



HAL
open science

Rôle et mécanismes moléculaires d'action des lipides de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis* dans la virulence

Jacques Augenstreich

► **To cite this version:**

Jacques Augenstreich. Rôle et mécanismes moléculaires d'action des lipides de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis* dans la virulence. Bactériologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30111 . tel-02306983

HAL Id: tel-02306983

<https://theses.hal.science/tel-02306983>

Submitted on 7 Oct 2019

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Jacques Augenstreich

le vendredi 14 septembre 2018

Titre :

Rôle et mécanismes moléculaires d'action des lipides de l'enveloppe de
Mycobacterium tuberculosis dans la virulence

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Microbiologie

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale

Directeur/trice(s) de Thèse :

Mme Catherine Astarie-Dequeker

M. Evert Haanappel

Jury :

M. Thierry Soldati, Professeur de l'Université de Genève - Rapporteur

M. Bruno Antonny, Directeur de Recherche CNRS - Rapporteur

Mme. Sophie Lecomte, Directrice de Recherche CNRS - Examinatrice

M. Alain Milon, Professeur de l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier - Président

Mme. Catherine Astarie-Dequeker, Chargée de Recherche CNRS - Directrice de thèse

M. Evert Haanappel, Chargé de Recherche CNRS - Co-directeur de thèse

You are what you dare



Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du Jury d'avoir accepté d'examiner mes travaux et d'avoir été présents pour ma soutenance de thèse. Je remercie en particulier le Pr Thierry Soldati et le Dr Bruno Antony d'avoir accepté d'être rapporteur du manuscrit et pour les discussions que nous avons eu autour du projet. Merci également à Sophie Lecomte d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinatrice. Tu as été une encadrante formidable et je suis ravi de pouvoir partager avec toi mes travaux de recherche. Merci aussi à Alain Milon qui a accepté de faire partie de ce jury en tant que président, et merci pour cette formidable collaboration qui a démarré.

Je remercie mes deux équipes d'accueil, l'équipe de Christophe Guilhot et de Laurence Salomé pour m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein de leur équipe, dans un environnement enrichissant, bienveillant et travailleur. En particulier, merci à Catherine Astarie-Dequeker pour m'avoir choisi pour ce projet. Je la remercie ainsi qu'Evert Haanappel pour leur encadrement pendant ces 4 années de thèse.

Pour des remerciements plus personnalisé....

Christophe, merci pour tout. Tu es un chef d'équipe comme on en voit peu. Toujours à l'écoute, d'une bienveillance et d'une ouverture d'esprit incroyable. Tu inspires un grand respect à tous ceux qui travaille avec toi et je te souhaite de continuer à mener l'équipe encore vers de nouvelles découvertes passionnantes.

Laurence, merci pour ton accueil. Je sais que je n'ai pas été particulièrement présent mais je suis content d'avoir pu évoluer au sein de ton équipe. Merci aussi pour tes précieux conseils pour l'oral.

Cathy, un grand grand merci. Tu as toujours été prête à tout donner pour la réussite de cette thèse, jusqu'à en perdre la santé. Ces 4 années passées ensemble ont été vraiment incroyables, très enrichissantes, et bien que ça ait pris du temps, je crois que tu as réussi à faire de moi un biologiste cellulaire convenable ! Je te souhaite tout le meilleur pour la suite !

Evert, merci beaucoup pour ton encadrement, ton écoute et ta bienveillance. A nous deux je crois que l'on forme le duo « liposomes » de l'IPBS. Bien que je ne passais pas beaucoup de temps dans le bâtiment A (à part pour faire des liposomes), j'ai toujours apprécié nos discussions et nos échanges. Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle équipe.

Wladimir, le grand maître du 0.8/2/1. Merci beaucoup pour tous tes conseils sur les lipides et comment les extraire ! Tu es le pilier de l'équipe Guilhot et tu as toujours su apporter de la bonne humeur par tes blagues et les expressions dont tu as le secret. Ne change rien.

Serge, je tenais à te remercier pour toutes les fois où tu m'as soutenu et aidé. Tu as toujours été là pour me donner d'excellents conseils pour faire avancer le projet. Je reste encore admiratif de tes connaissances en microscopie et de ta capacité à trouver des solutions. Merci aussi pour nos discussions pendant ces longues heures passées au spectro fluo. Bien sûr je remercie tous les membres permanents des équipes, Christian, Kaymeuang, Catherine, Fabrice, et Etienne (Joly), pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide quand j'en ai eu besoin.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de l'équipe d'Alain Milon, avec lesquels nous avons démarré une collaboration fructueuse ! Je pense pour cela à Alain, Georges et

Matthieu. J'espère que cette entente continuera et amènera à de nouvelles perspectives de recherche passionnantes.

Je remercie Valérie Guillet, pour ta gentillesse, pour ton aide dans la purification d'ESAT que tu as prise à bras le corps et avec un professionnalisme. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je voudrais remercier ensuite les « jeunes » de l'équipe qui m'ont accompagné qui m'ont accompagné, aidé et soutenu. D'abord une grande pensée pour ceux qui étaient là pour mes débuts. Je parle de Sophie, Hénar, Ainhoa, Stéphane et Arnaud, qui faisaient partie de l'équipe et que j'embrasse bien fort.

Il y a ceux qui m'ont accompagné à la fin, Laurie, Delphine, Aideen, Coralie, Alice et Gautier. Je vous remercie du fond du cœur, pour la bonne ambiance que vous avez amené dans ce bureau, les bonnes séances de rigolade, les fonds d'écrans, les phrases cultes... Une petite pensée particulière pour Laurie, tu prends la relève en tant que thésarde de l'équipe et merci à toi pour tout ce que tu as fait.

Je remercie tous les potos que je me suis fait au labo au cours de ces années, Camille, Arnaud, Pauline (Schmitt), Claire, Robin, Juliette, Christophe, Laura, Richard, Cyril, Lucie, Giulia, Alexia, Tamara, Maeva, Yves-Marie, Aurélien, Yoann, Anthony, Alan, Ania, Joana, Danilo, Amélie, Julie, Valérie, Sébastien, Sandra, Diana, Adrien, Matthieu, Guillaume, Pascal, JB, Chloé, Angie, Alexandrine, Pauline (Chanut), Thomas, Dusan, Etienne (Meunier), Rémi, Céline, et d'autres que je suis sûr d'avoir oublié dans cette liste. Je vous remercie tous pour ces bons moments passés ensemble.

Une mention spéciale pour toi Étienne, tu m'as beaucoup conseillé et encouragé pour le post-doc qui se prépare maintenant. La passion qui t'anime pour la recherche m'a beaucoup inspiré et m'a rappelé à chaque fois pourquoi on faisait ça

Une grosse pensée et un grand merci aux petits pédestres, Lucie et Guillaume qui m'ont permis de m'aérer l'esprit à grand coup de session snowboard. Guillaume, nos petites pauses et t'entendre râler sur la Ghréline vont me manquer. J'ai adoré nos très longues discussions sur la science et changer le monde, et merci pour ta patience quand je passais pas mal de temps à me plaindre. Tu es un des mecs les plus brillants que je connaisse et j'ai hâte de pouvoir ouvrir le laboratoire de biophysique de l'Ariège avec toi ! Je t'attends aussi pour aller aux palourdes.

Lulu, tu es une fille comme on en voit peu. D'une gentillesse incroyable mais en même temps capable de te mettre la misère à mains nues. Les moments passés au snow, à l'escalade, et même à danser du lindy, font partis des meilleurs moments que j'ai passé à Toulouse. J'espère qu'on se retrouvera en post-doc aux US (Sur un malentendu on ne sait jamais) !

Un grand merci aux amis de la dream team poitevine Laura, Obélia, Bertrand, Céline, Max, Bertrand, Laure et Sylvain, que j'ai pu continuer à voir. Mention spéciale pour Laura qui m'a écouté patiemment quand j'en avais besoin, et qui a toujours été là pour prendre de mes nouvelles. Également Max qui a aussi été là à Toulouse dans une période pas facile.

Enfin, un grand merci à ma famille, mes parents, mes frères et sœurs, mes grands-parents, mes cousins.e.s. Je vous embrasse bien fort.

Abréviations

AIM2 : absent in melanoma 2
ASB-14 : aminosulfobétaine 14
AT-I/II : cellules épithéliales alvéolaires de type 1/2
BCG : Bacille de Calmette-Guérin
CFP-10 : culture filtrate protein 10 kDa
cGAS : cyclic GMP-AMP synthase
CISH : Cytokin-Inducible SH2-containing protein
CLR : Récepteur aux lectines de type C (C-type lectin receptor)
CR3 : récepteur au complément de type 3 (complément receptor 3)
DAT/PAT : di- polyacyl tréhalose
DC : cellules dendritiques (dendritic cells)
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DIM : dimycocérosate de phthiocérol
DPPC : dipalmitoyl phosphatidylcholine
EEA-1 : early endosomal antigen 1
EMB : ethambutol
ESAT-6 : early secreted antigen target – 6 kDa
ESX-1 : ESAT-6 secretion system 1
FcγR : récepteur au fragment constant Fcγ des immunoglobulines
FRET : Förster / Fluorescence Resonance Energy Transfer
GP : polarisation généralisée (generalised polarisation)
H⁺ V-ATPase : pompe H⁺ ATPase de classe V
HDT : Host Directed Therapy
hMDM : human monocytes-derived macrophages
INF : interferon
INH : isoniazide
iNOS : NO synthase inductible
LAM (ManLAM) : lipoarabinomannane (mannoside)
LM : lipomannane
L_o / L_d : Liquide ordonné / désordonné
LT / LB : lymphocyte T / B
LX4 : lipoxine 4

MAC : *Mycobacterium avium* complex
MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight
MAT : mycobactérioses atypiques
MCR : mycobactéries à croissance rapide
MCL : mycobactéries à croissance lente
MDR-TB : multidrug resistant tuberculosis
Mincle : Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor
MLKL : mixed lineage kinase domain-like protein
MNT : mycobactéries non tuberculeuses
MTBC : *Mycobacterium tuberculosis* complex
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Ndk : nucléoside diphosphate kinase
NK : natural killer
NLR : récepteur nod-like (nod-like receptor)
NLRP3 : NOD-like receptor pyrin domain containing 3
NOS : espèces dérivées de l'oxyde d'azote (nitrogen oxide species)
OMS : organisation mondiale de la santé
PAM : peptide antimicrobiens
PAMP : pathogen associated molecular pattern
PE : phosphatidyléthanolamine
PFT : pore-forming protein
PG : phosphatidylglycérol
PGE2 : prostaglandine E2
PGL : phenolglycolipide
PI : phosphatidylinositol
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PI3P : phosphatidylinositol 3-phosphate
PIM : phosphoinositol mannoside
PKC : protéine kinase C
PKS : polyketide synthase
PMA : phorbol myristate acétate
POPC : palmitoyl-oléoyl-phosphatidylcholine
PRR : pattern recognition receptor
PS : phosphatidylsérine
PZA : pyrazinamide
RE : réticulum endoplasmique

RIF : rifampicine
RIPK : receptor-interacting protein kinase
RM : récepteur au mannose
ROS : espèces réactives de l'oxygène
(reactive oxygen species)
SL : sulfolipide
SM : sphingomyéline
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-
sensitive-factor attachment protein
receptors
SPT : suivi de particule unique (single
particle tracking)

SR : récepteur scavenger
TAG : triacylglycérol
TDR-TB : totally drug resistant
tuberculosis
TLR : Toll-like receptor
TMM / TDM : mono- (TMM) dimycolate
(TDM) de tréhalose
TNF : tumor necrosis factor
VE : vésicules extracellulaires
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
XDR-TB : extremely drug resistant
tuberculosis

Remerciements	3
Abréviations	5
Introduction	10
I. Les mycobactéries.....	10
1) Les mycobactéries - Généralités	10
2) Classification des mycobactéries.....	10
3) La tuberculose.....	13
a. Histoire de la tuberculose	13
b. Physiopathologie de la tuberculose.....	18
c. Traitement et prévention de la tuberculose et enjeux actuels.....	20
II. Interaction de <i>M. tuberculosis</i> avec l'hôte	23
1) Pathogénèse de la tuberculose	23
2) Interaction avec le macrophage : Acteur central dans la réponse immunitaire et dans le devenir de <i>M. tuberculosis</i>	30
a. Reconnaissance de <i>M. tuberculosis</i> et récepteurs de l'immunité innée.....	30
b. Les mécanismes de survie au sein du phagosome	36
c. Rupture et échappement du phagosome	40
d. L'autophagie lors de l'infection par <i>M. tuberculosis</i>	42
e. Régulation de la mort cellulaire du macrophage par <i>M. tuberculosis</i>	44
III. L'enveloppe mycobactérienne et son rôle dans la virulence de <i>M. tuberculosis</i>	51
1) Structure et composition de l'enveloppe de <i>M. tuberculosis</i>	51
2) Rôle et mécanisme moléculaire d'action des lipides d'enveloppe de <i>M. tuberculosis</i> dans la pathogénie	55
a. Les glycolipides	55
b. Les lipides apolaires	58
3) Le dimycocérosate de phthiocérol	59
a. Synthèse et transport.....	59
b. Rôle dans la virulence.....	61
c. Rôle des DIM dans le dialogue de <i>M. tuberculosis</i> avec le macrophage.....	61

IV.	Les membranes cellulaires, structure et rôle dans l'homéostasie cellulaire	63
1)	Structure et composition membranaire	63
a.	Les phospholipides	63
b.	Le cholestérol	65
c.	Les sphingolipides	67
2)	Propriétés biophysiques de la membrane et activité d'effecteurs membranaires	68
V.	Projet de recherche	71
1)	Hypothèse de travail.....	71
2)	Projet de recherche.....	73
	Résultats et Discussion	75
I.	Etude du rôle des DIM la rupture du phagosome, et la mort des macrophages infectés	75
1)	Contexte de l'étude et objectifs.....	75
2)	Résultats	76
3)	Discussion.....	112
II.	Etude du mécanisme moléculaire d'action des DIM.....	117
1)	Introduction	117
2)	Résultats partie 1 : Etude du transfert des DIM de la bactérie vers les membranes du macrophage	117
3)	Résultats partie 2 : étude de l'impact des DIM au point de contact entre la bactérie et la membrane	124
a.	Étude de la polarité membranaire au point de contact entre la bactérie et le macrophage.....	124
b.	Étude des variations de la polarité membranaire au point de contact entre la bactérie et une membrane supportée	129
4)	Résultats partie 3 : Rôle des DIM dans l'activité membranolytique d'ESAT-6.....	133
a.	Effet des DIM sur l'activité d'ESAT-6 purifiée native ou recombinant sans détergent	135
b.	Etat d'agrégation de rESAT-6 en fonction du pH.....	139

c. Rôle des DIM dans l'hémolyse dépendante d'ESAT-6 par M. tuberculosis	140
III. Discussion.....	143
Conclusion et perspectives.....	148
Annexes	152
I. Matériel et méthodes	152
a. Anticorps et réactifs	152
b. Culture des macrophages.....	152
c. Culture bactérienne	152
d. Etude du transfert des DIM dans les macrophages.....	154
e. Etude de la variation de polarité membranaire au point de contact entre la bactérie et la membrane	156
f. Etude du rôle des DIM sur l'activité membranolitique d'ESAT-6 sur liposomes THP-1	157
g. Etude du rôle des DIM dans l'hémolyse dépendante d'ESAT-6	158
Références bibliographiques	160

Introduction

I. Les mycobactéries

1) Les mycobactéries - Généralités

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium* de la famille des Mycobacteriaceae incluses dans l'ordre des Actinomycetales et le sous-ordre des Corynebacterineae (Stackebrandt *et al.*, 1997). Ce sont des bacilles aérobie, asporulées et non mobiles, qui se présentent sous la forme de bâtonnet droit ou légèrement incurvé de 0,2 à 0,6 µm de diamètre sur 1 à 10 µm de longueur. A ce jour, plus de 180 espèces de mycobactéries ont été répertoriées (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). Elles se distinguent des autres bactéries par leur enveloppe riche en lipides (environ 60% en masse sèche) qui leur confère des propriétés particulières comme une forte imperméabilité aux agents anti-microbiens et une résistance naturelle aux stress environnementaux, notamment aux acides et aux bases fortes. Cette propriété est utilisée pour l'identification des mycobactéries au microscope après leur coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen qui colore à la fuchsine les bacilles alcool-acido résistants capables de retenir le pigment (Bishop and Neumann, 1970).

2) Classification des mycobactéries

La diversité des espèces du genre *Mycobacterium* a mené à l'élaboration de plusieurs classifications basées notamment sur des caractéristiques qui leur sont propres, comme leur vitesse de croissance et leur pouvoir pathogène chez l'homme. Ces deux caractéristiques sont d'ailleurs étroitement liées (Figure 1).

Du point de vue de leur vitesse de croissance en milieu solide, les mycobactéries se répartissent en deux groupes :

- Les mycobactéries à croissance rapide (MCR), dont le temps de génération se situe entre 4h et 6h et dont les colonies sont visibles en 7 jours. Ce sont en majorité des mycobactéries environnementales saprophytes non pathogènes, avec quelques espèces responsables d'infections opportunistes chez l'homme (Figure 1),
- Les mycobactéries à croissance lente (MCL) forment des colonies visibles sur milieu solide en plus de 7 jours, avec un temps de génération élevé d'environ 20h. Ce

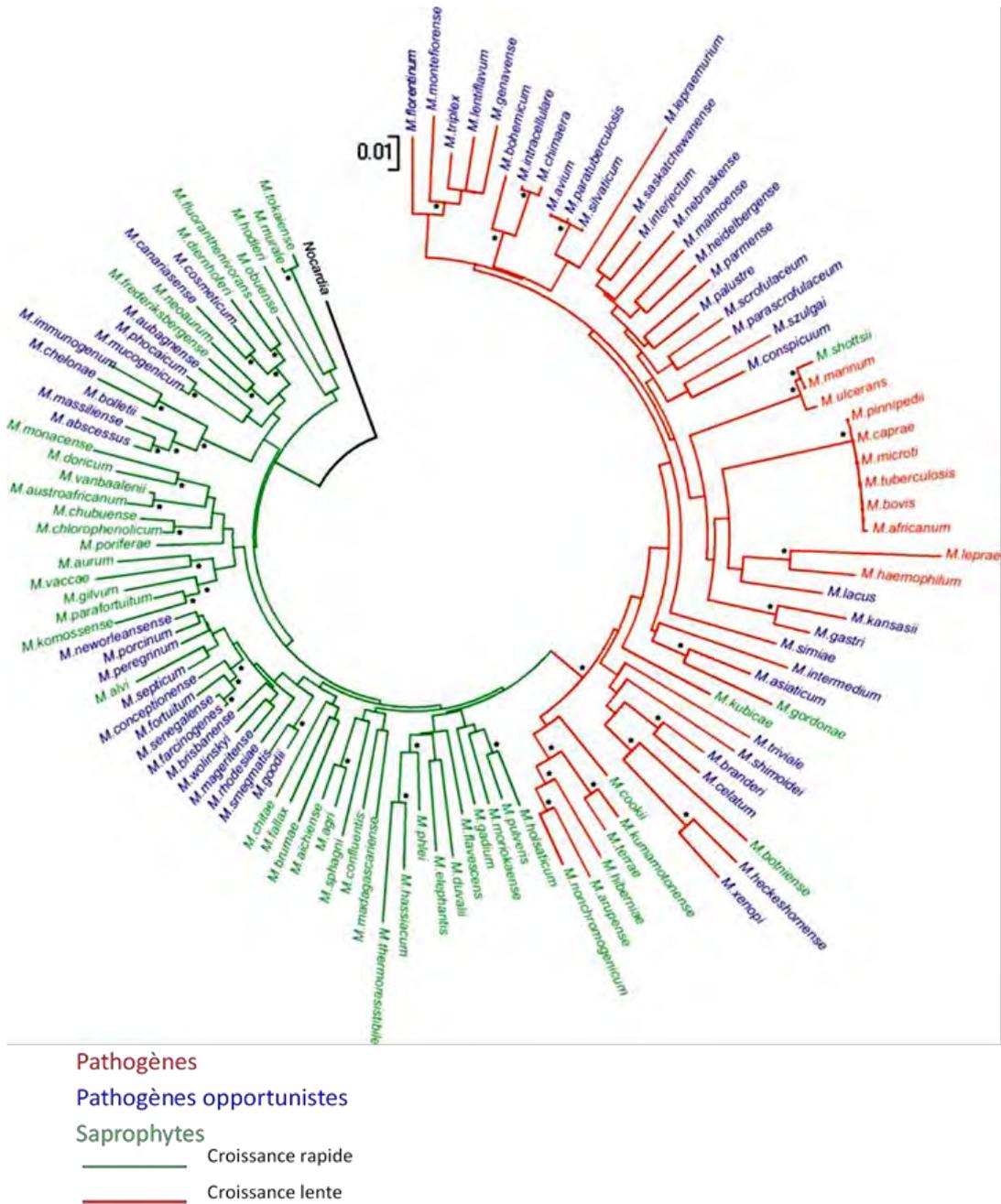


Figure 1: Relation phylogénétique et pouvoir pathogène des espèces mycobactériennes.

L'arbre phylogénétique de 119 mycobactéries est obtenu par comparaison des gènes codant pour *hsp65*, *rpoB*, et de l'ARN 16S et construit par la méthode de Neighbor-Joining (Adapté de(Gutierrez et al., 2009)).

groupe comprend les mycobactéries qui sont des pathogènes strictes pour l'Homme et un certain nombre de pathogènes opportunistes (Figure 1).

Du point de vue de leur pouvoir pathogène, 3 grands groupes de mycobactéries se distinguent :

- Les mycobactéries saprophytes non pathogènes pour l'homme qui sont majoritairement des MCR. La plus représentative est *Mycobacterium smegmatis* qui est largement utilisée en laboratoire comme modèle d'étude des mycobactéries
- Les mycobactéries pathogènes opportunistes dites « non-tuberculeuses » (MNT) ou atypiques sont le plus souvent retrouvées chez les sujets immunodéprimés. Les plus fréquemment retrouvées sont les mycobactéries du complexe *M. avium* (MAC) incluant *M. avium* et *M. intracellulare* qui sont responsables d'une grande partie des infections avec *M. kansasii* ; les mycobactéries du complexe *M. fortuitum*, dont *M. abscessus* qui est un pathogène opportuniste émergent responsable d'infections respiratoires, cutanéomuqueuses ou disséminées ; enfin, *M. ulcerans* qui est responsable de l'ulcère de Buruli, troisième mycobactériose la plus prévalente dans le monde

Un petit nombre de MNT est responsable d'infections opportunistes ou mycobactérioses atypiques (MAT), le plus souvent pulmonaires et associées à d'autres pathologies pulmonaires telles que des pneumoconioses, silicoses, protéinoses alvéolaires, tuberculoses, et mucoviscidoses. Partout où la tuberculose a régressé, les MAT représentent une proportion plus importante des cas de granulomatose et elles font partie des infections secondaires courantes chez les malades présentant un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La plupart des infections par les MAT viendraient de leur présence ubiquitaire dans l'environnement et notamment dans les réseaux d'eau (Delafont *et al.*, 2014, Feazel *et al.*, 2009). D'un point de vue épidémiologique, la prévalence des infections par MNT semble augmenter ces dernières années. Cette tendance peut s'expliquer par l'amélioration des méthodes diagnostiques, mais il apparaît également que les infections à MNT sont corrélées à des situations d'immunosuppression (infection VIH et traitements immunosuppresseurs) ou des pathologies respiratoires sous-jacentes comme la mucoviscidose (Griffith and Aksamit, 2016, Prevots and Marras, 2015). Dans le cas des infections par *M. abscessus*, contrairement aux autres MNT, une part importante de ces infections serait liée à la transmission de la bactérie de personnes à personnes, et non par une source environnementale, surtout parmi les patients atteints de mucoviscidose (Bryant *et al.*, 2016). En général, les MAT finissent par répondre à une antibiothérapie

antituberculeuse, mais elle reste longue et couteuse associant au moins trois antibiotiques pendant 18 à 24 mois.

- Les mycobactéries pathogènes strictes de l'homme et de l'animal qui comprennent les membres du complexe *M. tuberculosis* (MTBC) et qui sont responsables de la tuberculose humaine. Ce complexe regroupe *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. canetti* ou animale *M. bovis*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, et *M. caprae* ; et *M. leprae*, l'agent étiologique de la lèpre.

La tuberculose et la lèpre sont parmi les maladies infectieuses les plus anciennes et les plus répandues et constituent encore à ce jour un réel problème en matière de santé publique dans le monde. Ainsi, malgré l'existence d'un traitement efficace, la lèpre ou maladie de Hansen est une maladie qui touche plus de 100 pays et les chiffres de l'OMS montrent l'apparition chaque année de nouveaux cas. La lèpre se transmettrait de personne à personne par contact avec les malades et éventuellement par aérosols. Elle affecte la peau et les muqueuses respiratoires, mais sa gravité est liée aux destructions nerveuses. En raison du temps d'incubation de l'infection qui dure plusieurs années, les porteurs asymptomatiques de *M. leprae* peuvent transmettre la maladie, ce qui rend son élimination difficile à l'échelle mondiale. En outre, l'impossibilité de cultiver *M. leprae in vitro* a été un obstacle majeur pour la recherche sur la lèpre. De fait, la lèpre reste un problème de santé public majeur pour plusieurs pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique latine.

Par ailleurs, environ deux milliards d'individus dans le monde sont porteurs asymptomatiques de *M. tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose humaine. Ce réservoir conséquent de personnes, qui pourront développer la maladie des décennies après leur infection et transmettre le bacille à d'autres personnes, alimente la pandémie.

Le poids des infections mycobactériennes dans le monde fait qu'elles occupent encore une place majeure dans la recherche scientifique sur les maladies infectieuses. Dans l'équipe de C. Guilhot, nous sommes particulièrement intéressés à *M. tuberculosis* et au développement de la tuberculose.

3) La tuberculose

a. Histoire de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse qui touche l'homme depuis des millénaires et qui reste encore de nos jours un problème majeur de santé publique. C'est une infection pulmonaire qui se manifeste par une forte toux purulente et sanglante. Elle s'accompagne également d'une fièvre trainante, de douleurs thoraciques, d'une fatigue importante et d'un

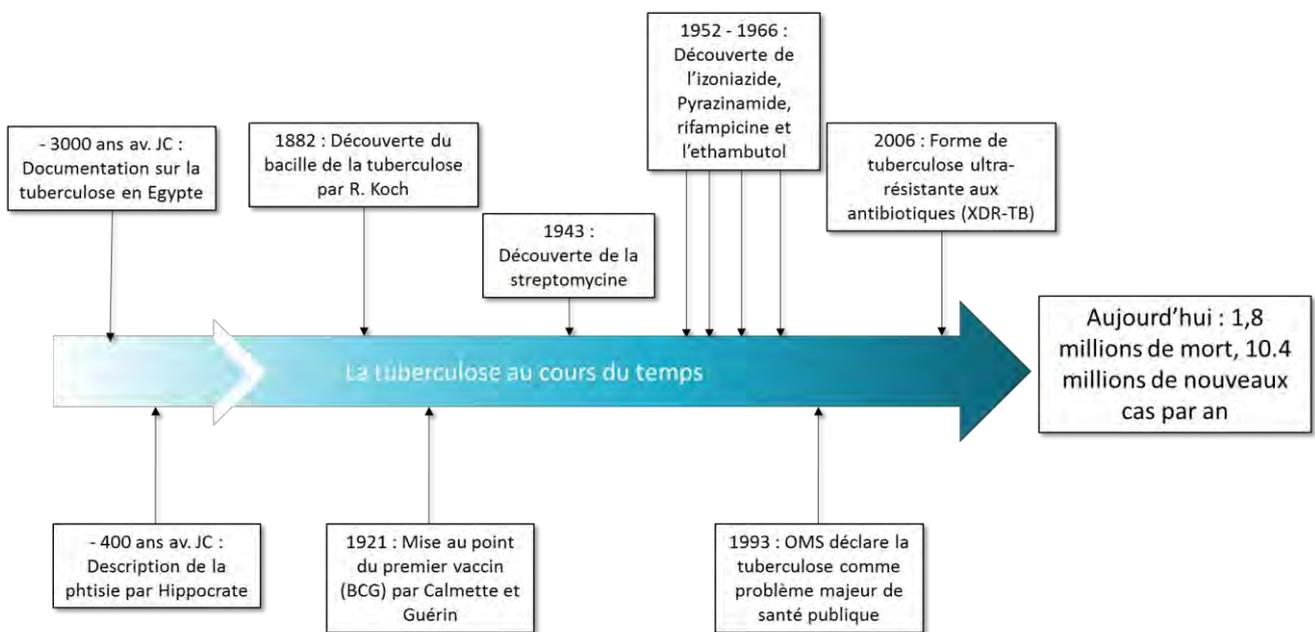


Figure 2: Histoire et évènements marquants dans la recherche sur la tuberculose.

BCG : Bacille de Calmette et Guérin. XDR : eXtremely Drug Resistant

amaigrissement. Il existe des formes plus rares de tuberculoses disséminées, comme des formes extra-pulmonaires caractérisées par l'atteinte des ganglions, des méninges, ou encore des os (maladie de Pott).

La tuberculose était déjà documentée en Egypte il y a environ 5000 ans ; des traces de tuberculose osseuse ont également été retrouvées sur des momies égyptiennes datant de la même période (Daniel, 2006) (Figure 2). Connue depuis l'antiquité, Hippocrate la nomme « phtisie », qui signifie « consommation, consumer » (Figure 2). Les symptômes décrits étaient un amaigrissement des malades, une peau pâle et une toux purulente qui donne l'image qu'ils se consomment de l'intérieur. Cependant les descriptions faites par Hippocrate, Galien ou encore Aristote ne concernaient que les signes visibles de la tuberculose. Les causes de la maladie resteront inconnues pendant des siècles. Bien qu'Aristote considérait la pathologie comme étant contagieuse, il était généralement admis qu'elle était associée à l'hérédité (Leao and Portales, 2007). Il fallut attendre le XVIIe siècle, lors de l'épidémie de « grande peste blanche » pour trouver les premières descriptions anatomopathologiques de la maladie. C'est à cette époque que Franciscus de le Boë décrivit des structures caractéristiques des poumons des malades tuberculeux auxquelles il donna le terme de tubercule, appelé aujourd'hui granulome. Le nom de « tuberculose » fut donné à la maladie par le médecin allemand Johann Lukas Schönlein en 1839. La notion de maladie contagieuse n'apparaît véritablement qu'au XVIIIe siècle avec Benjamin Marten qui a émis l'hypothèse selon laquelle la tuberculose serait causée par de « petits êtres vivants ». En 1865, le français Jean-Antoine Villemin montre que la tuberculose est inoculable et transmissible de l'humain aux animaux, appuyant l'hypothèse qu'un microorganisme est bien à l'origine de l'infection et de la contagion. C'est en 1882, que finalement Robert Koch annonce la caractérisation du bacille *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose lors d'une présentation restée célèbre : « Die Ätiologie der Tuberkuloze » (Figure 2). Il décrit dans le même temps une nouvelle méthode de culture et d'isolement de la bactérie sur milieux solide (Koch, 1982). Malgré ces avancées, la maladie reste incurable et meurtrière.

Il faut attendre 1921 pour qu'un vaccin voit le jour. Deux chercheurs de l'Institut Pasteur, Albert Calmette et Camille Guérin mettent au point le vaccin BCG en se basant sur le mode opératoire du vaccin de la variole (Figure 2). Pendant près de vingt ans, ils ont cultivé et passé le bacille responsable de la tuberculose bovine, *Mycobacterium bovis*. Ils ont remarqué que les passages successifs atténuent la virulence du bacille qui perd sa capacité à provoquer la maladie chez le bovin, tout en lui conférant une protection contre une réinfection par la souche non-atténuée. Le vaccin fut ensuite distribué à de nombreux instituts dans le monde pour vacciner rapidement les populations. Cette diffusion de la

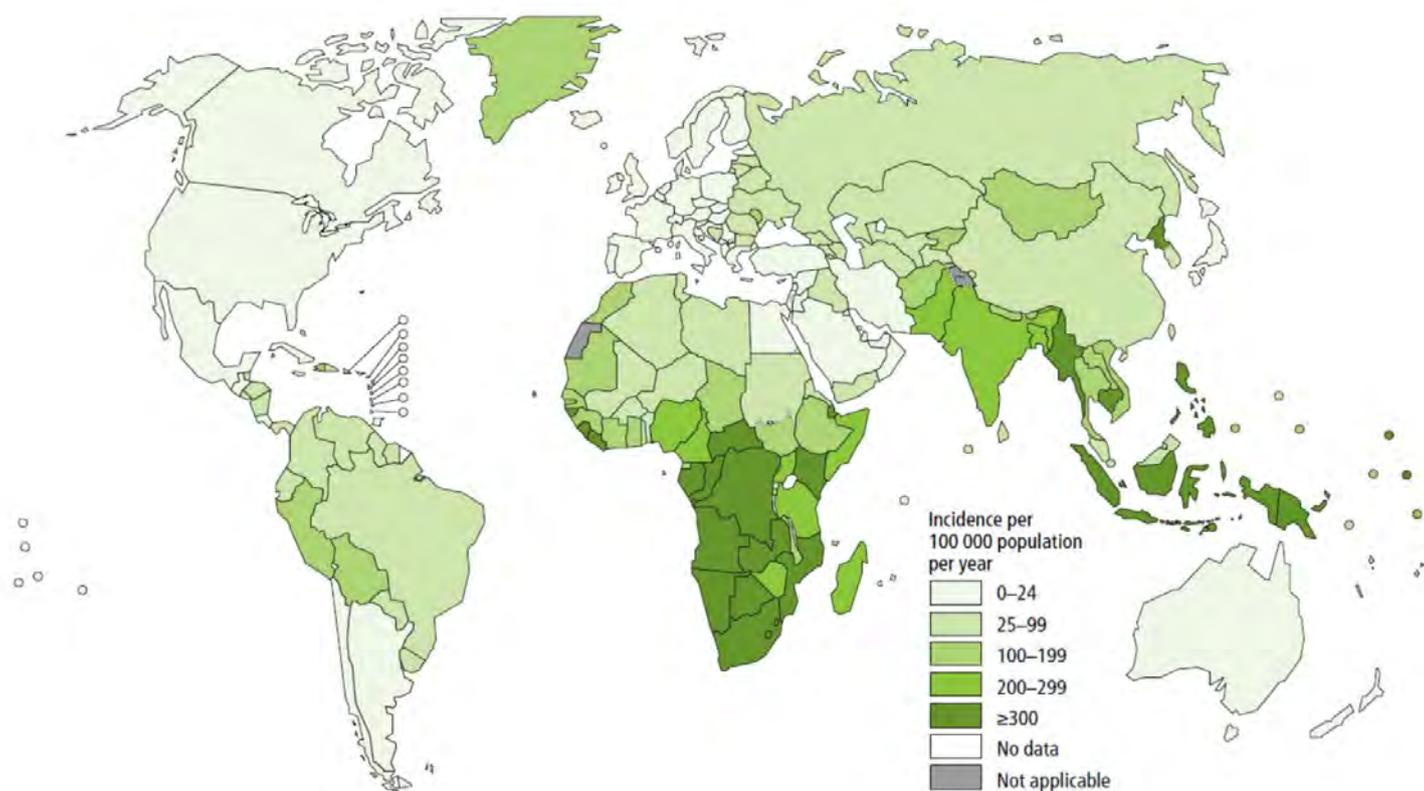


Figure 3: Carte de l'incidence de cas de tuberculose dans le monde en 2016 (OMS, rapport 2017)

souche vaccinale atténuée, *M. bovis* BCG, cultivée par la suite dans différentes conditions a conduit à l'apparition de plusieurs souches vaccinales, qui présentent aujourd'hui certaines différences de phénotypes et de protection. Les campagnes de vaccination ont ainsi permis de faire diminuer drastiquement le nombre de cas déclarés de tuberculose, passant par exemple en France de 31 248 à 9 027 entre 1970 et 1989 (Données de l'Institut de Veille Sanitaire).

Les premiers traitements antibiotiques apparaissent une vingtaine d'années plus tard avec la découverte de la streptomycine par Selman Waksman et Albert Schatz en 1943 (Schatz *et al.*, 1944) (Figure 2). Cette découverte marqua un tournant décisif dans la prise en charge de la maladie, jusqu'alors incurable. Plus tard, d'autres composés furent découverts. L'isoniazide (INH, Bernstein *et al.*, 1952), le pyrazinamide (PZA, Malone *et al.*, 1952), la rifampicine (RIF, Thomas *et al.*, 1961) et l'ethambutol (EMB, Maggi *et al.*, 1966) firent leur apparition et constituent encore aujourd'hui la base du traitement anti-tuberculeux (Figure 2). A l'heure actuelle, l'OMS préconise la prise des quatre antibiotiques dits de première ligne (INH, PZA, RIF, EMB) pendant deux mois, puis deux (RIF et INH) pendant les quatre mois suivants. Cette antibiothérapie a permis une diminution très importante de la mortalité due à la tuberculose, notamment dans les pays développés où les malades bénéficient d'un bon accès aux soins et d'un approvisionnement continu en médicaments.

Au cours de l'année 2016, l'OMS a malgré tout estimé le nombre de nouveaux cas à 10,4 millions de personnes (OMS, Global Tuberculosis Report, 2017), soit les neuf dixièmes de la population d'un pays comme la Belgique (services officiels 2016), et un nombre de décès qui s'élève à 1,3 million de personnes, l'équivalent de la population de Marseille et Lyon cumulée. Ces données classent la tuberculose à la 9ème place des causes de mortalité dans le monde, devant le paludisme et le VIH. Les pays les plus touchés sont ceux d'Afrique sub-saharienne, du sous-continent indien et d'Asie du Sud-Est (Figure 3), probablement à cause d'un niveau de vie plus bas et des conditions d'hygiène favorables à l'infection. L'incidence encore importante de la maladie dans ces régions du globe, le manque de couverture vaccinale et d'accès aux soins, l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques et la résurgence de la maladie dans les populations de personnes atteintes du VIH a conduit l'OMS à déclarer la tuberculose comme « urgence de santé publique mondiale » en 1993 (Figure 2). Le poids économique de la maladie dans ces différents pays est important et a également conduit l'OMS à lancer différents programmes de soutien. Ils visent à permettre un meilleur accès au vaccin et aux traitements dans les pays en voie de développement, et à développer la recherche de nouveaux vaccins et de nouvelles approches thérapeutiques.

b. Physiopathologie de la tuberculose

L'infection et la transmission de *M. tuberculosis* suit un cycle relativement bien défini (Figure 4). La transmission est essentiellement interhumaine et se ferait quasiment exclusivement par voie aérienne. Les mycobactéries contenues dans des microgouttelettes (ou gouttelettes de Flügge) sont expectorées par un donneur atteint d'une tuberculose active et inhalées par une personne receveuse (Figure 4). L'inhalation d'un seul bacille suffirait à démarrer l'infection (Russell, 2006). Les mycobactéries traversent le tractus respiratoire et atteignent l'alvéole pulmonaire. Une part inconnue des personnes infectées parvient à éliminer totalement l'infection (Figure 4). La primo-infection conduit à la mise en place d'une réponse immunitaire qui permet de contrôler l'infection dans 90% des cas et 5 à 10% déclenchent une tuberculose active. Dans 90-95% des cas, chez les individus immunocompétents le système immunitaire engendre une réponse coordonnée de plusieurs types cellulaires qui aboutit à la formation d'une structure multicellulaire caractéristique de la tuberculose, appelée granulome (Figure 4) Cette structure joue un double rôle dans le contrôle de l'infection. Elle permet le confinement de la bactérie dans un environnement hostile et empêche sa dissémination ; elle permet aussi le maintien du *M. tuberculosis* dans le poumon sur le long terme car le bacille est très rarement éliminé. Lorsque le granulome est formé l'infection est asymptomatique, on parle alors de tuberculose latente. Un équilibre s'établit entre la réponse immunitaire de l'hôte et la capacité du bacille à persister dans le poumon. Cette forme latente peut durer jusqu'à une dizaine d'années voire ne jamais donner de tuberculose active. Il est d'ailleurs considéré qu'un tiers de la population mondiale est infectée, faisant de ces personnes un réservoir bactérien considérable. Dans 5-10% des cas, une réactivation de la maladie a lieu, liée à un déséquilibre qui se crée en faveur de la bactérie, qui prolifère et provoque la rupture du granulome (Figure 4). Les mycobactéries peuvent alors se disséminer dans l'organisme et atteindre spécifiquement d'autres organes ; on parle de tuberculose extra-pulmonaire ou de tuberculose miliaire. C'est à ce stade que le malade est contagieux. Les bactéries libérées du granulome sont expulsées par les voies respiratoires lors des expectorations dans des microgouttelettes. Éventuellement ces gouttelettes peuvent être inhalées par une personne et le cycle infectieux peut recommencer (Figure 4). Les facteurs de réactivation de la maladie ne sont pas bien connus mais elle est souvent associée à une immunosuppression (VIH ou traitement immunosuppresseurs), au diabète ou encore à des facteurs socio-économiques comme la malnutrition et l'alcoolisme/tabagisme.

