (**A**). Les THP-1 pré-incubées sont infectées 2 heures avec chacune des souches à une MOI de 1:1. A différents temps post-infection, les échantillons sont excités à 405 nm et les émissions sont suivies afin d'établir un ratio 450/535 nm. Un échappement du phagosome est considéré pour les résultats strictement supérieurs à 1. Les résultats reflètent la moyenne de deux expériences indépendantes, pour chacune desquelles plusieurs centaines de cellules infectées ont été analysées.

Les résultats préliminaires montrent que les souches sauvages H37Rv ATCC et H37Rv Pasteur semblent avoir la capacité de s'échapper dans le cytosol progressivement au cours de l'infection (**A**). L'analyse de la souche PMM 127 ne synthétisant ni DIM, ni DAT/PAT, ni SL suggère que l'absence de lipides restreint drastiquement la capacité de *M. tuberculosis* à s'échapper dans le cytosol (**B**). Les lipides semblent donc être impliqués dans l'échappement de *M. tuberculosis* depuis le phagosome vers le cytosol de la cellule infectée. Ces analyses doivent être confirmées avant d'entreprendre une étude plus fine de la contribution individuelle de chacun des lipides d'intérêt.



### *Etude de l'effet cumulé des DIMs, DATs/PATs, SLs et des OMA.*

Des macrophages humains sont infectés 1 heure à une MOI de 10 :1 pour les temps courts (H0, H2 et H24 après infection) et à une MOI de 2 :1 pour les temps longs (H168 après infection) avec les souches H37Rv Pasteur (DATs/PATs<sup>-</sup>, bleu), PMM127 (DIMs<sup>-</sup>, DATs/PATs<sup>-</sup>, SLs<sup>-</sup>, rouge) et PMM142 (DIMs<sup>-</sup>, DATs/PATs<sup>-</sup>, SLs<sup>-</sup>, OMA<sup>-</sup>, vert). Pour chaque temps, le pourcentage de macrophages infectés (A), le nombre moyen de bactéries par macrophage (B) ainsi que le pourcentage de mycobactéries positives au LysoTracker, un marqueur des compartiments acides (C). Histogrammes représentant la moyenne de 2 expériences indépendantes.

## ANNEXE 6 : Délétion du gène *hma* dans la souche PMM127

Des macrophages humains sont mis en culture avant d'être infectés par la souche de *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur, la souche PMM127 mutée dans les voies de biosynthèse des DIMs, SLs et DATs/PATs, et la souche PMM142 qui possède les mêmes mutations que PMM127 accompagnées d'une délétion du gène *hma*, essentiel à l'oxygénation des acides mycoliques (OMAs pour Oxygenated Mycolic Acids). Les macrophages sont infectés pendant une heure à une MOI de 10 :1 pour les temps courts (H0, H2 et H24) et MOI 2 :1 pour les temps longs (7jours). Pour chaque temps de post-infection, les cellules sont analysées en microscopie à fluorescence pour leur pourcentage d'infection (**A**), le nombre moyen de bactéries par macrophage (**B**) ainsi que le pourcentage de bactéries présentent dans un compartiment acide (**C**).

Les résultats préliminaires issus de la moyenne de deux expériences indépendantes montrent un profil attendu des souches H37Rv Pasteur et PMM127. Ces résultats suggèrent par ailleurs que la souche PMM142 est phagocytée dans les macrophages humains de façon comparable à la souche PMM127 (17,9%  $\pm$ 0,8 Vs 20,3%  $\pm$  1,5, respectivement), alors que le pourcentage de macrophages infectés en absence d'acides mycoliques oxygénés est plus faible 7 jours après infection en comparaison à la souche PMM127 (11%  $\pm$  1,4 Vs 21%  $\pm$  0,4) (**A**). L'analyse du nombre moyen de bactéries par macrophage révèle des profils similaires pour les deux souches quelque que soit la durée de post-infection (**B**). Enfin, la souche PMM142 semble s'accumuler davantage dans un compartiment acide en comparaison à la souche PMM127, et ce dès deux heures post-infection (89,8%  $\pm$ 2,5 Vs 69%  $\pm$  3,6) (**C**).

L'ensemble de ces résultats est préliminaire et des expériences supplémentaires doivent être réalisées au laboratoire afin de valider statistiquement les résultats. Néanmoins, il semble que l'absence d'acides mycoliques oxygénés aggrave l'atténuation de la souche PMM127 dans les macrophages humains.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abou-Zeid, C., Garbe, T., Lathigra, R., Wiker, H.G., Harboe, M., Rook, G.A., and Young, D.B. (1991). Genetic and immunological analysis of Mycobacterium tuberculosis fibronectin-binding proteins. *Infection and immunity* 59, 2712-2718.
- Abou-Zeid, C., Ratliff, T.L., Wiker, H.G., Harboe, M., Bennedsen, J., and Rook, G.A. (1988). Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. *Infection and immunity* 56, 3046-3051.
- Alonso, S., Pethe, K., Russell, D.G., and Purdy, G.E. (2007). Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6031-6036.
- Andersen, P., and Doherty, T.M. (2005). The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews Microbiology* 3, 656-662.
- Arbues, A., Aporta, A., Aguilo, J.I., Monzon, M., Badiola, J.J., de Martino, A., Ferrer, N., Marinova, D., Anel, A., Martin, C., *et al.* (2012). Attenuated Mycobacterium tuberculosis SO2 vaccine candidate is unable to induce cell death. *PLoS one* 7, e45213.
- Astarie, C., Nigou, J., Passemar, C., and Guilhot, C. (2010). The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 7, e33-e41.
- Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E.N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J., and Maridonneau-Parini, I. (1999). The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and immunity* 67, 469-477.
- Bafica, A., Scanga, C.A., Feng, C.G., Leifer, C., Cheever, A., and Sher, A. (2005). TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 202, 1715-1724.
- Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H., and Remold, H.G. (1998). Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 161, 2636-2641.
- Barry, C.E., 3rd, Boshoff, H.I., Dartois, V., Dick, T., Ehrh, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R.J., and Young, D. (2009). The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews Microbiology* 7, 845-855.
- Barry, C.E., 3rd, Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., and Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research* 37, 143-179.
- Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D., and Britton, W.J. (1999). Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 162, 3504-3511.
- Behar, S.M., Divangahi, M., and Remold, H.G. (2010). Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nature reviews Microbiology* 8, 668-674.





Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.X., Divangahi, M., and Remold, H.G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal immunology* 4, 279-287.

Behr, M.A. (2002). BCG--different strains, different vaccines? *The Lancet infectious diseases* 2, 86-92.

Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276, 1420-1422.

Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181, 3733-3739.

Bermudez, L.E., and Goodman, J. (1996). *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infection and immunity* 64, 1400-1406.

Bernstein, J., Lott, W.A., Steinberg, B.A., and Yale, H.L. (1952). Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *American review of tuberculosis* 65, 357-364.

Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurcha, S.S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S.A., Kobayashi, K., Besra, G.S., *et al.* (2007). Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5157-5162.

Bhatt, K., Gurcha, S.S., Bhatt, A., Besra, G.S., and Jacobs, W.R., Jr. (2007). Two polyketide-synthase-associated acyltransferases are required for sulfolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 153, 513-520.

Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V., and Ernst, J.D. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell host & microbe* 11, 81-90.

Blomgran, R., and Ernst, J.D. (2011). Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 186, 7110-7119.

Boon, C., and Dick, T. (2012). How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later. *Future microbiology* 7, 513-518.