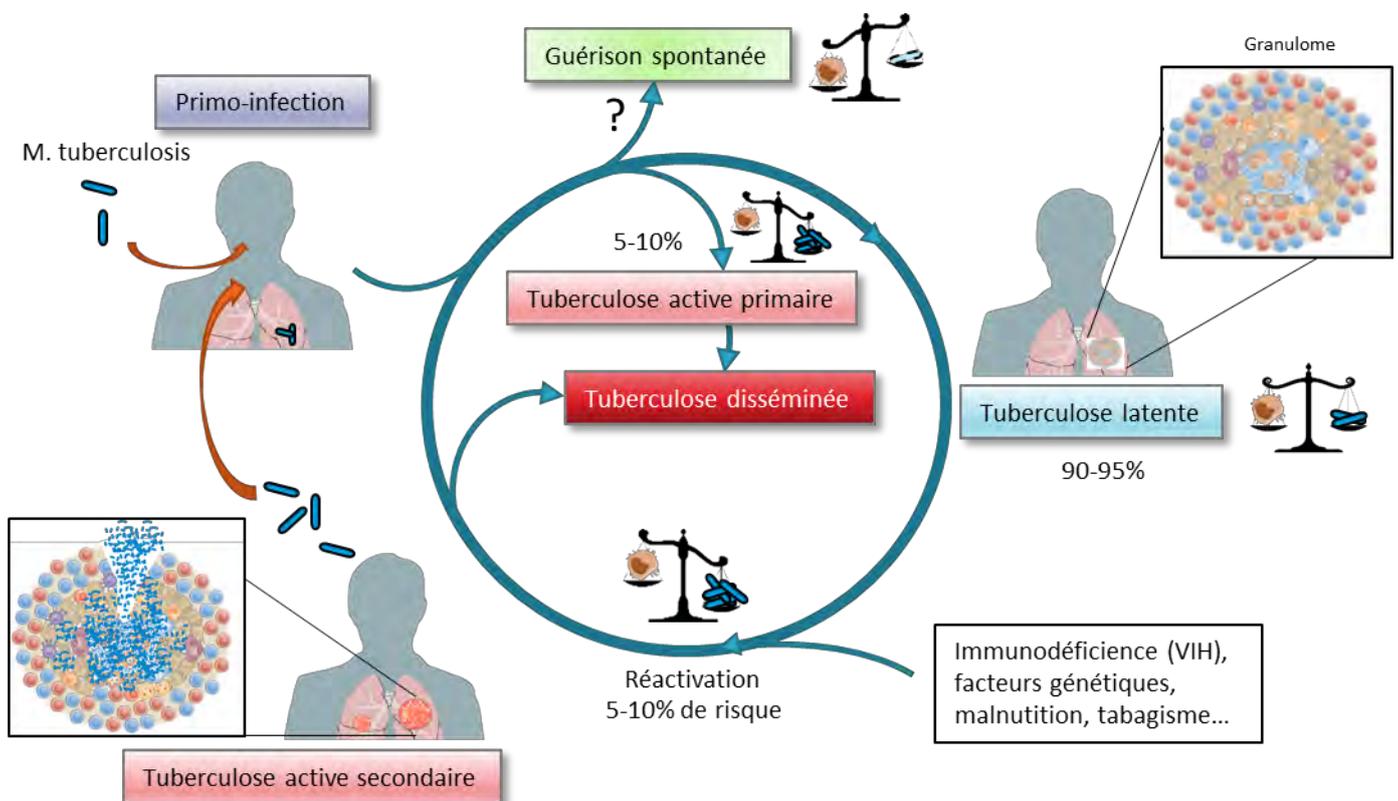


Figure 4: Cycle infectieux de la tuberculose (Adapté de (Ernst, 2012)).

Après inhalation du bacille, un pourcentage non déterminé d'individus est capable d'éliminer complètement le pathogène. Entre 5-10% des cas développent une tuberculose active dite primaire ; dans 90-95% des cas, l'infection est contenue et reste latente. Un équilibre se forme entre la bactérie et la réponse immunitaire. La phase de latence peut durer plusieurs années, voire rester asymptomatique. Dans 5-10% des cas, l'équilibre bascule alors en faveur du bacille. Une réactivation s'opère qui se traduit par une rupture du granulome et une libération du bacille. L'individu développe une tuberculose active dite secondaire qui peut se disséminer à d'autres organes. A ce stade, le bacille peut être libéré dans les voies aériennes supérieures par les expectorations puis transmis par inhalation sous forme de microgouttelettes à d'autres personnes.

c. Traitement et prévention de la tuberculose et enjeux actuels

Malgré l'existence d'un traitement efficace de la tuberculose, sa durée et le manque d'approvisionnement régulier en médicament dans certains pays en voie de développement favorise l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. Des cas de patients atteints de tuberculose résistante à un ou plusieurs antibiotiques (MDR-TB), à tous les antibiotiques de première ligne (XDR-TB), voire insensible à tout traitement (TDR-TB) ont fait leur apparition. En 2016, la tuberculose multirésistante est responsable d'une crise de santé publique et représente une menace pour la sécurité sanitaire. En 2017, l'OMS déclare que la Chine, la Fédération de Russie et l'Inde à eux seuls représentent ensemble près de la moitié des cas dans le monde (OMS, Global Tuberculosis Report, 2017). Par ailleurs, l'efficacité du vaccin BCG est variable. Il protège à hauteur de 90 % dans le cas de méningites tuberculeuses chez le jeune enfant mais il ne protège pas de façon fiable contre la tuberculose pulmonaire, surtout chez l'adulte où le niveau de protection peut varier de 0% à 80% (Andersen and Doherty, 2005). Il est donc devenu urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour atteindre les objectifs fixés par l'OMS en 2018 de réduire en 2035 de 95% le nombre de décès par tuberculose et de 90% le taux d'incidence de la maladie, pour arriver mondialement à des chiffres similaires à ceux que l'on observe aujourd'hui dans les pays à faible incidence de tuberculose.

La recherche dans le domaine de la lutte contre la tuberculose s'articule essentiellement autour de deux grands axes : i) le développement d'un nouveau vaccin et ii) la recherche de nouvelles approches thérapeutiques anti-tuberculeuses.

Les raisons de la faible efficacité du vaccin BCG actuel ne sont pas bien connues et des essais ont été réalisés pour tenter d'améliorer sa protection vaccinale (Marinova *et al.*, 2014). Cela passe par exemple par des modifications génétiques du vaccin existant pour lui faire exprimer des molécules produites par *M. tuberculosis* dans l'optique de provoquer une réponse immunitaire offrant une meilleure protection. Une approche plus pasteurienne consiste à mettre au point de nouvelles souches vaccinales dérivant directement de *M. tuberculosis* par atténuation de la souche pathogène. Une équipe de recherche a récemment mis au point des souches de *M. tuberculosis* atténuées, par délétion de deux gènes impliqués dans la virulence et qui confère une protection contre une infection par *M. tuberculosis* chez la souris (Aguilo *et al.*, 2016). Enfin, une autre option consiste à tenter de renforcer le vaccin BCG déjà existant avec de nouveaux adjuvants, contenant un cocktail d'antigènes de *M. tuberculosis*, pour stimuler plus efficacement la réponse immunitaire (Fletcher and Schragar, 2016). Comme ces différentes stratégies sont toujours en phase de développement, le BCG reste actuellement le seul vaccin contre la tuberculose.

Le second axe de recherche a pour objectif de traiter la maladie. La stratégie la plus classique consiste à identifier de nouveaux antibiotiques en recherchant des cibles protéiques essentielles à la bactérie et des molécules capables d'inhiber leur synthèse ou leur fonction. Une autre stratégie consiste à renforcer l'action des antibiotiques. Par exemple, un traitement antibiotique couplé à de la vitamine C a montré une augmentation notable de l'efficacité des antibiotiques sur *M. tuberculosis* (Vilchèze *et al.*, 2013, Vilchèze *et al.*, 2018). Certaines études se sont également intéressées aux peptides antimicrobiens, dont certains ont une activité anti-mycobactérienne (Silva *et al.*, 2016). Contrairement aux antibiotiques, ces molécules ont l'avantage de ne pas avoir de cible moléculaire spécifique, ce qui limite fortement l'apparition de souches résistantes à long terme (Jenssen *et al.*, 2006).

Une stratégie thérapeutique émergente appelée « Host Directed Therapy » (HDT) cherche à cibler l'hôte plutôt que la bactérie (Figure 5). Les antituberculeux actuels ont une capacité limitée à pénétrer les lésions et à prévenir les dommages tissulaires résultant d'une inflammation. Par ailleurs, ils ont des effets réduits sur les bactéries non répliquatives (*e.g.* en phase de latence). La HDT contre la tuberculose a trois objectifs distincts : augmenter les mécanismes antimicrobiens, réduire la réponse inflammatoire pour prévenir l'induction de dommages pulmonaires et stimuler la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les traitements proposés visent soit à moduler la réponse immunitaire pour la rendre plus favorable à l'élimination du bacille, soit à stimuler les réponses bactéricides cellulaires notamment du macrophage, partenaire principale de *M. tuberculosis* lors de l'infection (Figure 5). L'interaction de la bactérie avec l'hôte et le macrophage sera abordée en détail plus loin dans ce manuscrit.

Une stratégie possible est d'altérer la structure du granulome pour favoriser l'accessibilité aux antibiotiques. Ainsi, un traitement anti-TNF- α (Bourigault *et al.*, 2013) ou anti-facteurs angiogéniques désorganise le granulome et permet une meilleure pénétration des antibiotiques (Datta *et al.*, 2015, Oehlers *et al.*, 2014). *M. tuberculosis* étant un pathogène intracellulaire, d'autres stratégies de traitement visent les événements à l'intérieur de la cellule hôte (Machelart *et al.*, 2017). Par exemple, l'inhibition de la Abelson tyrosine kinase par l'imatinib augmente l'acidification du phagosome et inhibe la croissance de *M. tuberculosis* dans les macrophages (Bruns *et al.*, 2012). Il est également connu que l'autophagie, processus de dégradation et recyclage cellulaire, peut restreindre la survie et la multiplication de *M. tuberculosis* dans le macrophage (Gutierrez *et al.*, 2004). Comme pour la maturation du phagosome, un traitement avec des composés activateurs de l'autophagie a permis de diminuer la survie et la croissance intracellulaire de *M. tuberculosis* (Gutierrez *et al.*, 2004, Kuijl *et al.*, 2007) (Figure 4). Une étude sur le poisson-zèbre a aussi montré que l'inhibition de la mort cellulaire par nécrose, induite lors de l'infection par *M. marinum*, pouvait

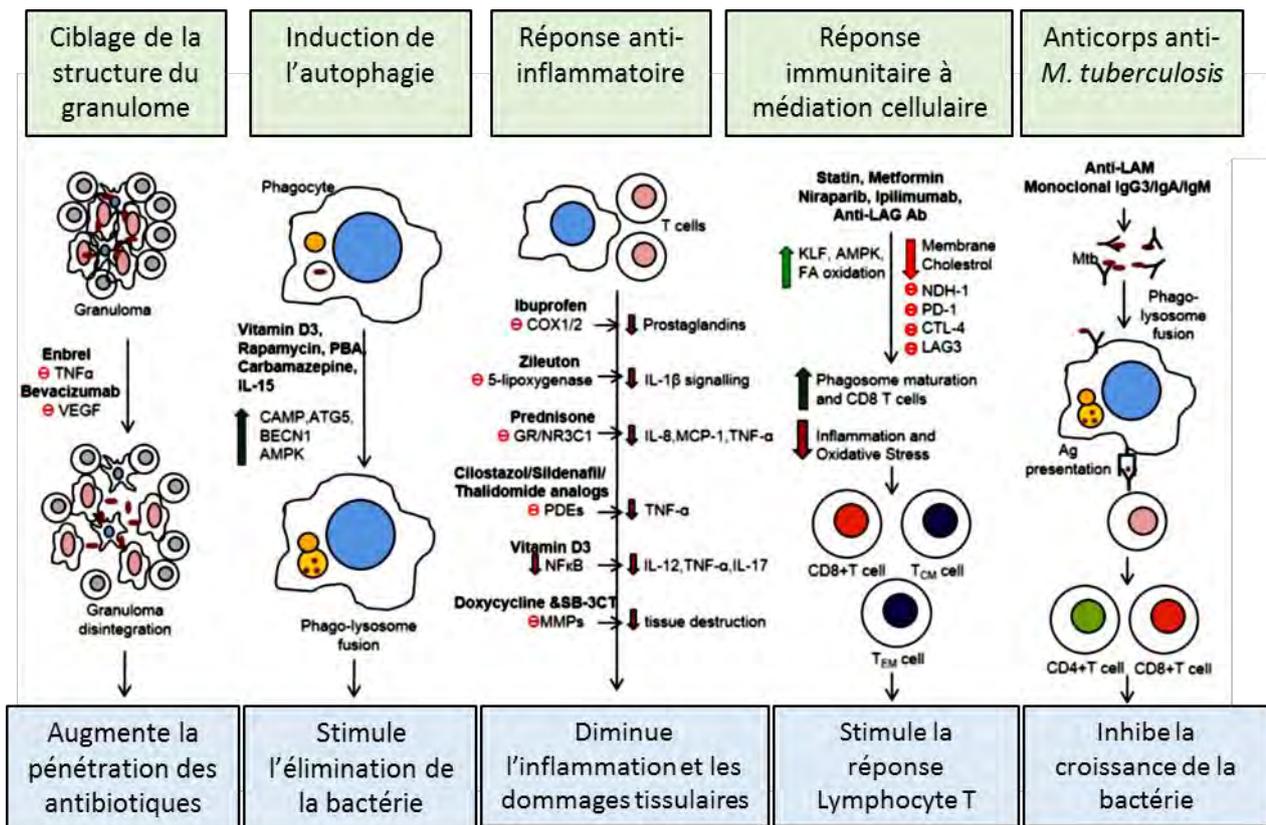


Figure 5: Présentation de différentes stratégies de thérapies dirigées contre l'hôte (adapté de (Kolloli and Subbian, 2017))

stimuler les mécanismes bactéricides du macrophage et donc augmenter l'élimination du bacille (Roca and Ramakrishnan, 2013). Finalement, ces nouvelles approches de thérapies sont prometteuses car elles pourraient permettre de contourner le problème de résistance aux antibiotiques. En revanche, elles peinent encore à montrer une réalité *in vivo*. La mise au point de ces approches repose avant tout sur une compréhension fine des mécanismes infectieux de *M. tuberculosis*. Il est donc primordial de décrypter le dialogue entre le bacille et les cellules immunitaires.

II. Interaction de *M. tuberculosis* avec l'hôte

1) Pathogénèse de la tuberculose

La réponse à l'infection par *M. tuberculosis* se caractérise par la mise en jeu de la réponse immunitaire de l'hôte. Cette réponse comprend d'abord la composante immunitaire innée qui est rapide et non spécifique et qui représente la première ligne de défense contre les pathogènes. Cette étape est suivie de la réponse immunitaire adaptative qui est spécifique du pathogène et plus lente à se mettre en place.

Le long des voies respiratoires, *M. tuberculosis* est confrontée aux premiers éléments de l'immunité innée (Lerner *et al.*, 2015). Des fosses nasales aux bronchioles, les voies respiratoires sont tapissées d'un épithélium cilié constitué d'une couche de cellules étroitement liées formant une première barrière physique de protection. Il est également recouvert d'un mucus composé entre autre d'anticorps et de peptides antimicrobiens toxiques pour les bactéries. Les cellules épithéliales expriment une panoplie de récepteurs de l'immunité, les « Pattern Recognition Receptors » (PRR), reconnaissant des motifs moléculaires particuliers situés à la surface de l'agent pathogène, les « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMP) (Li *et al.*, 2012). La reconnaissance de la bactérie ou d'autres molécules d'origine bactérienne par ces récepteurs déclenche une sécrétion de cytokines inflammatoires menant au recrutement de phagocytes professionnels tels que les macrophages (Lerner *et al.*, 2015).

Les bactéries ayant franchi avec succès les voies respiratoires atteignent les alvéoles pulmonaires, qui sont tapissées de cellules épithéliales alvéolaire de type I (AT-1) et de type II (AT-II) et contiennent les phagocytes professionnels de l'immunité innée, les macrophages alvéolaires (MA) et les cellules dendritiques résidentes (DC) baignant dans un fluide riche en lipides (Figure 6). Le dialogue de *M. tuberculosis* avec les AT semble jouer un rôle dans l'établissement de l'infection (Scordo *et al.*, 2016). En effet, il a été montré que *M. tuberculosis* peut infecter et survivre dans l'environnement permissif des AT-II

(McDonough and Kress, 1995). Néanmoins, les macrophages alvéolaires sont la première ligne de défense contre *M. tuberculosis*. La bactérie est reconnue par des récepteurs PRR à la surface des cellules et ce premier contact avec le pathogène est crucial pour établir une réponse immunitaire coordonnée entre les différents types cellulaires (Killick *et al.*, 2013, Troegeler *et al.*, 2017). Il déclenche une cascade de transduction intracellulaire qui aboutit à l'internalisation du bacille dans sa cellule hôte. Les macrophages infectés quittent les alvéoles et migrent dans le parenchyme pulmonaire où ils s'accumulent pour former un néogranulome (Ramakrishnan, 2012) (Figure 6). Les macrophages alvéolaires recrutés (Huang *et al.*, 2018) mais aussi les macrophages issus des monocytes circulants (Lastrucci *et al.*, 2015) ont montré être permissifs au développement de *M. tuberculosis* dans le poumon. Les macrophages infectés produisent des chimiokines qui favorisent le recrutement sur le foyer infectieux de cellules inflammatoires provenant du sang ou du tissu conjonctif local qui s'organisent pour enrichir le néogranulome. On constate l'arrivée massive de différentes populations de macrophages, résidant dans les tissus ou dérivants de monocytes circulants ainsi que des neutrophiles, des cellules « Natural Killer » (NK) et des cellules $\gamma\delta$ -T (Dieli *et al.*, 2003, Junqueira-Kipnis *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2011, Wolf *et al.*, 2007)(Figure 6). C'est l'arrivée des acteurs cellulaires de l'immunité adaptative, les lymphocytes T et B qui permet de structurer le néogranulome en granulome.

Les neutrophiles recrutés participent au contrôle de l'infection et à la formation du granulome. Ce sont des phagocytes professionnels doués d'un fort pouvoir microbicide cependant leur rôle dans l'élimination du bacille est controversé (Lyadova, 2017). Des études ont montré que les neutrophiles infectés ne tuent pas *M. tuberculosis* mais meurent par nécrose, libérant le bacille qui infecte les macrophages environnants pour s'y multiplier (Corleis *et al.*, 2012, Dallenga *et al.*, 2017). Aux stades tardifs de l'infection, une infiltration à grande échelle de neutrophiles est observée ; elle est associée à des événements exsudatifs, à une nécrose, à des lésions tissulaires et à une croissance du bacille (Ong *et al.*, 2015). Lorsqu'ils sont activés, les neutrophiles émettent aussi dans le milieu extracellulaire des filaments composés d'ADN et de protéines. Ces filaments forment un filet, ou NET (Neutrophile Extracellular Trap), qui piègent *M. tuberculosis* et préviennent ainsi sa propagation (Filio-Rodríguez *et al.*, 2017, Ramos-Kichik *et al.*, 2009). Ils sécrètent différentes chimiokines qui recrutent les monocytes et les lymphocytes T (Lyadova, 2017).

Les cellules NK recrutées ont des fonctions immunitaires innées précoces. Elles agissent sur les macrophages infectés par *M. tuberculosis* et déclenchent leur apoptose via la sécrétion de perforine et de granzymes (Allen *et al.*, 2015, Brill *et al.*, 2001). Les cellules apoptotiques sont alors reconnues et internalisées par les macrophages selon un processus appelé efferocytose qui conduit la bactérie dans un compartiment bactéricide. L'interaction avec

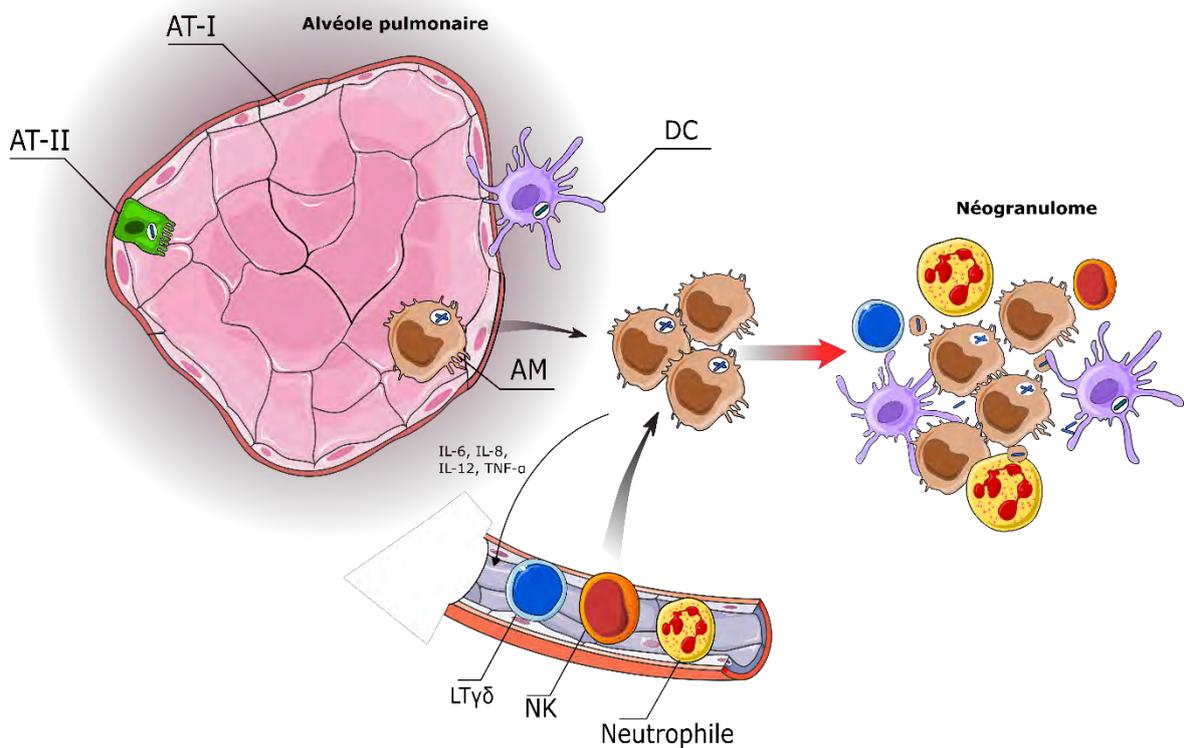


Figure 6: Cellules de l'immunité innée impliquées dans la réponse à *M. tuberculosis*.

Les bactéries arrivant dans les alvéoles sont prises en charge par les macrophages alvéolaires (AM) en premier lieu, mais aussi par les cellules épithéliales alvéolaires de type II (Type II EC) et les cellules dendritiques (DC). Les macrophages migrent dans le parenchyme et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires menant au recrutement des cellules Natural Killer (NK), des cellules $T\gamma\delta$ et neutrophiles. Adapté de Lerner et al., 2015.

M. tuberculosis peut initier des mécanismes anti-mycobactériens, comme la sécrétion de granulysine connue pour ses effets statiques voire microbicides vis-à-vis du bacille (Lu *et al.*, 2014). Les cellules NK sont donc considérées comme des acteurs importants dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*.

Les DC sont à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif (Alloatti *et al.*, 2016). Ce sont des phagocytes professionnels qui ingèrent *M. tuberculosis* sur le site infectieux. A la différence des macrophages, les DC ne permettent pas au bacille de se multiplier (Tailleux *et al.*, 2003). Elles sont plus connues pour leur capacité à transporter le bacille jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires et pour leur rôle dans la présentation d'antigènes. Par la mise en jeu de PRR, les DC reconnaissent des PAMP et des signaux issus de cellules endommagées (DAMP = Danger Associated Molecular Pattern). Cette reconnaissance induit une maturation des cellules avec notamment l'expression de récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité de type I et de type II (CMH I et CMH II) et les molécules CD1 qui sont structurellement proches des molécules de classe I du CMH mais ont la caractéristique de présenter des lipides et des glycolipides (Vartabedian *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que cette fonction de présentation d'antigènes est activée par la sécrétion de cytokines, comme l'IL-12 qui stimulent la production de récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) (Grohmann *et al.*, 1998). Dans les 4 à 6 semaines suivant la primo-infection, les DC migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, les ganglions et la rate, et présentent les antigènes aux lymphocytes T naïfs (LT) (Cooper, 2009) (Figure 7). Il est à noter que les macrophages possèdent aussi une fonction de cellule présentatrice d'antigènes. Cela conduit à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative qui, dans le cadre de la tuberculose, est essentiellement une réponse à médiation cellulaire.

Cette présentation par les DC et les macrophages conduit à la différenciation des LT naïfs en LT CD4⁺ appelés LT auxiliaires et des LT CD8⁺ appelés cytotoxiques, pour participer à la formation du granulome (Boom *et al.*, 2003) (Figure 7). Les LT CD4⁺ sont les acteurs majeurs du contrôle de la tuberculose. Ils interviennent dans la coordination de la réponse inflammatoire. On peut distinguer plusieurs sous-catégories de LT CD4⁺ participant à l'immunité antituberculeuse : les LT Th1 (Lymphocytes T helper 1) secrètent de l'IFN- γ et du TNF- α (Raphael *et al.*, 2015), des cytokines pro-inflammatoires qui stimulent les fonctions bactéricides des macrophages (Flesch and Kaufmann, 1990) ; les LT Th17 sont également des cellules pro-inflammatoires qui secrètent de l'IL-17 jouant un rôle dans la formation et le maintien du granulome (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010) ; enfin les LT régulateurs ont une fonction anti-inflammatoire, plus particulièrement dans la résolution de l'inflammation pour éviter un endommagement des tissus, mais dont la présence serait délétère pour le contrôle

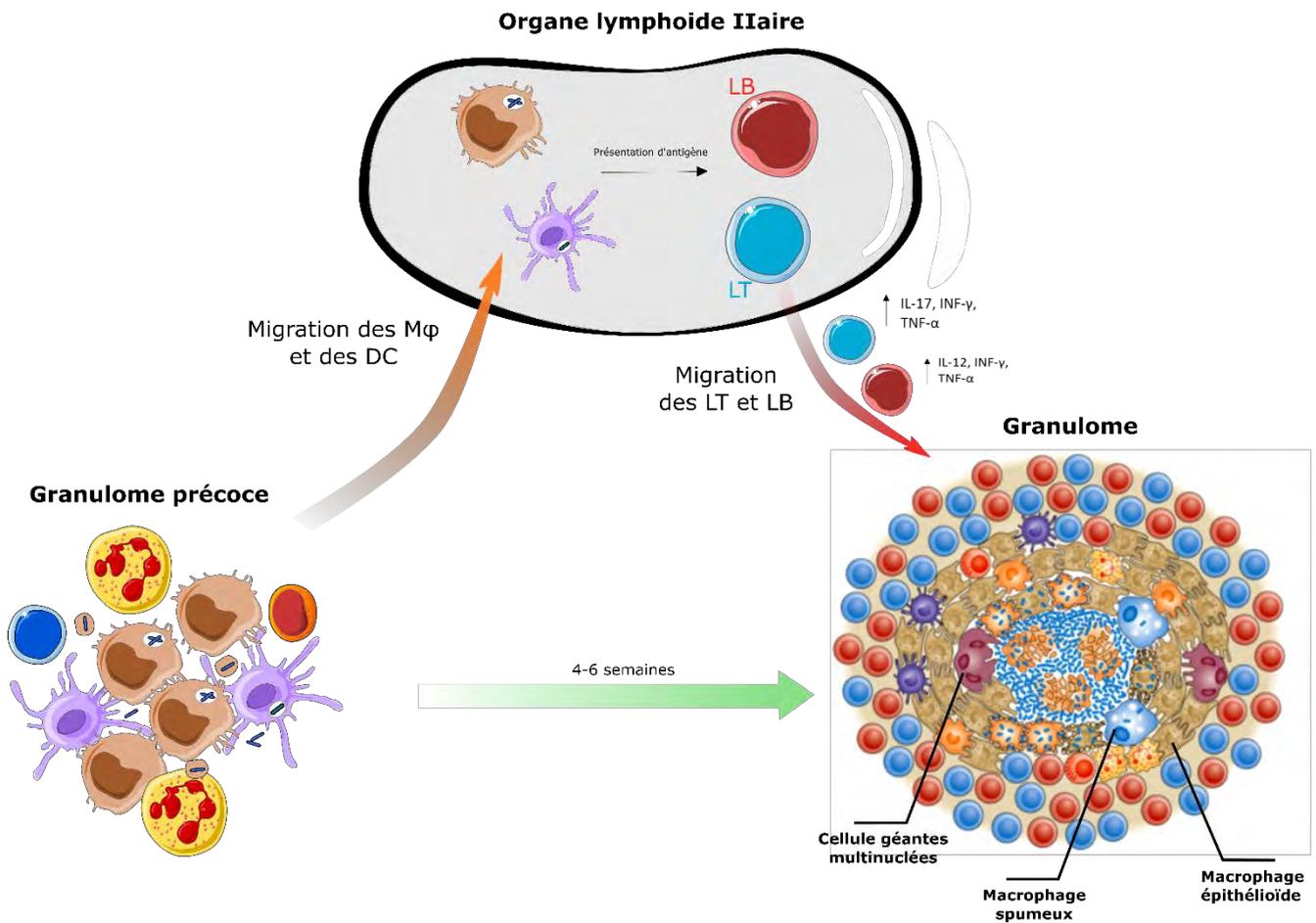


Figure 7: Activation de la réponse adaptative et formation du granulome

La formation du granulome passe d'abord par le recrutement des cellules de l'immunité adaptative, dont les lymphocytes T (LT) et B (LB). Cela se fait via la migration des macrophages (Mφ) et des cellules dendritiques (DC) dans les organes lymphoïdes secondaires, et qui utilisent leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes. Les LB et LT réactifs migrent par la suite au niveau du site infectieux, et sécrète des cytokines pro-inflammatoires participant à la formation et à l'organisation du granulome.

de l'infection (Kursar *et al.*, 2007). Le rôle des lymphocytes B est décrit comme étant plus ténu dans le contrôle de l'infection (Rao *et al.*, 2015). Leur fonction première est de produire des anticorps. La production d'anticorps anti-mycobactériens permettrait une meilleure élimination des bacilles après leur internalisation (Guilliams *et al.*, 2014, Maglione *et al.*, 2008). Néanmoins, ils sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, de l'INF- γ et du TNF- α , stimulant ainsi la réponse lymphocytaire Th1 (Chan *et al.*, 2014). Plus récemment, il a été montré que les lymphocytes B produisent les interférons de type I, et contribuent à une réduction de la réponse inflammatoire dans la tuberculose (Bénard *et al.*, 2018). Ils joueraient donc un rôle à la fois protecteur et potentiellement délétère pour l'hôte.

Chez les personnes immunocompétentes l'infection sera contenue dans des granulomes petits et compacts (Figure 7) contenant en leur centre des macrophages, des cellules épithélioïdes, des macrophages différenciés en cellules géantes multinuclées et des macrophages spumeux (chargés de vacuoles lipidiques) (Figure 7). D'autres cellules sont présentes comme les neutrophiles, des cellules dendritiques, des cellules NK et en périphérie une couronne de lymphocytes CD4+ et CD8+ et de fibroblastes qui forment une sorte de capsule (Ramakrishnan, 2012). Dans le cas d'une tuberculose active, le centre du granulome se nécrose suite à la lyse des macrophages infectés et les bactéries sont libérées dans un environnement favorable à leur croissance. Au fil du temps, les granulomes peuvent évoluer de différentes façons entraînant la formation de lésions structurellement hétérogènes, notamment des lésions tuberculeuses, cavitaires, fibro-calcifiées et nécrotiques. Puis les lésions nécrotiques caséifiées du granulome se liquéfient et des milliers de bacilles infectieux sont déversés dans les voies respiratoires. Le rôle du granulome n'est toujours pas très clair. Il semble jouer un rôle dans le confinement de *M. tuberculosis* mais il est aussi associé à des lésions tissulaires. Est-il bénéfique pour l'hôte ou pour la bactérie ? Probablement les deux à la fois suivant le stade de la maladie (Barry *et al.*, 2009).

En conclusion, la bactérie persiste tout au long de l'infection et cela en dépit d'une réponse immunitaire soutenue et de longue durée. Cela résulte en fait d'un équilibre entre la réponse immunitaire de l'hôte et les mécanismes de défenses mis en place par *M. tuberculosis*, qui est capable de manipuler la réponse de l'hôte à son avantage. Les macrophages, qui sont les cellules les plus abondantes du granulome, jouent un rôle central dans cet équilibre à la fois dans la mise en place de la réponse immunitaire, comme nous venons de le voir, mais ils sont aussi le siège de la multiplication et de la dissémination de *M. tuberculosis*. Pour cela le bacille a développé de nombreuses stratégies d'adaptation lui permettant de transformer cette cellule classiquement dédiée à la défense de l'hôte en une niche favorable à sa survie. Bien comprendre ces phénomènes et le dialogue entre la bactérie et le macrophage est

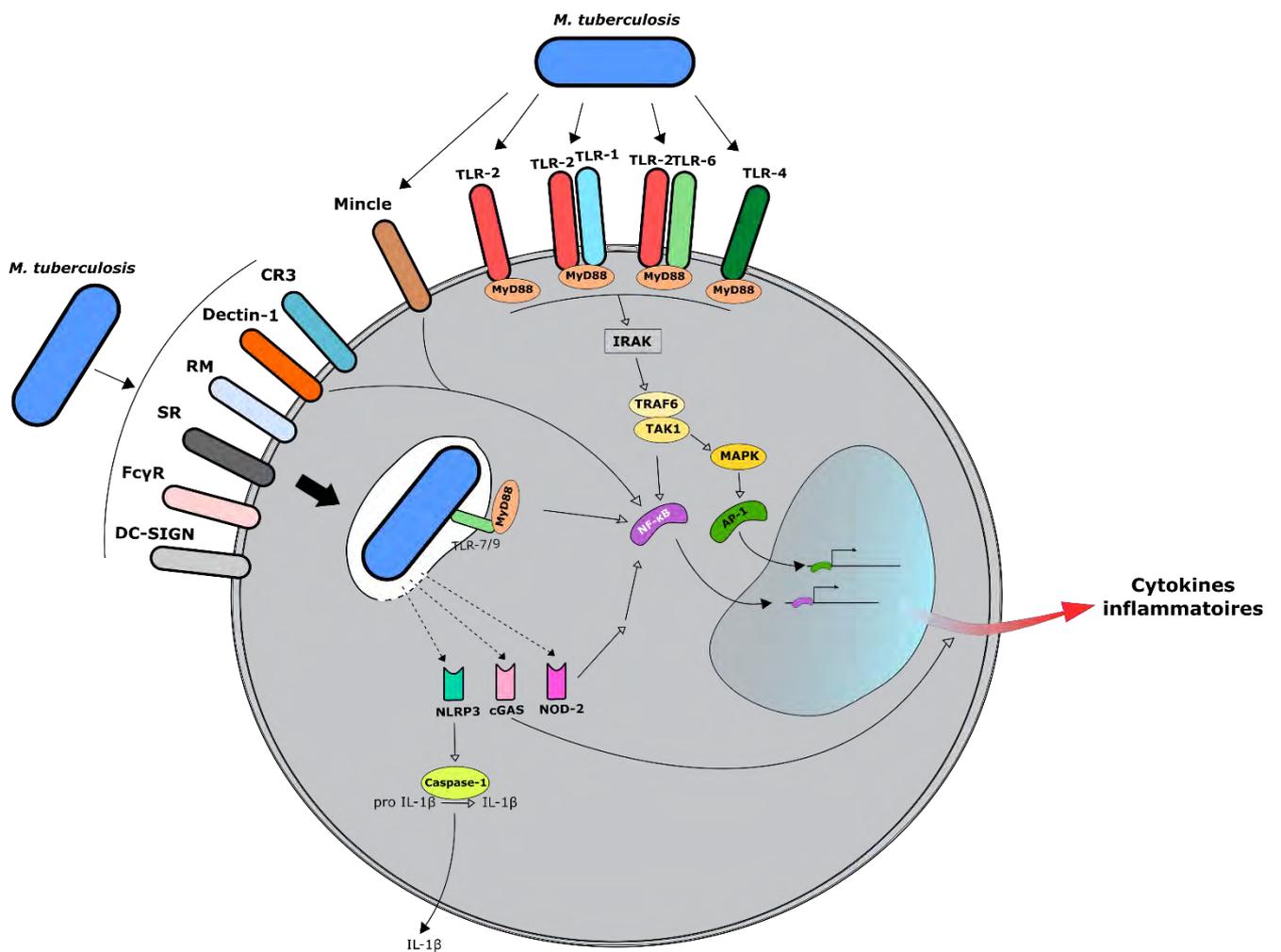


Figure 8: Reconnaissance de *M. tuberculosis* par les PRR et initiation de la réponse inflammatoire et de la phagocytose dans le macrophage (Adapté de (Hossain and Norazmi, 2013)).

donc crucial dans la compréhension de la pathogénèse et à plus long terme dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques, notamment les thérapies dirigées contre l'hôte.

2) Interaction avec le macrophage : Acteur central dans la réponse immunitaire et dans le devenir de *M. tuberculosis*

Les macrophages jouent un rôle clé dans le développement de l'infection et dans l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire. Lors du premier contact entre le bacille et le macrophage, un dialogue complexe se met en place qui va conditionner la survie de la bactérie au sein du macrophage.

*a. Reconnaissance de *M. tuberculosis* et récepteurs de l'immunité innée*

La première étape de l'interaction entre le macrophage et *M. tuberculosis* commence par la reconnaissance des PAMP, par les récepteurs de l'immunité innée, les PRR, qui déclenchent une cascade de signalisation conduisant à la mise en place d'une réponse inflammatoire et à l'internalisation de la bactérie. Le macrophage exprime plusieurs familles de PRR capables de reconnaître différents PAMP de *M. tuberculosis*, essentiellement des composés de l'enveloppe mais aussi de l'ADN, et qui conditionnent le recrutement des acteurs de la réponse immunitaire adaptative. Certains récepteurs sont membranaires comme les Récepteurs Toll-Like (TLR), les récepteurs aux lectines de type C (CLR) et les récepteurs scavengers (SR). D'autres sont cytosoliques comme les récepteurs NOD-like (NLR) (Mishra *et al.*, 2017) (Figure 8).

- Reconnaissance et réponse inflammatoire

Les TLR jouent un rôle important dans l'activation de la réponse inflammatoire à l'infection à *M. tuberculosis*. A ce jour, neuf isoformes de TLR ont été décrites chez l'homme mais seules les isoformes TLR-1, 2, 4, 6, 7 et 9 ont été décrites dans la reconnaissance de *M. tuberculosis*. Ces récepteurs lient un certain nombre de lipoprotéines ainsi que des glycolipides de surface (Mishra *et al.*, 2017) (Tableau 2). Par exemple, le TLR-2 reconnaît des lipoprotéines et des glycolipides de surface comme les phosphatidylinositol mannosides (PIM) et des dérivés et les sulfolipides (SL). Cette reconnaissance peut se faire en couple avec TLR-1 ou TLR-6 (Blanc *et al.*, 2017, Gilleron *et al.*, 2006). Les TLR-7 et 9 localisés à la membrane endosomale lient respectivement l'ADN simple brin et l'ADN CpG de *M. tuberculosis*. Après liaison des TLR avec leurs ligands, les récepteurs déclenchent une

Tableau 1 : PRR impliqués dans la reconnaissance de *M. tuberculosis* et l'activation de la réponse immunitaire

PRR	Ligands, PAMP	Références
TLR2-TLR1/6	SL, LAM, PIM, lipoprotéines	Gilleron et al., 2003 Quesniaux et al., 2004 Bulut et al., 2001 Blanc et al., 2017
TLR4	PIM, HSP-65	Bulut et al., 2005 Abel et al., 2002
TLR7,9	ADN simple brin, ADN CpG	Bao et al., 2017 Ohto et al., 2015
cGAS	ADN double brin	Wasserman et al., 2015
NOD-2	Muramyl Di-Peptide	Pandey et al., 2009 Brooks et al., 2011
NLRP3	ESAT-6	Mishra et al., 2010
Dectin1	Non déterminé	Yadav et Schorey, 2006
Dectin2	ManLAM	Yonekawa et al., 2014
Mincle	TDM	Ishikawa et al., 2009
DC-SIGN	ManLAM	Maeda et al., 2002

cascade de signalisation qui implique la protéine MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) qui peut conduire soit à l'activation de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinases) et du facteur de transcription AP-1 (activating protein 1) ; ou à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Figure 8). Ces voies induisent l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires.

La classe des récepteurs CLR est aussi impliquée dans le déclenchement de cette réponse. Par exemple, le récepteur Mincle, couplé au récepteur au fragment constant des immunoglobulines Fc γ R, est impliqué dans la reconnaissance du glycolipide bactérien dimycolate de tréhalose (TDM), et participe à la stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoire par la voie NF- κ B (Schoenen *et al.*, 2010, Ishikawa *et al.*, 2009) (Figure 8). Le récepteur Dectin-1 est lui aussi impliqué dans cet évènement en coopération avec TLR2 mais son ligand mycobactérien n'est pas encore connu (Yadav and Schorey, 2006). Cependant, contrairement à la plupart des PRR cités ci-dessus, des CLR sont décrits comme ayant un fonction anti-inflammatoire. Le récepteur DC-SIGN (Dendritic Cells - Specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) et le récepteur au mannose (MR), qui reconnaissent le ManLAM, inhibent la production de cytokine pro-inflammatoire comme l'IL-12 et induisent la production d'IL-10 qui est une cytokine anti-inflammatoire (Geijtenbeek *et al.*, 2003, Nigou *et al.*, 2001, Pathak *et al.*, 2005).

Les PRR cytosoliques ou NLR participent à la reconnaissance des bactéries localisées dans le cytosol (Figure 8). Cette reconnaissance serait liée à la capacité de *M. tuberculosis* à endommager le phagosome et à s'en échapper. Parmi ces récepteurs, NOD2, cGas et NLRP3 sont les principaux décrits comme étant impliqués dans la réponse à *M. tuberculosis* (Tableau 1). Le récepteur NOD2 lie le muramyl di-peptide du peptidoglycane et induit la sécrétion de cytokines par la voie NF- κ B. Le récepteur NLRP3 quant à lui est un PRR impliqué dans l'activation de l'inflammasome. Il est activé par la protéine « Early Secreted Antigen Target 6kDa » (ESAT-6), ce qui induit l'activation de la caspase-1 et la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Mishra *et al.*, 2010). Enfin, le senseur cGAS est capable de reconnaître des molécules d'ADN bactérien et stimule la production d'Interferon- β .

- Reconnaissance de *M. tuberculosis* et phagocytose

La reconnaissance de *M. tuberculosis* par le macrophage via des PRR permet aussi à la bactérie d'accéder à sa niche écologique, le macrophage (Figure 8) (Schäfer *et al.*, 2009). Cette entrée peut être médiée par deux mécanismes différents, la pinocytose qui est une voie d'entrée non spécifique, et la phagocytose qui est dépendante de récepteurs membranaires.

L'internalisation d'un élément comme une bactérie par pinocytose ou plus précisément par macropinocytose est un phénomène non spécifique d'internalisation. Il est caractérisé par une invagination de la membrane suivie de la formation d'un endosome qui fusionne avec des compartiments microbicides, les lysosomes, assurant la destruction de la particule endocytée. Dans le cadre de l'infection par *M. tuberculosis*, la macropinocytose a été décrite comme un mécanisme utilisé par les macrophages activés à l'INF- γ lorsque les systèmes de phagocytose dépendante des récepteurs sont saturés (Bosedasgupta and Pieters, 2014). Cette voie d'entrée est décrite comme délétère pour la bactérie, mais reste considérée comme étant une voie d'entrée minoritaire.

Plus classiquement, l'internalisation des mycobactéries passe par la mise en jeu de récepteurs de phagocytose qui reconnaissent des PAMP spécifiques à la surface du bacille. Cette reconnaissance déclenche une cascade de signalisation qui conduit à une restructuration du cytosquelette d'actine et au remodelage de la membrane plasmique. Cela conduit à la formation soit de protrusions membranaires appelés pseudopodes qui englobent la particule, soit d'une invagination de la membrane plasmique selon la nature du récepteur mis en jeu (Caron and Hall, 1998). La bactérie se retrouve ensuite dans une vacuole appelée phagosome. La reconnaissance de la bactérie peut se faire de manière opsonique ou non-opsonique (Tableau 2). L'opsonisation de la bactérie correspond à un enrobage du bacille par des molécules du système immunitaire comme des protéines du complément ou des immunoglobulines. Ces molécules sont reconnues respectivement par les récepteurs au complément, citons notamment le récepteur au complément de type 3 (CR3), et le récepteur du fragment constant Fc γ des immunoglobulines (Fc γ R). Toutefois, il est décrit que la phagocytose par ce mode de reconnaissance favorise la fusion phagosome-lysosome qui est délétère pour la survie de la bactérie au sein du macrophage (Aderem and Underhill, 1999, Hmama *et al.*, 2015).

La phagocytose non-opsonique de *M. tuberculosis* fait intervenir d'autres classes de récepteurs (Figure 8). Il s'agit en majorité de récepteurs CLR membranaires qui reconnaissent des ligands glycosylés mycobactériens (Zheng *et al.*, 2017). L'un des plus connus est le récepteur au mannose (RM, CD206) qui est exprimé majoritairement dans les macrophages alvéolaires et les macrophages dérivés de monocytes. Le RM reconnaît des motifs sucrés de type mannose et fucose sur des glycolipides comme les ManLAM et PIM présents à la surface de *M. tuberculosis* (Torrelles *et al.*, 2006). L'engagement du récepteur par *M. tuberculosis* conduit à l'internalisation du bacille (Schlesinger, 1993) en partenariat avec le récepteur Fc γ R et limite la fusion du phagosome avec des compartiment bactéricides (Kang *et al.*, 2005, Rajaram *et al.*, 2017). Le récepteur DC-SIGN est surtout exprimée par les cellules dendritiques. Il est impliqué dans l'adhésion et la migration de ces cellules et dans

Tableau 2 : Récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose de *M. tuberculosis*

PRR	Ligands, PAMP	Type de phagocytose	Références
FcγR	Fragment constant des Immunoglobulines	Opsonique	Armstrong and D'arcy Hart., 1974
CR3	C3b	Opsonique	Schlesinger et al., 1990
	LAM/PIM	Non-opsonique	Velasco-Velasquez et al., 2003
RM	LAM	Non-opsonique	Torrelles et al., 2006
Dectin-1	?	Non-opsonique	Yadav et schorey, 2006
DC-SIGN	ManLAM	Non-opsonique	Maeda et al., 2002
SR	TDM	Non-opsonique	Bowdish et al., 2009

présentation antigénique aux cellules T (Geijtenbeek *et al.*, 2000a, Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Le DC-SIGN est aussi retrouvé à la surface de macrophages alvéolaires de patients tuberculeux (Tailleux *et al.*, 2005) ce qui suggère qu'il est aussi une voie d'entrée de *M. tuberculosis* dans les macrophages. Il reconnaît aussi des glycolipides mycobactériens dont le ManLAM et le PIM et la liaison du ManLAM augmente l'efficacité d'internalisation de *M. tuberculosis* dans les cellules dendritiques (Maeda *et al.*, 2003, Tailleux *et al.*, 2005, Torrelles *et al.*, 2006). Enfin, le récepteur Dectin-1 lie les glucanes en bêta-1,3 et beta-1,6. Bien que ces motifs n'aient pas été identifiés dans les mycobactéries, des études *in vitro* montrent que le récepteur Dectin-1 reconnaît des mycobactéries et induise en collaboration avec le TLR-2 une sécrétion de cytokines et la phagocytose des mycobactéries (Reid *et al.*, 2009).

Outre les récepteurs CLR décrits ci-dessus, la phagocytose non opsonique des mycobactéries peut nécessiter l'engagement du récepteur au complément de type 3 (CR3), également appelé CD11b/CD18 ou MAC-1, qui est un récepteur de phagocytose professionnel (Dustin, 2016). C'est un récepteur de surface hétérodimérique qui appartient à la superfamille des intégrines, et qui se compose d'une chaîne α_M (CD11b) et β_2 (CD18). Il est exprimé en particulier dans les neutrophiles, les monocytes et les macrophages alvéolaires. Il est engagé dans la phagocytose non opsonique qui met en jeu le domaine de type lectine C du récepteur. Ce domaine lie des motifs de type du β -glucane, du mannose, glucose et N-acétyl-D-glucosamine (Thornton *et al.*, 1996). Il reconnaît aussi des oligosaccharides mycobactériens comme le LAM et le PIM (Velasco-Velázquez *et al.*, 2003, Villeneuve *et al.*, 2005). Des travaux menés sur des macrophages isolés de souris CR3-déficientes montrent que le CR3 joue un rôle dans la phagocytose de *M. tuberculosis* en conditions non opsoniques (Rooyakkers and Stokes, 2005). De plus, une étude comparative des mycobactéries pathogènes et non pathogènes indique que seules les mycobactéries pathogènes infectent efficacement des cellules CHO (chinese hamster ovary) non phagocytaires transfectées avec le CR3, via une reconnaissance de son domaine C-lectine (Cywes *et al.*, 1996, Cywes *et al.*, 1997). Par ailleurs, la phagocytose des mycobactéries par CR3 n'induit pas la destruction de la bactérie (Velasco-Velázquez *et al.*, 2003) ce qui suggère que le CR3 représente une voie d'entrée non microbicides pour les mycobactéries. Il est important de noter que la coopération du CR3 avec des PRR comme le TLR-2 semble être importante pour la reconnaissance et l'entrée des mycobactéries dans les phagocytes (Sendide *et al.*, 2005).

Enfin, la phagocytose de la bactérie peut s'effectuer après reconnaissance par les récepteurs scavengers. Par exemple, le récepteur MARCO est capable de reconnaître le glycolipide TDM (Bowdish *et al.*, 2009). Néanmoins leur rôle dans la phagocytose de *M.*

tuberculosis et dans le contrôle de l'infection *in vivo* semble ténu et encore discuté (Court *et al.*, 2010).

b. Les mécanismes de survie au sein du phagosome

La phagocytose conduit au cloisonnement de l'agent infectieux dans une vacuole de phagocytose ou phagosome qui débute par un processus de maturation le long de la voie d'endocytose pour mettre progressivement en place les conditions favorables à l'élimination de l'agent infectieux (Figure 9). Cette maturation passe par des fusions successives du phagosome avec les compartiments d'endocytose puis avec des lysosomes. Les échanges entre le phagosome et ces différents compartiments aboutissent à une acidification de la vacuole, un enrichissement en enzymes protéolytiques, en molécules bactéricides et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) et de l'azote (Nitrogen oxide Species, NOS) et d'ions métalliques toxiques (Uribe-Querol and Rosales, 2017).

La maturation phagosomale est finement régulée (Figure 9). Dans les phases précoces, le phagosome acquiert la protéine G Rab5 et la PI3 kinase VSP34 qui régulent la fusion avec les endosomes précoces (Figure 9). Cela permet le recrutement ensuite de l'antigène endosomal précoce EEA-1 qui permet la fusion du phagosome avec des endosomes tardifs (Figure 9). Par la suite, le phagosome perd Rab5 et acquiert la protéine G Rab7 qui régule la fusion du phagosome avec les lysosomes via le recrutement de plusieurs facteurs comme LAMP-1, et RILP, ce qui conduit à la formation du phagolysosome. Ce dernier s'enrichit en enzymes protéolytiques et hydrolases qui servent à dégrader le pathogène (Figure 9). Tout au long de la maturation, le phagosome accumule aussi les pompes à protons de classe V (H^+ V-ATPase) qui régulent le pH des lysosomes, et qui acidifient progressivement la lumière phagosomale (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994, Yates *et al.*, 2005) pour atteindre un pH d'environ 4,5 (Figure 9). Cette acidité est essentielle pour permettre la formation d'espèces réactives oxygénées et pour l'activité des enzymes protéolytiques comme la cathepsine D (Vieira *et al.*, 2002). L'acidification est couplée à la production de ROS et de NOS, assurée respectivement par le complexe NADPH oxydase (NOX-2) (Panday *et al.*, 2014) et de la NO synthase inductible (iNOS) (Bogdan *et al.*, 2000). Ce stress oxydatif s'accompagne aussi par l'accumulation d'ion métalliques Zn^{2+} et Cu^{2+} toxiques et d'une déplétion en fer, essentiel pour la viabilité des bactéries (Neyrolles *et al.*, 2015). Finalement la présence de tous ces composés microbicides génère un environnement toxique pour les bactéries et permet ainsi aux macrophages de détruire les agents infectieux.

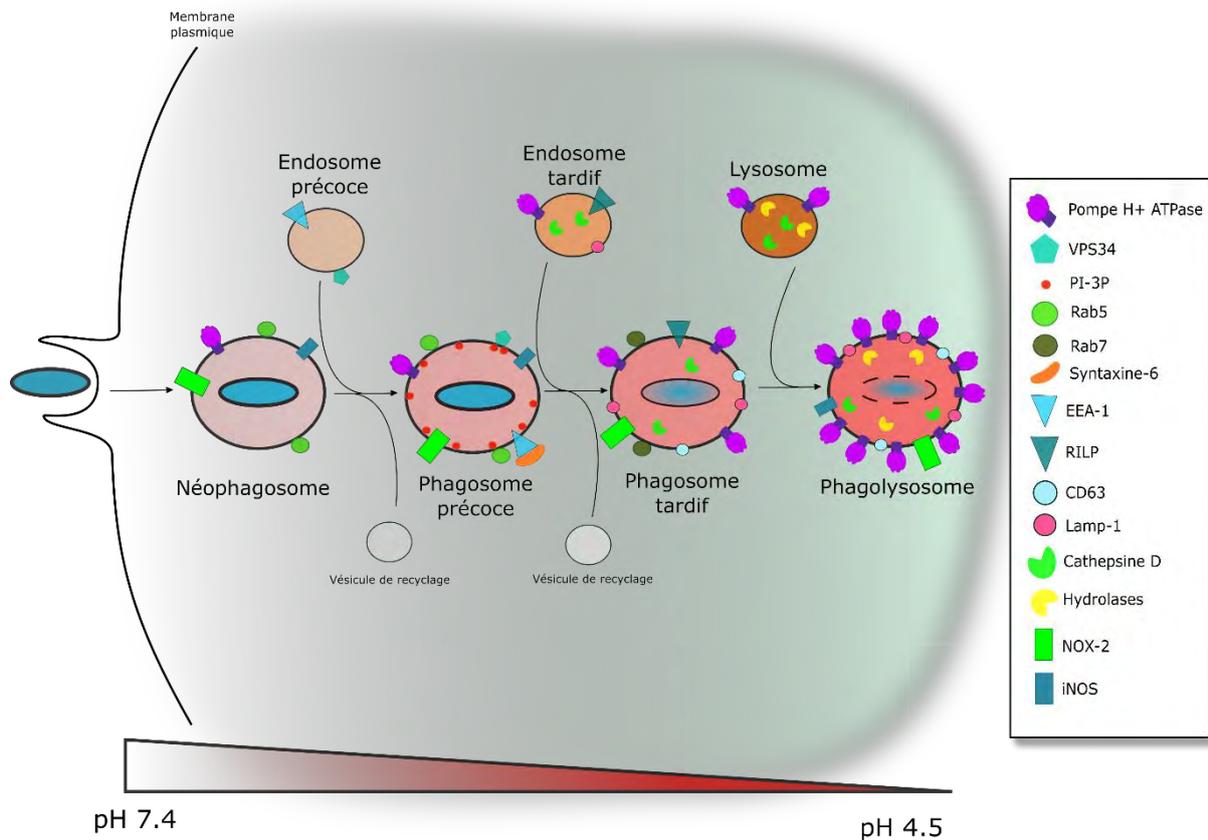


Figure 9 : Schéma représentatif de la maturation phagosomale après internalisation d'un agent étranger. Adapté de Uribe-Querol et Rosales, 2017.

Après l'internalisation d'un agent étranger, le phagosome formé va subir une maturation menant à la destruction de l'agent. Dans un premier temps, le phagosome fusionne avec les endosomes précoces et acquiert la petite GTPase Rab5 qui induit la fusion avec des endosomes précoces (Bucci et al., 1992). A ce stade, le phagosome précoce est encore peu acide avec un pH 6-6.5. Rab5 recrute la kinase Vps34 (phosphatidylinositol-3 Kinase vacuolaire de classe III tri-protéine 34) (Vieira et al., 2001). L'activité de la Vps34 et d'autres molécules entraîne l'accumulation de phosphatidylinositol-3 phosphate (PI3P) à la membrane phagosomale, processus essentiel à la progression de la maturation des phagosomes (Jeschke and Haas, 2016). Le PI3P intervient dans le recrutement de l'antigène endosomal précoce 1 (EEA1) à la membrane du phagosome, qui permet la fusion avec les endosomes (Gaullier et al., 2000). Progressivement le phagosome perd Rab5 et acquiert la petite GTPase Rab7 qui favorise la fusion des phagosomes avec les endosomes tardifs et finalement avec les lysosomes. Rab7 permet ensuite le recrutement de protéines effectrices comme RILP (Rab7-interacting lysosomal protein), entraînant la fusion du phagosome tardif avec les lysosomes pour former le phagolysosome (Harrison et al., 2003). Le phagosome tardif acquiert des marqueurs comme les protéines membranaires LAMP-1 qui facilitent sa fusion avec les lysosomes qui contiennent certaines hydrolases comme la cathepsine D (Huynh et al., 2007). Tout au long de sa maturation, le phagosome s'acidifie grâce à l'accumulation de la pompe H^+ V-ATPase à la membrane, pour atteindre un pH de 4,5.

Le pouvoir pathogène de *M. tuberculosis* est multiple, mais il repose en partie sur sa capacité à interférer avec la maturation de son phagosome pour prévenir la formation d'un phagolysosome (Figure 10) (Malik *et al.*, 2000, Russell, 2011, Vergne *et al.*, 2004). Différents effecteurs bactériens sont capables de détourner les voies de signalisation de cette maturation, en affectant le recrutement et la fonction des petites GTPases Rabs, de leurs effecteurs (phosphatidylinositol 3-kinases et EEA1), des protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors) comme la Syntaxin 6, et la signalisation Coronine-1–calcineurine (Fratti *et al.*, 2003, Jayachandran *et al.*, 2007, Uribe-Querol and Rosales, 2017). Par exemple, *M. tuberculosis* produit une nucléoside diphosphate kinase (Ndk) qui inactive Rab5 et empêche le recrutement de EEA1 à la membrane (Sun *et al.*, 2010). La lipoprotéine LprG peut se lier directement aux protéines membranaires associées aux lysosomes (LAMP) pour moduler la machinerie du trafic intracellulaire et favoriser la réplication de *M. bovis* (Vazquez *et al.*, 2017). En outre, la phosphatase acide sécrétoire (SapM) se lie directement à Rab7 (Hu *et al.*, 2015) et peut bloquer les effets de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) présente sur les phagosomes (Vergne *et al.*, 2005). La fusion du phagosome avec les lysosomes peut être inhibée par le recrutement et le maintien de la coronine-1 (ou TACO) à la membrane du phagosome (Jayachandran *et al.*, 2007) (Figure 10). Cette protéine permet d'activer la calmoduline dépendante du Ca²⁺ qui inhibe la fusion des lysosomes avec le phagosome. Les facteurs bactériens responsables du maintien de la coronine-1 à la membrane phagosomale, ainsi que le mécanisme d'action de la calmoduline sont encore inconnus. Enfin, un certain nombre de composés lipidiques de l'enveloppe mycobactérienne sont également impliqués dans l'inhibition de la maturation du phagosome. Ces lipides et leur rôle seront décrits plus tard dans ce manuscrit.

Au sein de son phagosome, *M. tuberculosis* est aussi capable de résister au stress oxydatif et de pH. Elle inhibe par exemple l'adressage de la nitric oxide synthase inductible (iNOS) à la membrane phagosomale, prévenant ainsi la production d'espèces nitrées toxiques (Miller *et al.*, 2004) (Figure 9). *M. tuberculosis* produit aussi différentes enzymes, comme des superoxyde dismutases, sodA et sodC qui transforment l'anion superoxyde O₂ en peroxyde d'hydrogène H₂O₂, et la catalase-peroxydase KatG qui permet la décomposition de H₂O₂ en H₂O et O₂ (Ehrt and Schnappinger, 2009). Le contrôle du pH est décisif pour la survie du bacille. En conséquence, la H⁺ V-ATPase est une cible majeure de *M. tuberculosis*. Des travaux ont montré que *M. tuberculosis* prévient l'adressage de la pompe à la membrane du phagosome (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Le bacille sécrète une protéine tyrosine phosphatase, PtpA, qui est capable de se lier à la H⁺ V-ATPase *in vitro* et dans des macrophages, et de favoriser l'exclusion de la pompe, prévenant ainsi l'acidification du

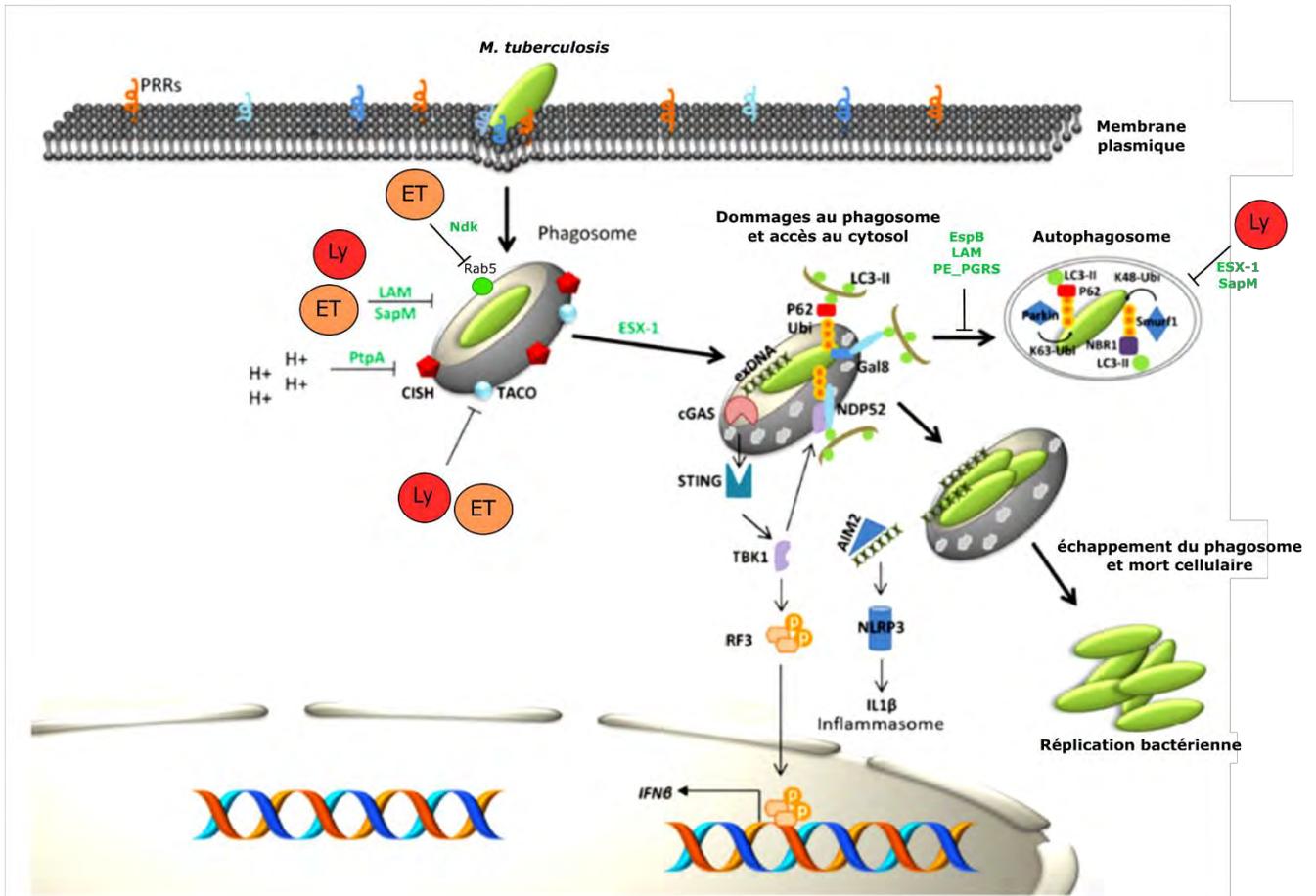


Figure 10 : Schéma représentatif des mécanismes de survie de *M. tuberculosis* dans le phagosome et de son échappement (adapté de Queval et al., 2017)

Après la phagocytose, *M. tuberculosis* est capable d'inhiber la maturation phagosomale et d'empêcher la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs (ET) et les lysosomes (Ly), par l'expression ou la sécrétion de facteurs comme le LAM, SapM, PtpA, et Ndk, ou en manipulant la signalisation dépendante de TACO ou CISH. La bactérie est ensuite capable d'induire la rupture du phagosome grâce au système de sécrétion ESX-1. Cette rupture conduit à l'activation de l'autophagie via l'activation de récepteurs cytosoliques comme cGAS, ou par l'ubiquitination de la bactérie. *M. tuberculosis* peut inhiber la réponse autophagique avec la production ou la sécrétion de facteurs comme ESX-1, LAM, PE-PGRS, et SapM, et peut ensuite s'échapper du phagosome, se multiplier dans le cytosol et induire la mort du macrophage infecté.

phagosome (Wong *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été montré que *M. tuberculosis* réprime l'acidification du phagosome en induisant la dégradation de la H⁺ V-ATPase (Queval *et al.*, 2017) (Figure 10). Le mécanisme n'est pas connu, mais les auteurs proposent que *M. tuberculosis* induit l'expression d'une protéine qui régule négativement la réponse cytokinique appelée CISH (Cytokin-Inducible SH2-containing protein). Elle favorise l'ubiquitination de la H⁺ V-ATPase qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Ainsi, face aux réponses microbicides du macrophage, *M. tuberculosis* possède un arsenal de molécules lui permettant de manipuler ses réponses et de résister à l'environnement hostile du phagosome.

Une fois son maintien assuré, le bacille est capable de s'échapper de cet environnement en induisant notamment la rupture de la membrane du phagosome.

c. Rupture et échappement du phagosome

Certains pathogènes sont capables d'échapper à l'environnement hostile du phagosome en détruisant la membrane du phagosome pour atteindre le cytosol qui constitue un environnement nutritionnel plus favorable (Figure 10). C'est le cas par exemple de *Listeria monocytogenes*, de *Shigella Flexneri* ou encore de *Legionella pneumophila* qui utilisent un arsenal de protéines membranolytiques ou de phospholipases (Hybiske and Stephens, 2008, Molmeret *et al.*, 2004). *M. tuberculosis* a longtemps été considérée comme un pathogène intracellulaire exclusivement intraphagosomal. Pourtant, dès 1974 Armstrong et D'Arcy Hart déclaraient observer ponctuellement des bacilles tuberculeux dépourvus de membrane phagosomale (Armstrong and Hart, 1975). Au fil des ans, des preuves ont émergé suggérant que les mycobactéries s'échappent du phagosome vers le cytosol (McDonough *et al.*, 1993, Myrvik *et al.*, 1984, Stamm *et al.*, 2003). Cependant, l'échappement de *M. tuberculosis* est resté longtemps débattu jusqu'au début des années 2000, où l'avènement de la cryo-microscopie électronique et le maintien de l'intégrité des échantillons a permis de montrer pour la première fois qu'une petite proportion de *M. tuberculosis* est présente dans le cytosol de macrophages infectés (van der Wel *et al.*, 2007). Cet événement est dépendant du système de sécrétion de type VII ESX-1 (pour ESAT-6 secretion system 1 or (T7SS/ESX-1) (Figure 10) et il est observé que des marqueurs d'endosomes tardifs/lysosomes sont recrutés à la membrane du phagosome (van der Wel *et al.*, 2007), ce qui suggère que l'échappement du bacille est un processus postérieur à la formation du phagolysosome. Par la suite, Simeone et collaborateurs ont exploité les propriétés de la sonde fluorescente CCF-4 qui s'accumule dans le cytosol et émet un signal de FRET sensible à la présence de bêta-lactamases bactériennes pour démontrer que *M. tuberculosis* provoque la rupture du phagosome *ex vivo*, et *in vivo* après transfert adoptif de macrophages (Simeone *et al.*, 2012,

Simeone *et al.*, 2015). Ces auteurs montrent aussi que la rupture requiert un blocage initial de l'acidification du phagosome (Simeone *et al.*, 2015). Depuis lors, différents laboratoires ont corroboré ces données en utilisant différentes techniques et modèles cellulaires (Houben *et al.*, 2012, Jamwal *et al.*, 2016, Welin *et al.*, 2011b). Le système ESX-1 joue un rôle primordial dans l'accès des mycobactéries au cytosol (Houben *et al.*, 2012, Simeone *et al.*, 2012, Simeone *et al.*, 2015, van der Wel *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme mis en jeu reste débattu. ESX-1 permet la sécrétion d'un des principaux facteurs de virulence de *M. tuberculosis* la protéine EsxA, aussi appelée ESAT-6 (pour 6kDa Early Secreted Antigenic Target). Les premiers travaux de Hsu et collaborateurs indiquaient que la protéine EsxA purifiée était effectivement capable de lyser des membranes (Hsu *et al.*, 2003). Ces travaux ont été confirmés par la suite par plusieurs études, mais le mécanisme d'action de lyse membranaire est encore peu connu (Peng and Sun, 2016). Malgré les études mentionnées ci-dessus, la capacité membranolytique d'ESAT-6 a récemment été remise en question par des travaux qui suggèrent que la protéine seule n'est pas suffisante pour lyser des membranes (Conrad *et al.*, 2017). En ce sens des travaux récents montrent que d'autres acteurs protéiques peuvent intervenir dans la rupture comme la phospholipase A2 cytosolique de l'hôte qui est recrutée au phagosome lors de l'infection et qui est capable de l'endommager (Jamwal *et al.*, 2016).

La rupture du phagosome favorise l'entrée et le contact de *M. tuberculosis* avec le cytosol. Cette étape est fondamentale dans la mise en place de l'immunité cytosolique, qui comprend des voies de détection des pathogènes cytosoliques ainsi que les réponses effectrices antimicrobiennes permettant de lutter contre ces pathogènes (Figure 10). Ainsi, l'ADN génomique de *M. tuberculosis* est détecté par l'enzyme cGAS (pour cyclic GMP-AMP synthase), qui catalyse la production du second messenger cyclic GAMP (cGAMP) à partir de l'ATP et du GTP et induit la production d'IFN de type I tel que IFN- β , qui sont considérés comme désavantageux pour l'hôte lors de l'infection par *M. tuberculosis* (Collins *et al.*, 2015, Wassermann *et al.*, 2015, Watson *et al.*, 2015) (Figure 10). Il est à noter que la liaison d'ADN de *M. tuberculosis* par cGAS, montrée *ex vivo* et *in vivo*, est dépendante du système de sécrétion ESX-1 (Wassermann *et al.*, 2015, Watson *et al.*, 2015). L'ADN cytosolique de *M. tuberculosis* peut être aussi détecté par le récepteur de l'inflammasome AIM2 (pour absent in melanoma 2), qui contribue à l'activation de l'axe NLRP3 et à la libération des cytokines pro-inflammatoires d'IL-1 β et d'IL-18 (Saiga *et al.*, 2012, Wassermann *et al.*, 2015). Enfin, la reconnaissance de l'ADN bactérien cytosolique par la voie dépendante de STING est nécessaire pour l'ubiquitinylation du bacille et son adressage à l'autophagosome (Collins *et al.*, 2015, Wassermann *et al.*, 2015, Watson *et al.*, 2015, Watson *et al.*, 2012) (Figure 10).

Les deux derniers points, contrairement au premier, pourraient être considérés comme plus bénéfiques pour l'hôte.

L'accès au cytosol de *M. tuberculosis* et sa reconnaissance par les récepteurs cytosoliques induit également la mise en place de l'autophagie.

d. L'autophagie lors de l'infection par *M. tuberculosis*

L'autophagie est un phénomène physiologique de maintenance et de recyclage des organites intracellulaire (Mizushima and Komatsu, 2011). Elle commence par la formation d'une structure à double membrane, qui suit une élongation avant de former complètement une vésicule appelée autophagosome (Figure 11). Ce dernier fusionne ensuite avec des lysosomes pour donner un autolysosome. Son contenu est dégradé et peut être recyclé.

L'implication de l'autophagie en tant que moyen de défense du macrophage contre les mycobactéries n'a été décrite que récemment. Les premiers travaux de Gutierrez et collaborateurs montraient qu'une induction exogène de l'autophagie est capable de restaurer la maturation du phagosome et de favoriser la mort des mycobactéries dans des macrophages infectés (Gutierrez *et al.*, 2004). Cette autophagie induite restaure la fusion autophagosome-lysosomes et génère aussi des peptides antimicrobiens issus de la dégradation de protéines, qui sont délivrés au bacille (Alonso *et al.*, 2007, Ponpuak *et al.*, 2010). Par la suite, il a été montré que l'infection par les mycobactéries peut déclencher une réponse autophagique des macrophages (Singh *et al.*, 2006). Cette réponse est associée en partie à l'ubiquitination de la bactérie, comme mentionné ci-dessus (Figure 10). D'autres mécanismes d'induction de l'autophagie au cours de l'infection par *M. tuberculosis* ont été proposés qui impliquent notamment la voie NF- κ B et l'expression du microRNA-155 (van der Vaart *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2013).

Cependant, plusieurs études révèlent que *M. tuberculosis* peut réguler négativement l'autophagie (Figure 10), et suggèrent que cette inhibition est importante pour la pathogénicité mycobactérienne et/ou la virulence. Les facteurs de virulence, ESX-1 et la phosphatase acide SapM sécrétée par *M. tuberculosis* bloquent le flux autophagique la fusion de l'autophagosome mycobactérien avec les lysosomes, respectivement en empêchant le recrutement de Rab7 ou en interagissant avec la protéine (Cardenal-Munoz *et al.*, 2017, Chandra *et al.*, 2015, Hu *et al.*, 2015). D'autres facteurs ont été décrits comme pouvant perturber le processus autophagique mais leur mécanisme d'action encore inconnu (Liang *et al.*, 2017). Par exemple, la protéine EspB également sécrétée par ESX-1 inhibe l'autophagie dans le macrophage (Huang and Bao, 2016) (Figure 10). Le glycolipide

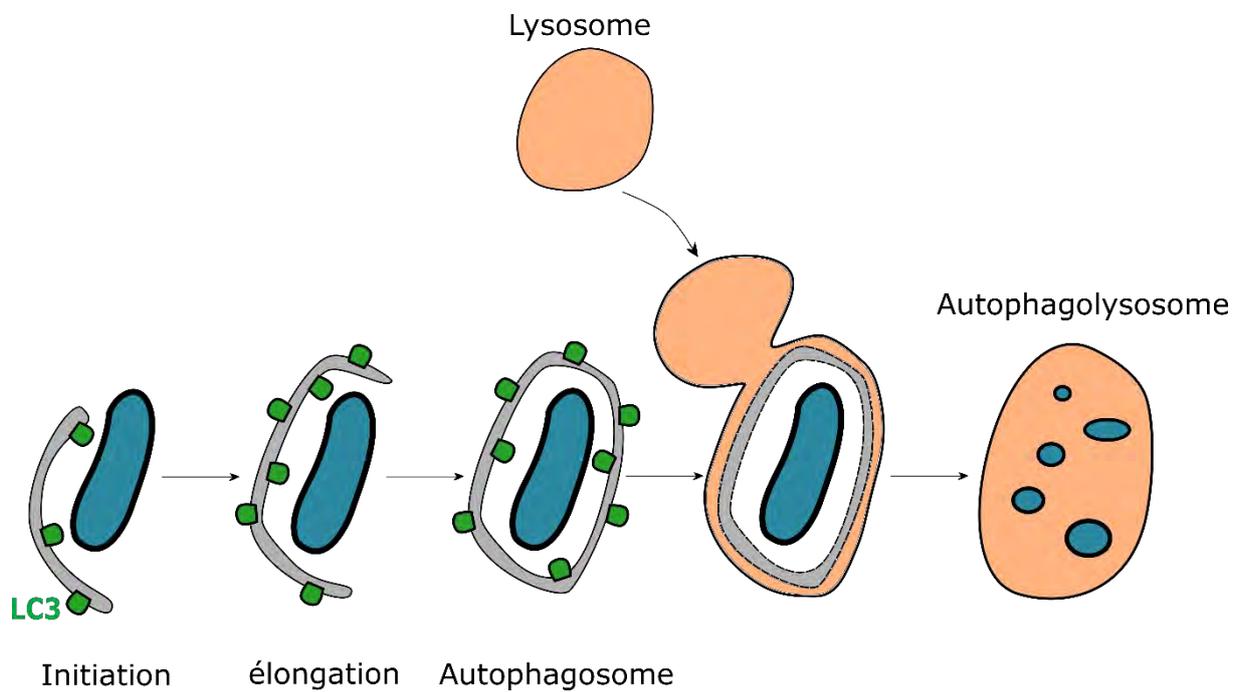


Figure 11 : Schéma simplifié du processus d'autophagie

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 (ou Atg8), molécule effectrice impliquée dans la formation de l'autophagosome

d'enveloppe de *M. tuberculosis*, ManLAM (pour mannosylated lipoarabinomannane) lorsqu'il est testé sous forme purifiée est aussi capable d'inhiber l'autophagie dans les macrophages (Shui *et al.*, 2011).

Finalement, l'accès des bactéries au cytosol est aussi déterminant pour la mise en place des réponses immunitaires spécifiques pour l'induction de la mort cellulaire qui permet aux mycobactéries de s'échapper du macrophage pour se propager aux cellules environnantes (Figure 10).

e. Régulation de la mort cellulaire du macrophage par *M. tuberculosis*

La mort cellulaire est un événement primordial dans la réponse immunitaire innée anti-infectieuse. Son objectif premier est d'éliminer le réservoir cellulaire de l'infection. Cependant, le type de mort cellulaire et sa dynamique de mise en place jouent un rôle important dans le devenir de l'agent infectieux. L'impact de *M. tuberculosis* sur la mort cellulaire induite lors de l'infection par les macrophages est très discuté (Amaral *et al.*, 2016). Différents types de mort cellulaire ont été identifiés à ce jour, qui se distinguent en particulier par la morphologie de la cellule en train de mourir (Galluzzi *et al.*, 2018). Dans l'ensemble, il est possible de distinguer deux grands types de mort cellulaire ; l'apoptose et la nécrose. L'apoptose est un type de mort cellulaire physiologique dite « programmée » car elle est induite par la cellule en réponse à un signal extracellulaire, comme des traitements chimiques et irradiant, ou à un signal intracellulaire comme une cassure de l'ADN ou l'accumulation de protéines mal conformées et agrégées. D'un point de vue morphologique, l'intégrité de la membrane plasmique et la structure des organelles cellulaires sont maintenues au cours des premières phases de l'apoptose. La cellule se contracte avec une condensation du noyau et une agrégation de la chromatine. Puis le noyau se fragmente et des vésicules appelées « corps apoptotiques » se forment. Les cellules envoient des signaux de type « trouve moi » chargés de recruter des phagocytes qui vont percevoir les signaux « mange-moi » pour phagocyter les cellules mortes et les éliminer. On parle d'efferocytose qui signifie en latin « emmener à la tombe ». Si la cellule est prise en charge avant d'évoluer vers une nécrose secondaire, l'apoptose n'est pas un processus inflammatoire car il n'y a pas libération du contenu intracellulaire toxique, signe d'une inflammation. Contrairement à l'apoptose, la nécrose est une mort cellulaire classiquement non physiologique et pro-inflammatoire. Elle se traduit par une perte d'intégrité membranaire et une destruction cellulaire menant au relargage dans le milieu extracellulaire du contenu intracellulaire pro-inflammatoire comme les « Damage-Associated Molecular Pattern » (DAMP) et à l'induction de dommages tissulaires.

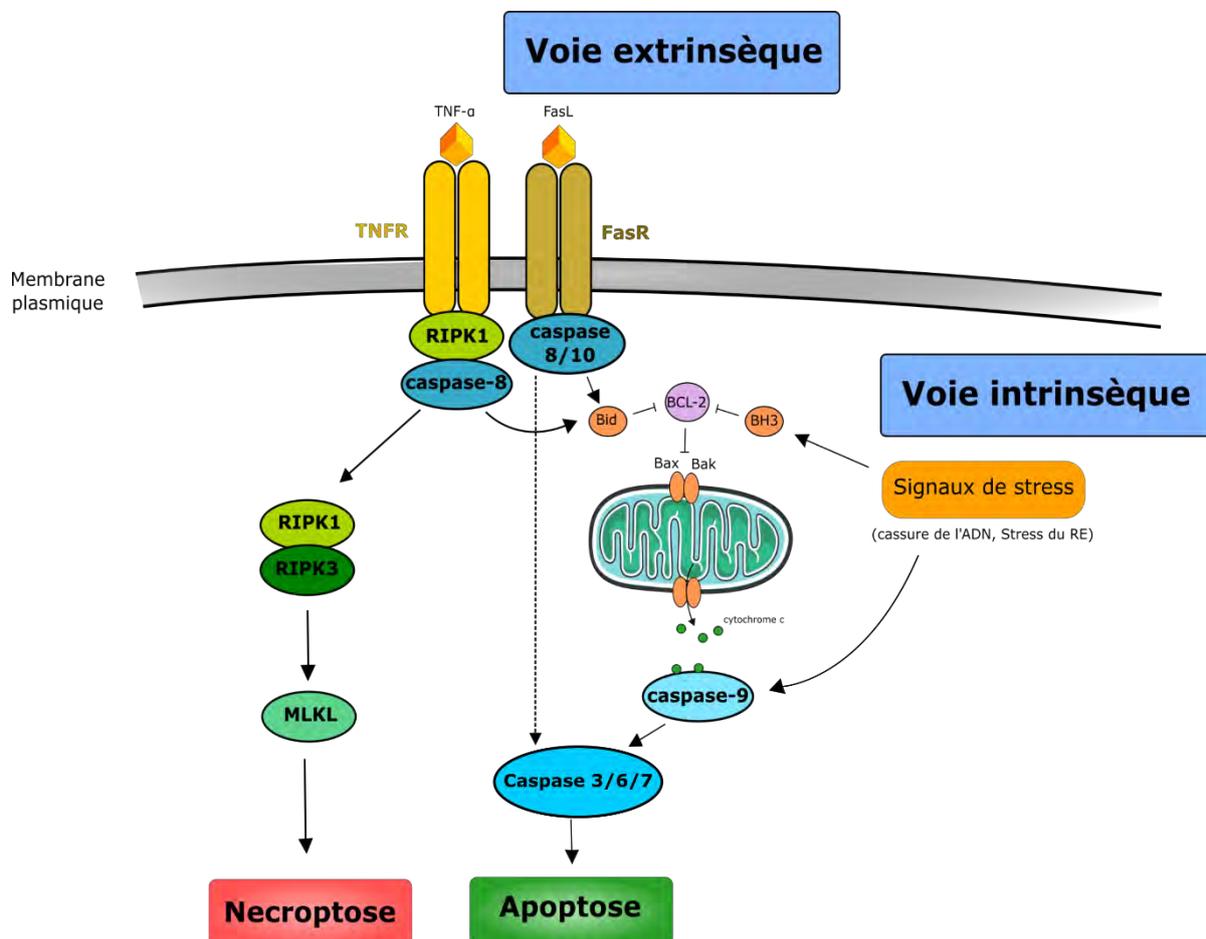


Figure 12: Les différentes voies de mort cellulaire programmée. Adapté de (Ashkenazi and Salvesen, 2014)

(A) Voies d'activation de l'apoptose et de la nécroptose. L'apoptose est déclenchée par un signal intrinsèque ou extrinsèque. La voie extrinsèque est activée après fixation de ligands aux récepteurs Fas ou au TNF- α (TNFR) conduisant à l'activation des caspases 8/10. Elles activent par la suite des protéines pro-apoptotiques, comme les protéines Bax et Bak qui induisent le relargage de cytochrome c. Celui-ci active la caspase 9 qui active les caspases effectrices 3 et 7. La voie intrinsèque est activée par des signaux de stress qui conduisent à l'activation de la voie caspase 9 – caspase 3.