Botelho, R.J., Hackam, D.J., Schreiber, A.D., and Grinstein, S. (2000). Role of COPI in phagosome maturation. *The Journal of biological chemistry* 275, 15717-15727.

Braunstein, M., Espinosa, B.J., Chan, J., Belisle, J.T., and Jacobs, W.R., Jr. (2003). SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* 48, 453-464.

Briken, V., and Miller, J.L. (2008). Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future microbiology* 3, 415-422.

Brill, K.J., Li, Q., Larkin, R., Canaday, D.H., Kaplan, D.R., Boom, W.H., and Silver, R.F. (2001). Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infection and immunity* 69, 1755-1765.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Brodin, P., Poquet, Y., Levillain, F., Peguillet, I., Larrouy-Maumus, G., Gilleron, M., Ewann, F., Christophe, T., Fenistein, D., Jang, J., *et al.* (2010). High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling. *PLoS pathogens* 6, e1001100.
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.
- Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffe, M., and Guilhot, C. (2001). Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *The Journal of biological chemistry* 276, 19845-19854.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular microbiology* 34, 257-267.
- Caron, E., and Hall, A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Carroll, K.S., Gao, H., Chen, H., Stout, C.D., Leary, J.A., and Bertozzi, C.R. (2005). A conserved mechanism for sulfonucleotide reduction. *PLoS biology* 3, e250.
- Cegielski, J.P., and McMurray, D.N. (2004). The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 8, 286-298.
- Chakravarty, S.D., Zhu, G., Tsai, M.C., Mohan, V.P., Marino, S., Kirschner, D.E., Huang, L., Flynn, J., and Chan, J. (2008). Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infection and immunity* 76, 916-926.
- Chalut, C., Botella, L., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., and Guilhot, C. (2006). The nonredundant roles of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of *Mycobacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8511-8516.
- Chen, L., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1998). Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Molecular cell* 1, 795-805.
- Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D.S., Hong, S., Lee, D.M., Serhan, C.N., Behar, S.M., and Remold, H.G. (2008). Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *The Journal of experimental medicine* 205, 2791-2801.
- Chen, M., Gan, H., and Remold, H.G. (2006). A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J Immunol* 176, 3707-3716.



- Chen, M., and Wang, J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7, 313-319.
- Chesne-Seck, M.L., Barilone, N., Boudou, F., Gonzalo Asensio, J., Kolattukudy, P.E., Martin, C., Cole, S.T., Gicquel, B., Gopaul, D.N., and Jackson, M. (2008). A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Journal of bacteriology* 190, 1329-1334.
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., *et al.* (2003). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol* 171, 4552-4560.
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I.P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., and Staels, B. (1998). Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *The Journal of biological chemistry* 273, 25573-25580.
- Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., and Chan, F.K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137, 1112-1123.
- Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. (2000). Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infection and immunity* 68, 2671-2684.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, *et al.* (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Constant, P., Perez, E., Malaga, W., Laneelle, M.A., Saurel, O., Daffe, M., and Guilhot, C. (2002). Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the *pks15/1* gene. *The Journal of biological chemistry* 277, 38148-38158.
- Converse, S.E., Mougous, J.D., Leavell, M.D., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., and Cox, J.S. (2003). MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6121-6126.
- Cooper, A.M. (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology* 27, 393-422.
- Cooper, A.M., Adams, L.B., Dalton, D.K., Appelberg, R., and Ehlers, S. (2002). IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends in microbiology* 10, 221-226.
- Cooper, A.M., and Khader, S.A. (2008). The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunological reviews* 226, 191-204.
- Cooper, A.M., Mayer-Barber, K.D., and Sher, A. (2011). Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal immunology* 4, 252-260.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Cotter, P.D., and Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 67, 429-453, table of contents.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R., Jr. (1999). Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 79-83.
- Cywes, C., Godenir, N.L., Hoppe, H.C., Scholle, R.R., Steyn, L.M., Kirsch, R.E., and Ehlers, M.R. (1996). Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infection and immunity* 64, 5373-5383.
- Daffe, M. (2008). The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope. In *The Mycobacterial Cell Envelope*, M. Daffe, and J.M. Reyrat, eds. (Washington, DC, ASM Press), p. 395.
- Daffe, M., and Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology* 39, 131-203.
- Daffe, M., McNeil, M., and Brennan, P.J. (1991). Novel type-specific lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 30, 378-388.
- Dahl, K.E., Shiratsuchi, H., Hamilton, B.D., Ellner, J.J., and Toossi, Z. (1996). Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 64, 399-405.
- Dao, D.N., Sweeney, K., Hsu, T., Gurcha, S.S., Nascimento, I.P., Roshevsky, D., Besra, G.S., Chan, J., Porcelli, S.A., and Jacobs, W.R. (2008). Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS pathogens* 4, e1000081.
- Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Weich, N., and Nathan, C.F. (2003). The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science* 302, 1963-1966.
- Darwin, K.H., and Nathan, C.F. (2005). Role for nucleotide excision repair in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 73, 4581-4587.
- Davis, J.M., and Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37-49.
- de Haas, M., Vossebeld, P.J., von dem Borne, A.E., and Roos, D. (1995). Fc gamma receptors of phagocytes. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 126, 330-341.
- DeCoursey, T.E. (2004). During the respiratory burst, do phagocytes need proton channels or potassium channels, or both? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004, pe21.
- Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Current opinion in immunology* 18, 375-382.
- Deretic, V., Vergne, I., Chua, J., Master, S., Singh, S.B., Fazio, J.A., and Kyei, G. (2004). Endosomal membrane traffic: convergence point targeted by *Mycobacterium tuberculosis* and HIV. *Cellular microbiology* 6, 999-1009.





Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G., and Griffiths, G. (1994). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of cell biology* 124, 677-688.

Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., and Srimal, S. (1990). Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol* 145, 940-944.

Divangahi, M., Chen, M., Gan, H., Desjardins, D., Hickman, T.T., Lee, D.M., Fortune, S., Behar, S.M., and Remold, H.G. (2009). Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature immunology* 10, 899-906.

Downing, K.J., Mischenko, V.V., Shleeva, M.O., Young, D.I., Young, M., Kaprelyants, A.S., Apt, A.S., and Mizrahi, V. (2005). Mutants of Mycobacterium tuberculosis lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infection and immunity* 73, 3038-3043.

Dubey, V.S., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2002). Disruption of msl3 abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in Mycobacterium tuberculosis H37Rv and causes cell aggregation. *Molecular microbiology* 45, 1451-1459.

Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Laneelle, M.A., Yu, K., Quemard, A., Smith, I., and Daffe, M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Molecular microbiology* 36, 630-637.

Edwards, K.M., Cynamon, M.H., Voladri, R.K., Hager, C.C., DeStefano, M.S., Tham, K.T., Lakey, D.L., Bochan, M.R., and Kernodle, D.S. (2001). Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to Mycobacterium tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 164, 2213-2219.

Ehrt, S., Schnappinger, D., Bekiranov, S., Drenkow, J., Shi, S., Gingeras, T.R., Gaasterland, T., Schoolnik, G., and Nathan, C. (2001). Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *The Journal of experimental medicine* 194, 1123-1140.

Ernst, J.D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature reviews Immunology* 12, 581-591.

Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews Microbiology* 2, 820-832.

Fargeas, C., Wu, C.Y., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T., and Delespesse, G. (1992). Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *European journal of immunology* 22, 2173-2176.

Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., and Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435-447.