L'activation de la caspase 8 peut induire l'activation de la voie RIP1-3/MLKL qui conduit à l'induction de la nécroptose.

Il était classiquement admis que l'apoptose est une mort « programmée » de la cellule alors que la nécrose ne l'est pas. Il apparaît maintenant que ces deux grands types de mort cellulaires sont finement régulés.

- L'apoptose

L'apoptose est régulée par une famille de protéases appelées caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving protease) qui peuvent être divisées en caspases initiateuses (Figure 13). Une fois activées, les caspases initiateuses activent à leur tour les caspases effectrices qui clivent au niveau de résidus aspartate différents effecteurs cellulaires (Thornberry and Lazebnik, 1998), aboutissant ainsi à la réponse apoptotique (Figure 12). Il est possible de distinguer trois grandes voies distinctes d'activation de l'apoptose, la voie extrinsèque récepteur-dépendante, la voie intrinsèque mitochondrie-dépendante et l'apoptose dépendante de couple perforine/granzyme. La première est activée via plusieurs récepteurs, comme le récepteur au TNF (TNFR) ou encore le récepteur Fas (FasR), qui reconnaissent leur ligand respectif, le TNF- α et le ligand Fas (FasL) (Figure 12). La liaison du ligand entraîne l'activation des caspase 8 ou 10, qui elles-mêmes activent les caspases effectrices 3, 6 et 7 (Shalini *et al.*, 2015). La voie intrinsèque est activée par divers signaux récepteurs indépendants et elle est régulée par la famille de protéines Bcl-2 comprenant des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (Figure 12). Parmi les signaux décrits, citons le stress du réticulum endoplasmique (RE) (Sano and Reed, 2013) ou encore une cassure de l'ADN qui activent alors des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Roos and Kaina, 2006). Ces effecteurs perméabilisent la membrane externe mitochondriale, libérant le cytochrome *c* dans le cytosol qui participe au clivage la pro-caspase 9 et à la formation de l'apoptosome, qui à son tour active la caspase 3 et initie l'apoptose (Figure 12). Enfin, le dernier mécanisme est celui impliquant les LT cytotoxiques et les cellules NK qui sont capables de déclencher l'apoptose de la cellule infectée (Sutton and Trapani, 2010). Ces cellules sécrètent successivement une perforine qui forme des pores à la membrane plasmique de la cellule cible, puis l'enzyme granzyme B qui emprunte les pores pour pénétrer dans la cellule cible et active la caspase 3 (Trapani and Sutton, 2003).

- La nécrose

Il existe des formes de nécrose programmées et régulées. La mise en jeu de PRR particulièrement les PRR cytotoxiques, déclenche une voie de signalisation dépendante de l'activation de la caspase-1 et de la caspase-11 qui conduit à une forme rapide et lytique de mort, appelée pyroptose (Shi *et al.*, 2017) (Figure 13). Les caspase-1 et caspase-11 coupent la gasdermine D, un membre de la famille des gasdermine, pour libérer son domaine N-

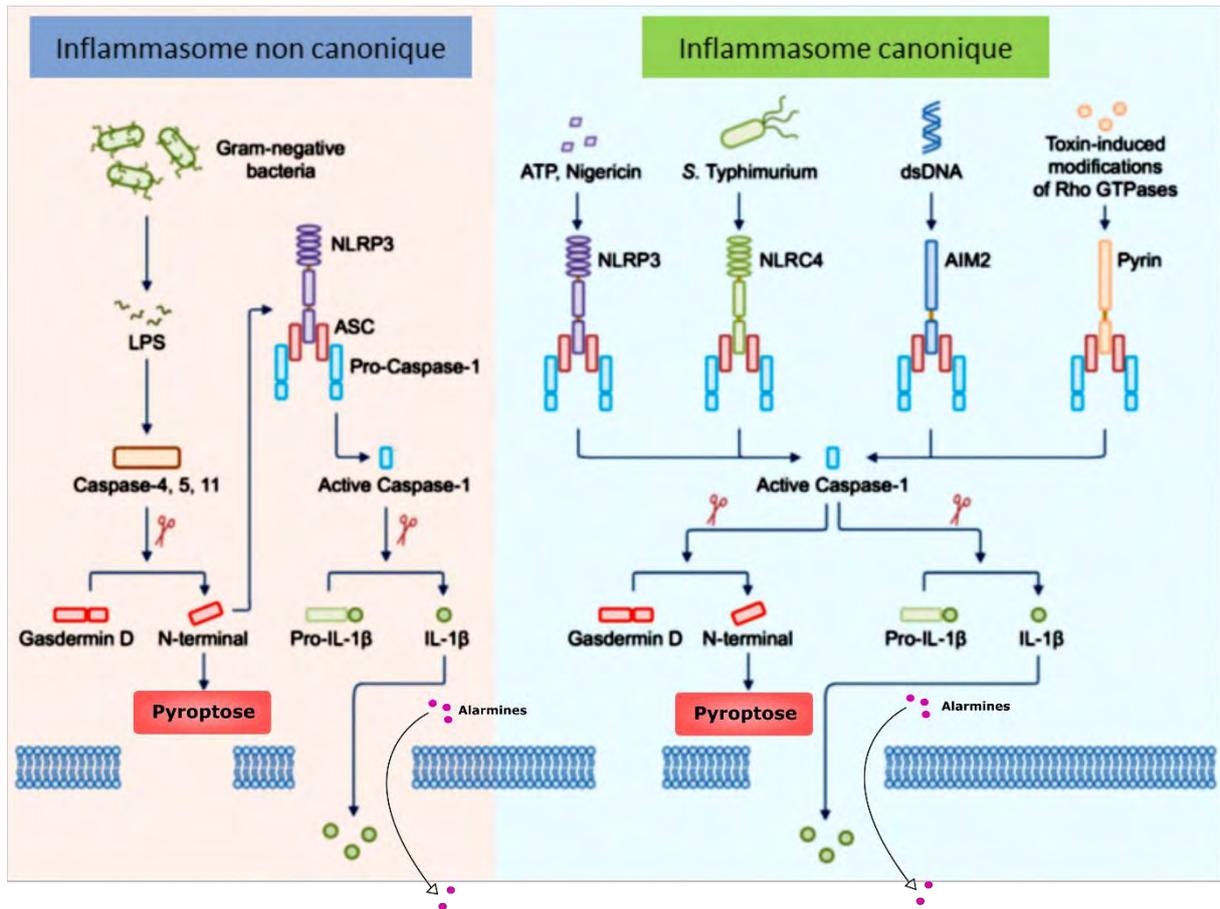


Figure 13 : Voies d'activation la pyroptose (adapté de (Man and Kanneganti, 2015)).

La présence de pathogènes ou de PAMP dans le cytosol va être détectée par les récepteurs cytosoliques de type NLR. Ils activent la caspase 1 qui clive la gasdermine D, dont la partie N-terminale va perméabiliser la membrane cellulaire, ce qui déclenche la pyroptose. La gasdermine D peut être clivée par les caspase 4/5/11 suite à leur activation par la fixation de LPS. La perméabilisation de la membrane permet le relargage de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et également d'alarmines.

terminal qui perméabilise la membrane en formant un pore (He *et al.*, 2015, Kayagaki *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2015) (Figure 13). Ce pore permet la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β et l'IL-18, et/ou la libération d'alarmines cytosoliques, ce qui fait que la pyroptose est hautement inflammatoire (Lamkanfi *et al.*, 2010, Shi *et al.*, 2015). Les macrophages peuvent également mourir par nécroptose, qui est une mort cellulaire régulée indépendante des caspases (Pasparakis and Vandenabeele, 2015) (Figure 13). Ce type de mort est déclenché par divers signaux de stress, comme une déplétion en ATP, la production d'espèce réactives de l'oxygène, une altération du potentiel membranaire mitochondrial ou encore une surcharge en calcium intracellulaire (Amaral *et al.*, 2016, Golstein and Kroemer, 2007). Il dépend de la phosphorylation de RIPK1 et 3 (pour Receptor-interacting protein Kinase 1 et 3) qui activent la pseudokinase MLKL (pour Mixed lineage kinase domain-like protein) pour provoquer la rupture de la membrane plasmique (Hildebrand *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2012). De façon similaire à la pyroptose, la nécroptose est lytique et inflammatoire.

- *M. tuberculosis* et mort cellulaire programmée du macrophage

Lors d'une infection par *M. tuberculosis*, la mort des macrophages joue un rôle crucial dans la pathogenèse de la tuberculose car elle permet la diffusion du bacille et, par conséquent, la progression de la maladie. Cependant, la mise en place d'un programme de mort par le macrophage peut aussi permettre à la cellule infectée de contrôler le devenir du bacille (Figure 14).

L'apoptose aurait des effets plus bénéfiques pour l'hôte que pour *M. tuberculosis* car elle permet le contrôle de l'infection (Oddo *et al.*, 1998). Les bactéries piégées dans des corps apoptotiques sont internalisées par efferocytose et conduites vers un compartiment bactéricide où elles sont détruites (Martin *et al.*, 2012). La bactérie est capable de bloquer l'apoptose. Elle produit des facteurs anti-apoptotiques, notamment nuoG, PtpA, pknE, secA2, sodA, ou encore sigH dont la production perturbe les voies de signalisation déclenchant l'apoptose (Liu *et al.*, 2015). Mais *M. tuberculosis* produit aussi des facteurs pro-apoptotiques parmi lesquelles les lipoprotéines LpqH et pstS1, PE_PGRS33, ou encore la protéine ESAT-6 qui est le facteur le plus connu (Liu *et al.*, 2015). ESAT-6 est impliqué en particulier dans l'induction d'un stress du RE (Lim *et al.*, 2016), dans l'altération mitochondriale (Fine-Coulson *et al.*, 2015), et elle contribue *in vivo* à l'apoptose des macrophages primo-infectés chez le poisson-zèbre (Davis and Ramakrishnan, 2009) et chez la souris (Aguilo *et al.*, 2013).

Il est envisageable que la manipulation de l'apoptose suive un schéma dynamique. Lors de la primo-infection, les macrophages meurent par apoptose (Davis and Ramakrishnan, 2009), en particulier des macrophages microbicides de type M1 qui sont les plus fréquemment rencontrés par le bacille dans les étapes précoces de l'infection (Lim *et al.*, 2016). Cette phase de mort cellulaire servirait au recrutement de macrophages moins bactéricides de type M2 sur les lieux de l'infection (Davis and Ramakrishnan, 2009). Puis dans un second temps, *M. tuberculosis* induit une nécrose, plus favorable à la survie des bactéries et à leur dissémination (Butler *et al.*, 2017, Lee *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que les macrophages nécrotiques constituent une niche pour la réplication de *M. tuberculosis* (Lerner *et al.*, 2017). *M. tuberculosis* se développe rapidement dans la cellule morte, avec un temps de doublement plus rapide que dans l'environnement extracellulaire ou dans des cellules vivantes (Mahamed *et al.*, 2017). Il est décrit que *M. tuberculosis* est capable de stimuler les voies de la nécrose programmée, notamment de la pyroptose. Le système ESX-1 et le facteur de virulence ESAT-6 jouent là encore un rôle prépondérant. Ainsi ESAT-6 active l'inflammasome NLRP-3 (Mishra *et al.*, 2010), mais elle ne passerait pas par l'activation de la caspase-1 (Welin *et al.*, 2011a). ESAT-6 pourrait également être impliquée dans la nécrose dépendante de la perte de potentiel mitochondrial (Chen *et al.*, 2006), et dans l'inhibition de la réparation des dommages à la membrane plasmique conduisant à la nécrose (Divangahi *et al.*, 2009). Cette réparation membranaire est sous la dépendance du métabolisme des éicosanoïdes. Par ailleurs, la production de prostaglandine E2 (PGE2) a un rôle protecteur des mitochondries et l'inhibition de sa production lors de l'infection par *M. tuberculosis* privilégie une mort de la cellule hôte par nécrose (Chen *et al.*, 2008). L'inhibition de la production de PGE2 permet à l'inverse la production d'un autre médiateur lipidique, la lipoxin A4, qui possède une action anti-apoptotique, orientant les macrophages vers une mort de type nécrose (Behar *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2008).

Pour conclure, l'ensemble des données de la littérature soulignent que la survie et la réplication de *M. tuberculosis* au sein du macrophage reposent sur un équilibre entre les stratégies anti-infectieuses de la cellule hôte et la capacité de *M. tuberculosis* à les manipuler, de l'étape initiale de reconnaissance du bacille jusqu'à la mort du macrophage. Parmi les acteurs bactériens impliqués, l'enveloppe de *M. tuberculosis* joue un rôle central dans la manipulation de ces réponses. Elle est localisée à l'interface avec l'hôte et elle contient un grand nombre de composés capables notamment de lier des PRR de l'hôte pour moduler leur activité et les fonctions immunes auxquelles ils sont associés.

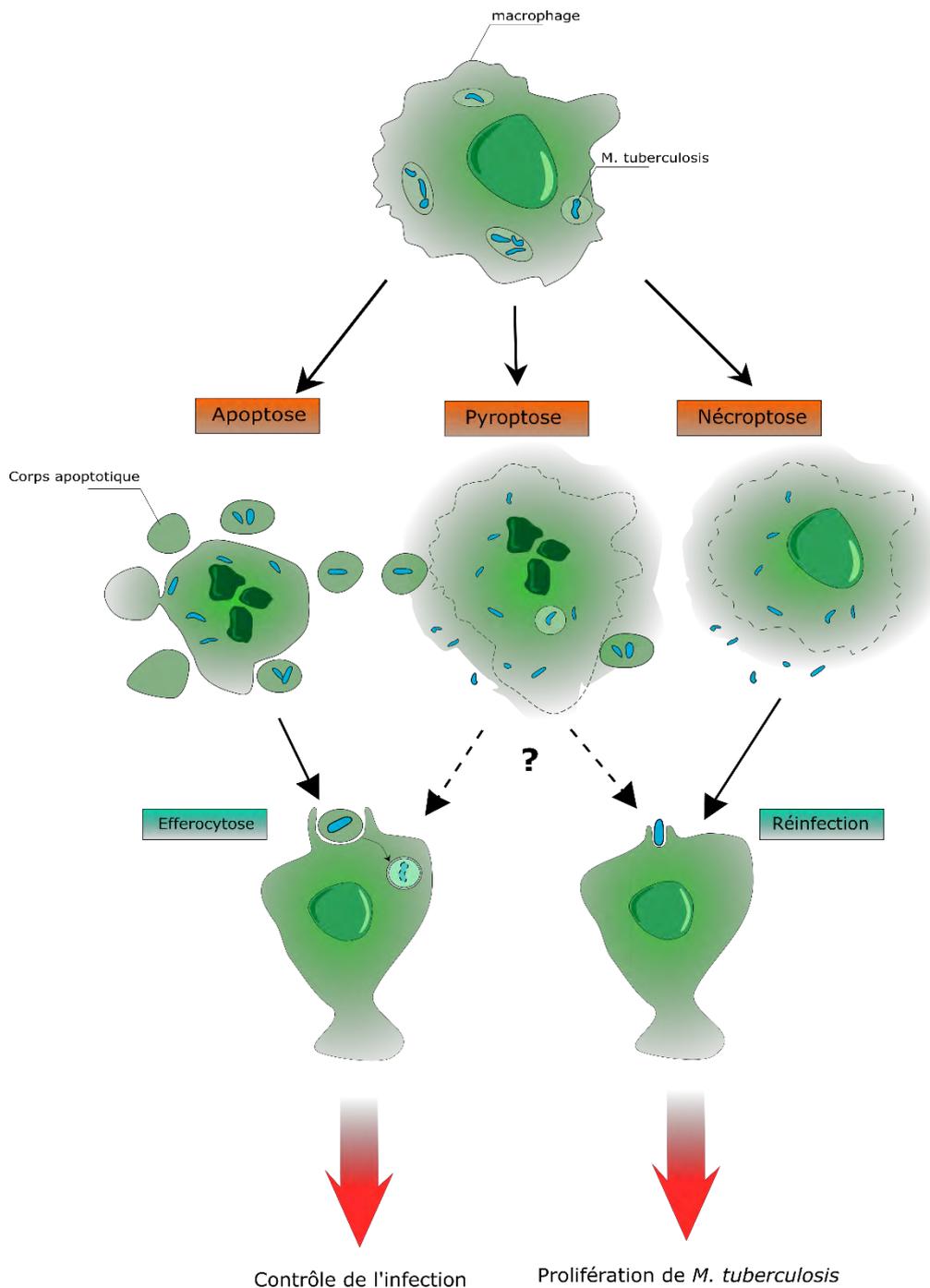


Figure 14 : *M. tuberculosis* et la mort cellulaire du macrophage. D'après Behar et al., 2011.

L'infection par *M. tuberculosis* peut induire une mort cellulaire qui détermine le devenir du bacille. L'apoptose est décrite comme bénéfique pour l'hôte, confinant les bactéries dans des corps apoptotiques. L'efferocytose permet une meilleure élimination de la bactérie et stimule la fonction de présentation d'antigènes des DC, activant la réponse immunitaire. Les formes de nécrose induite (i.e. necroptose et pyroptose) sont décrites comme étant favorable au développement de *M. tuberculosis*. Après induction de la nécrose et relargage de la bactérie dans le milieu extracellulaire, elle est phagocytée de nouveau par les phagocytes environnants ce qui favorise sa multiplication.

III. L'enveloppe mycobactérienne et son rôle dans la virulence de *M. tuberculosis*

1) Structure et composition de l'enveloppe de *M. tuberculosis*

L'enveloppe des mycobactéries, et particulièrement de *M. tuberculosis* est unique de par sa structure et sa composition (Figure 15). Grace à son caractère hautement hydrophobe, elle constitue une barrière de faible perméabilité qui confère au bacille une protection contre des stress environnementaux et des drogues. Notons par exemple que *M. tuberculosis* est intrinsèquement résistante à de nombreux antibiotiques qui ne peuvent pénétrer cette enveloppe.

Cette paroi se compose en majorité de lipides (60% de la matière sèche), dont certains sont vitaux pour la bactérie. Différentes études de microscopie électronique, de cryo-microscopie électronique ainsi que des études biochimiques ont montré que la paroi se compose d'une membrane plasmique, d'une couche de peptidoglycane liée à des molécules d'arabinogalactane, elles-mêmes estérifiées avec des acides mycoliques qui forment le feuillet interne d'une bicouche lipidique appelée la mycomembrane. Tout cet ensemble est surmonté d'une capsule (Figure 15) (Daffé *et al.*, 2017). La composition du feuillet externe reste sujette à discussion mais il est admis qu'elle se compose de trois grandes familles de lipides (Neyrolles and Guilhot, 2011) dont les structures sont présentées dans le tableau 3 :

- Les glycolipides contenant du tréhalose ; les principaux composés sont des molécules de tréhalose acylées par un ou deux acides mycoliques, donnant le tréhalose dimycolate (TDM) et le tréhalose monomycolate (TMM), qui sont présents dans toutes les espèces mycobactériennes. Il existe cependant des variations structurales fines de ces molécules qui sont spécifiques de *M. tuberculosis* (Barry *et al.*, 1998). Cette famille comprend également des lipides qui contiennent un tréhalose acylés avec des acides gras méthyl-branchés en différentes positions : les di-acyltréhaloses (DATs), les tri-acyltréhaloses (TATs) et les poly- ou penta-acyltréhaloses (PATs). Ces molécules sont constitués d'un tréhalose acylé par un acide stéarique ou palmique et par des chaînes d'acides gras méthyl-branchées, qui peuvent être un acide mycosanoïque, mycolipénique ou mycolipanolique. Ces lipides ne sont retrouvés que chez les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*. Enfin cette famille comprend des lipides contenant un tréhalose-sulfate multiacylé, les sulfolipides, dont la forme majoritaire est tétra-acylée par un acide palmitique, un acide phthiocéranique et deux acides hydroxyphthiocéraniques, spécifiques du genre *Mycobacterium*. Ces lipides ne sont synthétisés que par *M. tuberculosis* et *M. canettii*.

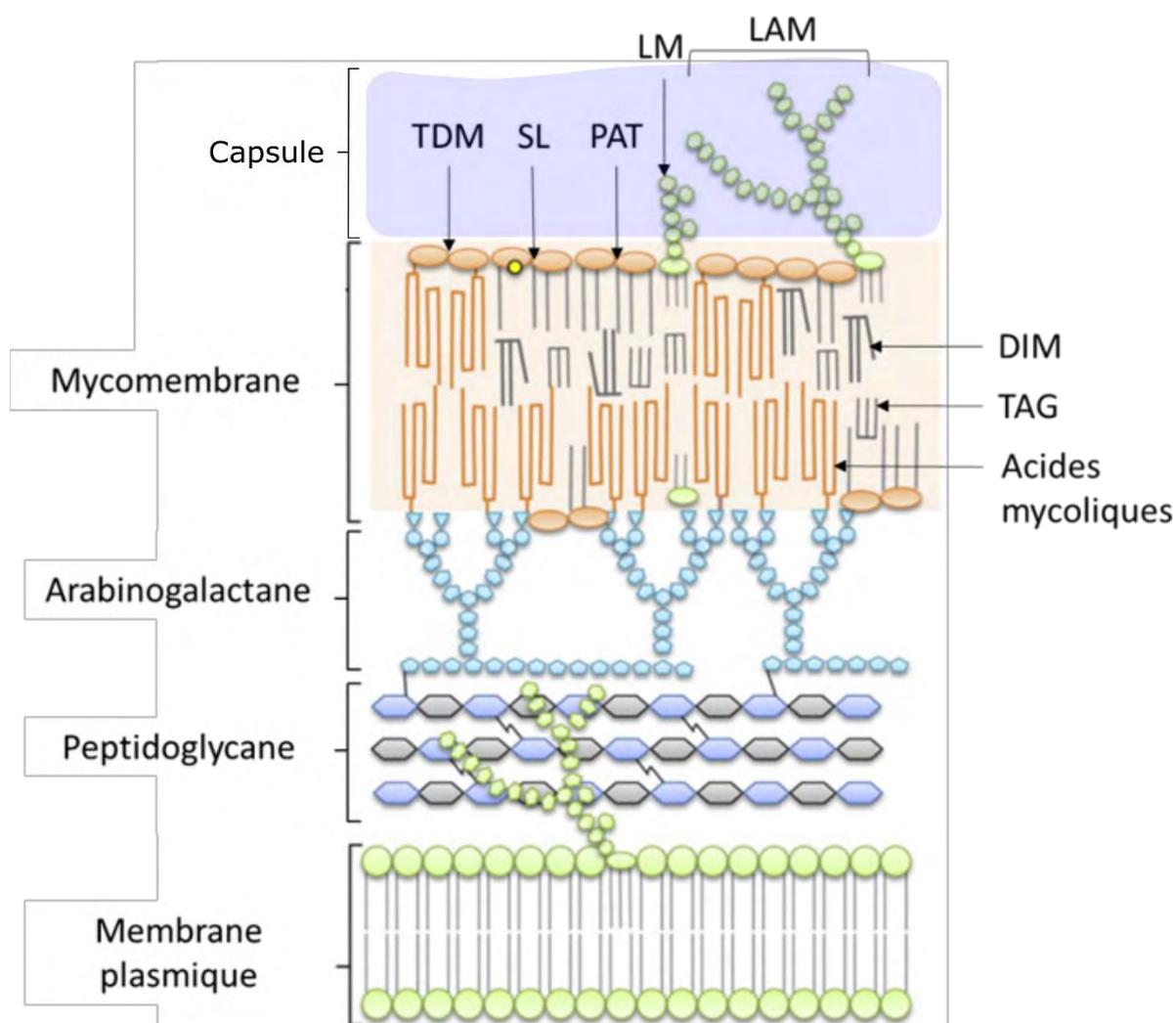


Figure 15: Modèle de l'organisation de l'enveloppe de *M. tuberculosis* (Adapté (Touchette and Seeliger, 2017)).

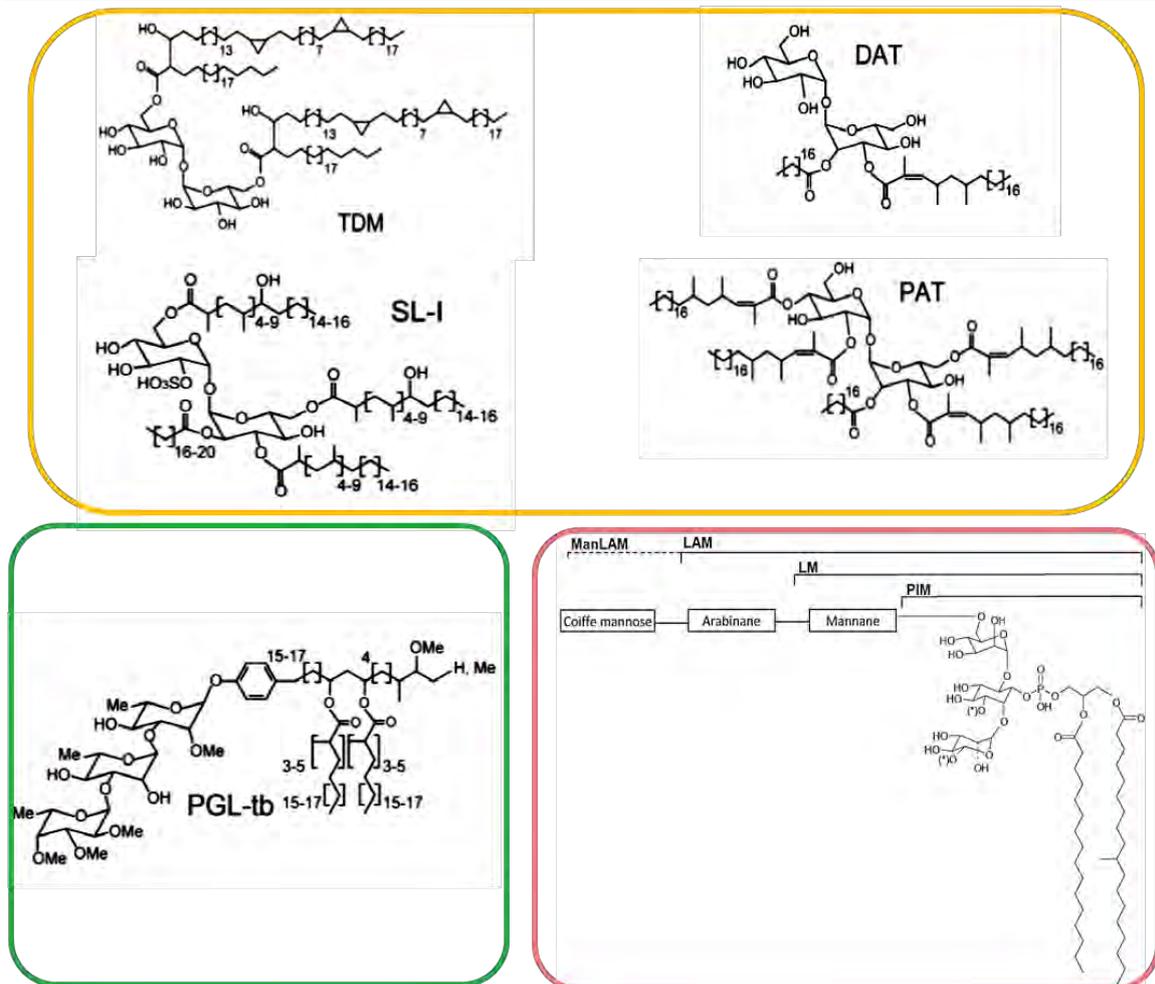
DIM : dimycocérosate de phthiocérol ; *TDM* : dimycolate de tréhalose ; *SL* : sulfolipid ; *LM* : lipomannan ; *LAM* : lipoarabinomannane ; *PAT* : polyacyltrehalose ; *TAG* : triacylglycérôle

Tableau 3: Les lipides majeurs impliqués dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* (.

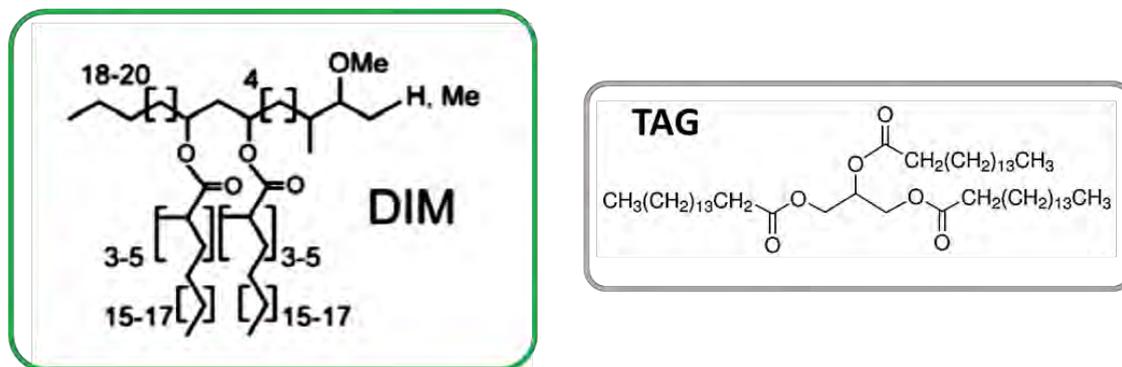
Encadré Jaune : Lipides dérivés du tréhalose ; encadré vert ; lipides dérivés des mycocérosates ; encadré rouge : lipides dérivés du phosphatidylinositol. Encadré gris : triacylgcérol

DAT/PAT : di- polyacyl tréhalose ; **DIM** : dimycocérosate de phthiocérol ; **PGL** : phénolglycolipide ; **PIM** ; phosphatidylinositol mannoside ; **LM** : lipomannane ; **LAM** : lipoarrabinomannane ; **ManLAM** : LAM mannoside ; **TDM** : tréhalose dimycolate ; **TAG** : triacylglycérol ; **SL** : sulfolipide

Les glycolipides



Les lipides apolaires



- Les dérivés glycosylés du phosphatidylinositol: ce sont des glycophospholipides essentiels retrouvés dans toutes les espèces mycobactériennes et leurs structures sont relativement conservées. Le phosphatidylinositol (PI) entre dans la composition de plusieurs des phosphatidylinositol mannosides (PIMs) constitués d'un PI glycosylé. L'ajout d'un domaine mannane sur les PIMs permet de former le lipomannane (LM). Le LM peut lui-même être coiffé par un domaine arabinane pour donner du lipoarabinomannane (LAM) qui est mannosylé (ManLAM) chez les espèces pathogènes.
- Les dérivés de mycocérosates : les lipides de cette famille sont structurellement très proches et sont produits par un nombre limité de mycobactéries pour la plupart pathogènes pour l'homme. Les dimycosérosates de phthiocérol (DIM) et les phénolglycolipides (PGL), sont composés d'une longue chaîne de phthiocérol sur laquelle sont estérifiés deux acides gras poly-méthylés appelés acides mycosérosiques. Les PGL sont des glycolipides qui partagent avec les DIM le corps lipidique, mais auquel est associé un noyau phénol glycosylé. Ce dernier est composé de 1 à 3 sucres dont la composition varie entre les espèces mycobactériennes.

Enfin, la mycomembrane est surmontée d'une capsule, jusqu'alors non visible à cause des techniques de préparation des échantillons pour la microscopie électronique et l'utilisation de Tween-80 dans le milieu de culture (Sani *et al.*, 2010). Celle-ci est composée essentiellement de polysaccharides notamment des polymères d' α -glucan, de mannane et d'arabinomannan, de protéines et lipoprotéines, et dans une moindre mesure de lipides.

Le rôle des lipides bactériens dans le contexte d'interaction hôte/pathogène constituent un domaine scientifique peu exploré à l'exception du lipide A du LPS et des acides lipotéiques (LTA) des bactéries Gram négatif. Le séquençage du génome de *M. tuberculosis* a dévoilé que 250 gènes sont impliqués dans la biosynthèse des lipides, soit cinq fois plus que chez *E. Coli* (Cole *et al.*, 1998). La plupart de ces lipides, à l'exception des acides mycoliques et de leurs dérivés, et des LAM ne sont pas nécessaires pour la viabilité de la bactérie. Certains jouent un rôle dans la structuration de l'enveloppe. C'est par exemple le cas des DIM, où a été montré que des mutants d'insertion ou de délétion dépourvus de DIM sont plus sensibles à des détergents et des antibiotiques que la souche sauvage *M. tuberculosis* (Camacho *et al.*, 2001, Passemar *et al.*, 2014, Soetaert *et al.*, 2015). C'est aussi le cas des TMM/TDM, où une mutation dans le gène *hma* responsable d'une hydroxylation des acides mycoliques, a rendu les bactéries sensibles aux ROS comme l' H_2O_2 .

Néanmoins, tous ces lipides positionnés dans la couche la plus externe de l'enveloppe mycobactérienne, sont à l'interface avec l'hôte et ils jouent à ce titre un rôle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*.

2) Rôle et mécanisme moléculaire d'action des lipides d'enveloppe de *M. tuberculosis* dans la pathogénie

A partir de la classification précédente, il est possible de classer les lipides également en fonction de leurs propriétés physiques. Une grande majorité d'entre eux possède une tête glycosylée qui leur confère en partie un rôle de PAMP, mais qui fait office de tête polaire (tableau 3). En opposition, on retrouve les lipides non glycosylés et entièrement apolaires.

a. Les glycolipides

Les glycolipides impliqués dans la pathogénicité jouent un rôle essentiel dans la modulation de la réponse inflammatoire. La production préférentielle de certaines espèces lipidiques par rapport à d'autres peut stimuler ou au contraire diminuer la réponse inflammatoire. Il a d'ailleurs été proposé la notion « d'immunostat lipidique », où d'un côté, les DAT/PAT, les SL et les PGL ont tendance à diminuer la réponse inflammatoire, alors que les TDM, PIM, LAM/ManLAM ont tendance à l'augmenter (Queiroz and Riley, 2017).

Les glycolipides sont composés d'un groupe glycosylé polaire ou hydrophile et d'une chaîne de carbone apolaire ou hydrophobe. La plupart des effets biologiques de ces lipides sont attribués à leur décoration glycosylée dont la nature et la composition varient d'une famille de lipide à l'autre (Tableau 3). Ces motifs glycosylés sont reconnus en tant que motif moléculaire par des récepteurs membranaires de type PRR (Tableau 1). Leur reconnaissance déclenche l'activation du macrophage et la mise en place de la réponse immunitaire et/ou de l'internalisation de la bactérie. Par exemple, la liaison du TDM au récepteur Mincle, qui participe à l'activation des macrophages et des DC, est essentielle pour la formation et la maintenance du granulome (Ostrop *et al.*, 2015). Les DAT/PAT jouent aussi un rôle, plus modeste, dans l'entrée (Rousseau *et al.*, 2003), la persistance de la bactérie et la maturation phagosomale (Passemar *et al.*, 2014), mais n'ont pas de récepteurs cellulaires connus. Les SL, proches structuralement des DAT/PAT sont aussi impliqués dans le contrôle des réponses microbicides du macrophage et la sécrétion de cytokines (Pabst *et al.*, 1988, Passemar *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 1988). Il a récemment été montré qu'ils

inhibent l'activation de la voie NF- κ B par une liaison antagoniste au récepteur TLR-2 (Blanc *et al.*, 2017).

Les PIM et leurs dérivés LAM et ManLAM sont d'importants modulateurs de la réponse immunitaire via leurs motifs saccharidiques antigéniques qui sont reconnus par les récepteurs TLR2 et de type C-lectines (Jones *et al.*, 2001, Quesniaux *et al.*, 2004, Vergne *et al.*, 2015). Ils interviennent dans l'internalisation de la bactérie via l'interaction avec des récepteurs de type C-lectine comme le récepteur au mannose (Torrelles *et al.*, 2006).

Les PGL sont également impliqués dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*. Ils possèdent le même corps lipidique que les DIM, surmonté d'un groupement phénol lié à un épitope saccharidique dont la composition et l'interaction avec les phagocytes varient suivant l'espèce (Arbués *et al.*, 2016). Les PGL de *M. tuberculosis* ne sont d'ailleurs pas présents chez tous les isolats cliniques (Neyrolles and Guilhot, 2011). Ils possèdent principalement une action anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des macrophages (Reed *et al.*, 2004). Les PGL stimulent également la transmission de *M. Marinum* entre macrophages dans les phases précoces d'infection chez le poisson-zèbre (Cambier *et al.*, 2017).

Le rôle de ces lipides ne se limite pas seulement à leur activité de PAMP. Une fois dans le phagosome, la plupart de ces lipides jouent aussi un rôle plus ou moins important dans l'inhibition de la maturation du phagosome. Le plus caractérisé est le ManLAM, qui inhibe l'activation de la calmoduline, qui permet normalement le recrutement de la PI3K et du facteur EEA-1, essentiels à la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs et les lysosomes (Fratti *et al.*, 2001, Fratti *et al.*, 2003). Le TDM joue aussi un rôle dans le trafic vésiculaire intracellulaire en inhibant la fusion du phagosome avec les lysosomes (Indrigo *et al.*, 2003). Enfin, un rôle plus modeste dans l'inhibition de la maturation du phagosome a été observé pour les PGL (Robinson *et al.*, 2008), les SL et les DAT/PAT (Passemar *et al.*, 2014). Néanmoins les mécanismes d'inhibition de la maturation phagosomale par ces lipides restent largement méconnus.

L'interaction des lipides avec la membrane plasmique des cellules de l'hôte, la modification de ses propriétés et leur impact sur les réponses du macrophage sont des notions émergentes dans le cadre de l'étude des lipides de *M. tuberculosis*. C'est le cas des composés LAM/ManLAM qui sont relargués par la bactérie et diffusent dans le macrophage (Beatty *et al.*, 2000, Rhoades *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 1994). Des travaux ont montré que les LAM s'insèrent dans la membrane plasmique des macrophages et plus particulièrement dans les micro-domaines membranaires ou « raft » (Welin *et al.*, 2008). Cette insertion a pour conséquence de déstructurer les domaines membranaires (Hayakawa *et al.*, 2007)

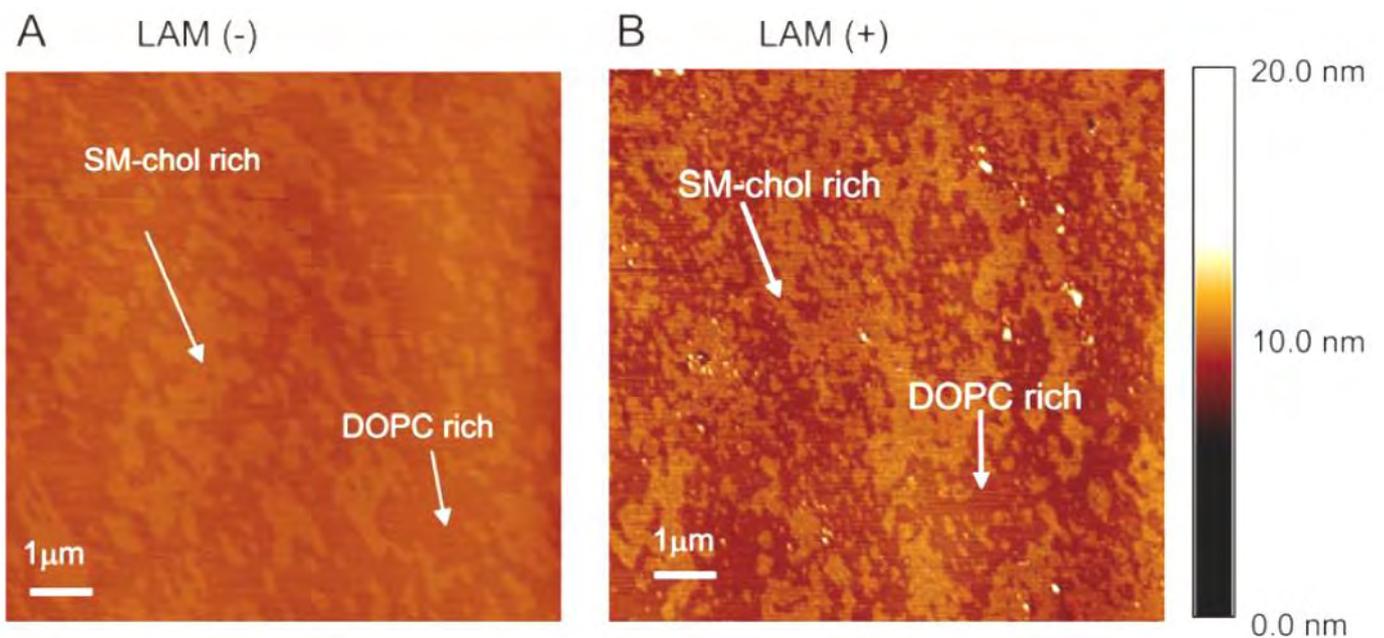


Figure 16 : Impact du LAM sur l'organisation des microdomaines dans une bicouche supportée (Hayakawa et al., 2007)

Ces images ont été obtenues par microscopie à force atomique sur bicouche supportées de di-oleoyl-phosphatidylcholine (DOPC)/sphingomyeline (SM)/cholesterol (Chol) (1:1:1) ± LAM 1.8% (w/w). Les domaines membranaires riches en SM et Chol (jaune SM-Chol rich) se distinguent du reste de la membrane (orange DOPC rich). (A) Ces domaines apparaissent plus grands et réguliers en absence de LAM (B) qu'en leur présence.

(Figure 16) ce qui pourrait expliquer en partie le rôle des LAM dans l'inhibition de la fusion phagosome/lysosome (Fratti *et al.*, 2003). L'exemple du LAM suggère que l'impact des lipides sur l'organisation membranaire joue un rôle dans la virulence de *M. tuberculosis*. Cette interaction membranaire est également une piste pour le mécanisme d'action des autres glycolipides. En effet, à l'instar du LAM, les PGL, PIM et TDM diffusent aussi dans le macrophage, sont même captés par les macrophages avoisinants et modulent leur réponse inflammatoire (Rhoades *et al.*, 2003).

b. Les lipides apolaires

Les lipides apolaires majeurs de *M. tuberculosis* sont les triglycérides (TAG). Ils sont localisés dans la bactérie au sein de gouttelettes lipidiques, mais aussi dans l'enveloppe (Chiaradia *et al.*, 2017, Ortalo-Magne *et al.*, 1996). Il est décrit que les TAG s'accumulent durant la phase de persistance et qu'ils servent de réserve énergétique lors de la réactivation de l'infection (Daniel *et al.*, 2004). De plus, la synthèse des TAG permettrait de rediriger le flux de molécules carbonées approvisionnant le cycle de Krebs vers la synthèse lipidique (Deb *et al.*, 2009). La synthèse des TAG peut être aussi stimulée en condition de stress oxydatif, d'hypoxie ou de privation en nutriment (Daniel *et al.*, 2011), conditions qui peuvent être rencontrées par le bacille dans le granulome (Via *et al.*, 2008). Ainsi, les TAG contribuent de manière indirecte à la pathogénicité de *M. tuberculosis*.

Les DIM sont les lipides les plus apolaires de l'enveloppe de *M. tuberculosis*. Comme les TAG, ils participent au métabolisme central du carbone chez *M. tuberculosis* en particulier dans l'assimilation des composés issus du catabolisme des lipides de l'hôte (Jain *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2009). Cette étape fait intervenir le senseur WhiB3, qui réagit au stress réducteur produit lors de la β -oxydation des acides gras en engageant le NADPH dans la voie de biosynthèse des lipides de virulence tels que les SL, DIM, et DAT/PAT (Singh *et al.*, 2009). WhiB3 est aussi activé en condition acide par le système à deux composants PhoPR en réponse à un pH acide (Feng *et al.*, 2018). Ces données soulignent un lien étroit entre les mécanismes d'adaptation de *M. tuberculosis* au stress environnemental et le métabolisme des DIM. Dans ces conditions, l'accumulation de DIM pourrait constituer une réserve de stockage lorsque la bactérie se retrouve dans le phagosome (Saini *et al.*, 2012), et leur accumulation pourrait aussi renforcer la résistance de la bactérie aux différents stress. Néanmoins, ce rôle ne serait qu'indirect dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*.

Nous verrons dans le chapitre suivant que ces lipides jouent un rôle majeur dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*. Ce sont des facteurs lipidiques majeurs de virulence, mais

leur contribution est encore assez mal connue probablement du fait de leur composition chimique très riche en carbone et sans groupement polaire ou chimiquement réactif qui les rend difficiles à manipuler. La caractérisation de leur rôle dans la pathogénèse de la tuberculose pourrait permettre de proposer des mécanismes biologiques originaux et de concevoir de nouvelles stratégies antituberculeuses et plus généralement anti-infectieuses.

3) Le dimycocérosate de phthiocérol

a. Synthèse et transport

Approximativement 1% du génome des mycobactéries est dédié à la synthèse et au transport des DIM (Camacho *et al.*, 2001, Cole *et al.*, 1998, Onwueme *et al.*, 2005) (Figure 17A). Les DIM sont synthétisés dans le cytoplasme par des PKS qui allongent des chaînes d'acides gras par addition de courtes chaînes acyl à partir de précurseurs malonyl-CoA de méthylmalonyl-CoA (Jackson *et al.*, 2007) (Figure 17A). La chaîne phthiocérol est synthétisée par un groupe de 5 PKS (ppsA-E). La réaction démarre par l'activation d'un acide gras précurseur de 22-24 carbones par ajout d'un groupement AMP (Adénosine monophosphate) au lipide par l'enzyme FadD26, qui lie le précurseur sur PpsA. Cette dernière avec les PpsB-E allongent le précurseur lipidique par condensation successive de 3 malonyl-CoA et 2 méthylmalonyl-CoA (Figure 17A). La chaîne phthiocérol ainsi créée est ensuite libérée de PpsE par l'enzyme TesA.

La chaîne d'acide mycocérosique est synthétisée par la PKS itérative Mas. Le précurseur lipidique se compose d'une chaîne de 18 à 20 carbones qui est fournie par l'enzyme FadD28. La chaîne est ensuite allongée par Mas à partir de 3 à 5 molécules de méthylmalonyl-CoA, pour former un acide mycocérosique ramifié par des groupements méthyles (Azad *et al.*, 1996) (Figure 17A). Ensuite, l'enzyme acyltransferase PapA5 (Polyketide-associated protein A5) permet l'estérification de la chaîne phthiocérol par deux mycocérosates (Figure 17A). Il peut suivre un ajout d'une méthylation sur la fonction cétone de la chaîne phthiocérol par les enzymes Rv2951c et Rv2952 (Figure 17A). La forme non méthyliée est appelée DIM B et la forme méthyliée DIM A. En revanche, dans la littérature ainsi que dans ce manuscrit, aucune distinction n'est faite entre ces deux molécules.

Une fois synthétisés, les DIM sont transportés à travers la membrane plasmique par un système de transport résistance-nodulation-division (RND) composé de la protéine mmpL7

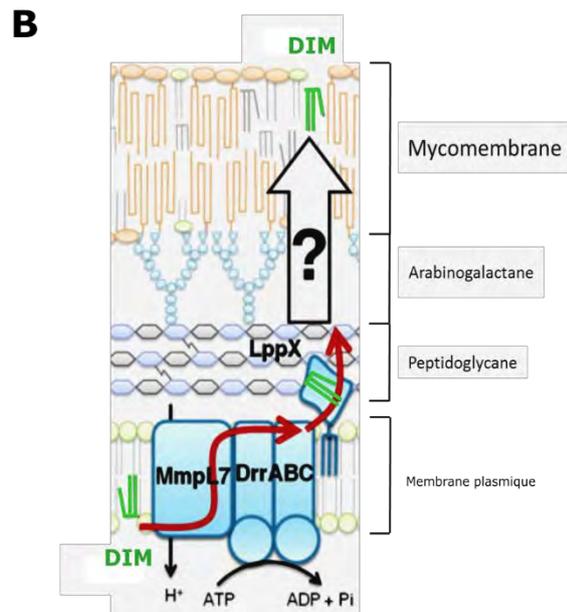
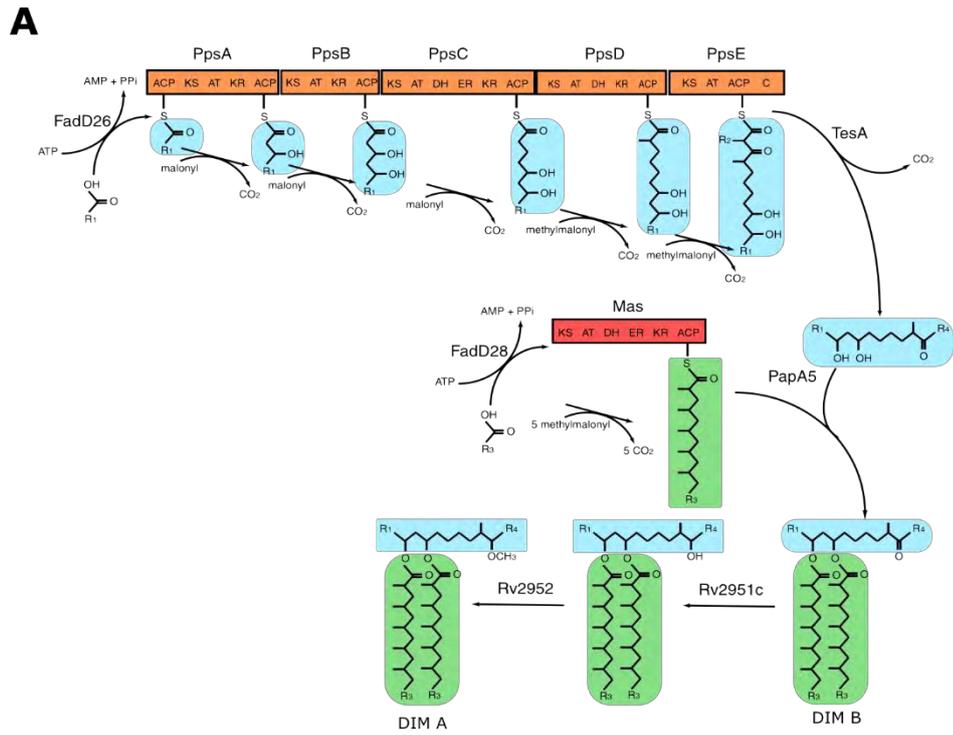


Figure 17: Modèle de la synthèse et du transport des DIM à la mycomembrane (adapté de Guilhot et al., 2008, Touchette and Seelinger, 2018)

(A) Schéma de la voie de biosynthèse des DIM. (B) Schéma du mécanisme de transport des DIM à la mycomembrane.

et d'un transporteur ABC (ATP-Binding Cassette) composé des protéines DrrA-C (Chalut, 2016) (Figure 17C). Les DIM sont ensuite pris en charge par la lipoprotéine LppX au niveau du périplasma mais le mécanisme exact du transport jusqu'à la mycomembrane est encore inconnu.

b. Rôle dans la virulence

Le rôle des DIM dans la virulence a été proposé il y a maintenant plus de 40 ans, lorsque Goren et collaborateurs analysèrent les lipides d'isolats cliniques, et constatèrent que les souches déficientes en DIM étaient atténuées chez le cobaye (Goren *et al.*, 1974). Plus de deux décennies plus tard, des études de criblages de mutants générés par transposition ont confirmé que les souches déficientes en DIM sont atténuées dans des modèles animaux d'infection (Camacho *et al.*, 1999, Cox *et al.*, 1999). Plus précisément, ces deux études montrèrent une inactivation des gènes *fadD26* et *fadD28*, impliqués respectivement dans la synthèse de la chaîne phthiocérol et mycocérosate, résultant en l'absence de production de DIM et une atténuation de *M. tuberculosis*. De manière intéressante, les auteurs ont également observé une atténuation de la pathogénicité pour des souches capables de produire des DIM mais déficientes dans leur transport à la mycomembrane. En effet, ils ont relevé une insertion du transposon dans les gènes *mmpL7* et *drrC*, impliqués dans le transport des DIM à la surface de la bactérie (Figure 17B). Ces données soulignent donc un rôle majeur des DIM dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*, en particulier lorsqu'ils sont présents à la surface du bacille. Ce rôle est particulièrement remarquable dans les 2 premières semaines suivant l'infection, lors de la mise en place de la réponse innée (Camacho *et al.*, 1999, Cox *et al.*, 1999, Day *et al.*, 2014, Murry *et al.*, 2009, Rousseau *et al.*, 2004). Les travaux de Day et collaborateurs montrent d'ailleurs que les souches déficientes en DIM sont plus sensibles à la réponse immunitaire innée de l'hôte *in vivo* aux premiers jours de l'infection (Day *et al.*, 2014).

Ainsi, dans une démarche de compréhension du mécanisme d'action des DIM, les macrophages ont donc fait l'objet d'une attention particulière.

c. Rôle des DIM dans le dialogue de M. tuberculosis avec le macrophage

Des études comparatives de *M. tuberculosis* et de différents mutants déficients pour la synthèse et le transport des DIM indiquent que ces lipides sont impliqués dans l'interaction du bacille avec les macrophages (Arbues *et al.*, 2014, Cambier *et al.*, 2014, Queiroz and Riley, 2017). Plus précisément, il a été montré que la présence de DIM à la surface de

M. tuberculosis augmente l'efficacité d'infection du bacille en favorisant la mise en jeu de récepteurs professionnels de la phagocytose (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Une fois internalisé, *M. tuberculosis* utilise les DIM pour déjouer les réponses bactéricides du macrophage. La présence de DIM à la surface de *M. tuberculosis* est requise pour prévenir la translocation de la H⁺ V-ATPase à la membrane du phagosome et favoriser le maintien du bacille dans un environnement intracellulaire peu acide favorable à sa survie (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Passemar *et al.*, 2014). Le rôle des DIM dans la perméabilité de l'enveloppe et la résistance à divers stressés, comme la production de NOS microbicides, contribue à la survie du bacille dans des macrophages activés (Camacho *et al.*, 2001, Rousseau *et al.*, 2004). Comme décrit dans le paragraphe précédent, leur synthèse est d'ailleurs stimulée en condition de stress acide ou réducteur par le système phoPR et le régulateur WhiB3. Dans les macrophages humains, le rôle des NOS n'est pas connu et les DIM ne sont pas impliqués dans la résistance de *M. tuberculosis* aux radicaux libres oxygénés ou à l'acidification (Passemar *et al.*, 2014). *M. tuberculosis* semble aussi exploiter les DIM pour prévenir la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, TNF- α et IL-6 dans les macrophages de souris (Rousseau *et al.*, 2004). A l'échelle du macrophage, le TNF- α augmente la production de NOS (Ding *et al.*, 1988) et favorise la fusion phagosome-lysosome (Harris *et al.*, 2008). Les DIM sont également impliqués dans l'induction de la mort du macrophage infecté et dans la dissémination de *M. tuberculosis* aux macrophages environnants (Passemar *et al.*, 2014). Dans ce processus de dissémination, Cambier et collaborateurs ont proposé que les DIM masquent des PAMP à la surface de la bactérie, ce qui permet le recrutement de macrophage permissif au développement du bacille, dans le modèle d'infection du poisson-zèbre par *M. marinum* (Cambier *et al.*, 2013).

A ce jour, les mécanismes moléculaires d'action des DIM ne sont pas connus. Cependant, les travaux qui décrivent leur implication sur la phagocytose indiquent que les DIM agissent sur un processus qui met en jeu des récepteurs membranaires, notamment le CR3 et le RM (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Par l'absence de motifs glycosylés qui permettraient leur interaction avec ces récepteurs de type C-lectine, il est peu probable que les DIM aient un rôle de PAMP. En revanche, il est remarquable que l'effet des DIM ne soit pas spécifique pour un récepteur membranaire (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Une piste alternative pour expliquer l'activité des DIM est que ces lipides s'insèrent dans la membrane et ont un effet sur les propriétés physiques des membranes, ce qui module indirectement les réponses du macrophage. Ce raisonnement est basé sur le fait que certains lipides mycobactériens sont capables d'être transférés de la bactérie aux membranes plasmique du macrophage (Russell *et al.*, 2002), comme cela a été montré pour le LAM. En s'insérant dans la membrane, le LAM est capable d'en altérer l'organisation, en particulier au niveau des nanodomains, et

altère la capacité de fusion de liposomes (Hayakawa *et al.*, 2007). Cette hypothèse d'une interaction des DIM avec la membrane s'appuie aussi sur le fait que la membrane plasmique est une structure cellulaire essentielle à de nombreux processus cellulaires.

IV. Les membranes cellulaires, structure et rôle dans l'homéostasie cellulaire

Les membranes cellulaires sont les structures lipidiques les plus conservées du vivant, des virus aux animaux. Une membrane se présente sous la forme d'un double feuillet lipidique (Figure 18A) qui sépare physiquement deux compartiments aqueux. Sa présence assure la compartimentation essentielle à l'homéostasie cellulaire. Elle est essentielle à la communication intercellulaire, la transduction du signal, la synthèse protéique ou encore le trafic intracellulaire et la bonne distribution de composants membranaires. Sa structure et sa composition, différente suivant le compartiment, joue un rôle prépondérant dans ces processus et également dans les interactions d'une cellule avec des pathogènes.

1) Structure et composition membranaire

La membrane cellulaire est constituée pour moitié (en masse) de lipides, et pour moitié de protéines membranaires. Dans cette section, je ne discuterai que des lipides membranaires.

a. *Les phospholipides*

Après les protéines membranaires, le constituant majeur de la membrane cellulaire est le phospholipide. Sa structure est composée d'une tête polaire hydrophile et de deux chaînes d'acides gras hydrophobes (Figure 18B), ce qui lui confère un caractère amphiphile. La tête polaire correspond à un groupement phosphate lié à une molécule de glycérol (Figure 18B). Ce phosphate porte également un groupement qui permet de distinguer les différents types de phospholipides. Ainsi, dans une cellule eucaryote, les têtes majoritairement retrouvées sont la choline, la sérine, l'éthanolamine et l'inositol, qui donne respectivement la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE), et le phosphatidylinositol (PI) (Figure 18B). Le phosphatidylglycérol peut également être trouvé dans les membranes cellulaires mais reste essentiellement localisé à la membrane des mitochondries (van Meer *et al.*, 2008). La partie hydrophobe est constituée de deux acides gras estérifiés sur le squelette glycérol. Dans les cellules eucaryotes, la chaîne en position

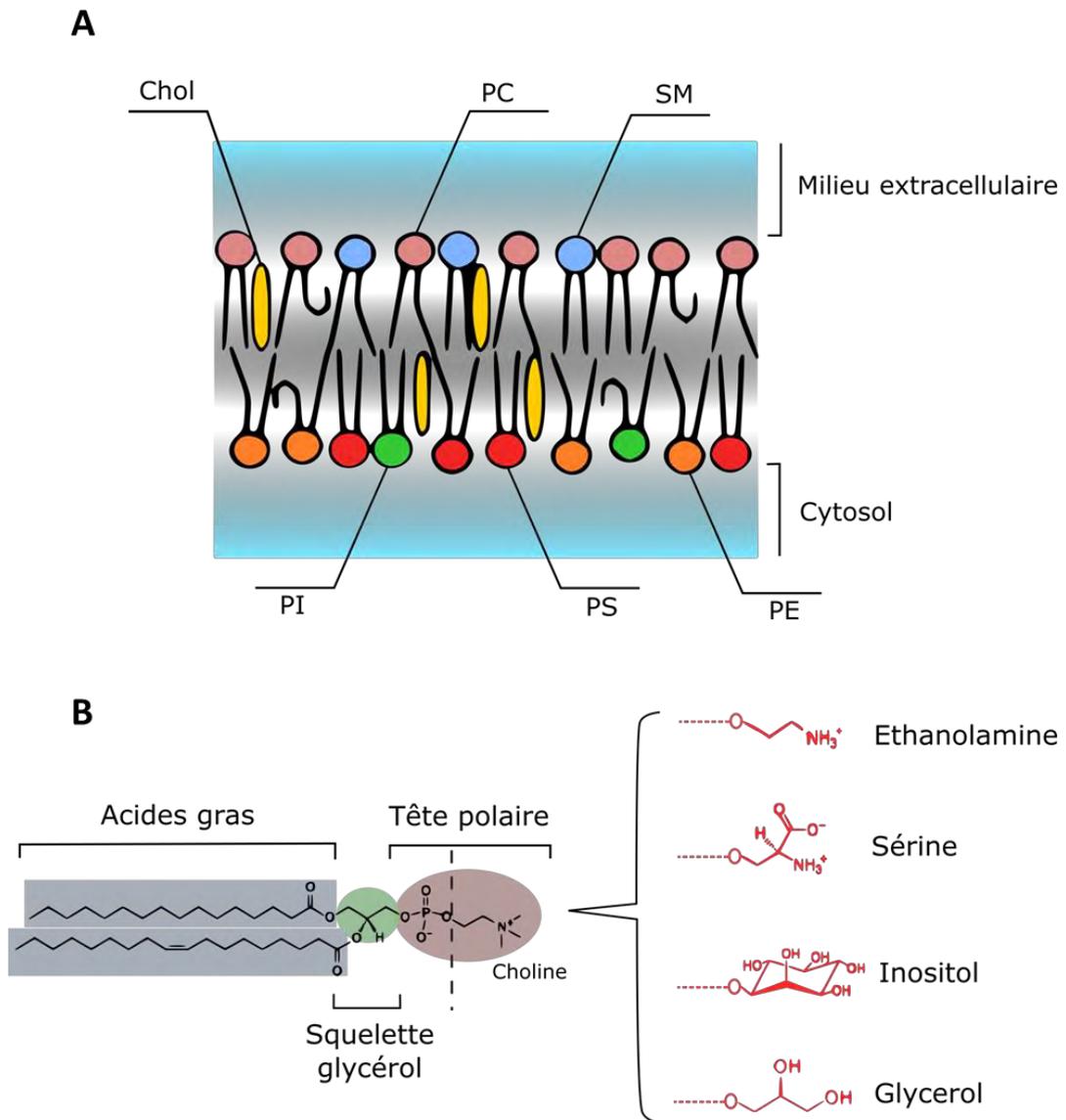


Figure 18: (A) Schéma illustratif de la composition lipidique de la membrane plasmique et de son asymétrie. (B) Structure des phospholipides majeurs de la membrane (adapté de Harayama and Riezman, 2018).

PC : phosphatidylcholine, SM, sphingomyéline, Chol : cholestérol, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine, PI : phosphatidylinositol

sn-1 tend à être saturée tandis que celle en position *sn*-2 comporte une ou plusieurs insaturations (Yamashita *et al.*, 2014) (Figure 18B). La longueur des chaînes d'acide gras et le nombre d'insaturations sont régulés et la diversité en acide gras dépend du tissu analysé (Harayama and Riezman, 2018). Les phospholipides possèdent donc un caractère amphiphile qui conditionne leur organisation spontanée en bicouche en milieu aqueux (Figure 18A). La membrane plasmique a également la particularité d'avoir une composition asymétrique entre les feuillet interne et externe de la bicouche lipidique (Figure 18A). Le feuillet externe est composé majoritairement de PC, alors que le feuillet interne est enrichi en PI, PE et PS (van Meer *et al.*, 2008) (Figure 18A). Cette différence de composition est importante pour l'homéostasie cellulaire. La cellule possède d'ailleurs des protéines membranaires spécialisées dans le transfert de phospholipides d'un feuillet à l'autre, appelées flippase et scramblase (van Meer, 2011), dont l'activité régule cette asymétrie. Néanmoins, un changement de la composition en phospholipides peut traduire un changement de physiologie de la cellule, par exemple dans le cas de l'apoptose où le PS est exposé au feuillet externe de la membrane plasmique (Fadok *et al.*, 1992). Ce lipide sert ensuite de signal pour l'efferocytose de la cellule apoptotique (Elliott *et al.*, 2017, Fadok *et al.*, 1992). L'exposition de PS au feuillet externe a également été observée en conditions non physiologiques, comme sur des lignées de cellules cancéreuses et métastatiques (Riedl *et al.*, 2011).

b. Le cholestérol

Le deuxième constituant majoritaire des membranes de cellules animales est le cholestérol. Il est présent à hauteur de 30 % dans la membrane plasmique et réparti environ à part égale entre les deux feuillet de la bicouche (van Meer, 2008) (Figure 18A). Des travaux récents ont cependant remis en cause cette répartition en montrant que le cholestérol serait douze fois plus abondant dans le feuillet externe que dans le feuillet interne (Liu *et al.*, 2016). Il existe toutefois un gradient de concentration du cholestérol entre les organelles de la cellule pauvres en cholestérol, et la membrane plasmique, riche en cholestérol (van Meer, 2008).

Le cholestérol possède un caractère amphiphile grâce à la fonction hydroxyle portée sur le premier des quatre cycles du noyau polycyclique, qui se termine par une courte chaîne aliphatique (Figure 20). Sa structure amphiphile et polycyclique plane lui fait jouer un rôle « d'adaptateur » dans l'organisation membranaire (de Meyer and Smit, 2009). Cette structure plane tend à interagir préférentiellement avec les chaînes d'acides gras saturées, ce qui condense la membrane (Ikonen, 2008). De plus, le cholestérol possède une affinité particulière pour une autre classe de lipides membranaires, les sphingolipides, grâce à une

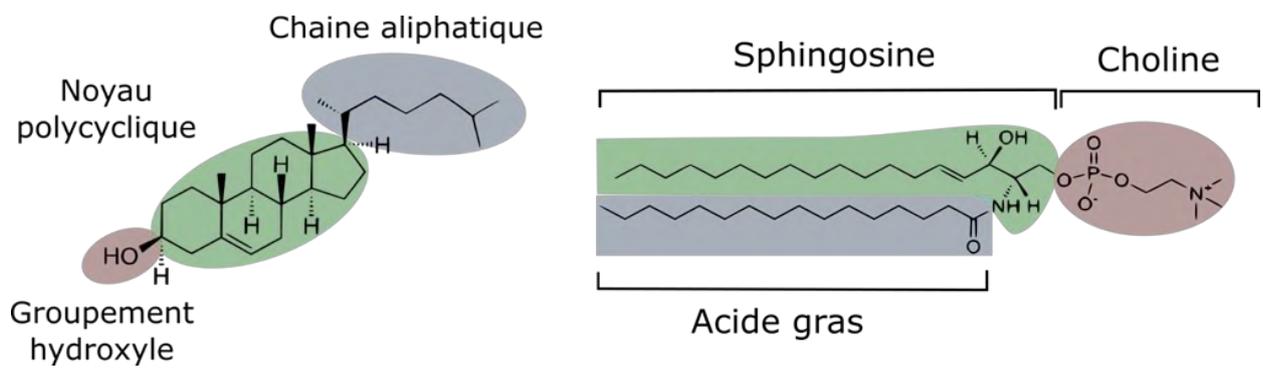


Figure 19: Structure du cholestérol et de la sphingomyéline

liaison hydrogène entre le groupement OH du cholestérol et la fonction amine du squelette sphingosine de la sphingomyéline (Ramstedt and Slotte, 1999, Sezgin *et al.*, 2017). Cette affinité aurait pour conséquence la formation de domaines enrichis en cholestérol et sphingomyéline appelés rafts, qui sont distincts en épaisseur et rigidité du reste de la membrane et les stabiliseraient. La présence du cholestérol joue donc un rôle fondamental pour la signalisation cellulaire dépendante des rafts. De plus, certains récepteurs nécessitent la présence de cholestérol pour leur activité, comme par exemple des récepteurs couplés aux protéines G (Cherezov *et al.*, 2007), ou pour leur organisation à la membrane comme pour des intégrines (Dibya *et al.*, 2010). Dans le cadre de l'infection par *M. tuberculosis*, le cholestérol a montré être nécessaire à l'entrée de la bactérie soulignant un potentiel rôle des domaines membranaires riches en cholestérol dans l'interaction avec le macrophage (Gatfield and Pieters, 2000, Peyron *et al.*, 2000).

c. Les sphingolipides

La dernière classe de lipides membranaires consiste des sphingolipides, dont la structure de base est formée par la liaison d'un acide gras avec la fonction amide de la sphingosine (Figure 19). Quand cette molécule appelée céramide porte une tête phosphocholine, le composé résultant est la sphingomyéline (SM). C'est le plus abondant des sphingolipides au sein de la membrane, retrouvé majoritairement dans le feuillet externe de la membrane plasmique (van Meer, 2008) (Figure 19A). D'autres lipides de cette famille dérivent des céramides comme les glucosyl- galactosyl- ou encore lactosyl-céramides ; d'autres possèdent des têtes polysaccharidiques plus complexes, avec notamment la présence de l'acide sialique : ce sont les glycosphingolipides, plus connus sous le nom de gangliosides (Harayama and Riezman, 2018). Tandis que la SM possède davantage un rôle dans l'organisation membranaire, les gangliosides jouent un rôle important dans la reconnaissance cellulaire et dans la signalisation, notamment au niveau des cavéoles et des rafts (Hakomori *et al.*, 1998, Ledeen and Wu, 2015). De plus, l'abondance et la composition en gangliosides varient également suivant le type cellulaire. Le ganglioside GM1, par exemple, est produit en majorité par les cellules nerveuses (Yu *et al.*, 2009) alors que dans les cellules immunitaires, notamment les macrophages, c'est le GM3 qui est majoritairement retrouvé (Yohe *et al.*, 2001). De manière plus générale, les sphingolipides jouent aussi un rôle important dans les processus d'inflammation et d'infection (Chiricozzi *et al.*, 2018).

Pour conclure, la membrane cellulaire est composée d'un grand nombre de lipides ayant une diversité importante. Cette diversité se retrouve au niveau de la distribution des lipides, différente selon les organelles de la cellule ou le tissu considéré, et aussi dans la structure-

même du lipide, notamment au niveau des chaînes d'acide gras et la tête polaire du lipide. Cette variabilité intrinsèque confère à la membrane lipidique des propriétés physiques spécifiques, alors que la diversité de composition lipidique au sein d'une membrane affecte le comportement collectif des lipides membranaires, qui dépend de l'interaction entre lipides ou entre les lipides et les protéines. Il est donc important de comprendre comment cette diversité peut affecter les fonctions cellulaires.

2) Propriétés biophysiques de la membrane et activité d'effecteurs membranaires

Une notion importante dans l'étude des membranes cellulaires est celle de la fluidité membranaire. Centrale au modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (Singer and Nicolson, 1972), la fluidité constitue néanmoins une propriété physique mal-définie (Mouritsen and Bagatolli, 2016). Elle est associée à la dynamique des lipides au sein d'une membrane. Un lipide individuel peut avoir la capacité de se déplacer latéralement (dynamique latérale), de tourner autour de son axe (dynamique rotationnelle) ou d'avoir des mouvements de faible amplitude perpendiculairement à la membrane. De plus, une molécule lipidique peut avoir des degrés de liberté internes, à cause de la flexibilité des chaînes acyles capables de changements de conformation (Dzikovski and Freed, 2008, Harayama and Riezman, 2018). La fluidité membranaire englobe ces degrés de liberté.

Au niveau membranaire, la fluidité est liée à l'état de phase de la membrane. Quand la membrane est dans l'état de phase « liquide désordonné » (L_d), elle se distingue par une fluidité élevée. Les lipides au sein de cette membrane ont une grande mobilité, à la fois sur le plan de leur dynamique latérale et rotationnelle que de la dynamique conformationnelle des chaînes d'acides gras qui peuvent avoir une grande amplitude de mouvement. Quand on diminue la température en dessous de la température de fusion, une transition de phase apparaît vers la phase « solide ordonné » (S_o), dans laquelle les lipides ont perdu à la fois leur mobilité de déplacement et de rotation et leur dynamique conformationnelle. On observe qu'il faut deux étiquettes pour distinguer ces deux états de phase, une étiquette (solide/liquide) pour décrire l'absence ou la présence de dynamique latérale et rotationnelle, et une étiquette (ordonné/désordonné) pour décrire l'absence ou la présence de la dynamique conformationnelle des chaînes d'acides gras.

En présence de cholestérol, un état intermédiaire peut advenir dans lequel les lipides conservent une grande mobilité latérale mais perdent la liberté de mouvement des chaînes acyles qui ont un haut degré d'ordre conformationnel. Cet état est appelé « liquide ordonné »

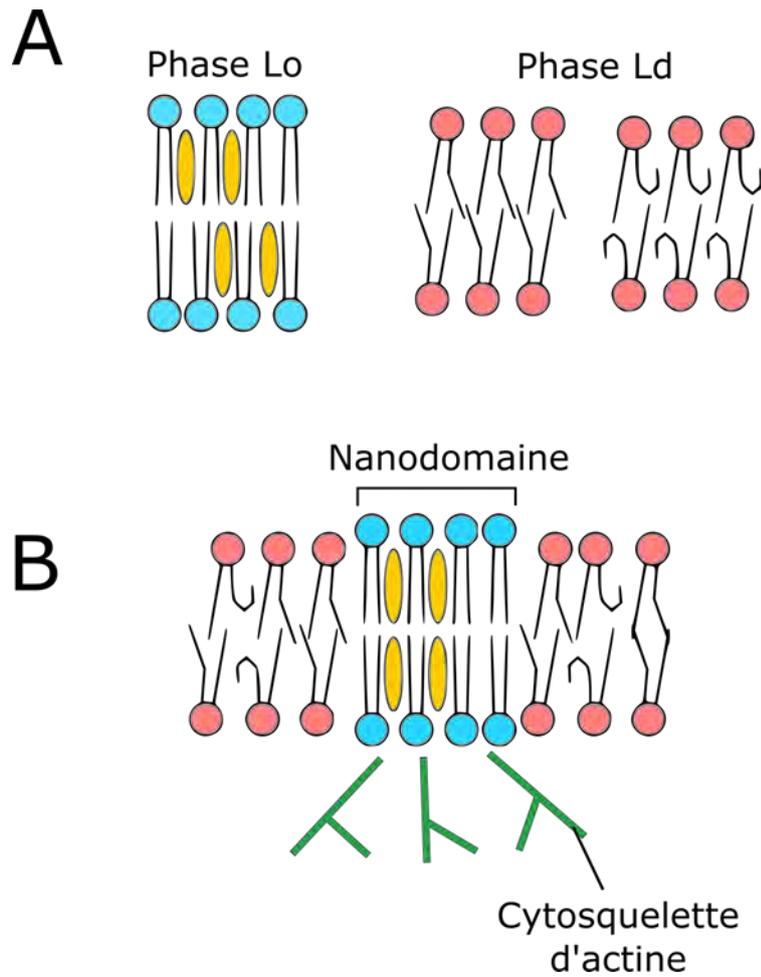


Figure 20: (A) Modèles des phase membranaires liquides ordonnées et liquides désordonnées. (B) Modèle représentatif de la structure d'un nanodomaine ou raft. Adapté de Harayama and Riezman, 2018

(L_o) (Ipsen *et al.*, 1987). Il est dû à la géométrie moléculaire du cholestérol, une molécule plane et hydrophobe. Par conséquent, le cholestérol interagit avec les chaînes d'acide gras et a tendance à les orienter et allonger. Cette interaction est importante avec les acides gras saturés mais moindre pour les acides gras comportant des insaturations qui introduisent des « kinks » dans la chaîne. La phase liquide ordonnée (L_o) se caractérise donc notamment par l'abondance de cholestérol et de lipides aux chaînes d'acides gras saturées (Figure 20).

Au niveau cellulaire et tissulaire, les cellules contrôlent l'état de phase membranaire en régulant le taux de cholestérol et de sphingomyéline, ainsi que le nombre d'insaturations dans la chaîne des phospholipides (Antonny *et al.*, 2015, van Meer *et al.*, 2008). La membrane plasmique riche en cholestérol, sphingomyéline et en acide gras saturé est majoritairement dans un état L_o, alors que les compartiments intracellulaires moins riches en cholestérol et en acides gras saturés sont en majorité en phase L_d. Cette caractéristique a pu être confirmée expérimentalement, notamment par fluorescence, en utilisant des sondes lipidiques sensibles à l'état de phase membranaire (Golfetto *et al.*, 2013, Mazeret *et al.*, 2017, Niko *et al.*, 2016).

Les différences de fluidité membranaire et leur régulation jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, par exemple dans le trafic vésiculaire. En effet, une altération dans la composition membranaire, notamment une augmentation des phospholipides à acides gras saturés, peut entraîner une perturbation de ce trafic vésiculaire intracellulaire (Payet *et al.*, 2013). A l'inverse, il a été montré qu'un apport en lipides polyinsaturés peut modifier les propriétés membranaires et faciliter des événements d'endocytose (Pinot *et al.*, 2014). La fluidité membranaire peut également impacter l'activité de protéines localisées à la membrane. Un exemple connu est celui de la rhodopsine, un récepteur couplé aux protéines G, qui nécessite la présence d'acide gras polyinsaturés autour de sa partie transmembranaire afin de permettre une flexibilité du récepteur suffisante pour induire la transduction du signal (Grossfield *et al.*, 2006).

Néanmoins, il est généralement admis que les deux phases L_o et L_d coexistent de manière hétérogène dans la membrane plasmique (Harayama and Riezman, 2018, Nicolson, 2014, Suzuki, 2015, van Meer *et al.*, 2008). Cette hétérogénéité amène la notion de microdomaines membranaires, ou rafts (Simons and Ikonen, 1997), riches en cholestérol et en lipides saturés, en particulier la sphingomyéline (Figure 18). Ces domaines membranaires sont importants, notamment dans la régulation des voies de signalisation. Par exemple, des récepteurs de l'immunité comme le récepteur aux immunoglobulines E, le récepteur des cellules T et B sont retrouvés dans des rafts après leur activation (Dinic *et al.*, 2015, Sezgin *et al.*, 2017, Stone *et al.*, 2017). Les intégrines aussi sont connues pour s'assembler dans ces rafts après activation (Leitinger and Hogg, 2002). De manière intéressante, le récepteur

au complément CR3, qui appartient à la famille des intégrines, nécessite une localisation dans ces rafts pour la phagocytose non-opsonique (Nakayama *et al.*, 2008).

En résumé, la composition des membranes ainsi que leurs propriétés physiques sont essentielles à l'homéostasie cellulaire. Il est envisageable qu'une modification de cette composition lipidique suite au transfert de lipides de *M. tuberculosis* vers certaines membranes du macrophage pourrait avoir des conséquences sur ses réponses bactéricides.

V. Projet de recherche

1) Hypothèse de travail

Une étude antérieure de l'équipe a pu mettre en évidence que les DIM présents à la surface des mycobactéries induisent une baisse de la polarité membranaire lorsque *M. bovis* BCG est mise en contact avec des macrophages (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009) (Figure 21). Dans la même étude, cette baisse de polarité a également été constatée dans des liposomes contenant des DIM (Figure 21). La polarité membranaire est liée à la présence de molécules d'eau au sein de la membrane : elle augmente quand l'eau pénètre plus facilement dans la membrane et baisse quand l'eau en est exclue (Perochon *et al.*, 1992). Par conséquent, la polarité membranaire est généralement associée à l'état de phase de la membrane, où une faible polarité traduit une membrane plus compacte ou en phase Lo. Cette baisse de polarité suggère donc une rigidification de la membrane des macrophages par les DIM. Cette réorganisation membranaire pourrait expliquer le rôle pléiotropique des DIM sur le trafic intracellulaire de la bactérie et sur l'activité d'effecteurs membranaires de l'hôte. En effet, à la membrane plasmique du macrophage les DIM modulent l'internalisation de la bactérie médiée par le récepteur au complément CR3 et le RM (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). De plus, l'effet des DIM sur le CR3 dépend de la présence de cholestérol à la membrane plasmique. Si la membrane est déplétée en cholestérol, la présence ou absence des DIM n'influence plus l'internalisation de la bactérie, ce qui suggère que les DIM altèrent des structures membranaires riches en cholestérol. Les DIM préviennent aussi l'adressage de la pompe à protons H⁺ V-ATPase au phagosome (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Passemar *et al.*, 2014). A l'instar du LAM, cet effet pourrait suggérer une inhibition de la fusion du phagosome avec les lysosomes par une perturbation de l'organisation membranaire. Enfin, des données préliminaires obtenues avant le début de ce projet semblent montrer l'implication des DIM dans l'induction de dommages membranaires au phagosome par le facteur de virulence ESAT-6 (Roland Brosch, communication personnelle). Là encore, les DIM affecteraient l'activité d'une protéine agissant sur la

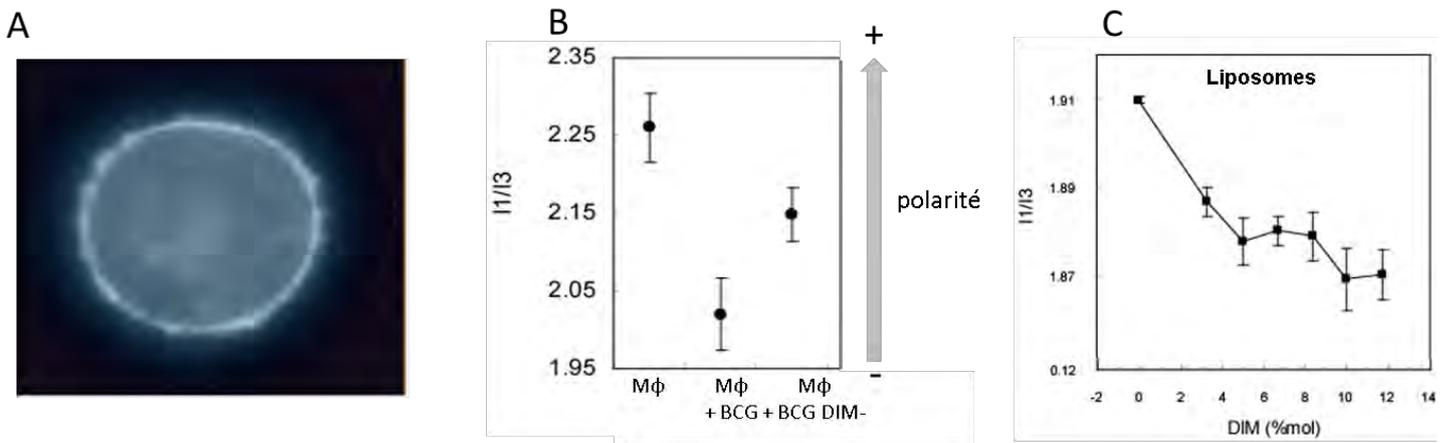


Figure 21: Les DIM diminuent la polarité membranaire (adapté de Astarie-Dequeker et al., 2009).