Fine, P.E. (1995). Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346, 1339-1345.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* 73, 1907-1916.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews Microbiology* 7, 355-366.
- Flores-Villanueva, P.O., Ruiz-Morales, J.A., Song, C.H., Flores, L.M., Jo, E.K., Montano, M., Barnes, P.F., Selman, M., and Granados, J. (2005). A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 202, 1649-1658.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., and Bloom, B.R. (1995). Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2, 561-572.
- Forbes, J.R., and Gros, P. (2001). Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends in microbiology* 9, 397-403.
- Fratuzzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C., and Remold, H.G. (1997). Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 158, 4320-4327.
- Fratti, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *The Journal of cell biology* 154, 631-644.
- Friedland, J.S., Remick, D.G., Shattock, R., and Griffin, G.E. (1992). Secretion of interleukin-8 following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocyte cell lines. *European journal of immunology* 22, 1373-1378.
- Fukuda, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., Maeda, Y., Yoshimori, T., Matsumoto, S., Kobayashi, K., *et al.* (2013). Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *mBio* 4.
- Gagneux, S. (2012). Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367, 850-859.
- Gallegos, A.M., Pamer, E.G., and Glickman, M.S. (2008). Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4+ T cells after airborne *M. tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine* 205, 2359-2368.
- Gallegos, A.M., van Heijst, J.W., Samstein, M., Su, X., Pamer, E.G., and Glickman, M.S. (2011). A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of *M. tuberculosis* infection in vivo. *PLoS pathogens* 7, e1002052.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19, 107-120.



Gan, H., Lee, J., Ren, F., Chen, M., Kornfeld, H., and Remold, H.G. (2008). Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nature immunology* 9, 1189-1197.

Gaullier, J.M., Ronning, E., Gillooly, D.J., and Stenmark, H. (2000). Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *The Journal of biological chemistry* 275, 24595-24600.

Geldmacher, C., Ngwenyama, N., Schuetz, A., Petrovas, C., Reither, K., Heeregrave, E.J., Casazza, J.P., Ambrozak, D.R., Louder, M., Ampofo, W., *et al.* (2010). Preferential infection and depletion of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells after HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 207, 2869-2881.

Geldmacher, C., Schuetz, A., Ngwenyama, N., Casazza, J.P., Sanga, E., Saathoff, E., Boehme, C., Geis, S., Maboko, L., Singh, M., *et al.* (2008). Early depletion of Mycobacterium tuberculosis-specific T helper 1 cell responses after HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 198, 1590-1598.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L.A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R.T., Consolaro, M.R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., *et al.* (2008). Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 205, 1447-1461.

Gill, W.P., Harik, N.S., Whiddon, M.R., Liao, R.P., Mittler, J.E., and Sherman, D.R. (2009). A replication clock for Mycobacterium tuberculosis. *Nature medicine* 15, 211-214.

Gilleron, M., Stenger, S., Mazorra, Z., Wittke, F., Mariotti, S., Bohmer, G., Prandi, J., Mori, L., Puzo, G., and De Libero, G. (2004). Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 199, 649-659.

Glickman, M.S., Cox, J.S., and Jacobs, W.R., Jr. (2000). A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular cell* 5, 717-727.

Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences* 32, 37-43.

Goren, M.B., Brokl, O., and Schaefer, W.B. (1974). Lipids of putative relevance to virulence in Mycobacterium tuberculosis: phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid. *Infection and immunity* 9, 150-158.

Goren, M.B., D'Arcy Hart, P., Young, M.R., and Armstrong, J.A. (1976). Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 2510-2514.

Grange, J.M. (2001). Mycobacterium bovis infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb)* 81, 71-77.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Gupta, A., Kaul, A., Tsolaki, A.G., Kishore, U., and Bhakta, S. (2012). Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 217, 363-374.
- Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., and Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS pathogens* 1, e5.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-766.
- Harrison, R.E., Bucci, C., Vieira, O.V., Schroer, T.A., and Grinstein, S. (2003). Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Molecular and cellular biology* 23, 6494-6506.
- Hatzios, S.K., Schelle, M.W., Holsclaw, C.M., Behrens, C.R., Botyanszki, Z., Lin, F.L., Carlson, B.L., Kumar, P., Leary, J.A., and Bertozzi, C.R. (2009). PapA3 is an acyltransferase required for polyacyltrehalose biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of biological chemistry* 284, 12745-12751.
- Herzog, H. (1998). History of tuberculosis. *Respiration; international review of thoracic diseases* 65, 5-15.
- Hinchey, J., Lee, S., Jeon, B.Y., Basaraba, R.J., Venkataswamy, M.M., Chen, B., Chan, J., Braunstein, M., Orme, I.M., Derrick, S.C., *et al.* (2007). Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of clinical investigation* 117, 2279-2288.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., and Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135, 1311-1323.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., *et al.* (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433, 523-527.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., and Engelhardt, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3963-3967.
- Hunter, R.L., Olsen, M.R., Jagannath, C., and Actor, J.K. (2006). Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Annals of clinical and laboratory science* 36, 371-386.
- Indrigo, J., Hunter, R.L., Jr., and Actor, J.K. (2002). Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* 148, 1991-1998.
- Iyer, S.S., Pulskens, W.P., Sadler, J.J., Butter, L.M., Teske, G.J., Ulland, T.K., Eisenbarth, S.C., Florquin, S., Flavell, R.A., Leemans, J.C., *et al.* (2009). Necrotic cells trigger a sterile





inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20388-20393.

Jackett, P.S., Aber, V.R., and Lowrie, D.B. (1978). Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and susceptibility to peroxidative killing systems. *Journal of general microbiology* 107, 273-278.

Jain, M., and Cox, J.S. (2005). Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS pathogens* 1, e2.

Jankute, M., Grover, S., Rana, A.K., and Besra, G.S. (2012). Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets. *Future microbiology* 7, 129-147.

Jarlier, V., and Nikaido, H. (1990). Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *Journal of bacteriology* 172, 1418-1423.

Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82-86.

Jo, E.-K. (2013). Autophagy as an innate defense against mycobacteria. *Pathogens and Disease* 67, 108-118.

Jo, E.K., Shin, D.M., and Choi, A.M. (2012). Autophagy: cellular defense to excessive inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14, 119-125.

Junqueira-Kipnis, A.P., Kipnis, A., Jamieson, A., Juarrero, M.G., Diefenbach, A., Raulet, D.H., Turner, J., and Orme, I.M. (2003). NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol* 171, 6039-6045.

Kahnert, A., Seiler, P., Stein, M., Bandermann, S., Hahnke, K., Mollenkopf, H., and Kaufmann, S.H. (2006). Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of immunology* 36, 631-647.

Kang, D.D., Lin, Y., Moreno, J.R., Randall, T.D., and Khader, S.A. (2011). Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. *PLoS one* 6, e16161.

Kang, P.B., Azad, A.K., Torrelles, J.B., Kaufman, T.M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L.E., and Schlesinger, L.S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of experimental medicine* 202, 987-999.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* 18, 571-580.

Kaufmann, S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews Immunology* 1, 20-30.

Kaufmann, S.H. (2005a). Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends in immunology* 26, 660-667.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Kaufmann, S.H. (2005b). Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *The New England journal of medicine* 353, 2423-2426.
- Kaufmann, S.H. (2012). Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. *Trends in immunology* 33, 373-379.
- Kaufmann, S.H., and McMichael, A.J. (2005). Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature medicine* 11, S33-44.
- Kaur, D., Guerin, M.E., Skovierova, H., Brennan, P.J., and Jackson, M. (2009). Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in applied microbiology* 69, 23-78.
- Keane, J., Remold, H.G., and Kornfeld, H. (2000). Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 164, 2016-2020.
- Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., *et al.* (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology* 8, 369-377.
- Khader, S.A., Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D.M., Swain, S., Pearl, J.E., Ghilardi, N., Desauvage, F.J., Lund, F.E., and Cooper, A.M. (2006). Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine* 203, 1805-1815.
- Khader, S.A., Pearl, J.E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G.K., Jelley-Gibbs, D.M., Ghilardi, N., deSavauge, F., and Cooper, A.M. (2005). IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175, 788-795.
- Khoo, K.H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J., and Chatterjee, D. (1995). Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan. *Glycobiology* 5, 117-127.
- Knutson, K.L., Hmama, Z., Herrera-Velitz, P., Rochford, R., and Reiner, N.E. (1998). Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *The Journal of biological chemistry* 273, 645-652.
- Korbel, D.S., Schneider, B.E., and Schaible, U.E. (2008). Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10, 995-1004.
- Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 1004-1010.
- Krysko, D.V., D'Herde, K., and Vandenabeele, P. (2006). Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11, 1709-1726.



Kumar, D., and Narayanan, S. (2012). *pknE*, a serine/threonine kinase of *Mycobacterium tuberculosis* modulates multiple apoptotic paradigms. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 737-747.

Kumar, P., Schelle, M.W., Jain, M., Lin, F.L., Petzold, C.J., Leavell, M.D., Leary, J.A., Cox, J.S., and Bertozzi, C.R. (2007). *PapA1* and *PapA2* are acyltransferases essential for the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor sulfolipid-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11221-11226.

Kurtz, S., McKinnon, K.P., Runge, M.S., Ting, J.P., and Braunstein, M. (2006). The *SecA2* secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infection and immunity* 74, 6855-6864.

Kvitko, B.H., Park, D.H., Velasquez, A.C., Wei, C.F., Russell, A.B., Martin, G.B., Schneider, D.J., and Collmer, A. (2009). Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS pathogens* 5, e1000388.

Kwan, C.K., and Ernst, J.D. (2011). HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical microbiology reviews* 24, 351-376.

Labbe, K., and Saleh, M. (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell death and differentiation* 15, 1339-1349.

Lawe, D.C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D., and Corvera, S. (2000). The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *The Journal of biological chemistry* 275, 3699-3705.

Leao, S.C., and Portaels, F. (2007). *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care*, J.C. Palomino, S.C. Leao, and V. Ritacco, eds. (Belgium, Brazil, Argentina, [www.tuberculosisistextbook.com](http://www.tuberculosisistextbook.com)).

Lebreton, A., Lakisic, G., Job, V., Fritsch, L., Tham, T.N., Camejo, A., Mattei, P.J., Regnault, B., Nahori, M.A., Cabanes, D., *et al.* (2011). A bacterial protein targets the BAHD1 chromatin complex to stimulate type III interferon response. *Science* 331, 1319-1321.

Lee, H.M., Shin, D.M., Kim, K.K., Lee, J.S., Paik, T.H., and Jo, E.K. (2009a). Roles of reactive oxygen species in CXCL8 and CCL2 expression in response to the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical immunology* 29, 46-56.

Lee, J., Hartman, M., and Kornfeld, H. (2009b). Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei medical journal* 50, 1-11.

Lee, J., Remold, H.G., Jeong, M.H., and Kornfeld, H. (2006). Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol* 176, 4267-4274.

Lee, K.S., Dubey, V.S., Kolattukudy, P.E., Song, C.H., Shin, A.R., Jung, S.B., Yang, C.S., Kim, S.Y., Jo, E.K., Park, J.K., *et al.* (2007). Diacyltrehalose of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits lipopolysaccharide- and mycobacteria-induced proinflammatory cytokine production in human monocytic cells. *FEMS microbiology letters* 267, 121-128.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Lee, W.L., Kim, M.K., Schreiber, A.D., and Grinstein, S. (2005). Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation. *Molecular biology of the cell* *16*, 2077-2090.
- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of clinical investigation* *115*, 2679-2688.
- Lima, V.M., Bonato, V.L., Lima, K.M., Dos Santos, S.A., Dos Santos, R.R., Goncalves, E.D., Faccioli, L.H., Brandao, I.T., Rodrigues-Junior, J.M., and Silva, C.L. (2001). Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infection and immunity* *69*, 5305-5312.
- Lonnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B.G., Dye, C., and Raviglione, M. (2009). Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med* *68*, 2240-2246.
- Lugo-Villarino, G., Verollet, C., Maridonneau-Parini, I., and Neyrolles, O. (2011). Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. *Frontiers in immunology* *2*, 43.
- Luo, Z.Q., and Isberg, R.R. (2004). Multiple substrates of the Legionella pneumophila Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 841-846.
- Lynett, J., and Stokes, R.W. (2007). Selection of transposon mutants of Mycobacterium tuberculosis with increased macrophage infectivity identifies fadD23 to be involved in sulfolipid production and association with macrophages. *Microbiology* *153*, 3133-3140.
- Mackenzie, B., and Hediger, M.A. (2004). SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* *447*, 571-579.
- Maggi, N., Pasqualucci, C.R., Ballotta, R., and Sensi, P. (1966). Rifampicin: a new orally active rifamycin. *Chemotherapy* *11*, 285-292.
- Maglione, P.J., and Chan, J. (2009). How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. *European journal of immunology* *39*, 676-686.
- Malik, Z.A., Denning, G.M., and Kusner, D.J. (2000). Inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *The Journal of experimental medicine* *191*, 287-302.
- Malik, Z.A., Thompson, C.R., Hashimi, S., Porter, B., Iyer, S.S., and Kusner, D.J. (2003). Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca<sup>2+</sup> signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol* *170*, 2811-2815.
- Malone, L., Schurr, A., Lindh, H., Mc, K.D., Kiser, J.S., and Williams, J.H. (1952). The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *American review of tuberculosis* *65*, 511-518.
- Marrakchi, H., Bardou, F., Laneelle, M.A., and Daffe, M. (2008). A Comprehensive Overview of Mycolic Acid Structure and Biosynthesis. In *The Mycobacterial Cell Envelope*, M. Daffe, and J.M. Reyrat, eds. (Washington, DC, ASM Press), p. 41.