(A) Cliché d'un macrophage marqué au Py-Met-Chol, une sonde lipidique sensible à la polarité membranaire. (B) Le contact des macrophages (Mφ) avec la souche vaccinale BCG diminue la polarité membranaire qui n'est que partielle avec la souche BCG DIM-. (C) La baisse de la polarité membranaire dépend de la concentration des DIM dans la membrane des liposomes.

membrane, ce qui renforce l'idée que la modification de la fluidité membranaire induite par les DIM est le mécanisme par lequel ils modulent la virulence de *M. tuberculosis*.

L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer un modèle d'étude (Figure 22) selon lequel les DIM sont transférés de la surface de la bactérie au macrophage et s'insèrent dans la membrane plasmique ou phagosomale. Cette insertion induit une altération de l'organisation membranaire qui affecte l'activité d'effecteurs membranaires de l'hôte, comme le CR3 et la pompe à protons H⁺ V-ATPase, et d'une protéine bactérienne comme le facteur de virulence ESAT-6. Par ce mécanisme, les DIM favoriseraient la survie et le développement de la bactérie dans le macrophage (Figure 22).

2) [Projet de recherche](#)

Au cours de ces dernières années, les principaux acteurs bactériens impliqués dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* ont été identifiés, parmi lesquels des lipides complexes et uniques au genre mycobacterium, localisés dans les couches externes de l'enveloppe : les DIM. Outre leur rôle dans la structuration de la paroi, ces lipides sont des facteurs majeurs de virulence. Pourtant, en dépit de leur rôle clé, le mode d'action des DIM reste encore mal connu. Le projet de thèse vise à poursuivre l'étude de leur rôle dans la subversion de la réponse immunitaire de l'hôte en se focalisant sur le dialogue de *M. tuberculosis* avec les macrophages, et à identifier les mécanismes moléculaires d'action des DIM.

Le projet de thèse s'appuie sur le modèle d'étude décrit ci-dessus et s'articule autour de deux grands axes :

1) L'étude du rôle des DIM dans la rupture du phagosome bactérien et dans l'induction de la mort du macrophage, car ces deux événements sont souvent associés et pourraient contribuer à la dissémination de *M. tuberculosis* aux cellules environnantes.

2) Caractériser plus en détail l'impact des DIM sur les propriétés biophysiques de la membrane du macrophage et comprendre comment cet effet module l'activité d'effecteurs membranaires, en particulier le facteur de virulence ESAT-6. Le décryptage de la collaboration de ces deux facteurs majeurs de virulence doit permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes infectieux de *M. tuberculosis*, et d'identifier un mécanisme d'action original.

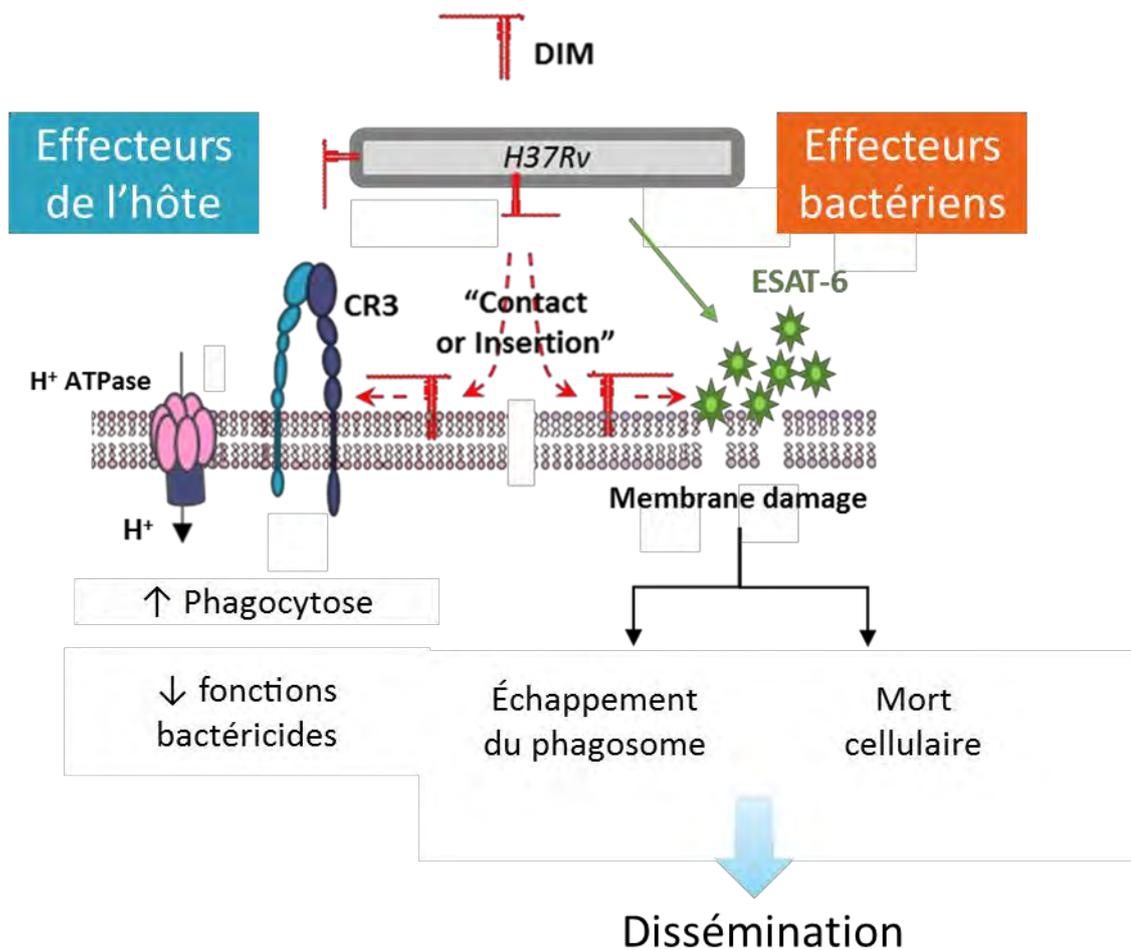


Figure 22 : Modèle du mécanisme d'action des DIM dans le trafic intracellulaire de *M. tuberculosis* (adapté de (Arbues et al., 2014))

Selon le modèle, les DIM présents à la surface de la bactérie sont transférés de la bactérie aux membranes du macrophage et s'y insèrent. Leur présence dans la membrane provoque une baisse de polarité membranaire qui module l'activité d'effecteurs membranaires de l'hôte, comme le CR3 et la pompe H⁺-V ATPase favorisant ainsi la survie de *M. tuberculosis* au sein du macrophage. Les DIM module également l'activité membranolytique d'ESAT-6 au niveau du phagosome, favorisant l'induction de dommages membranaires et la rupture phagosomale, permettant ainsi l'échappement de *M. tuberculosis* dans le cytosol. La rupture phagosomale est également associée à l'induction de la mort de la cellule hôte qui permet la dissémination de la bactérie aux cellules environnantes.

Résultats et Discussion

I. Etude du rôle des DIM la rupture du phagosome, et la mort des macrophages infectés

1) Contexte de l'étude et objectifs

La présence de DIM à la surface de *M. tuberculosis* permet de déjouer les réponses bactéricides du macrophage humain, rendant la cellule hôte permissive à la réplication du bacille (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Passemar *et al.*, 2014). Pour ce faire, les DIM préviennent l'accumulation du bacille dans un phagolysosome et favorisent le maintien de la bactérie dans un phagosome faiblement acide en empêchant l'acquisition de la pompe H⁺-ATPase (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Passemar *et al.*, 2014). Cette inhibition est une étape critique dans la stratégie de survie de *M. tuberculosis* au sein des macrophages. Cependant une proportion non négligeable de bactéries est retrouvée dans un compartiment acide (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Harris *et al.*, 2008, Levitte *et al.*, 2016, Pethe *et al.*, 2004). Certaines souches de *M. tuberculosis* sont tolérantes au pH acide et se multiplient dans un phagolysosome. Les travaux de l'équipe montrent que la sensibilité de *M. tuberculosis* au pH *in vitro*, ne requiert pas la présence des DIM (Passemar *et al.*, 2014).

M. tuberculosis est également capable de s'échapper de l'environnement du phagosome et de s'accumuler dans le cytosol (van der Wel *et al.*, 2007). Ce contact cytosolique lui permet d'avoir accès à des médiateurs cytosoliques de l'autophagie (Romagnoli *et al.*, 2014, Watson *et al.*, 2012), de la mort cellulaire et de la sécrétion de cytokines (van der Wel *et al.*, 2007, Simeone *et al.*, 2012, Welin *et al.*, 2011). Le contrôle de la rupture du phagosome au niveau moléculaire est encore peu caractérisé. Néanmoins, il a été montré que la perméabilisation membranaire du phagosome par la bactérie nécessite l'expression du système de sécrétion ESX-1 et de sa protéine effectrice ESAT-6/EsxA. Des études conduites *in vitro* montrent qu'ESAT-6 altère l'intégrité de membranes artificielles et biologiques et provoque une lyse cellulaire en perméabilisant les membranes (Stanley and Cox, 2013). Des travaux récents ont montré une relation directe entre l'activité membranolytique et rupture phagosomale en introduisant une mutation ponctuelle dans la séquence d'ESAT-6 (Zhang *et al.*, 2016). Les auteurs montrent qu'une mutation de la Glutamine 5 en Lysine diminue à la fois l'activité membranolytique d'ESAT-6 *in vitro*, et la capacité du bacille à induire la rupture phagosomale et à se disséminer *in vivo*.

Au démarrage du projet, une étude exploratoire menée par nos collaborateurs de l'institut Pasteur Paris (équipe R. Brosch) indiquait que la perte de DIM dans une souche vaccinale BCG recombinante exprimant ESAT-6 atténue la capacité du bacille à induire une rupture du phagosome, ce qui suggèrerait que l'activité membranolytique d'ESAT-6 nécessite la présence des DIM à la surface du bacille. De plus, ESAT-6 partage avec les DIM la propriété d'induire la mort des macrophages infectés et de participer à la propagation du bacille aux cellules environnantes (Passemar *et al.*, 2014, Aguiló *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces données nous a conduit à rechercher si les DIM sont impliqués dans la rupture du phagosome des macrophages et si oui, est-ce qu'ils collaborent avec ESAT-6 et le système de sécrétion ESX-1. Nous avons également cherché à approfondir notre compréhension du rôle des DIM dans l'induction de la mort des macrophages.

2) [Résultats](#)

Article

“ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis”

Jacques Augenreich, Ainhoa Arbues, Roxane Simeone, Evert Haanappel, Alice Wegener, Fadel Sayes, Fabien Le Chevalier, Christian Chalut, Wladimir Malaga, Christophe Guilhot, Roland Brosch and Catherine Astarie-Dequeker.

Cellular Microbiology, 2017, 19:e12726. doi: 10.1111/cmi.12726.

J.A., E.H., et C.A.D., ont conçu les expériences de fuite de calcéine.

J.A. a réalisé les expériences de l'étude de l'activité membranolytique d'ESAT-6 sur liposomes, et a contribué aux expériences de l'analyse de la mort cellulaire induite par *M. tuberculosis*

RESEARCH ARTICLE

ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis

Jacques Augenstreich^{1*} | Ainhoa Arbues^{1*} | Roxane Simeone^{2*} | Evert Haanappel¹ | Alice Wegener¹ | Fadel Sayes² | Fabien Le Chevalier² | Christian Chalut¹ | Wladimir Malaga¹ | Christophe Guilhot¹ | Roland Brosch² | Catherine Astarie-Dequeker¹ 

¹Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS-Université de Toulouse (UPS), Toulouse, France

²Unit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, Institut Pasteur, Paris, France

Correspondence

Roland Brosch, Institut Pasteur, Unit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, 25, Rue du Docteur Roux, F-75015 Paris Cedex 15, France.

Email: roland.brosch@pasteur.fr

Catherine Astarie-Dequeker, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), CNRS-Université de Toulouse (UPS), BP 64182, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 04, France.

Email: catherine.astarie-dequeker@ipbs.fr

Funding information

TRI-Genotoul Imaging facility (Toulouse, France); BEI Resources, NIAID, NIH; Recombinant Protein Reference Standard, NR-14868; European Community's, Grant/Award Number: TBVAC2020, 643381; Agence National de Recherche, Grant/Award Number: ANR-10-LABX-62-IBEID, ANR-14-JAMR-001-02 and ANR-16-CE15-0003; Fondation pour la Recherche Médicale FRM, Grant/Award Number: DEQ20090515399, DEQ20130326471 and ING20140129051; Centre National de la Recherche Scientifique

Summary

Although phthiocerol dimycocerosates (DIM) are major virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causative agent of human tuberculosis, little is known about their mechanism of action. Localized in the outer membrane of mycobacterial pathogens, DIM are predicted to interact with host cell membranes. Interaction with eukaryotic membranes is a property shared with another virulence factor of Mtb, the early secretory antigenic target EsxA (also known as ESAT-6). This small protein, which is secreted by the type VII secretion system ESX-1 (T7SS/ESX-1), is involved in phagosomal rupture and cell death induced by virulent mycobacteria inside host phagocytes. In this work, by the use of several knock-out or knock-in mutants of Mtb or *Mycobacterium bovis* BCG strains and different cell biological assays, we present conclusive evidence that ESX-1 and DIM act in concert to induce phagosomal membrane damage and rupture in infected macrophages, ultimately leading to host cell apoptosis. These results identify an as yet unknown function for DIM in the infection process and open up a new research field for the study of the interaction of lipid and protein virulence factors of Mtb.

KEYWORDS

ESX-1, macrophage, *Mycobacterium*, phagosomal membrane rupture, phthiocerol dimycocerosates, tuberculosis

1 | INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) is the causative agent of human tuberculosis. The ability of Mtb to infect and persist in its host is linked to multiple factors, one of which is certainly the mycobacterial cell envelope, which is unique both in its molecular composition and in the architectural arrangement of its constituents. This barrier is constituted of a classic inner membrane and an outer membrane,

whose existence was confirmed by cryo-electron microscopy (Hoffmann, Leis, Niederweis, Plitzko, & Engelhardt, 2008; Zuber et al., 2008). The outer membrane is mainly composed of mycolates and a set of noncovalently bound lipids that may include sulfatides, acyltrehaloses, trehalose mycolates, phosphatidyl-myo-inositol mannosides, and phthiocerol dimycocerosates and is surrounded by a capsule (Daffe, Crick, & Jackson, 2014; Kaur, Guerin, Skovierova, Brennan, & Jackson, 2009). Among the extractable lipids, phthiocerol dimycocerosates, referred to as PDM (Brennan & Nikaido, 1995), DIM (Camacho, Ensergueix, Perez, Gicquel, & Guilhot, 1999), or PDIM (Cox, Chen, McNeil, & Jacobs, 1999; Onwueme, Vos, Zurita,

* Jacques Augenstreich, Ainhoa Arbues, and Roxane Simeone contributed equally.

Ferreras, & Quadri, 2005) have only been found in a few slow-growing, pathogenic mycobacterial species (Brennan & Nikaido, 1995). Virulence studies in animal models have revealed that phthiocerol dimycocerosates, hereafter termed DIM are required for the multiplication of bacteria during the acute phase of infection (Cambier et al., 2014; Cox et al., 1999). This finding is in agreement with the genetic organization of the specific, more than 50 kb-spanning genomic DIM synthesis locus of slow-growing mycobacteria that contains the *ppsABCDE* gene cluster, encoding phenolphthiocerol synthesis type-I polyketide synthases, upstream of the *mas* gene, encoding a multifunctional mycocerosic acid synthase, and the *mmpL7* gene, encoding a lipid transporter essential for DIM transport to the outer cell envelope (Cole et al., 1998; Guilhot, Chalut, & Daffe, 2008). DIM are also involved in the resistance of tubercle bacilli to detergent (Camacho et al., 1999; Simeone, Constant, Guilhot, Daffe, & Chalut, 2007), a feature related to the cell envelope solidity (Ates et al., 2015; Camacho et al., 2001). Historically, the only well-established function for these specific lipids was described as a structural support for the mycobacterial cell envelope but recent progress indicates that DIM also contribute to modulation of the protective host immune responses, specifically during the early steps of infection when the bacilli encounter host macrophages (Astarie-Dequeker et al., 2009; Cambier et al., 2014; Passemar et al., 2014; Rousseau et al., 2004). For instance, DIM enhance the efficiency of Mtb to invade macrophages by strengthening the bacterial interaction with host cell phagocytic receptors (Astarie-Dequeker et al., 2009). DIM also favor intracellular bacterial replication through arrest of phagosomal acidification by excluding the vacuolar proton-ATPase from the phagosomal membrane (Astarie-Dequeker et al., 2009; Passemar et al., 2014). Finally, DIM-deficient mutants of Mtb are defective in their capacity to provoke death of macrophages (Passemar et al., 2014), a process usually associated with a loss of membrane integrity, which can eventually be repaired by the cells. For the moment, the exact molecular mechanism involved in DIM activity still remains elusive, probably because of the highly hydrophobic nature of these lipids and the inherent difficulties of working with them. Nonetheless, it was recently reported that Mtb interacts with human macrophages in a manner that induces changes in host membrane fluidity, provided that DIM are present at the bacterial surface (Astarie-Dequeker et al., 2009). Moreover, the incorporation of DIM into model liposomes was found to decrease their membrane fluidity (Astarie-Dequeker et al., 2009). These findings led us to propose a model in which DIM induce a modification of the physical state of the host membrane, and hence, influence in a global way many processes taking place at the membrane level (Arbues, Lugo-Villarino, Neyrolles, Guilhot, & Astarie-Dequeker, 2014).

Interestingly, alterations of host cell membrane during Mtb infection require another major bacterial factor, the 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6), also known as EsxA, a key effector of the ESX-1 type VII secretion system (ESX-1/T7SS). Of note, the ESX-1 system, similar to DIM, was suggested to be implicated in preventing phagosomal maturation (Tan, Lee, Alexander, Grinstein, & Liu, 2006; MacGurn & Cox, 2007) and to induce host cell death (Aguilo, Marinova, Martin, & Pardo, 2013; Aporta et al., 2012; Derrick & Morris, 2007; Simeone et al., 2012). Another remarkable membrane-affecting feature of the ESX-1 system, and EsxA, is

associated with the induction of membrane damage and phagosomal rupture (Simeone et al., 2012; Wong & Jacobs, 2011). EsxA has been predicted to insert into membranes and to lyse lipid bilayers, liposomes, and biological membranes by an as yet unknown mechanism (de Jonge et al., 2007; Gao et al., 2004; Hsu et al., 2003; Ma, Keil, & Sun, 2015; Peng & Sun, 2016), although a most recent study suggests that the process of ESX-1-mediated membrane disruption is contact-dependent and more complex than thought (Conrad et al., 2017). It remains therefore of importance to identify the potential players responsible for the reported membrane-lysing activity of Mtb that represents an essential step for establishing contact with the host cytosol (Houben et al., 2012; Simeone et al., 2012; Simeone et al., 2015; van der Wel et al., 2007; Wong & Jacobs, 2011). Indeed, cytosolic access of mycobacteria has been described as a key element in the host-pathogen interaction, involving a complex cascade of innate immune signalling that leads to production of type I interferons, inflammasome activation, and secretion of interleukins IL-1 β and IL-18 (for review, see Gröschel, Sayes, Simeone, Majlessi, & Brosch, 2016).

Taken together, these data prompted us to examine whether two of the key pathogenicity determinants of Mtb, the cell wall lipids, DIM, and the secreted mycobacterial protein, EsxA, might act in concert to circumvent innate host defences. We thus have investigated the intracellular behaviour of various mutant strains lacking DIM and EsxA functions in different cellular infection models. We employed two independent techniques that have successfully been adapted to study phagosomal membrane damage in Mtb-infected phagocytes, the first using monoclonal antibodies against Galectin-3 and ubiquitinated proteins for identification of damaged phagosomal-membranes (Paz et al., 2010; Ray et al., 2010; Wong & Jacobs, 2011) and the second using a beta-lactamase-driven Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) screen for detection of phagosomal rupture and cytosolic access of bacteria (Simeone et al., 2012; Simeone 2015). Our results clearly demonstrate that the presence of DIM at the mycobacterial cell surface is critical for phagosomal rupture and host cell apoptosis and strongly strengthen the proposal that DIM are required for optimal ESX-1 activities.

2 | RESULTS

2.1 | Mtb mutants lacking DIM are unable to induce phagosomal membrane damage and rupture in human macrophages

Using EsxA-deficient Mtb mutants that had lost their ability to induce accumulation of ubiquitinated proteins and galectin-3 as markers of phagosomal membrane damage, Wong and Jacobs recently proposed that EsxA contributes to destabilize the phagosomal membranes in infected THP-1 cells (Wong & Jacobs, 2011). We used a similar strategy for exploring whether DIM also contributed to the phagosomal membrane damage in Mtb-infected human monocyte-derived macrophages (hMDMs). First, hMDMs were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 either with

the Mtb strain H37Rv wild-type (WT) or the DIM-deficient isogenic H37Rv mutant in which the *mas* gene encoding a mycosiderin synthase involved in DIM synthesis (Azad, Sirakova, Rogers, & Kolattukudy, 1996) has been deleted (H37Rv Δ *mas*, Table S1). At 72-hr postinfection (p.i.), we found that a fraction of intracellular H37Rv were surrounded by galectin-3 and ubiquitinated proteins (Figure 1a) although the number of macrophages positively stained with these markers was relatively small (Figure 1b). We therefore tested a longer time of p.i. (144 hr) using a lower MOI of 2:1. Under these conditions, around 15% of hMDMs infected with H37Rv exhibited positive staining with the respective phagosomal damage markers (Figure 1c), suggesting that H37Rv accumulated in phagosomes with damaged membranes. By contrast, no significant accumulation of galectin-3 or ubiquitinated proteins was detected around phagosomes containing H37Rv Δ *mas*, irrespective of the MOI (2:1 or 10:1) or infection duration (72-hr or 144-hr p.i.; Figure 1a-c).

To ascertain that the absence of phagosomal damage markers in cells infected with H37Rv Δ *mas* was due to the loss of DIM, the mutant was complemented with the integrative plasmid pMAS3, carrying a DNA region covering the *mas* gene (Table S1). This complementation reconstituted the ability of the resulting strain to produce DIM (Figure S1a) and fully rescued the WT phenotype of phagosomal membrane damage (Figure 1b-c). This finding suggested that DIM are required to destabilize membranes of phagosomes containing Mtb. Next, we examined whether another lipid virulence factor, known as sulpholipids (SL; Converse et al., 2003; Passemar et al., 2014) acted in the same way. Because DIM are dominant lipid virulence factors, we took advantage of a recombinant H37Rv mutant harbouring multiple deletions in genes involved in the biosynthesis of cell wall lipids, to test the implication of SL independently of DIM (Passemar et al., 2014). As shown on Figure 1d, the DIM- and SL-deficient H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2* mutant has lost the ability to recruit galectin-3 and ubiquitinated proteins when compared to WT H37Rv. The transformation of the DIM- and SL-deficient mutant with a plasmid carrying a functional *ppsE* gene restored the production of DIM in the corresponding strain H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2*::*ppsE* (Figure S1b) and rescued the phagosomal damage phenotype of H37Rv (Figure 1d), corroborating the results shown in Figure 1b-c. On the contrary, the complementation of H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2* with the cosmid CIE526 carrying the SL gene cluster (Table S1) rescued the production of SL in H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2*::*pks2* (Figure S1b) but did not lead to phagosomal damage (Figure 1d), suggesting that in contrast to DIM, SL were not involved in the process.

To further establish the contribution of DIM in phagosomal membrane damage and eventual rupture, we applied our recently developed FRET-based phagosomal rupture assay, which is exploiting the changes in the fluorescence spectrum from green to blue caused by mycobacterial β -lactamase-mediated cleavage of coumarin-cephalosporin-fluorescein (CCF-4) upon mycobacterial cytosolic contact. For these experiments, human THP-1 macrophage-like cells were employed, which were used with success to study mycobacteria-induced phagosomal rupture (Simeone et al., 2012; Simeone et al., 2015). We analyzed the intracellular behaviour

of various DIM-proficient and DIM-deficient recombinant H37Rv strains compared to the H37Rv parental strain as a positive control and an H37Rv Δ ESX-1 mutant as a negative control (Hsu et al., 2003; Simeone et al., 2012). As shown in Figure 2a-b, the DIM-deficient H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2* showed no green to blue shift at 72-hr and 144-hr p.i. in three independent experiments, indicating that this strain was unable to establish cytosolic contact and remained in an intact phago-vacuole throughout the experimental period (144-hr p.i.), similar to the H37Rv Δ ESX-1 negative control. In contrast, the complementation of H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2*, with a vector that restored the production of DIM, fully complemented the ability of the resulting recombinant strain H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2*::*ppsE* to cause phagosomal rupture in THP-1 cells (Figure 2a-b). These results were corroborated by the calculation of the mean fluorescence intensities of the blue signal (MFI 447 nm; Figure 2a-b). Consistently, the DIM-deficient H37Rv Δ *mas* showed no green-to-blue change at 72-hr and 144-hr p.i. (Figure 2c-d). Together, these findings strongly suggest that Mtb exploits surface-exposed DIM to destabilize the phagosome and induce phagosomal rupture in infected human macrophages.

2.2 | Prevention of phagosomal acidification is not sufficient to rescue the defect of Mtb mutants lacking DIM to cause phagosomal membrane damage

It is well accepted that DIM-deficient mutants of Mtb end up in an acidified vacuolar compartment (Astarie-Dequeker et al., 2009; Pethe et al., 2004; Stewart, Patel, Robertson, Rae, & Young, 2005). On the other hand, we have observed that restriction of phagosomal acidification was a prerequisite for mycobacterial phagosomal rupture and cytosolic contact (Simeone et al., 2015). We thus sought to investigate whether the absence of phagosomal membrane damage observed with DIM-deficient Mtb mutants was linked to their inability to control the acidification of the phagosomal lumen. For this, we pretreated hMDMs with the specific proton-ATPase inhibitor bafilomycin A1, a procedure that prevents acidification of phagosomes containing DIM-deficient Mtb mutants (Passemar et al., 2014). Next, we examined whether treatment with bafilomycin A1 was able to compensate the defect of DIM-deficient Mtb mutants to provoke phagosomal damage. At 72-hr p.i., we observed that bafilomycin A1 treatment enhanced phagosomal membrane damage induced by both H37Rv and the DIM-deficient H37Rv Δ *mas* (Figure 3a-b). This confirms that prevention of phagosomal acidification is a prerequisite for phagosomal membrane damage in macrophages infected with Mtb (Simeone et al., 2015). However, bafilomycin A1 treatment did not abolish the differences in response between H37Rv and H37Rv Δ *mas*, at 72-hr p.i. and beyond, up to 144-hr p.i. (Figure 3a-b). A similar tendency was observed with the (DIM and SL)-deficient H37Rv Δ *ppsE*, Δ *pks2* (Figure S2a). Importantly, bafilomycin A1 treatment restored the growth capacity of a DIM-deficient mutant inside the host cells, approaching that of the WT H37Rv (Figure 3b and Figure S2b) as described (Passemar et al., 2014). Thus, the observed differences in the ability of WT and DIM-deficient Mtb strains to affect

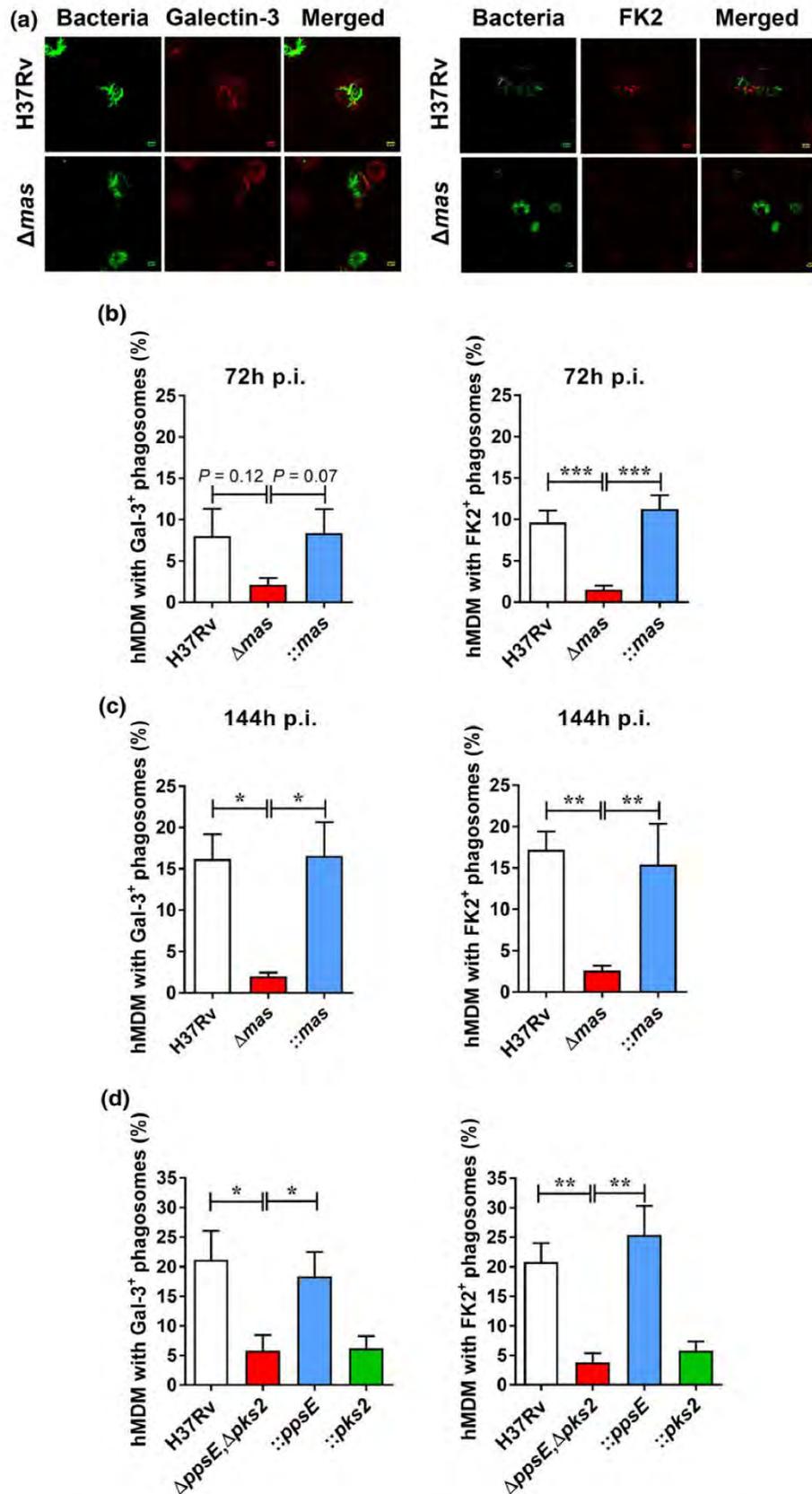


FIGURE 1 Mtb mutants lacking DIM are unable to induce phagosomal damage in hMDMs. Cells were infected for 1 hr with the indicated GFP-expressing Mtb strains at the required MOI. At (a-b) 72-hr p.i. (MOI 10:1) and (c-d) 144-hr p.i. (MOI 2:1), macrophages were fixed, immunostained with mAbs against galectin-3 and ubiquitinated proteins (FK2) and examined by fluorescence microscopy. (a) A confocal image at 72-hr p.i. indicated that some H37Rv (green) reside in galectin-3 and FK2-positive phagosomes (red) while DIM-deficient H37RvΔmas (green) do not. Scale bars, 5 μm. (b-d) For each marker, the percentage of infected hMDMs having at least one positively-stained phagosome was determined. The values reported are mean ± SEM of five to eight independent experiments. The significance of difference between strains was evaluated; * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .005$. DIM = phthiocerol dimycocerosates; GFP = green fluorescent protein; hMDMs = human monocyte-derived macrophages; MOI = multiplicity of infection

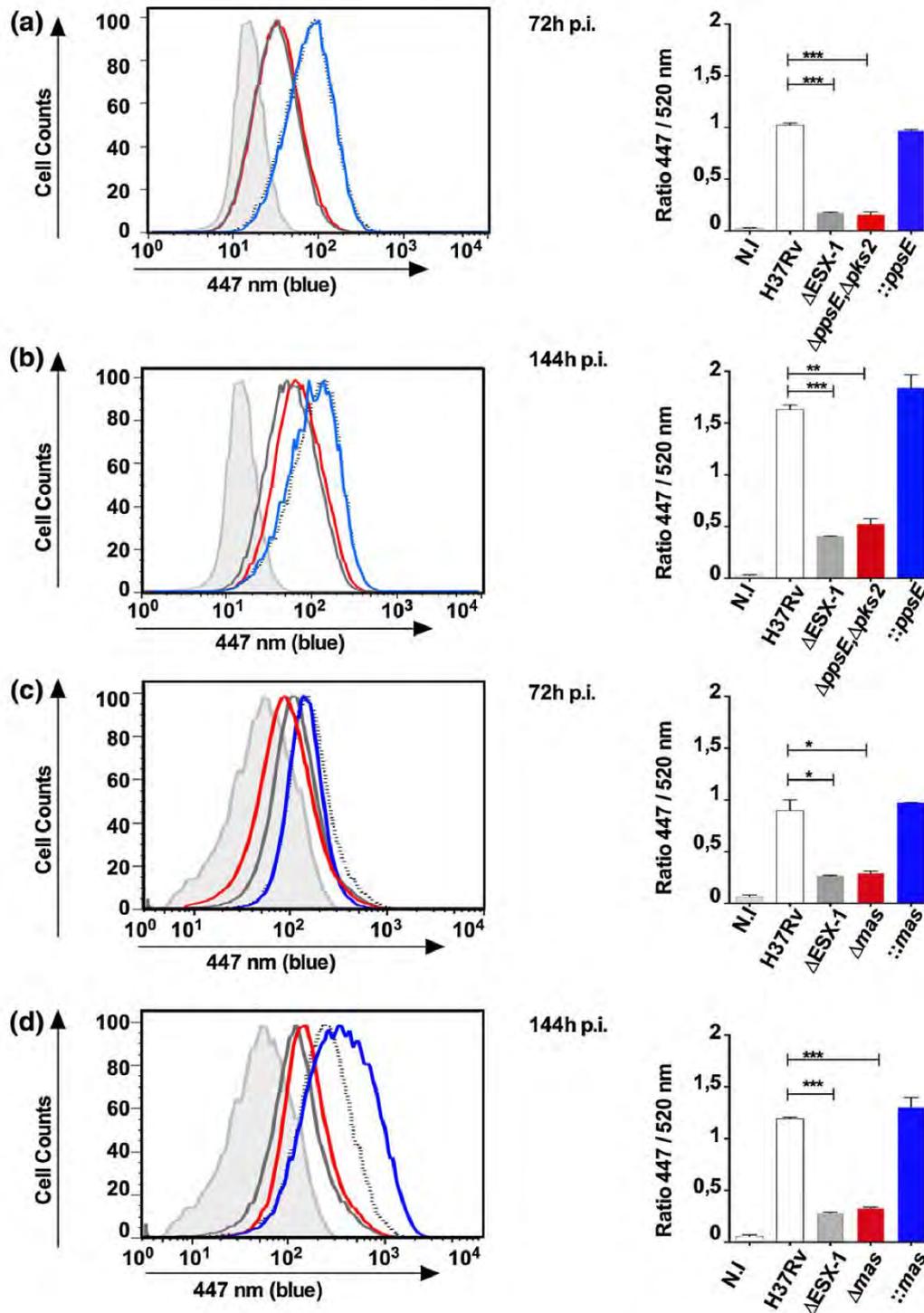


FIGURE 2 Mtb mutants lacking DIM are unable to induce phagosomal membrane rupture in THP-1 cells. Phagosomal rupture detected by CCF-4 FRET-based flow cytometry (Simeone et al., 2015). Differentiated THP-1 cells were infected for 2 hr with Mtb H37Rv WT (black dotted line), MtbΔESX-1 (grey line), MtbΔppsE,Δpks2 (red line) and the complemented MtbΔppsE,Δpks2::ppsE strain at MOI 1:1. At (a,c) 72-hr p.i. and (b,d) 144-hr p.i., cells were successively stained with CCF-4 and anti-CD11b mAbs, fixed, and their green (520 nm) versus blue (447 nm) fluorescent signals were analyzed after gating on CD11b⁺ cells. Note that gating on CD11b⁺ cell was applied to focus on the macrophage-like cell population. In the left panels, results are depicted as signal overlays of different groups. Results from uninfected cells are shown as filled curve. Right panels show ratios of fluorescence intensities MFI 447 nm/MFI 520 nm of blue signals from two to three independent experiments. The significance of difference between strains was evaluated; * $p < .05$, ** $p < .01$. DIM = phthiocerol dimycocerosates; Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*

membrane integrity are likely not linked to the intracellular growth defect of DIM-deficient mutants. While these data confirmed a certain association between intraphagosomal pH and phagosomal

membrane integrity, they also suggest that DIM enhance phagosomal membrane damage by an additional, yet unknown mechanism.

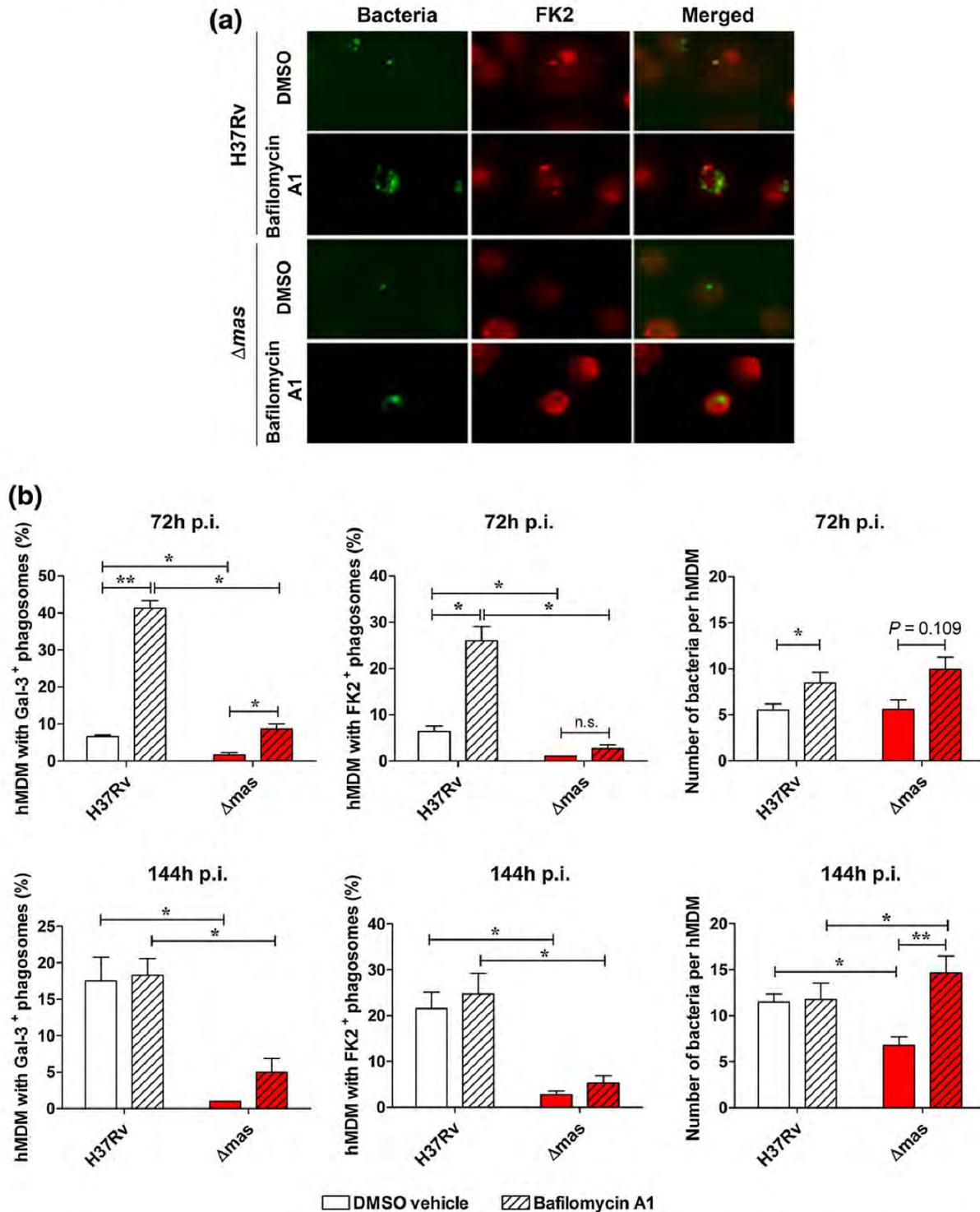


FIGURE 3 Bafilomycin A1 treatment is insufficient to restore the ability of Mtb mutant lacking DIM to damage phagosomal membrane. One hour before infection and until the end of the p.i., hMDMs were treated for with 100 nM bafilomycin A1 or vehicle control (DMSO). Cells were infected for 1 hr with the indicated GFP-expressing Mtb strains, fixed at (a,b) 72-hr p.i. (MOI 10:1) or (b) 144-hr p.i. (MOI 2:1), immunostained with mAbs against galectin-3 and ubiquitinated proteins (FK2) and examined by fluorescence microscopy. (a) A representative epifluorescence image at 72-hr p.i. of macrophages treated or untreated with bafilomycin A1 and then infected with H37Rv and DIM-deficient H37Rv Δmas . (b) For each marker, the percentage of infected hMDMs having at least one positively stained phagosome was determined (left and middle panels). The bacterial load was assessed by counting the number of fluorescent bacteria per cell (right panels). The values reported are the mean \pm SEM of three to four independent experiments. The significance of difference between strains was evaluated; * $p < .05$, ** $p < .01$. DIM = phthiocerol dimycocerosates; GFP = green fluorescent protein; hMDMs = human monocyte-derived macrophages; MOI = multiplicity of infection; Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*; n.s. = non-significant

2.3 | The loss of DIM is accompanied by a decrease in the ability of EsxA to induce phagosomal membrane damage

A previous study has established that phagosomal membrane damage is mediated by the ESX-1 system and requires the membranolytic activity of EsxA (Wong & Jacobs, 2011). To verify the activity of EsxA under our experimental conditions, we constructed an EsxA-deficient mutant in the same genetic background as the DIM-deficient mutant, that is, the Mtb H37Rv Pasteur strain (Table S1 and Figure S3a). As expected, the resulting H37RvΔesxA no longer caused recruitment of galectin-3 and ubiquitinated

proteins to phagosomes at 144-hr p.i. (Figure 4a). Complementation with the plasmid pMV361 derivative containing the *esxB* and *esxA* genes (Table S1) reconstituted the ability of H37RvΔesxA to secrete EsxA (Figure S3a) and to accumulate markers around their phagosomes (Figure 4a). These data confirmed that EsxA by itself is critical to destabilize phagosomal membranes. Nonetheless, EsxA-deficient H37RvΔesxA displayed the same defect in phagosomal membrane damage as a DIM-deficient H37RvΔmas, (Figure 4a). Thus, the destabilization of phagosomal membranes by H37Rv apparently required the presence of both DIM and EsxA. This prompted us to examine the impact of single and double deficiency in DIM and EsxA.

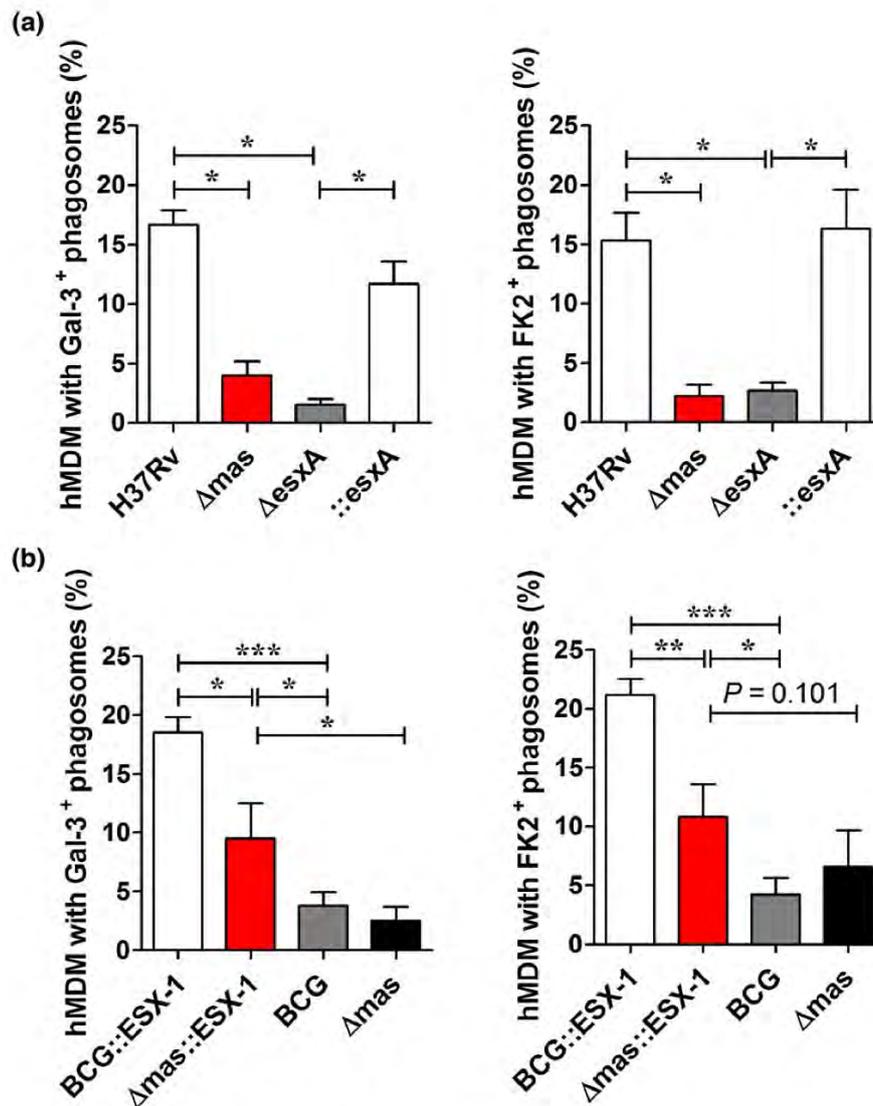


FIGURE 4 Deficiency in DIM affects the capacity of ESX-1-proficient mycobacterial strains to induce membrane damage in hMDMs. The cells were infected for 1 hr with GFP-expressing WT and recombinant mycobacterial strains at MOI 2:1. At 144-hr p.i., hMDMs were fixed, immunostained with mAbs against galectin-3 and ubiquitinated proteins (FK2) and examined by fluorescence microscopy. (a) hMDMs were infected with H37Rv, DIM-deficient mutant, EsxA-deficient mutant and the corresponding complemented strain. (b) hMDMs were infected with *M. bovis* BCG Pasteur and the recombinant strains expressing different combinations of DIM and ESX-1. For each marker, the percentage of infected hMDMs having at least one positively stained phagosome was determined. The values reported are the mean ± SEM of three to five independent experiments. The significance of difference between strains was evaluated; **p* < .05, ***p* < .01. BCG = Bacillus Calmette-Guérin; DIM = phthiocerol dimycocerosates; GFP = green fluorescent protein; hMDMs = human monocyte-derived macrophages; MOI = multiplicity of infection; n.s. = non-significant; WT = wild-type

We took advantage of the *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine strain, which naturally lacks the ESX-1 secretion system, to produce a BCG Δ mas mutant doubly deficient in DIM and EsxA. ESX-1 complementation of DIM-proficient BCG WT or the isogenic DIM-deficient BCG Δ mas mutant was obtained by integrating into the *attB* site the 2F9 integrating cosmid containing the extended region of difference 1 (RD1) from Mtb (Table S1), which was used to restore EsxA secretion in BCG::ESX-1 Pasteur (Pym, Brodin, Brosch, Huerre, & Cole, 2002; Simeone et al., 2012). The generated BCG Pasteur recombinant strains were DIM-proficient or DIM-deficient and both secreted EsxA (Figure S3a). This collection of mutants was then put in contact with hMDMs at MOI 2:1 for 1 hr and their capacity to induce phagosomal membrane damage was compared at 144-hr p.i. First, we confirmed that ESX-1 is essential to destabilize phagosomal membranes. Indeed, ESX-1 complementation conferred to both DIM-proficient and DIM-deficient BCG some capacity of recruiting galectin-3 and ubiquitinated proteins when compared to isogenic ESX-1-deficient parental strains, which were totally inefficient (Figure 4b). However, we observed that DIM-proficient BCG::ESX-1 strains recruited markers to the phagosome in a much higher extent than DIM-deficient BCG::ESX-1 (Figure 4b), suggesting that DIM exert a potentiating effect on EsxA activity.

To further explore this finding, we compared the ability of these DIM-proficient and DIM-deficient BCG::ESX-1 strains to induce phagosomal rupture in infected THP-1 cells. Flow-cytometric evaluation of the green-to-blue shifts showed that DIM-proficient BCG::ESX-1 mutants induced stronger green-to-blue changes than DIM-deficient BCG::ESX-1 strains (Figure 5a-b). Finally, we chose to examine BCG strains from other genetic backgrounds that were reported to be DIM-deficient (Chen, Islam, Ren, & Liu, 2007). Indeed, previous analyses have shown that the BCG vaccine strains, BCG Moreau and BCG Japan were naturally deficient in DIM production due to deletions or mutations occurred in the genetic region encoding the enzymes for DIM synthesis (Chen et al., 2007; Gomes et al., 2011; Naka et al., 2011). These two strains were complemented with the ESX-1 secretion system carried by the 2F9 cosmid (Table S1). Successful restoration of ESX-1 functions in BCG::ESX-1 Moreau and BCG::ESX-1 Japan was confirmed by western blotting (Figure S3b) and by induction of EsxA-specific responses in T cell hybridoma and splenocytes of Mtb-infected C57BL/6 mice (Figure S4). For these ESX-1 complemented BCG strains of various strain subtypes, we chose to assess the induction of phagosomal rupture in our flow-cytometric assay at 96-hr and 120-hr p.i. As shown in Figure 5c-d, there was a clear difference observed between DIM-proficient BCG::ESX-1 Pasteur and the two DIM-deficient BCG::ESX-1 Moreau and Japan. While BCG::ESX-1 Pasteur strongly induced phagosomal rupture, as indicated by the clear-cut green-to-blue emission shift of infected THP-1 cells, BCG::ESX-1 Moreau and Japan showed similar values as parental BCG Pasteur, which is unable to induce phagosomal rupture.

Altogether, these results indicate that during mycobacterial infection, the production of DIM is critical for the induction of phagosomal rupture in human macrophages in cooperation with appropriate ESX-1 functions.

2.4 | DIM modulate the membrane permeabilizing activity of EsxA depending on membrane lipid composition

We next sought to explore how DIM might influence the permeabilizing activity of EsxA, and hypothesized that the effect of DIM could be linked to altering the fluidity of the host cell membrane (Astarie-Dequeker et al., 2009). Previous studies have shown that purified protein preparations of EsxA from Mtb (also known as MtbESAT-6) exhibit membranolytic activity in model membranes (de Jonge et al., 2007; De Leon et al., 2012; Hsu et al., 2003; Smith et al., 2008) and seem to require a direct interaction of the protein with the membranes (De Leon et al., 2012). Building on these data, we studied the influence of DIM on the permeabilizing activity of EsxA by performing a conventional assay based on the leakage of calcein from large unilamellar vesicles (LUV; de Jonge et al., 2007; De Leon et al., 2012; Hsu et al., 2003; Smith et al., 2008). The use of LUV with various lipid compositions allowed us to test the influence of membrane fluidity. Calcein is self-quenched at high concentration inside LUV, and becomes fluorescent when released into the medium after membrane permeabilization, leading to a fluorescence increase. The level of permeabilization can be quantified as a percentage of leakage after complete lysis of liposomes by adding Triton X-100.

To approximate the lipid composition of cellular membranes, we first produced LUV with lipids extracted from crude membranes of THP-1 cells, either without DIM or complemented with 10% (mol/mol) DIM. THP-1 LUV were then incubated with recombinant purified EsxA and the calcein fluorescence was measured. Whereas addition of 10 μ M of EsxA to THP-1 LUV without DIM led to some increase of the fluorescence (Figure 6a), reflecting a partial lysis of the membranes, a substantially higher fluorescence was obtained for DIM-containing LUV (Figure 6a). As depicted in Figure 6b, the presence of DIM increased by $27 \pm 15\%$ the calcein leakage induced by EsxA. These data indicated that DIM have a potentiating effect on the lytic activity of EsxA in THP-1-LUV. This is consistent with the above-described concerted activity of DIM and EsxA in the induction of phagosomal membrane damage in hMDMs and THP-1 cells (Figures 4 and 5).

However, from previous studies, it is also known that DIM modify the biophysical properties of membranes and that their presence rigidifies fluid membranes as well as THP-1 plasma membranes (Astarie-Dequeker et al., 2009). To test whether DIM-dependent rigidification was impacting EsxA activity, we repeated the calcein leakage experiments using LUV with simpler lipid compositions and different membrane fluidities (Figure S5). Here, we noticed that overall the lytic efficiency of EsxA diminished with decreasing membrane fluidity (Figure S6) similar to results from studies on pore-forming proteins whose activity generally decreases in more rigid membranes (for review, see (Ros & Garcia-Saez, 2015)). Moreover, we observed in the more fluid membranes that the incorporation of DIM decreased the lytic activity of EsxA (Figure S6) with an averaged effect of $20 \pm 6\%$ (Figure 6b), consistent with our earlier report that DIM rigidify fluid membranes (Astarie-Dequeker et al., 2009). However, for membranes that were already rigid before the incorporation of DIM, an opposite effect was observed (Figure 6b). For these rigid membranes, such as the membranes with a lipid mixture of THP-1 cells, the addition of DIM even stimulated the activity of EsxA (Figure S6 and Figure 6b).

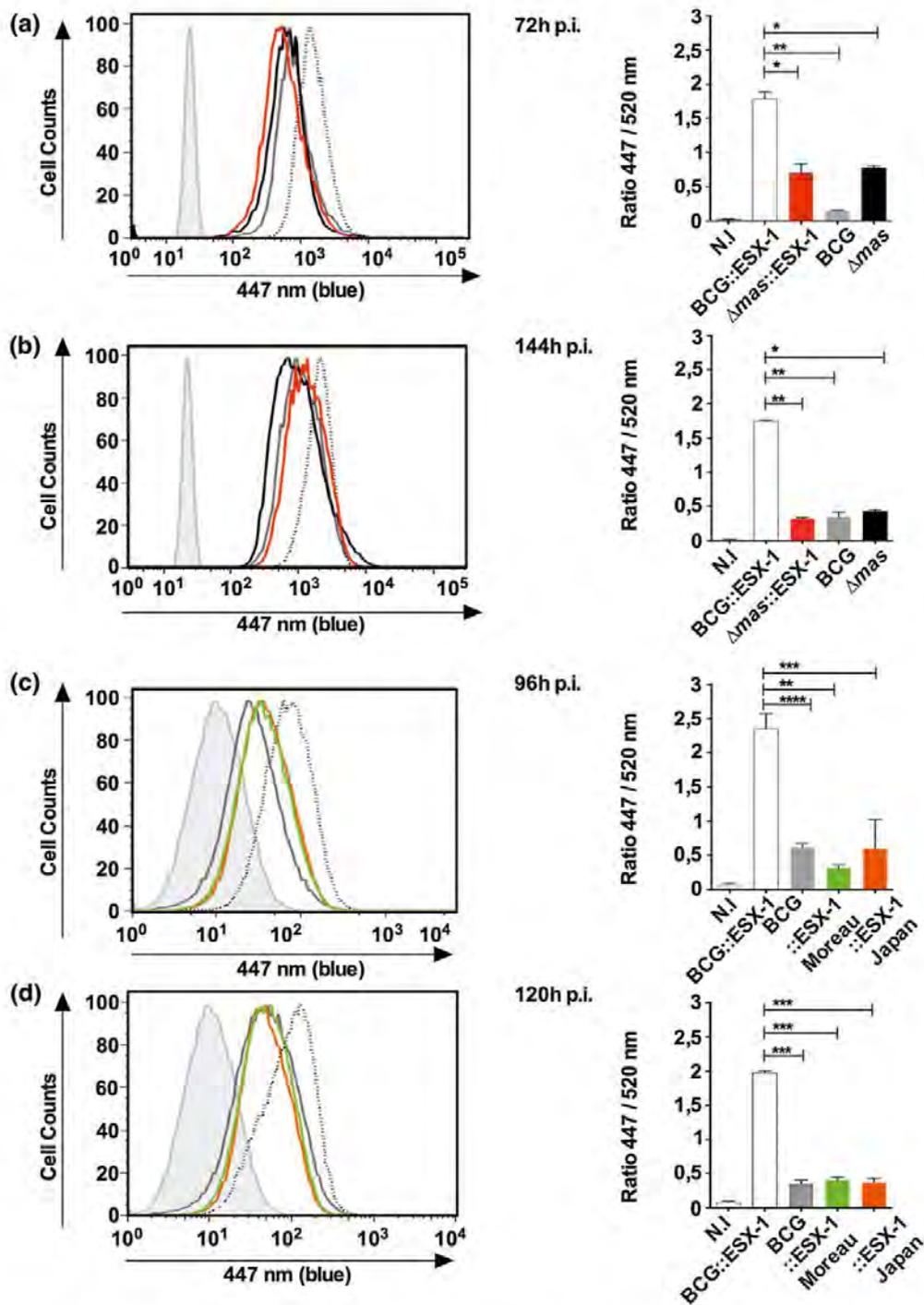


FIGURE 5 Recombinant ESX-1-proficient rBCG mutants lacking DIM are unable to induce phagosomal rupture in THP-1 cells. Phagosomal rupture detected by CCF-4 FRET-based flow cytometry (Simeone et al., 2015). Differentiated THP-1 cells were infected for 2 hr with different *M. bovis* BCG strains at MOI 1:1: (a-b) the panels show BCG Pasteur (grey line), its ESX-1-complemented version (black dotted line), its ESX-1-complemented version lacking DIM (red line), and a version just lacking DIM (black line); (c-d) the recombinant strains BCG Moreau or BCG Japan complemented with ESX-1, compared to BCG Pasteur and its ESX-1-complemented version. At (a-c) 96-hr p.i. and (b-d) 120-hr p.i., cells were successively stained with CCF-4 and anti-CD11b mAb, fixed, and their green (520 nm) versus blue (447 nm) fluorescent signals were analysed after gating on CD11b⁺ cells. Note that gating on CD11b⁺ cell was applied to focus on the macrophage-like cell population. In the left panels results are depicted as signal overlays of different groups. Results from uninfected cells are shown as filled curve. Right panels show ratios of fluorescence intensities MFI 447 nm/MFI 520 nm of blue signals from three independent experiments. The time points for experiments shown in panels (a) and (b) were chosen in accordance with experiments employing different Mtb strains (shown in Figure 2), while data shown in panels (c) and (d) were obtained in an independent series of experiments using different time points. The significance of difference between strains was evaluated; **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .005. BCG = Bacillus Calmette-Guérin; CCF-4 = coumarin-cephalosporin-fluorescein; DIM = phthiocerol dimycocerosates; FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfer; mAb = mouse antibody; MOI = multiplicity of infection; Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*

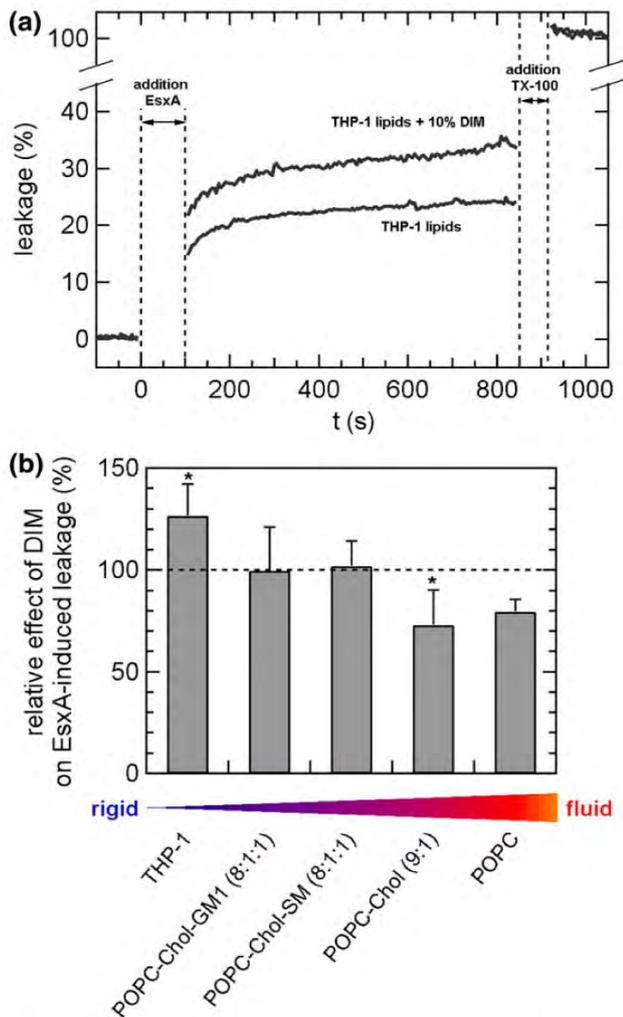


FIGURE 6 Modulation of the membranolytic activity of EsxA by DIM depends on the membrane composition in lipids. (a) Representative calcein leakage kinetics for LUV formed from THP-1 lipids with or without 10% (mol/mol) DIM. After stabilization of the basal fluorescence level, 10 μ M EsxA was injected in the liposome suspension. At the end of the reaction, total lysis of the LUV was obtained by adding 0.1% of Triton X-100 to achieve complete calcein release. (b) Relative effect of DIM on calcein leakage induced by 10 μ M of EsxA from LUV with various membrane composition, as listed in increasing order of fluidity. The values are calculated from the percentage of calcein leakage given in Figure S6. Histograms represent the mean \pm SEM of three independent experiments. The significance of difference between strains was evaluated; * $p < .05$. DIM = phthiocerol dimycocerosates; LUV = large unilamellar vesicles; EsxA = 6-kDa early secreted antigenic target

Altogether, these results indicate that the stimulating effect of DIM on the membranolytic activity of EsxA observed in THP-1 LUV and in hMDMs are the result of a yet unknown mechanism that seems to compensate the DIM-induced physical effect of membrane rigidification.

2.5 | DIM contribute to the induction of apoptosis in human macrophages infected with Mtb

In a previous study, we obtained preliminary results which strongly suggested that DIM contribute to the induction of cell death in

hMDMs infected with Mtb (Passemar et al., 2014). Interestingly, several studies have indicated that induction of cell death is closely linked to phagosomal membrane destabilization (Simeone et al., 2012, van der Wel et al., 2007, Wong & Jacobs, 2011). However, the type of induced cell death (apoptosis or necrosis) remained a matter of debate. On the basis of these observations, we decided to characterize the cell death program of hMDMs infected with H37Rv and several DIM-deficient mutants. First, we counted cell nuclei to evaluate the total number of hMDMs during Mtb infection (Figure 7a). We noticed that the number of cells infected with H37Rv diminished progressively over the time course of the infection. This decrease corresponded to a necrosis-like cell death, as it reflects the percentage of cell lysis. A comparable effect occurred with DIM-deficient H37Rv Δ mas (Figure 7a), suggesting that DIM play no role in the induction of cell lysis. We then stained the remaining hMDMs with Annexin V, to analyse phosphatidylserine translocation to the outer leaflet of the plasma membrane, and with 7-aminoactinomycin D (7-AAD), to evaluate plasma membrane integrity. We infected hMDMs and fixed the time of p.i. to 72 hr because difference in the bacterial load between H37Rv and DIM-deficient H37Rv mutants observed at longer times p.i. (Astarie-Dequeker et al., 2009) could have an impact on apoptosis. Only macrophages containing GFP-expressing bacteria were analysed (Figure 7b-e). At 72-hr p.i., H37Rv induced cell death in 10% to 35% of infected cells depending on the donor. The type of cell death had essentially the characteristics of apoptosis as most of the cells stained positive for Annexin V and negative for 7-AAD uptake (Figure 7b-c). This finding was confirmed using inhibitors of the caspases implicated in apoptosis, such as caspase-3 and caspase-9. As depicted in Figure 7d, pretreatment of hMDMs with Z-DEVD-FMK, a specific inhibitor of caspase-3, dramatically decreased the percentage of infected apoptotic cells (AnV⁺, 7-AAD⁻). A decrease was also observed with Z-LEHD-FMK, an inhibitor of the initiator caspase-9 (Figure 7e) albeit the extent of the inhibition was apparently lower than with Z-DEVD-FMK (Figure 7d). H37Rv also induced some necrosis because a small but significant percentage of infected cells was AnV⁺ and 7-AAD⁺. Importantly, this necrotic response was inhibited by Z-DEVD-FMK, suggesting a natural outcome of apoptosis (secondary necrosis) rather than a necrosis program (primary necrosis). When the DIM-deficient Mtb mutants were tested, we found that H37Rv Δ mas was almost totally unable to induce apoptosis (Figure 7c), mimicking almost the defect of H37Rv to induce apoptosis under conditions of caspase-3/9 inhibition (Figure 7d-e). Importantly, the complemented strain H37Rv Δ mas::mas recovered the ability to trigger apoptosis (Figure 7c). Such inhibitory profile of apoptosis was also observed with two other DIM-deficient mutants, H37Rv Δ ppeE and H37Rv Δ ppeE, Δ pks2 (Figure 7c). Taken together, these data suggest that DIM-deficient mutants are impaired in their ability to induce apoptosis when compared to WT H37Rv, suggesting that DIM are important for the induction of apoptosis by Mtb.

Apoptosis induction was reported to be restricted to ESX-1 proficient strains (Aguilo, Marinova, et al., 2013). In line with this finding, the naturally ESX-1-deficient BCG strains poorly induced apoptosis (Aporta et al., 2012) whereas complementation with ESX-1 allowed recombinant BCG::ESX-1 to acquire an apoptotic phenotype

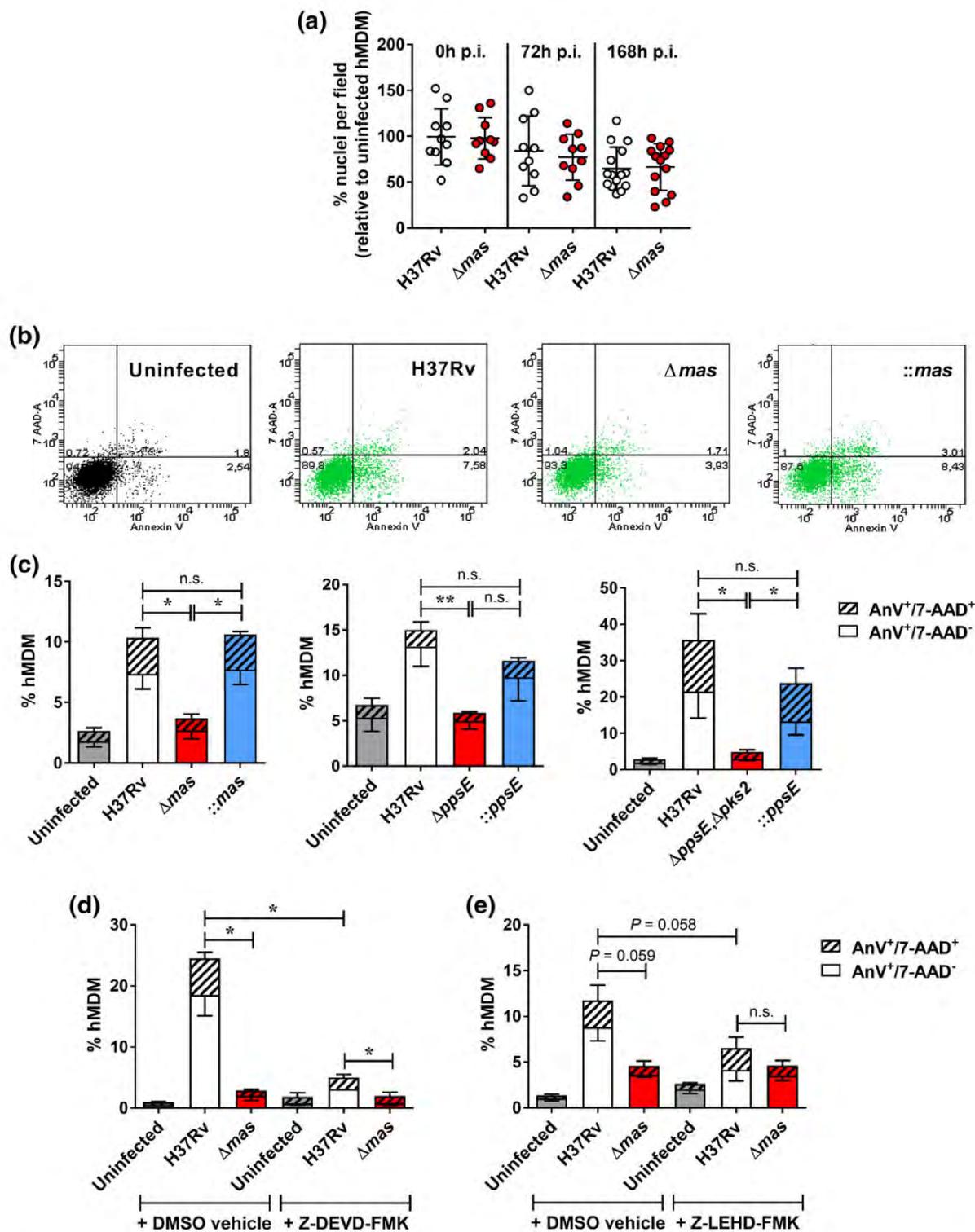


FIGURE 7 DIM contribute to the induction of apoptosis in hMDMs infected with Mtb. The cells were infected with GFP-expressing Mtb strains for 2 hr. (a) At different time after infection with an MOI of 2:1, macrophages were fixed, stained with DAPI and nuclei were quantified by fluorescence microscopy. The cell lysis was evaluated as the remaining nuclei in five individual fields from two independent experiments. Data are expressed as a percentage of control, uninfected cells. (b-e) 72 hr after infection with Mtb strains at MOI 10:1, phosphatidylserine exposure on plasma membrane (Annexin V-APC, AnV) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) uptake were analysed in bacteria-infected cells (GFP+) by flow cytometry. (b) Dot-plots of a representative experiment. Numbers correspond to the percentage of cells in each quadrant and green color pictures infected cells. (c-e) The values reported are mean \pm SEM of two to four independent experiments using various DIM-deficient mutants and their correspondent complemented strains. (d) Cells were treated, or not (DMSO vehicle), with the caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK (20 μ M). (e) Cells were treated, or not (DMSO vehicle), with the caspase-9 inhibitor Z-LEHD-FMK (20 μ M). * p < .05, ** p < .01. DIM = phthiocerol dimycocerosates; DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole; GFP = green fluorescent protein; hMDMs = human monocyte-derived macrophages; MOI = multiplicity of infection; Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*; n.s. = non-significant

(Aguilo, Marinova, et al., 2013). We decided to assess whether DIM also have an impact on EsxA-dependent apoptosis. We compared the capacity of DIM-proficient and DIM-deficient BCG Pasteur variants (WT and Δmas) and their recombinant ESX-1-expressing mutants to induce cell death in hMDMs. For this experiment, hMDMs were infected at an MOI of 30:1 for 2 hr and cell death was examined at 168-hr p.i. to get a detectable signal with BCG. As depicted in Figure 8, complementation with ESX-1 restored the ability to induce apoptosis in both DIM-proficient and DIM-deficient BCG variants, although a quantitative difference could be noted (Figure 8). While the restoration of apoptosis induction in both ESX-1-proficient BCG variants is suggesting that DIM are not essential for this ESX-1-mediated activity, the induction of lower apoptosis by DIM-deficient BCG::ESX-1 (Figure 8) indicates that DIM may modulate the apoptotic activity of ESX-1.

3 | DISCUSSION

The identification of DIM as lipid virulence factors of Mtb dates back to the first systematic large-scale transposon screens in mice, named signature-tagged transposon mutation (STM) screens in mice (Camacho et al., 1999, Cox et al., 1999). In these independent studies, it was found that Mtb mutants that had transposon insertions in the gene cluster encoding the enzymes for the synthesis and transport of DIM, were unable to persist in vivo. The attenuated phenotype of DIM transposon or deletion mutants was confirmed in several follow-up studies, stating that DIM were essential for the survival of Mtb strains inside the host. It was evoked that DIM-deficient Mtb mutants are susceptible to being killed by an early innate immune response (Day et al., 2014). In accordance with this proposal, we showed that the loss of DIM rendered Mtb mutants less able to arrest phagosome maturation, causing their accumulation in acidified

phagosomes, a fact that contributed to bacterial killing (Passemare et al., 2014). Interestingly, this phenotype is reminiscent of the phenotype of ESX-1-deactivated Mtb strains and natural ESX-1-deficient BCG strains (MacGurn & Cox, 2007; Tan et al., 2006). However, BCG and ESX-1-deficient Mtb mutants also displayed a defect in their capacity to escape from phagosomes (Houben et al., 2012; Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007), another strategy exploited by Mtb for survival in the host macrophage (Jamwal et al., 2016). These findings made us test different DIM-deficient mutants in recently developed phagosomal rupture screens, and we demonstrate that DIM are required for the induction of phagosomal membrane rupture in infected human macrophages, a yet unknown function for these lipids.

Phagosomal rupture, which leads to the translocation of bacterial effector proteins into the host cytoplasm (Canaday et al., 1999; Grotzke, Siler, Lewinsohn, & Lewinsohn, 2010; Lewinsohn et al., 1998) and/or to the cytosolic translocation of the pathogen (Gerstenmaier et al., 2015; Simeone, Majlessi, Enninga, & Brosch, 2016), has important consequences for Mtb recognition by the host and the generation of immune responses. However, apart from the major contribution of ESX-1, and in particular EsxA, we have an incomplete understanding of the mechanisms involved in the regulation of phagosomal permeabilization. In this study, we demonstrate that DIM exert a control on phagosomal rupture. This effect seems to occur independently of the ability of DIM to prevent phagosomal acidification, which remains an important step for phagosomal membrane damage in itself (Simeone et al., 2015), as confirmed herein (see Figure 3). Instead, DIM were required for an optimal activity of EsxA. This hypothesis is consistent with our data obtained for model membranes containing lipid extracted from THP-1 cells, showing that DIM increased the membranolytic activity of EsxA. However, this potentiating effect of DIM on the EsxA activity was independent from their tendency to rigidify membranes and evokes

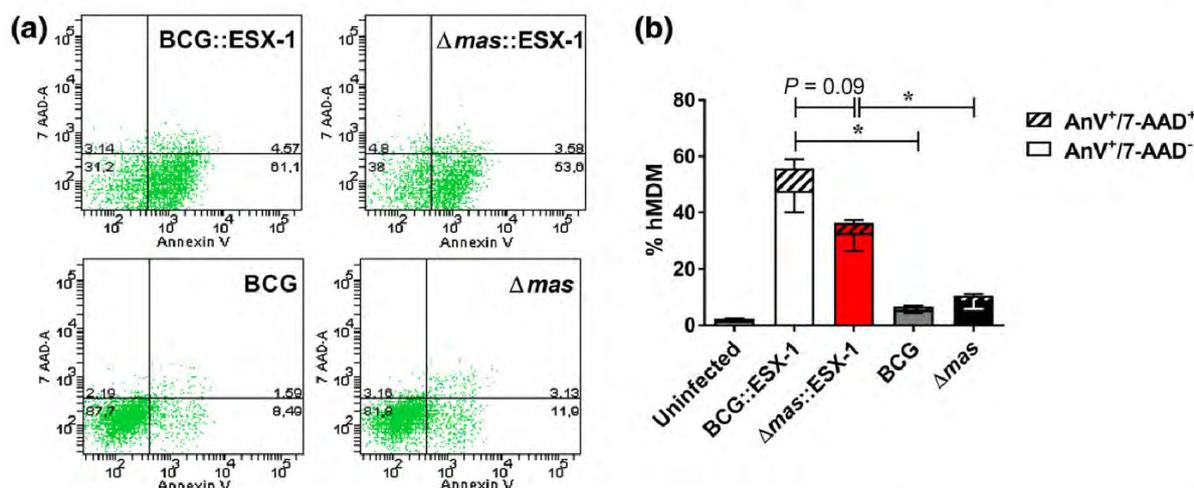


FIGURE 8 DIM collaborate with EsxA to trigger apoptosis in hMDMs infected with Mtb. The cells were infected at MOI 30:1 for 2 hr with GFP-expressing *M. bovis* BCG and the indicated recombinant strains. At 168-hr p.i., phosphatidylserine exposure on the plasma membrane (Annexin V-APC, AnV) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) uptake were analysed in bacteria-infected cells (GFP+) by flow cytometry. (a) Dot-plots of a representative experiment. Numbers correspond to the percentage of cells in each quadrant and green color pictures infected cells. (b) The values reported are the mean \pm SEM of three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. DIM = phthiocerol dimycocerosates; GFP = green fluorescent protein; hMDMs = human monocyte-derived macrophages; MOI = multiplicity of infection; Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*; n. s. = non-significant

an as yet unidentified collaborative mechanism in the crosstalk between EsxA and DIM. In that context, we found that the enhancing effect of DIM on EsxA activity is limited to membranes containing lipids from macrophages (THP-1-LUV and macrophages). This suggests that lipid components of the host cells may be selected candidates for a third partner in the interaction between EsxA and DIM at the membrane level. To date, no partner of EsxA has been described, with the exception of its putative chaperone CFP-10 and the EspACD cluster needed for co-dependent secretion (Gröschel et al., 2016). However, host lipids are known to play a role in the recruitment of pore-forming proteins to the host membrane (for example, sphingomyelin for actinoporins or sterols for cholesterol-dependent cytolysins) (Dal Peraro & van der Goot, 2016). Altogether, these findings open new perspectives for the study of the interaction of two unlinked virulence factors. Recently, Jamwal and colleagues reported that differences in EsxA secretion alone could not account for the observed differences in translocation competency of several Mtb strains (Jamwal et al., 2016). The authors proposed that EsxA-mediated contributions to phagosomal escape of Mtb might be complemented by a mechanism involving the activation of host cytosolic phospholipase A2 (Jamwal et al., 2016). Hence, it might be conceivable that the stimulating effect of DIM on the membranolytic activity of the bacterial factor, EsxA is extended to host cell effectors.

It has been proposed that the escape of Mtb from the phagosome to the cytosol is associated with the death of infected macrophages (Simeone et al., 2012; Simeone et al., 2015; van der Wel et al., 2007). Consistently, we have reported that H37Rv, unlike DIM-deficient Mtb mutants, killed human macrophages (Passemar et al., 2014). The cell death program of macrophages infected with Mtb is the subject of intense investigation and debate. Here, we show that necrosis is the main cell death type induced by Mtb. However, we also observed a small proportion of an apoptotic cell death program that requires the secretion of EsxA and involves the presence of DIM at the bacterial surface. The apoptotic phenotype of Mtb is consistent with previous studies (Aporta et al., 2012; Schaible et al., 2003). Although apoptosis seems to be an efficient way to control mycobacteria through antimicrobial effects, some authors suggest that this process promotes macrophage deactivation and consequent bacillus growth and dissemination of bacilli (Aguilo, Marinova, et al., 2013; Davis & Ramakrishnan, 2009). On the contrary, other groups have suggested that virulent Mtb strains inhibit macrophage apoptosis and promote necrosis (Behar et al., 2011; Martin et al., 2012). However, it was recently proposed that the apoptotic phenotype is a common feature of virulent Mtb strains (Aguilo, Alonso, et al., 2013). Interestingly, this phenotype requires ESX-1 function (Aporta et al., 2012). Moreover, data including ours, indicated that ESX-1-complemented BCG::ESX-1 acquired a pro-apoptotic phenotype in human macrophages in comparison with the parental strain BCG (Aguilo, Alonso, et al., 2013). We now demonstrated that EsxA acts likely in collaboration with DIM to regulate the apoptotic response of Mtb. In general, the apoptosis is a process involving many complex signalling pathways and mediators. Previous studies have shown that Mtb infection induces ROS production and activates ER stress-mediated apoptosis (Lim et al., 2011).

More recently, the pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, the BH3-only protein Bim was proposed to be involved in the apoptosis induced by virulent Mtb, in a manner that likely involves the ESX-1 secretion system (Aguilo, Uranga, Marinova, Martin, & Pardo, 2014). In the present work, we show that the apoptosis induced by H37Rv is abolished in the presence of inhibitors of caspase-9 and caspase-3, suggesting that the caspase-9 dependent formation of an apoptosome structure and the activation of the executioner caspase-3 are required. Based on these sets of data, we proposed that Mtb can activate the canonical intrinsic apoptotic pathway in a process that involves EsxA and DIM. In recent years, it has become widely accepted that translocated bacterial effectors can target specific points in apoptotic-related pathways (Robinson & Aw, 2016). Mtb produces several pro-apoptotic proteins such as EsxA, the 19 kDa lipoprotein (Ciaramella, Martino, Cicconi, Colizzi, & Fraziano, 2000) and HBHA (Choi et al., 2013). This finding led us to speculate that Mtb can modulate on its own the apoptotic response by exploiting EsxA in combination with DIM to mediate perturbation and disruption of phagosomal membranes, and thus favor cytosolic access of Mtb apoptotic factors. This suggests that phagosome permeabilization alone might be enough on its own to induce an apoptotic response and that the impact of DIM and EsxA on apoptosis is simply a consequence of their capacity to induce phagosomal rupture.