- Martin, C.J., Booty, M.G., Rosebrock, T.R., Nunes-Alves, C., Desjardins, D.M., Keren, I., Fortune, S.M., Remold, H.G., and Behar, S.M. (2012). Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell host & microbe* 12, 289-300.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* 27, 451-483.
- Meena, L.S., and Rajni (2010). Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *The FEBS journal* 277, 2416-2427.
- Mendez-Samperio, P. (2008). Expression and regulation of chemokines in mycobacterial infection. *The Journal of infection* 57, 374-384.
- Miller, B.H., Fratti, R.A., Poschet, J.F., Timmins, G.S., Master, S.S., Burgos, M., Marletta, M.A., and Deretic, V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infection and immunity* 72, 2872-2878.
- Mishra, A.K., Driessen, N.N., Appelmelk, B.J., and Besra, G.S. (2011). Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *FEMS microbiology reviews* 35, 1126-1157.
- Mishra, B.B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hacoheh, N., Griffiths, G., Moita, L.F., and Anes, E. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cellular microbiology* 12, 1046-1063.
- Molle, V., Saint, N., Campagna, S., Kremer, L., Lea, E., Draper, P., and Molle, G. (2006). pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection. *Molecular microbiology* 61, 826-837.
- Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M.A., and Reljic, R. (2009). TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflammation & allergy drug targets* 8, 53-62.
- Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication? *Trends in cell biology* 22, 283-291.
- Mougous, J.D., Petzold, C.J., Senaratne, R.H., Lee, D.H., Akey, D.L., Lin, F.L., Munchel, S.E., Pratt, M.R., Riley, L.W., Leary, J.A., *et al.* (2004). Identification, function and structure of the mycobacterial sulfotransferase that initiates sulfolipid-1 biosynthesis. *Nature structural & molecular biology* 11, 721-729.
- Murray, J.T., Panaretou, C., Stenmark, H., Miaczynska, M., and Backer, J.M. (2002). Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic* 3, 416-427.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of leukocyte biology* 89, 557-563.
- Nagabhushanam, V., Solache, A., Ting, L.M., Escaron, C.J., Zhang, J.Y., and Ernst, J.D. (2003). Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol* 171, 4750-4757.
- Neyrolles, O., and Guilhot, C. (2011). Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)* 91, 187-195.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., and McKinney, J.D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Molecular microbiology* 52, 1291-1302.
- Nigou, J., Gilleron, M., and Puzo, G. (2003). Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 85, 153-166.
- O'Connor, T.J., Adepoju, Y., Boyd, D., and Isberg, R.R. (2011). Minimization of the *Legionella pneumophila* genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14733-14740.
- O'Connor, T.J., Boyd, D., Dorer, M.S., and Isberg, R.R. (2012). Aggravating genetic interactions allow a solution to redundancy in a bacterial pathogen. *Science* 338, 1440-1444.
- Okamoto, Y., Fujita, Y., Naka, T., Hirai, M., Tomiyasu, I., and Yano, I. (2006). Mycobacterial sulfolipid shows a virulence by inhibiting cord factor induced granuloma formation and TNF- $\alpha$  release. *Microbial pathogenesis* 40, 245-253.
- Okamoto Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y., and Matsuzaki, G. (2010). Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol* 184, 4414-4422.
- Onwueme, K.C., Ferreras, J.A., Buglino, J., Lima, C.D., and Quadri, L.E. (2004). Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: proof of principle with *Mycobacterium tuberculosis* PapA5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4608-4613.
- Ortalo-Magne, A., Lemassu, A., Laneelle, M.A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G., and Daffe, M. (1996). Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *Journal of bacteriology* 178, 456-461.
- Othieno, C., Hirsch, C.S., Hamilton, B.D., Wilkinson, K., Ellner, J.J., and Toossi, Z. (1999). Interaction of *Mycobacterium tuberculosis*-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10. *Infection and immunity* 67, 5730-5735.
- Pabst, M.J., Gross, J.M., Brozna, J.P., and Goren, M.B. (1988). Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 140, 634-640.
- Pai, M., Mohan, A., Dheda, K., Leung, C.C., Yew, W.W., Christopher, D.J., and Sharma, S.K. (2007). Lethal interaction: the colliding epidemics of tobacco and tuberculosis. *Expert review of anti-infective therapy* 5, 385-391.
- Palma-Nicolas, J.P., Hernandez-Pando, R., Segura, E., Ibarra-Sanchez, M.J., Estrada-Garcia, I., Zentella-Dehesa, A., and Lopez-Marin, L.M. (2010). Mycobacterial di-O-acyl trehalose inhibits Th-1 cytokine gene expression in murine cells by down-modulation of MAPK signaling. *Immunobiology* 215, 143-152.
- Peters, W., and Ernst, J.D. (2003). Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 151-158.



Phuah, J.Y., Mattila, J.T., Lin, P.L., and Flynn, J.L. (2012). Activated B cells in the granulomas of nonhuman primates infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *The American journal of pathology* 181, 508-514.

Piddington, D.L., Fang, F.C., Laessig, T., Cooper, A.M., Orme, I.M., and Buchmeier, N.A. (2001). Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infection and immunity* 69, 4980-4987.

Ponpuak, M., Davis, A.S., Roberts, E.A., Delgado, M.A., Dinkins, C., Zhao, Z., Virgin, H.W.t., Kyei, G.B., Johansen, T., Vergne, I., *et al.* (2010). Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* 32, 329-341.

Potian, J.A., Rafi, W., Bhatt, K., McBride, A., Gause, W.C., and Salgame, P. (2011). Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *The Journal of experimental medicine* 208, 1863-1874.

Puech, V., Guilhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L.Y., Gicquel, B., and Daffe, M. (2002). Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* 44, 1109-1122.

Purwantini, E., and Mukhopadhyay, B. (2009). Conversion of NO<sub>2</sub> to NO by reduced coenzyme F420 protects mycobacteria from nitrosative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6333-6338.

Rajaram, M.V., Brooks, M.N., Morris, J.D., Torrelles, J.B., Azad, A.K., and Schlesinger, L.S. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol* 185, 929-942.

Raju, B., Hoshino, Y., Belitskaya-Levy, I., Dawson, R., Ress, S., Gold, J.A., Condos, R., Pine, R., Brown, S., Nolan, A., *et al.* (2008). Gene expression profiles of bronchoalveolar cells in pulmonary TB. *Tuberculosis (Edinb)* 88, 39-51.

Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature reviews Immunology* 12, 352-366.

Ramos-Kichik, V., Mondragon-Flores, R., Mondragon-Castelan, M., Gonzalez-Pozos, S., Muniz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Chacon-Salinas, R., Estrada-Parra, S., and Estrada-Garcia, I. (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 89, 29-37.

Rao, A., and Ranganathan, A. (2004). Interaction studies on proteins encoded by the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 272, 571-579.

Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A., and Glickman, M.S. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *The Journal of experimental medicine* 201, 535-543.

Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W.R., Jr., and Glickman, M.S. (2006). Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium*



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

tuberculosis -induced inflammation and virulence. *The Journal of clinical investigation* 116, 1660-1667.

Raynaud, C., Papavinasasundaram, K.G., Speight, R.A., Springer, B., Sander, P., Bottger, E.C., Colston, M.J., and Draper, P. (2002). The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology* 46, 191-201.

Redente, E.F., Higgins, D.M., Dwyer-Nield, L.D., Orme, I.M., Gonzalez-Juarrero, M., and Malkinson, A.M. (2010). Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation. *Journal of leukocyte biology* 88, 159-168.

Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G., and Barry, C.E., 3rd (2004). A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431, 84-87.

Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 405-413.

Roach, D.R., Bean, A.G., Demangel, C., France, M.P., Briscoe, H., and Britton, W.J. (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168, 4620-4627.

Roca, F.J., and Ramakrishnan, L. (2013). TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to *Mycobacteria* via Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell* 153, 521-534.

Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E., and Russell, D.G. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunological reviews* 219, 37-54.

Rook, G.A., Hernandez-Pando, R., Dheda, K., and Teng Seah, G. (2004). IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in immunology* 25, 483-488.

Rosas-Taraco, A.G., Higgins, D.M., Sanchez-Campillo, J., Lee, E.J., Orme, I.M., and Gonzalez-Juarrero, M. (2011). Local pulmonary immunotherapy with siRNA targeting TGFbeta1 enhances antimicrobial capacity in *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. *Tuberculosis (Edinb)* 91, 98-106.

Rousseau, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.C., Kolattukudy, P.E., Gicquel, B., and Jackson, M. (2003a). Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. *Cellular microbiology* 5, 405-415.

Rousseau, C., Turner, O.C., Rush, E., Bordat, Y., Sirakova, T.D., Kolattukudy, P.E., Ritter, S., Orme, I.M., Gicquel, B., and Jackson, M. (2003b). Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infection and immunity* 71, 4684-4690.

Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Ave, P., Huerre, M., Gicquel, B., and Jackson, M. (2004). Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates





produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cellular microbiology* 6, 277-287.

Rowland, K. (2012). Totally drug-resistant TB emerges in India. In *Nature*.

Russell, D.G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature reviews Microbiology* 5, 39-47.

Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L.A., and Lopez-Marin, L.M. (2001). Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8, 1081-1088.

Saavedra, R., Segura, E., Tenorio, E.P., and Lopez-Marin, L.M. (2006). Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8, 533-540.

Sasindran, S.J., and Torrelles, J.B. (2011). Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Frontiers in microbiology* 2, 2.

Saukkonen, J.J., Bazydlo, B., Thomas, M., Strieter, R.M., Keane, J., and Kornfeld, H. (2002). Beta-chemokines are induced by Mycobacterium tuberculosis and inhibit its growth. *Infection and immunity* 70, 1684-1693.

Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.

Schaible, U.E., Collins, H.L., Priem, F., and Kaufmann, S.H. (2002). Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 196, 1507-1513.

Schaible, U.E., and Kaufmann, S.H. (2007). Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS medicine* 4, e115.

Schaible, U.E., Winau, F., Sieling, P.A., Fischer, K., Collins, H.L., Hagens, K., Modlin, R.L., Brinkmann, V., and Kaufmann, S.H. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature medicine* 9, 1039-1046.

Schaeffer, M.L., Khoo, K.H., Besra, G.S., Chatterjee, D., Brennan, P.J., Belisle, J.T., and Inamine, J.M. (1999). The pimB gene of Mycobacterium tuberculosis encodes a mannosyltransferase involved in lipoarabinomannan biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 274, 31625-31631.

Schatz, A.W., S.A. (1944). Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium tuberculosis and Related Organisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 57, 244-248.

Schlesinger, L.S. (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* 150, 2920-2930.

Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R., and Horwitz, M.A. (1990). Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* 144, 2771-2780.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Schlesinger, L.S., Hull, S.R., and Kaufman, T.M. (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 152, 4070-4079.

Schlesinger, L.S., Kaufman, T.M., Iyer, S., Hull, S.R., and Marchiando, L.K. (1996). Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol* 157, 4568-4575.

Schreiber, T., Ehlers, S., Heitmann, L., Rausch, A., Mages, J., Murray, P.J., Lang, R., and Holscher, C. (2009). Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J Immunol* 183, 1301-1312.

Seeliger, J.C., Holsclaw, C.M., Schelle, M.W., Botyanszki, Z., Gilmore, S.A., Tully, S.E., Niederweis, M., Cravatt, B.F., Leary, J.A., and Bertozzi, C.R. (2011). Elucidation and Chemical Modulation of Sulfolipid-1 Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*.

Senaratne, R.H., De Silva, A.D., Williams, S.J., Mougous, J.D., Reader, J.R., Zhang, T., Chan, S., Sidders, B., Lee, D.H., Chan, J., *et al.* (2006). 5'-Adenosinephosphosulphate reductase (CysH) protects *Mycobacterium tuberculosis* against free radicals during chronic infection phase in mice. *Molecular microbiology* 59, 1744-1753.

Sendide, K., Deghmane, A.E., Pechkovsky, D., Av-Gay, Y., Talal, A., and Hmama, Z. (2005). *Mycobacterium bovis* BCG attenuates surface expression of mature class II molecules through IL-10-dependent inhibition of cathepsin S. *J Immunol* 175, 5324-5332.

Sharma, S.K., Mohan, A., Sharma, A., and Mitra, D.K. (2005). Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *The Lancet infectious diseases* 5, 415-430.

Shaw, T.C., Thomas, L.H., and Friedland, J.S. (2000). Regulation of IL-10 secretion after phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytic cells. *Cytokine* 12, 483-486.

Shin, D.M., Jeon, B.Y., Lee, H.M., Jin, H.S., Yuk, J.M., Song, C.H., Lee, S.H., Lee, Z.W., Cho, S.N., Kim, J.M., *et al.* (2010). *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS pathogens* 6, e1001230.

Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS pathogens* 8, e1002507.

Simeone, R., Constant, P., Malaga, W., Guilhot, C., Daffe, M., and Chalut, C. (2007). Molecular dissection of the biosynthetic relationship between phthiocerol and phthiodiolone dimycocerosates and their critical role in the virulence and permeability of *Mycobacterium tuberculosis*. *The FEBS journal* 274, 1957-1969.

Sinsimer, D., Huet, G., Manca, C., Tsenova, L., Koo, M.S., Kurepina, N., Kana, B., Mathema, B., Marras, S.A., Kreiswirth, B.N., *et al.* (2008). The phenolic glycolipid of *Mycobacterium*



tuberculosis differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. *Infection and immunity* 76, 3027-3036.

Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H., and Kolattukudy, P.E. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *The Journal of biological chemistry* 276, 16833-16839.

Smith, J., Manoranjan, J., Pan, M., Bohsali, A., Xu, J., Liu, J., McDonald, K.L., Szyk, A., LaRonde-LeBlanc, N., and Gao, L.Y. (2008). Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infection and immunity* 76, 5478-5487.

Smith, N.H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J.R., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Hewinson, R.G., and Smith, J.M. (2006). Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of theoretical biology* 239, 220-225.

St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., and Nathan, C. (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9901-9906.

Stadthagen, G., Jackson, M., Charles, P., Boudou, F., Barilone, N., Huerre, M., Constant, P., Liav, A., Bottova, I., Nigou, J., *et al.* (2006). Comparative investigation of the pathogenicity of three *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the synthesis of p-hydroxybenzoic acid derivatives. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8, 2245-2253.

Stamm, L.M., Morisaki, J.H., Gao, L.Y., Jeng, R.L., McDonald, K.L., Roth, R., Takeshita, S., Heuser, J., Welch, M.D., and Brown, E.J. (2003). *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *The Journal of experimental medicine* 198, 1361-1368.

Stuehr, D.J., Gross, S.S., Sakuma, I., Levi, R., and Nathan, C.F. (1989). Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *The Journal of experimental medicine* 169, 1011-1020.

Sulzenbacher, G., Canaan, S., Bordat, Y., Neyrolles, O., Stadthagen, G., Roig-Zamboni, V., Rauzier, J., Maurin, D., Laval, F., Daffe, M., *et al.* (2006). LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *The EMBO journal* 25, 1436-1444.

Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445, 77-88.

Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J.L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P.H., de Blic, J., Tazi, A., *et al.* (2005). DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS medicine* 2, e381.

Takayama, K., Wang, L., and David, H.L. (1972). Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2, 29-35.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Thomas, J.P., Baughn, C.O., Wilkinson, R.G., and Shepherd, R.G. (1961). A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-l-butanol). *The American review of respiratory disease* 83, 891-893.
- Toossi, Z., and Ellner, J.J. (1998). The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clinical immunology and immunopathology* 87, 107-114.
- Torrelles, J.B., Azad, A.K., and Schlesinger, L.S. (2006). Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors. *J Immunol* 177, 1805-1816.
- Torrelles, J.B., DesJardin, L.E., MacNeil, J., Kaufman, T.M., Kutzbach, B., Knaup, R., McCarthy, T.R., Gurcha, S.S., Besra, G.S., Clegg, S., *et al.* (2009). Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase *pimB* reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. *Glycobiology* 19, 743-755.
- Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2004). Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* 428, 441-445.
- Trivedi, O.A., Arora, P., Vats, A., Ansari, M.Z., Tickoo, R., Sridharan, V., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2005). Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Molecular cell* 17, 631-643.
- Tsai, M.C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., Tufariello, J., Flynn, J., and Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular microbiology* 8, 218-232.
- Udwadia, Z.F., Amale, R.A., Ajbani, K.K., and Rodrigues, C. (2012). Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54, 579-581.
- Underner, M., and Perriot, J. (2012). [Smoking and tuberculosis.]. *Presse Med.*
- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., and van der Meer, J.W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews* 15, 294-309.
- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., and Peters, P.J. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287-1298.
- van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., and van Soolingen, D. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases* 18, 653-655.
- Vandal, O.H., Pierini, L.M., Schnappinger, D., Nathan, C.F., and Ehrt, S. (2008). A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature medicine* 14, 849-854.





- Vandal, O.H., Roberts, J.A., Odaira, T., Schnappinger, D., Nathan, C.F., and Ehrh, S. (2009). Acid-susceptible mutants of *Mycobacterium tuberculosis* share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment. *Journal of bacteriology* 191, 625-631.
- Vankayalapati, R., Wizel, B., Weis, S.E., Safi, H., Lakey, D.L., Mandelboim, O., Samten, B., Porgador, A., and Barnes, P.F. (2002). The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* 168, 3451-3457.
- Velasco-Velazquez, M.A., Barrera, D., Gonzalez-Arenas, A., Rosales, C., and Agramonte-Hevia, J. (2003). Macrophage--*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microbial pathogenesis* 35, 125-131.
- Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J.L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., Glickman, M., Jacobs, W.R., Jr., Porcelli, S.A., and Briken, V. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS pathogens* 3, e110.
- Vergne, I., Chua, J., and Deretic, V. (2003). Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *The Journal of experimental medicine* 198, 653-659.
- Vergne, I., Chua, J., Lee, H.H., Lucas, M., Belisle, J., and Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4033-4038.
- Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R.A., Tosch, V., Delgado, M.A., Proikas-Cezanne, T., Laporte, J., and Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO journal* 28, 2244-2258.
- Vesosky, B., Rottinghaus, E.K., Stromberg, P., Turner, J., and Beamer, G. (2010). CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of leukocyte biology* 87, 1153-1165.
- Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., and Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *The Journal of biological chemistry* 272, 13326-13331.
- Vieira, O.V., Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A.D., Stahl, P.D., and Grinstein, S. (2003). Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and cellular biology* 23, 2501-2514.
- Villemagne, B., Crauste, C., Flipo, M., Baulard, A.R., Deprez, B., and Willand, N. (2012). Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance. *European journal of medicinal chemistry* 51, 1-16.
- Volkman, H.E., Clay, H., Beery, D., Chang, J.C., Sherman, D.R., and Ramakrishnan, L. (2004). Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS biology* 2, e367.
- Volkman, H.E., Pozos, T.C., Zheng, J., Davis, J.M., Rawls, J.F., and Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science* 327, 466-469.
- Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annual review of microbiology* 53, 155-187.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Waddell, S.J., Chung, G.A., Gibson, K.J., Everett, M.J., Minnikin, D.E., Besra, G.S., and Butcher, P.D. (2005). Inactivation of polyketide synthase and related genes results in the loss of complex lipids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Letters in applied microbiology* *40*, 201-206.
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* *304*, 1800-1804.
- Welin, A., Eklund, D., Stendahl, O., and Lerm, M. (2011). Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis. *PLoS one* *6*, e20302.
- Welin, A., and Lerm, M. (2012). Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* *92*, 113-120.
- Welin, A., Winberg, M.E., Abdalla, H., Sarndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O., and Lerm, M. (2008). Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infection and immunity* *76*, 2882-2887.
- Welsh, K.J., Abbott, A.N., Hwang, S.A., Indrigo, J., Armitige, L.Y., Blackburn, M.R., Hunter, R.L., Jr., and Actor, J.K. (2008). A role for tumour necrosis factor-alpha, complement C5 and interleukin-6 in the initiation and development of the mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate induced granulomatous response. *Microbiology* *154*, 1813-1824.
- WHO (2012). World report 2012 Global Tuberculosis Control ([http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/fr/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/fr/index.html)).
- Wiker, H.G., and Harboe, M. (1992). The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological reviews* *56*, 648-661.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Beguec, C., Wolbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rusch-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., *et al.* (2008). Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS pathogens* *4*, e1000160.
- Wolf, A.J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The Journal of experimental medicine* *205*, 105-115.
- Wolf, A.J., Linas, B., Trevejo-Nunez, G.J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., and Ernst, J.D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* *179*, 2509-2519.
- Wu, C.H., Tsai-Wu, J.J., Huang, Y.T., Lin, C.Y., Liou, G.G., and Lee, F.J. (1998). Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS letters* *439*, 192-196.
- Yadav, M., and Schorey, J.S. (2006). The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* *108*, 3168-3175.



Young, D., Stark, J., and Kirschner, D. (2008). Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nature reviews Microbiology* 6, 520-528.

Yu, X., and Xie, J. (2012). Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of *Mycobacterium tuberculosis*-host interaction from a systems biology perspective. *Cellular signalling* 24, 1841-1846.

Zaridze, D., Brennan, P., Boreham, J., Boroda, A., Karpov, R., Lazarev, A., Konobeevskaya, I., Igitov, V., Terechova, T., Boffetta, P., *et al.* (2009). Alcohol and cause-specific mortality in Russia: a retrospective case-control study of 48,557 adult deaths. *Lancet* 373, 2201-2214.

Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325, 332-336.

Zhang, L., Goren, M.B., Holzer, T.J., and Andersen, B.R. (1988). Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infection and immunity* 56, 2876-2883.

Zhang, M., Gong, J., Presky, D.H., Xue, W., and Barnes, P.F. (1999). Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol* 162, 2441-2447.

Zhang, Y., Broser, M., Cohen, H., Bodkin, M., Law, K., Reibman, J., and Rom, W.N. (1995). Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *The Journal of clinical investigation* 95, 586-592.

Zimmerli, S., Edwards, S., and Ernst, J.D. (1996). Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 15, 760-770.

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffe, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of bacteriology* 190, 5672-5680.

Zullo, A.J., and Lee, S. (2012). Mycobacterial induction of autophagy varies by species and occurs independently of mammalian target of rapamycin inhibition. *The Journal of biological chemistry* 287, 12668-12678.

Zuniga, J., Torres-Garcia, D., Santos-Mendoza, T., Rodriguez-Reyna, T.S., Granados, J., and Yunis, E.J. (2012). Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical & developmental immunology* 2012, 193923.

Avec 1.4 millions de décès et 8.7 millions de nouveaux cas en 2012, la tuberculose fait encore aujourd'hui partie des plus importantes maladies infectieuses. Ce constat alarmant souligne l'état d'urgence dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Malgré l'impact de cette pathologie sur la santé publique, les molécules bactériennes impliquées dans la pathogénie de la tuberculose ainsi que leurs mécanismes d'action restent mal connus. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent pathogène responsable de la tuberculose, est une bactérie capable de résister au sein de son hôte, l'Homme, et ce même lorsqu'elle est confrontée à une réponse immunitaire intacte.

*M. tuberculosis* synthétise une large quantité et variété de composés lipidiques incorporés dans son enveloppe cellulaire, notamment dans les couches externes. De fait, ils sont stratégiquement localisés pour interagir avec l'hôte, et donc potentiellement impliqués dans la pathogénie de la tuberculose. Ces composés lipidiques peuvent être définis en différentes catégories, parmi lesquelles les lipides contenant des mycocérosates (phénolglycolipides (PGL) et dimycocérosates de phthiocérol (DIM)) et les lipides dérivés de tréhaloses (sulfolipides (SL) et di- et poly- acyltrehaloses (DAT et PAT, respectivement)). Les lipides de ces deux familles n'ont pas de rôle structural majeur, cependant leur distribution restreinte au genre *Mycobacterium* est en accord avec leur rôle dans la pathogénie. Dans ce contexte, l'équipe du Dr. Guilhot s'intéresse à analyser le rôle fonctionnel de ces lipides dans la pathogénie en étudiant leurs voies de biosynthèses ainsi que leurs contributions dans l'interaction avec les cellules de l'hôte. Grâce à cette approche, les DIM ont été décrits comme des facteurs de virulence ayant un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire des macrophages humains. A l'inverse, le rôle des DAT/PAT et des SL reste ambigu. Ils ne semblent pas contribuer, individuellement ou collectivement, à la virulence *in vivo*. Toutefois, lorsque ces glycolipides sont étudiés sous forme purifiée, ils montrent des activités biologiques qui pourraient avoir des répercussions sur l'interaction de *M. tuberculosis* avec les cellules hôtes.

Grâce à une bourse de la Fondation Médicale pour la Recherche obtenue en 2009, j'ai eu l'opportunité de rejoindre le laboratoire du Dr. Guilhot sous la direction du Dr. Astarie-Dequeker, afin d'étudier la contribution respective de chacun de ces lipides spécifiques de *M. tuberculosis* dans la pathogénie. Dans cet optique, nous avons développé une stratégie génétique au cours de laquelle nous interrompons la biosynthèse de ces différents lipides. Nous avons par la suite analysé les conséquences de ces simples ou multiples mutations sur la virulence bactérienne dans un modèle animal, puis dans la réponse immunitaire des macrophages humains, cellules cibles de *M. tuberculosis*. Nous avons établi i) une redondance fonctionnelle entre les DIM, les DAT/PAT et les SL au cours de l'interaction entre les mycobactéries et les cellules hôtes, ii) la contribution des DAT/PAT et des SL à la fois dans la phase aigüe d'infection chez la souris mais aussi dans les macrophages humains via la modulation de la maturation du phagosome, iii) un effet dominant des DIM dans la virulence de *M. tuberculosis*, principalement en modulant les fonctions bactéricides des macrophages. En collaboration avec d'autres laboratoires de recherche, j'ai aussi obtenu des résultats préliminaires suggérant que les DIM, DAT/PAT et SL contribueraient à l'échappement de *M. tuberculosis* depuis le phagosome vers le cytosol des macrophages infectés, ainsi qu'au contrôle de deux processus cellulaires d'autodestruction : l'autophagie et l'apoptose.

La construction de notre collection de souches mutées est un outil majeur dans la compréhension du rôle des lipides spécifiques de l'enveloppe de *M. tuberculosis* en tant que facteurs de virulence.

Mots-clés : *Mycobacterium tuberculosis* ; macrophages ; lipides ; enveloppe ; réponse immunitaire

Avec 1.4 millions de décès et 8.7 millions de nouveaux cas en 2012, la tuberculose fait encore aujourd'hui partie des plus importantes maladies infectieuses. Ce constat alarmant souligne l'état d'urgence dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Malgré l'impact de cette pathologie sur la santé publique, les molécules bactériennes impliquées dans la pathogénie de la tuberculose ainsi que leurs mécanismes d'action restent mal connus. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent pathogène responsable de la tuberculose, est une bactérie capable de résister au sein de son hôte, l'Homme, et ce même lorsqu'elle est confrontée à une réponse immunitaire intacte.

*M. tuberculosis* synthétise une large quantité et variété de composés lipidiques incorporés dans son enveloppe cellulaire, notamment dans les couches externes. De fait, ils sont stratégiquement localisés pour interagir avec l'hôte, et donc potentiellement impliqués dans la pathogénie de la tuberculose. Ces composés lipidiques peuvent être définis en différentes catégories, parmi lesquelles les lipides contenant des mycocérosates (phénolglycolipides (PGL) et dimycocérosates de phthiocérol (DIM)) et les lipides dérivés de tréhaloses (sulfolipides (SL) et di- et poly- acyltrehaloses (DAT et PAT, respectivement)). Les lipides de ces deux familles n'ont pas de rôle structural majeur, cependant leur distribution restreinte au genre *Mycobacterium* est en accord avec leur rôle dans la pathogénie. Dans ce contexte, l'équipe du Dr. Guilhot s'intéresse à analyser le rôle fonctionnel de ces lipides dans la pathogénie en étudiant leurs voies de biosynthèses ainsi que leurs contributions dans l'interaction avec les cellules de l'hôte. Grâce à cette approche, les DIM ont été décrits comme des facteurs de virulence ayant un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire des macrophages humains. A l'inverse, le rôle des DAT/PAT et des SL reste ambigu. Ils ne semblent pas contribuer, individuellement ou collectivement, à la virulence *in vivo*. Toutefois, lorsque ces glycolipides sont étudiés sous forme purifiée, ils montrent des activités biologiques qui pourraient avoir des répercussions sur l'interaction de *M. tuberculosis* avec les cellules hôtes.

Grâce à une bourse de la Fondation Médicale pour la Recherche obtenue en 2009, j'ai eu l'opportunité de rejoindre le laboratoire du Dr. Guilhot sous la direction du Dr. Astarie-Dequeker, afin d'étudier la contribution respective de chacun de ces lipides spécifiques de *M. tuberculosis* dans la pathogénie. Dans cet optique, nous avons développé une stratégie génétique au cours de laquelle nous interrompons la biosynthèse de ces différents lipides. Nous avons par la suite analysé les conséquences de ces simples ou multiples mutations sur la virulence bactérienne dans un modèle animal, puis dans la réponse immunitaire des macrophages humains, cellules cibles de *M. tuberculosis*. Nous avons établi i) une redondance fonctionnelle entre les DIM, les DAT/PAT et les SL au cours de l'interaction entre les mycobactéries et les cellules hôtes, ii) la contribution des DAT/PAT et des SL à la fois dans la phase aigüe d'infection chez la souris mais aussi dans les macrophages humains via la modulation de la maturation du phagosome, iii) un effet dominant des DIM dans la virulence de *M. tuberculosis*, principalement en modulant les fonctions bactéricides des macrophages. En collaboration avec d'autres laboratoires de recherche, j'ai aussi obtenu des résultats préliminaires suggérant que les DIM, DAT/PAT et SL contribueraient à l'échappement de *M. tuberculosis* depuis le phagosome vers le cytosol des macrophages infectés, ainsi qu'au contrôle de deux processus cellulaires d'autodestruction : l'autophagie et l'apoptose.

La construction de notre collection de souches mutées est un outil majeur dans la compréhension du rôle des lipides spécifiques de l'enveloppe de *M. tuberculosis* en tant que facteurs de virulence.

Mots-clés : *Mycobacterium tuberculosis* ; macrophages ; lipides ; enveloppe ; réponse immunitaire