Among the more than 130 mycobacterial species, only a few have been shown to be able to induce phagosomal rupture and establish contact with the cytosol of the host-phagocytes during infection. This ability has so far only been reported from selected slow-growing, facultative, or obligate pathogens, such as *Mycobacterium marinum* (Houben et al., 2012; Simeone et al., 2012; Stamm et al., 2003), *Mycobacterium kansasii* (Wang et al., 2015), *Mycobacterium leprae* (van der Wel et al., 2007) and Mtb (Simeone et al., 2012; Simeone et al., 2015; van der Wel et al., 2007). All these species harbour a gene cluster encoding an ESX-1 secretion system in their genomes. In contrast, *Mycobacterium smegmatis*, which also harbours an ESX-1 encoding gene cluster, is not able to rupture the phagosome (Simeone et al., 2012), and the reasons for this inability remain unknown. One possible explanation that was evoked could be the sequence differences in the EsxA amino-acid sequence which differs from EsxA homologues from slow growing mycobacterial species, particularly in the C-terminal part which is essential for the biological function of EsxA of Mtb (Kupz et al., 2016; Simeone et al., 2012).

A second possibility could be the absence of the *espACD* gene cluster from *M. smegmatis* and other fast-growing non-pathogenic mycobacterial species, which in Mtb encodes the EspA and EspC proteins that are essential for proper EsxA/B secretion (Fortune et al., 2005; MacGurn, Raghavan, Stanley, & Cox, 2005; Lou, Rybniker, Sala, & Cole, 2017). The *espACD* cluster has been suggested to represent a pathogenicity-associated genomic island as it is present only in a restricted number of slow-growing mycobacterial species at different, non-syntenic genomic regions (Ates & Brosch, 2017; Simeone et al., 2012). Until now, all mycobacterial species shown to induce phagosomal rupture in host-phagocytes contained an *espACD* locus suggesting that the occurrence of these genes may account for the capacity to escape phagosome and induce apoptosis.

However, a third possibility, which emerges from the results of our present study, is that DIM are also crucial for this key step of the Mtb infectious process. In contrast to the impression one can get from a scheme suggesting that defined as phthiocerol dimycocerosates (DIM) are also present in fast-growing non-pathogenic mycobacteria (Veyrier, Dufort, & Behr, 2011), the ability to synthesize DIM is restricted to a few pathogenic mycobacterial species (Brennan & Nikaido, 1995; Onwueme *et al.*, 2005), which harbour a genomic locus containing the *ppsABCDE*, *mas* and *mmpL7* genes. Interestingly, most of these species also harbour the *espACD* operon and show the ability to rupture the phagosomes of host cells during infection (Ates & Brosch, 2017). Our results thus provide the scientific basis for unraveling the potential interaction of DIM and ESX-1 in the disruption of host-cell membranes, which is a very attractive perspective for better understanding the virulence mechanisms of pathogenic mycobacteria, including representatives of the most devastating pathogens in the history of humankind.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURE

4.1 | Antibodies and reagents

Specific mouse antibodies (mAbs) against ubiquitinated proteins (FK2 clone) and human galectin-3 were purchased from Enzo Life Science and BD Pharmingen, respectively. Annexin V-APC, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), anti-CD11b-APC mAbs were from BD Biosciences. Bafilomycin A1, Z-DEVD-FMK and Z-LEHD-FMK were purchased from Santa Cruz Biotechnology. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) and secondary antibodies were from Molecular Probes. Recombinant EsxA (NR-14868) was kindly provided by BEI Resources (Manassas, VA, USA). DIM were extracted from *Mycobacterium canetti* and purified in our laboratory (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). The THP-1 lipids were prepared from THP-1 cells. Briefly, cells were disrupted by nitrogen cavitation and whole cell membranes were isolated by centrifugation. Subsequently, the THP-1 lipids were extracted from these membranes by the Bligh-Dyer method (Bligh & Dyer, 1959). Other lipids, POPC (850457), cholesterol (700000), sphingomyelin (860061), and GM1 ganglioside (brain, 860065), were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). C-Laurdan has been synthesized and characterized as described in (Mazeris, Joly, Lopez, & Tardin, 2014). Except when specified in the text, other chemicals were purchased from Sigma Chemical.

4.2 | Bacterial strains and growth conditions

Strains used in this study include WT Mtb H37Rv Pasteur (the sequenced strain from Institut Pasteur), *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, *M. bovis* BCG Japan, *M. bovis* BCG Moreau, various mutants and recombinant strains. All strains were cultured at 37 °C in liquid Middlebrook 7H9 liquid medium (Difco) supplemented with 10% (v/v) ADC (Difco) and 0.05% (v/v) Tween-80. When required, kanamycin and hygromycin were added to the medium at a final concentration of 40 µgml⁻¹ and 50 µgml⁻¹, respectively.

4.3 | Generation of recombinant strain (Table S1)

4.3.1 | Construction of complementation plasmids

To construct pMAS3, a DNA region covering the *mas* gene plus 274 BP of the sequence upstream of the start codon was polymerase chain reaction (PCR)-amplified from *M. bovis* BCG genomic DNA and inserted between the XbaI and HindIII restriction sites of pMV361H, a pMV361 derivative harboring a hygromycin resistance gene (Stover *et al.*, 1991). Complementation plasmid pMVesxBA was constructed by amplifying *esxB* and *esxA* from the pRD1-2F9 cosmid (Pym *et al.*, 2002). The PCR product was cloned into a modified pMV361 integrative plasmid containing the *pblaF** promoter instead of the original *phsp60* promoter and carrying a hygromycin resistance marker.

4.3.2 | Construction of recombinant *M. bovis* BCG and Mtb strains

The *mas* *M. bovis* BCG mutant was constructed by phage-mediated allelic exchange using the strategy described by Bardarov *et al.* (Bardarov *et al.*, 2002). An internal DNA fragment of the *mas* gene (nt 345–5284) was amplified by PCR from *M. bovis* BCG genomic DNA and inserted within the vector pGEM-T. A kanamycin resistance cassette flanked by two *res* sites from transposon (Malaga, Perez, & Guilhot, 2003) was inserted between the HindIII and EcoRI sites of the *mas* gene fragment and the recombination substrate was cloned into the cosmid vector pYUB854 (Bardarov *et al.*, 2002). The resulting cosmid was cut with PacI and ligated with the mycobacteriophage phAE87 to form the recombinant mycobacteriophage phMas. Phage particles were then used to infect *M. bovis* BCG and allelic exchange mutants were selected on 7H11 agar plates supplemented with kanamycin. Mutant clones were screened by PCR analyses. One clone giving an amplification pattern corresponding to allelic exchange was selected and subsequently transformed with the thermosensitive plasmid pWM19 to recover the kanamycin resistance marker by site-specific recombination between the two *res* sites as described (Malaga *et al.*, 2003). One clone giving the corresponding pattern for excision of the kanamycin resistance cassette was selected and named BCGΔ*mas*.

The unmarked *mas* mutant of Mtb was generated following the same procedure as described for the construction of the *M. bovis* BCGΔ*mas* mutant. The *esxA* mutant of Mtb (H37RvΔ*esxA*) was constructed using the mycobacterial recombineering system (van Kessel & Hatfull, 2007). 1-kb DNA fragments flanking the *esxA* gene were amplified by PCR from Mtb genomic DNA and inserted, flanking a *res-km-res* resistance cassette into the plasmid pBluescript. The recombination substrate was digested, purified and introduced by electroporation in Mtb competent cells carrying pJV53H, an hygromycin resistant pJV53 derivative plasmid expressing the recombineering proteins (Jamet *et al.*, 2015; van Kessel & Hatfull, 2007). Transformants were selected on 7H11 containing kanamycin at 37 °C and selected colonies were analyzed by PCR to check for the replacement of the WT copy of *esxA* by the mutated *esxA::km* allele. One mutant with the correct deletion was selected and the recombineering plasmid pJV53H was cured from the mutant by successive growth in drug-free media. Loss of plasmid was checked by plating bacteria on hygromycin-containing solid medium. The kanamycin resistance cassette was recovered as described for the

BCG Δ mas mutant using plasmid pWM19. One clone giving the expected pattern for excision of the res-km-res cassette in *esxA* was selected and named H37Rv Δ esxA.

The strain mutant Mtb H37Rv Δ ppsE, Δ pks2 is a derivative from H37Rv Pasteur with mutations in genes *pks2* and *ppsE* preventing the formation of SL and DIM, respectively (Passemar et al., 2014). The production of DIM or SL was restored by transferring the integrative plasmid, pMVE carrying *ppsE* (Astarie-Dequeker et al., 2009) or the cosmid CIE526 harboring the *pks2* locus, respectively. The production of the corresponding lipids was controlled by TLC of the extractable lipids.

Construction of recombinant strains BCG::ESX-1 in DIM-deficient or DIM-proficient strains:

In the present study, our aim was to introduce ESX-1 sequences into *M. bovis* BCG Pasteur, *M. bovis* BCG Japan and *M. bovis* BCG Moreau to obtain versions of these strains that produce and secrete EsxA. The cosmid pRD1-2F9 (Pym et al., 2002) was electroporated into *M. bovis* BCG Pasteur, *M. bovis* BCG Japan and *M. bovis* BCG Moreau and hygromycin-resitant colonies were analyzed by PCR.

All Mtb and *M. bovis* BCG strains were subsequently transformed with pCG211 which carry the *gfp* gene (Astarie-Dequeker et al., 2009).

4.4 | Cell culture and infection

The human pro-monocytic cell line THP-1 was maintained in RPMI 1640 glutamax with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37 °C under an atmosphere containing 5% CO₂. For differentiation into macrophages, THP-1 cells were plated into 12-well plates and treated with 20 ng ml⁻¹ of PMA for 72 hr. Human blood, from fully-anonymous non-tuberculous donors, was purchased from the Etablissement Français du Sang of Toulouse. hMDMs were prepared as described in (Astarie-Dequeker et al., 2009). Briefly, monocytes plated into 24-well plates were isolated by adhesion from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and allowed to differentiate for 7 days in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM glutamine (Gibco) and 7% (v/v) heat-inactivated human AB serum at 37 °C in 5% CO₂. The culture medium was renewed on the third day. Before use, the cells were washed twice with fresh RPMI medium.

Mycobacterial infection was performed as described (Astarie-Dequeker et al., 2009, Tabouret et al., 2010). In brief, exponentially-growing mycobacteria were pelleted by centrifugation and subsequently dispersed in serum-free RPMI 1640 medium using glass beads. The number of bacteria per ml in the suspension was estimated by measurement of the optical density at 600 nm. Human macrophages were infected for 1–2 hr at the indicated MOI in serum-free RPMI medium at 37 °C in 5% CO₂. Extracellular bacteria were then removed by three successive washes with fresh medium and infected cells were further incubated in RPMI 1640 medium supplemented with heat-inactivated serum at 37 °C in 5% CO₂.

4.5 | Immunofluorescence staining of phagosomal membrane damage

Induction of phagosomal membrane damage was assessed as described (Wong & Jacobs, 2011) using monoclonal antibodies against Galectin-3 and ubiquitinated proteins. Galectin-3 is a marker of

damaged endo-membranes (Paz et al., 2010) that labels in particular damaged vacuolar membranes (Ray et al., 2010). FK2 antibody labels mono- and poly-ubiquitinated proteins. Previous electron microscopy studies indicated that although ubiquitin can localize directly with Mtb, the majority of ubiquitin is found on membranous structures surrounding bacteria-containing phagosomes (Houben et al., 2012). Briefly, hMDMs cultured on sterile glass coverslips were infected with green fluorescent protein (GFP)-expressing mycobacteria and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde at different times after infection. Cells were then permeabilized for 10 min by a treatment in PBS containing 0.3% Triton X100 and blocked in PBS supplemented with 0.3% bovine serum albumin (BSA). Phagosomal membrane damage was revealed using mAbs against ubiquitinated proteins (FK2 clone) and galectin-3 (1:50), detected by a Rhodamine Red-conjugated goat anti-mAb (1:1000). The coverslips were mounted onto glass slides with fluorescent mounting medium (Dako) and were viewed on a Leica DM-RB fluorescence microscope or a Zeiss LSM510 confocal microscope. All images were processed with Adobe Photoshop software. An infected cell was considered positive for membrane damage when at least one phagosome containing a GFP-bacteria was stained positive for the markers. For each marker, the percentage of infected cells having at least one positively-stained phagosome was determined from 50 cells among five different fields in duplicate.

4.6 | Phagosomal rupture assay

The phagosomal rupture was measured in mycobacteria-infected THP-1 cells, as described (Simeone et al., 2015). Briefly, cells were stained during 1 hr at RT, with 8 μM CCF-4 (Invitrogen) in EM buffer (120 mM NaCl, 7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 5 mM glucose and 25 mM Hepes, pH 7.3) complemented with 2.5 μM probenecid. Cells were then stained with anti-CD11b-APC mAbs and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde overnight at 4 °C. Cells were analysed in a Fortessa cytometer using Diva software (Beckman Coulter, France). At least 100,000 events per sample were acquired. Data were analyzed with FlowJo software (Treestar, OR, USA).

4.7 | Cell death assays

The lysis of hMDMs during the course of infection was evaluated by counting the number of remaining nuclei using the DAPI staining procedure. At different times after infection, hMDMs were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde and stained for 10 min in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.5 μg ml⁻¹ DAPI. The cells were then washed with PBS, mounted on slides and the fluorescence was analyzed on a Leica DM-RB fluorescence microscope. Five image fields were acquired per slide in duplicate and the nuclei were counted with an ImageJ analysis module. Data are presented as the percentage of nuclei per field relative to uninfected hMDMs.

Cell death was characterized by flow cytometry as described in (Aporta et al., 2012). Briefly, phosphatidylserine (PS) exposure and membrane integrity were analysed using Annexin V-APC and 7-aminoactinomycinD (7-AAD) double staining and flow cytometry according to manufacturer instructions. Briefly, cells in the supernatant and adherent cells recovered by trypsin treatment, were pooled,

washed and incubated with Annexin V-APC and 7-AAD in Annexin binding buffer (BD Biosciences) for 15 min at room temperature. Afterwards cells were washed, fixed with 4% paraformaldehyde (containing CaCl₂) and subsequently examined using a BD fluorescence-activated cell sorting LSR-II (BD Biosciences). Data were analyzed using a Flowjo software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

4.8 | Liposome preparation

To prepare liposomes of well-defined composition, without DIM or containing 10% (mol/mol) of DIM, appropriate quantities of stock solutions of lipids in chloroform were mixed in a glass tube. For the DIM-containing THP-1 LUV, the molar concentration of DIM was estimated to be 5%–10% (mol/mol) based on the measured mass of the THP-1 lipid extract and on a published lipid composition of human alveolar macrophages (Sahu & Lynn, 1977). The lipid mixture was dried by evaporating the chloroform under a gentle nitrogen flow. The lipid residues were further dried in vacuum for at least 1 hr. Liposomes were formed by rehydration of the dry lipid residue in 0.5 mL of Tris buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) containing in addition 50 mM of calcein (Sigma Aldrich). Rehydration was done at 37 °C, by vortexing the tubes for 2 min. Large Unilamellar Vesicles (LUV) were formed by extrusion through a polycarbonate membrane of ϕ 0.2 μ m pore size, using a Mini Extruder (Avanti Polar Lipids). Unencapsulated calcein was removed by size exclusion chromatography using a Sephadex G-75 column and a Tris elution buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4). After LUV formation, the size of the liposomes was verified by Nanoparticle Tracking Analysis (NanoSight Ltd, UK). The concentration of phospholipids was measured using a standard phosphorus analysis (Rouser, Fkeischer, & Yamamoto, 1970).

4.9 | Calcein leakage assays

The membranolytic activity of EsxA was evaluated using a calcein leakage assay. Encapsulated calcein has a high concentration of 50 mM. At this concentration the calcein fluorescence is weak due to auto-quenching. When calcein is released due to the activity of EsxA, the measured fluorescence intensity increases. The fluorescence increase as a function of time reflects the activity of the protein. Calcein fluorescence was measured on an FLSP920 spectrometer (Edinburgh Instruments) using an excitation wavelength of 491 nm (excitation slit 1 nm) and an emission wavelength of 517 nm (emission slit 1 nm). Measurements were done at room temperature on a 10- μ M liposome suspension in a 100- μ L quartz cuvette. At the start of each measurement, the initial fluorescence intensity was measured. The cuvette was then removed from the spectrometer to allow addition of EsxA (final concentration 10 μ M) and mixing. This resulted in a “dead time” during which the calcein fluorescence could not be monitored. Once the fluorescence reached a plateau, Triton X-100 (final concentration 0.1% [v/v]) was added to the liposome suspension to disrupt the liposomes and release all calcein, and the fluorescence was measured. This yielded the maximum fluorescence intensity. The fluorescence intensity was converted into a percentage of leakage by the formula: % leakage = $100 \times [(I(t) - I_0) / (I_{TX-100} - I_0)]$, where $I(t)$ is

the fluorescence intensity at time t , and I_0 and I_{TX-100} are the initial and maximum fluorescence intensities. To compare the activity of EsxA for different lipid compositions, the percentage of leakage at the plateau was always used.

4.10 | Generalized polarization

Membrane fluidity was evaluated using the fluorescence of the solvatochromic probe C-Laurdan, whose fluorescence spectrum shows a maximum at 490 nm in the fluid liquid-disordered (l_d) membrane phase, and shifts to 440 nm in the more rigid liquid-ordered (l_o) or solid (s_o) phase. The generalized polarization (GP) is used as a measure of the fluidity of the membrane (Sanchez, Triccerri, Gunther, & Gratton, 2007). It is defined as $GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$, where I_{440} and I_{490} are the fluorescence intensities at 440 and 490 nm, respectively. LUVs were formed by the protocol outlined above, but an appropriate volume of a stock solution of C-Laurdan dissolved in chloroform was added to achieve 1% (mol/mol) labeling of the membranes. The dry residues were rehydrated in Tris buffer. The spectra of C-Laurdan were measured on a FLSP920 spectrometer (Edinburgh Instruments) with an excitation wavelength $\lambda_{exc} = 360$ nm (slit width 3 nm) and fluorescence emission was measured in the range 380–600 nm (emission slit width 2 nm). Temperature was varied in the range 10–60 °C in steps of 5 °C, except for dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) where the temperature was changed in 2 °C steps above 30 °C. The temperature was allowed to stabilize for 5 min before the spectra were measured. Plots of the GP for liposomes of different membrane compositions are shown in Figure S5. Low GP values represent fluid membranes (l_d phase); high GP values correspond to more rigid membranes (l_o and s_o phases). The drop at 41 °C in the value of GP for DPPC corresponds to the well-known s_o - l_d phase transition of this lipid.

The characterization of membrane fluidity using the fluorescence of C-Laurdan and the generalized polarization is discussed more completely in the Supporting Information.

5 | STATISTICS

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of the indicated number of experiments (n) performed at least in duplicate. Data were analyzed by two-tailed paired or unpaired Student's t tests using GraphPad PRISM (GraphPad Software, GPW5-078069-NBH-9780) and $p < .05$ was used as the limit of statistical significance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to F. Laval and M. Daffé (IPBS) for their help with the mass spectrometry analyses and L. Majlessi (IP) for advice in hybridoma technology. We wish to acknowledge I. Vergne (IPBS) for her assistance with confocal microscopy. We thank TRI-Genotoul Imaging facility (Toulouse, France). The following reagent was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: Recombinant Protein Reference Standard, NR-14868.

This study was in part supported by the European Community's grant TBVAC2020, 643381, the Agence National de Recherche (ANR-10-LABX-62-IBEID, ANR-14-JAMR-001-02 and ANR-16-

CE15-0003), the Fondation pour la Recherche Médicale FRM (DEQ20090515399, DEQ20130326471 and ING20140129051) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). J.A. is a recipient of a PhD scholarship from the French government.

REFERENCES

- Aguilo, J. I., Alonso, H., Uranga, S., Marinova, D., Arbues, A., de Martino, A., ... Martin, C. (2013). ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology*, *15*, 1994–2005.
- Aguilo, N., Marinova, D., Martin, C., & Pardo, J. (2013). ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: To be or not to be, that is the question. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*, 88.
- Aguilo, N., Uranga, S., Marinova, D., Martin, C., & Pardo, J. (2014). Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Death & Disease*, *5*, e1343.
- Aporta, A., Arbues, A., Aguilo, J. I., Monzon, M., Badiola, J. J., de Martino, A., ... Pardo, J. (2012). Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* SO2 vaccine candidate is unable to induce cell death. *PLoS One*, *7*, e45213.
- Arbues, A., Lugo-Villarino, G., Neyrolles, O., Guilhot, C., & Astarie-Dequeker, C. (2014). Playing hide-and-seek with host macrophages through the use of mycobacterial cell envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*, 173.
- Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F. K., Chalut, C., Lopez, A., & Guilhot, C. (2009). Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathogens*, *5*, e1000289.
- Ates, L. S., & Brosch, R. (2017). Discovery of the type VII ESX-1 secretion needle? *Molecular Microbiology*, *103*, 7–12.
- Ates, L. S., Ummels, R., Commandeur, S., van de Weerd, R., Sparrius, M., Weerdenburg, E., ... Houben, E.N. (2015). Essential Role of the ESX-5 Secretion System in Outer Membrane Permeability of Pathogenic Mycobacteria. *PLoS Genetics*, *11*, e1005190.
- Azad, A. K., Sirakova, T. D., Rogers, L. M., & Kolattukudy, P. E. (1996). Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*, 4787–4792.
- Bardarov, S., Bardarov, S. Jr., Pavelka, M. S. Jr., Sambandamurthy, V., Larsen, M., Tufariello, J., ... Jacobs, W.R. Jr. (2002). Specialized transduction: An efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*, *148*, 3007–3017.
- Behar, S. M., Martin, C. J., Booty, M. G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H. X., ... Remold, H.G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunology*, *4*, 279–287.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 911–917.
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, *64*, 29–63.
- Camacho, L. R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., & Guilhot, C. (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology*, *34*, 257–267.
- Camacho, L. R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M. A., Triccas, J. A., Gicquel, B., ... 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.
- Cambier, C. J., Takaki, K. K., Larson, R. P., Hernandez, R. E., Tobin, D. M., Urdahl, K. B., ... Ramakrishnan, L. (2014). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*, *505*, 218–222.
- Canaday, D. H., Ziebold, C., Noss, E. H., Chervenak, K. A., Harding, C. V., & Boom, W. H. (1999). Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *Journal of Immunology*, *162*, 372–379.
- Chen, J. M., Islam, S. T., Ren, H., & Liu, J. (2007). Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine*, *25*, 8114–8122.
- Choi, J. A., Lim, Y. J., Cho, S. N., Lee, J. H., Jeong, J. A., Kim, E. J., ... Song, C. H. (2013). Mycobacterial HBHA induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the generation of reactive oxygen species and cytosolic Ca²⁺ in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Cell Death & Disease*, *4*, e957.
- Ciaramella, A., Martino, A., Cicconi, R., Colizzi, V., & Fraziano, M. (2000). Mycobacterial 19-kDa lipoprotein mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages at early stages of infection. *Cell Death and Differentiation*, *7*, 1270–1272.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., ... Barrell, B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, *393*, 537–544.
- Conrad, W. H., Osman, M. M., Shanahan, J. K., Chu, F., Takaki, K. K., Cameron, J., ... Ramakrishnan, L. (2017). The mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1620133114
- Converse, S. E., Mougous, J. D., Leavell, M. D., Leary, J. A., Bertozzi, C. R., & 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.
- Cox, J. S., Chen, B., McNeil, M., & Jacobs, W. R. Jr. (1999). Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*, *402*, 79–83.
- Daffe, M., Crick, D. C., & Jackson, M. (2014). Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiol Spectr*, *2*, MGM2-0021-2013.
- Dal Peraro, M., & van der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews. Microbiology*, *14*, 77–92.
- Davis, J. M., & Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, *136*, 37–49.
- Day, T. A., Mittler, J. E., Nixon, M. R., Thompson, C., Miner, M. D., Hickey, M. J., ... Sherman, D.R. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* strains lacking surface lipid phthiocerol dimycocerosate are susceptible to killing by an early innate host response. *Infection and Immunity*, *82*, 5214–5222.
- de Jonge, M. I., Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M. M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P., ... Brosch, R. (2007). ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of Bacteriology*, *189*, 6028–6034.
- De Leon, J., Jiang, G., Ma, Y., Rubin, E., Fortune, S., & Sun, J. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 exhibits a unique membrane-interacting activity that is not found in its ortholog from non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*, 44184–44191.
- Derrick, S. C., & Morris, S. L. (2007). The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*, *9*, 1547–1555.
- Fortune, S. M., Jaeger, A., Sarracino, D. A., Chase, M. R., Sasseti, C. M., Sherman, D. R., ... Rubin, E.J. (2005). Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 10676–10681.
- Gao, L. Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J. N., & Brown, E. J. (2004). A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is

- required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular Microbiology*, 53, 1677–1693.
- Gerstenmaier, L., Pilla, R., Herrmann, L., Herrmann, H., Prado, M., Villafano, G. J., ... Hagedorn, M. (2015). The autophagic machinery ensures nonlytic transmission of mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E687–E692.
- Gomes, L. H., Otto, T. D., Vasconcellos, E. A., Ferrao, P. M., Maia, R. M., Moreira, A. S., ... Mendonça-Lima, L. (2011). Genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian vaccine strain against tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, 193, 5600–5601.
- Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., & Brosch, R. (2016). ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews. Microbiology*, 14, 677–691.
- Grotzke, J. E., Siler, A. C., Lewinsohn, D. A., & Lewinsohn, D. M. (2010). Secreted immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* antigens are processed by the cytosolic pathway. *Journal of Immunology*, 185, 4336–4343.
- Guilhot, C., Chalut, C., & Daffe, M. (2008). Biosynthesis and roles of phenolic glycolipids and related molecules in *Mycobacterium tuberculosis*. In M. Daffe, & J. M. Reytrat (Eds.), *The mycobacterial cell envelope* (pp. 273–289). Washington, D.C. ASM Press.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., & 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.
- Houben, D., Demangel, C., van Ingen, J., Perez, J., Baldeon, L., Abdallah, A. M., ... Peters, P.J. (2012). ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cellular Microbiology*, 14, 1287–1298.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., - Jacobs, W.R. (2003). The primary mechanism of attenuation of *Bacillus Calmette-Guerin* is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 12420–12425.
- Jamet, S., Slama, N., Domingues, J., Laval, F., Texier, P., Eynard, N., ... Cam, K. (2015). The non-essential mycolic acid biosynthesis genes *hadA* and *hadC* contribute to the physiology and fitness of *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One*, 10, e0145883.
- Jamwal, S. V., Mehrotra, P., Singh, A., Siddiqui, Z., Basu, A., & Rao, K. V. (2016). Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. *Scientific Reports*, 6, 23089.
- Kaur, D., Guerin, M. E., Skovierova, H., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2009). Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in Applied Microbiology*, 69, 23–78.
- Kupz, A., Zedler, U., Staber, M., Perdomo, C., Dorhoi, A., Brosch, R., & Kaufmann, S. H. (2016). ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 126, 2109–2122.
- Lewinsohn, D. M., Alderson, M. R., Briden, A. L., Riddell, S. R., Reed, S. G., & Grabstein, K. H. (1998). Characterization of human CD8+ T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen-presenting cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 1633–1640.
- Lim, Y. J., Choi, J. A., Choi, H. H., Cho, S. N., Kim, H. J., Jo, E. K., ... Song, C.H. (2011). Endoplasmic reticulum stress pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 6, e28531.
- Lou, Y., Rybniker, J., Sala, C., & Cole, S. T. (2017). EspC forms a filamentous structure in the cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* and impacts ESX-1 secretion. *Molecular Microbiology*, 103, 26–38.
- Ma, Y., Keil, V., & Sun, J. (2015). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* EsxA membrane insertion: Roles of N- and C-terminal flexible arms and central helix-turn-helix motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 7314–7322.
- MacGurn, J. A., & Cox, J. S. (2007). A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infection and Immunity*, 75, 2668–2678.
- MacGurn, J. A., Raghavan, S., Stanley, S. A., & Cox, J. S. (2005). A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 57, 1653–1663.
- Malaga, W., Perez, E., & Guilhot, C. (2003). Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 261–268.
- Martin, C. J., Booty, M. G., Rosebrock, T. R., Nunes-Alves, C., Desjardins, D. M., Keren, I., ... Behar, S.M. (2012). Efferocytosis is an innate anti-bacterial mechanism. *Cell Host & Microbe*, 12, 289–300.
- Mazeres, S., Joly, E., Lopez, A., & Tardin, C. (2014). Characterization of M-laurdan, a versatile probe to explore order in lipid membranes. *F1000Research*, 3, 172.
- Naka, T., Maeda, S., Niki, M., Ohara, N., Yamamoto, S., Yano, I., ... Fujiwara, N. (2011). Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 44153–44161.
- Onwueme, K. C., Vos, C. J., Zurita, J., Ferreras, J. A., & Quadri, L. E. (2005). The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Progress in Lipid Research*, 44, 259–302.
- Passemar, C., Arbues, A., Malaga, W., Mercier, I., Moreau, F., Lepourry, L., ... Astarie-Dequeker, C. (2014). Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 16, 195–213.
- Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., ... Sansonetti, P. (2010). Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cellular Microbiology*, 12, 530–544.
- Peng, X., & Sun, J. (2016). Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxicon*, 116, 29–34.
- Pethe, K., Swenson, D. L., Alonso, S., Anderson, J., Wang, C., & Russell, D. G. (2004). Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13642–13647.
- Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., & Cole, S. T. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology*, 46, 709–717.
- Ray, K., Bobard, A., Danckaert, A., Paz-Haftel, I., Clair, C., Ehsani, S., ... Enninga, J. (2010). Tracking the dynamic interplay between bacterial and host factors during pathogen-induced vacuole rupture in real time. *Cellular Microbiology*, 12, 545–556.
- Robinson, K. S., & Aw, R. (2016). The Commonalities in Bacterial Effector Inhibition of Apoptosis. *Trends in Microbiology*, 24, 665–680.
- Ros, U., & Garcia-Saez, A. J. (2015). More than a pore: The interplay of pore-forming Proteins and lipid membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 248, 545–561.
- Rouser, G., Fkeischer, S., & Yamamoto, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5, 494–496.
- Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Ave, P., ... 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.
- Sahu, S., & Lynn, W. S. (1977). Lipid composition of human alveolar macrophages. *Inflammation*, 2, 83–91.
- Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., Gunther, G., & Gratton, E. (2007). Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. In E. A.

- Méndez-Vilas, & J. Díaz (Eds.), *In modern research and educational topics in microscopy* (pp. 1007–1014).
- Schaible, U. E., Winau, F., Sieling, P. A., Fischer, K., Collins, H. L., Hagens, K., ... Kaufmann, S.H. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nature Medicine*, *9*, 1039–1046.
- Simeone, R., Constant, P., Guilhot, C., Daffe, M., & Chalut, C. (2007). Identification of the missing trans-acting enoyl reductase required for phthiocerol dimycocerosate and phenolglycolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, *189*, 4597–4602.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., & Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathogens*, *8*, e1002507.
- Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Groschel, M. I., Brodin, P., Brosch, R., & Majlessi, L. (2015). Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathogens*, *11*, e1004650.
- Simeone, R., Majlessi, L., Enninga, J., & Brosch, R. (2016). Perspectives on mycobacterial vacuole-to-cytosol translocation: The importance of cytosolic access. *Cellular Microbiology*, *18*, 1070–1077.
- Smith, J., Manoranjan, J., Pan, M., Bohsali, A., Xu, J., Liu, J., ... 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.
- Stamm, L. M., Morisaki, J. H., Gao, L. Y., Jeng, R. L., McDonald, K. L., Roth, R., ... Brown, E.J. (2003). *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *The Journal of Experimental Medicine*, *198*, 1361–1368.
- Stewart, G. R., Patel, J., Robertson, B. D., Rae, A., & Young, D. B. (2005). Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathogens*, *1*, 269–278.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., ... Bloom, B.R. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, *351*, 456–460.
- Tabouret, G., Astarie-Dequeker, C., Demangel, C., Malaga, W., Constant, P., Ray, A., ... Guilhot, C. (2010). *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathogens*, *6*, e1001159.
- Tan, T., Lee, W. L., Alexander, D. C., Grinstein, S., & Liu, J. (2006). The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cellular Microbiology*, *8*, 1417–1429.
- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., ... Peters, P.J. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, *129*, 1287–1298.
- van Kessel, J. C., & Hatfull, G. F. (2007). Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Methods*, *4*, 147–152.
- Veyrier, F. J., Dufort, A., & Behr, M. A. (2011). The rise and fall of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Trends in Microbiology*, *19*, 156–161.
- Wang, J., McIntosh, F., Radomski, N., Dewar, K., Simeone, R., Enninga, J., ... Behr, M.A. (2015). Insights on the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the analysis of *Mycobacterium kansasii*. *Genome Biology and Evolution*, *7*, 856–870.
- Wong, K. W., & Jacobs, W. R. Jr. (2011). Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology*, *13*, 1371–1384.
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., & Daffe, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of Bacteriology*, *190*, 5672–5680.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Augenstreich J, Arbues A, Simeone R, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cellular Microbiology*. 2017;e12726. <https://doi.org/10.1111/cmi.12726>

ESAT-6 requires phthiocerol dimycocerosates to induce phagosomal rupture and host cell death during infection with *Mycobacterium tuberculosis*

Jacques Augenreich^{1*}, Ainhoa Arbues^{1*}, Roxane Simeone^{2*}, Evert Haanappel¹, A. Wegener¹, Fadel Sayes² Fabien Le Chevalier², Christian Chalut¹, Wladimir Malaga¹, Christophe Guilhot¹, Roland Brosch^{2**}, and Catherine Astarie-Dequeker¹

Supporting Information

- I- Supplementary experimental procedure**
 - **Characterization of the membrane lipid order using the generalized polarization of C-Laurdan**
 - Membrane organization and C-Laurdan generalized polarization*
 - Discussion of the membrane fluidity of the LUV used in this study*
 - **Extraction and analysis of extractable lipids and ESAT-6 secretion.**
- II- Supplementary figures and legends**
- III- Supplementary table**
- IV- Supplementary References**

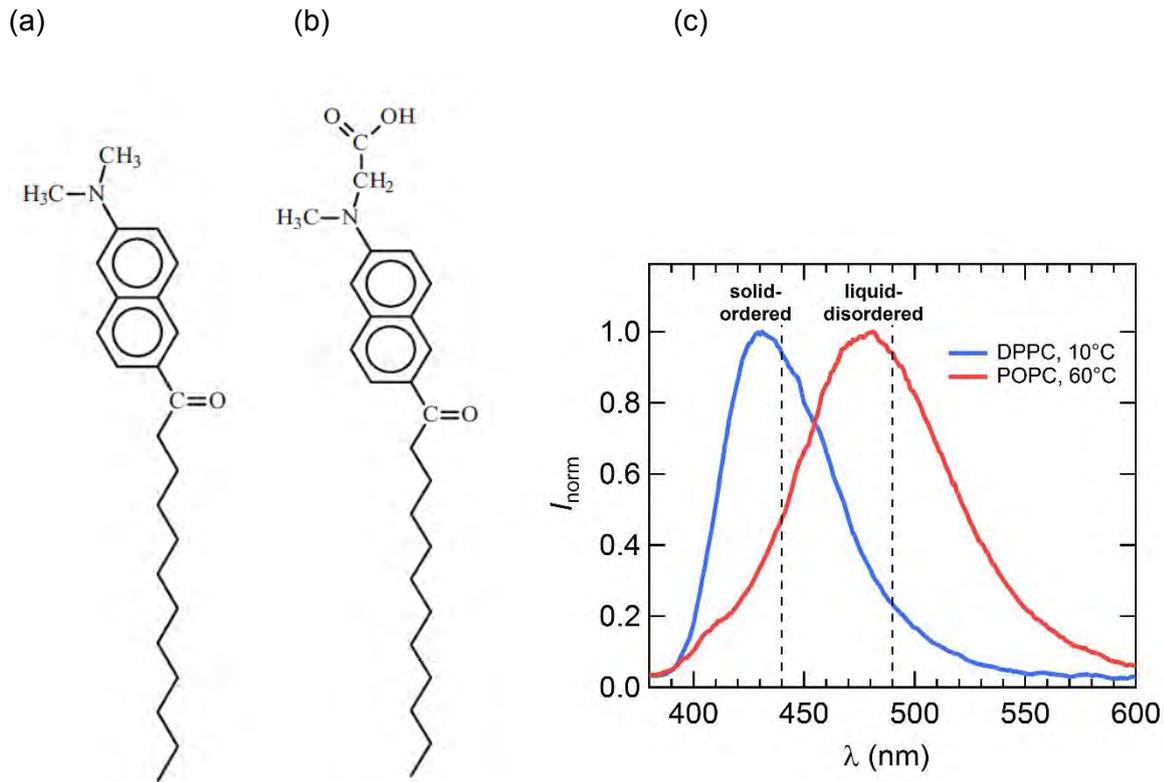
I Supplementary experimental procedure

Characterization of the membrane lipid order using the generalized polarization of C-Laurdan

Membrane organization and C-Laurdan generalized polarization

Membrane lipid order and the organization of the cell membrane in microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids (Simons and Sampaio, 2011) influence the localization and function of membrane proteins, as well as cellular processes occurring at the membrane (Lingwood and Simons, 2010; van Meer *et al.*, 2008). Artificial lipid membranes of simple compositions can exist in two phases: a fluid liquid-disordered phase, where the lipid acyl chains are disordered and the lipid molecules diffuse freely, and a rigid solid-ordered phase, where the acyl chains are extended and the lipid molecules immobile. In the solid-ordered phase, the lipids are tightly packed together. As a result, the membrane is highly impermeable to water. In the liquid-disordered phase, on the contrary, the lipid molecules are more loosely arranged; water molecules can penetrate between the lipids. Cholesterol, with its flat and rigid structure of fused rings, straightens the acyl chains of the lipids but does not impede their lateral mobility. This results in an intermediate liquid-ordered phase, with ordered lipid chains but lateral diffusion of the lipids. In a rigid membrane, on the contrary, cholesterol interferes with the lipid packing and introduces disorder in the membrane.

Fluorescence-based methods have been developed to characterize the lipid order in artificial and cell membranes (Kaiser *et al.*, 2009). One common method uses the fluorescent properties of Laurdan (Figure a below) or the related C-Laurdan (Figure b below). Both are solvatochromic dyes, meaning that their fluorescence emission spectrum depends on the polarity of the surrounding medium. In an apolar solvent like hexane, the Laurdan spectrum shifts toward shorter wavelengths (blue shift) whereas it shifts toward longer wavelengths (red shift) in a polar solvent like water. Likewise, when Laurdan is used as a label in a lipid membrane, its spectrum reflects the polarity of that membrane. In a fluid membrane the lipids are loosely packed, water molecules can penetrate into the space between the lipids, the polarity is high and the Laurdan spectrum shifts toward the red. On the contrary, in a rigid membrane the lipids are tightly packed without room for water, the polarity is low and the spectrum shifts toward the blue. This is illustrated by the two fluorescence spectra of C-Laurdan shown in Figure c below representing a rigid, solid-ordered phase (blue curve) and a fluid, liquid-disordered phase (red curve). Hence, the fluorescence spectrum of Laurdan reflects the degree of water penetration in the membrane and can be used to characterize the physical phase of a lipid membrane.



Molecular structures of Laurdan (a) and C-Laurdan (b) taken from (Mazères2014). (c) Representative fluorescence spectra of C-Laurdan in a rigid (blue, DPPC at 10°C) and a fluid (red, POPC at 60°C) membrane phase. The dashed lines correspond to the wavelengths of 440 nm and 490 nm used for the calculation of the generalized polarization. GP values are calculated from these spectra: $GP = +0.60$ (DPPC) and $GP = -0.33$ (POPC). It should be noted that the intensity maxima for C-Laurdan occur at slightly shorter wavelengths than for Laurdan; nevertheless, the Laurdan wavelengths are used by convention for the calculation of GP.

Laurdan and C-Laurdan are widely used to label the plasma membrane of cells in order to study lipid order and the presence of microdomains by confocal or two-photon microscopy. C-Laurdan labels the plasma membrane and internal membranes, whereas the more hydrophobic Laurdan preferentially labels cytosolic compartments and lipid droplets (Mazeres *et al.*, 2014). Thus, C-Laurdan is more useful than Laurdan for the labeling of membranes in live cells; for this reason, we have chosen to use C-Laurdan for our study.

The spectrum of Laurdan is often expressed in terms of the generalized polarization (GP) defined by: $GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$. Here I_{440} and I_{490} are the fluorescence intensities at 440 nm and 490 nm, respectively. These are the wavelengths of the fluorescence maxima of

Laurdan in the solid-ordered and the liquid-disordered phase, respectively (Parasassi *et al.*, 1991). For C-Laurdan these wavelengths are slightly lower (Figure c above) but the Laurdan values are used by convention. In the rigid membrane phase, the spectrum is dominated by the intensity peak at 440 nm; GP is large and positive. In the fluid phase, on the contrary, the peak at 490 nm increases in intensity; GP is smaller or even negative. To illustrate the method, we show in Figure c above normalized fluorescence spectra for two opposite membrane phases: the solid-ordered phase in liposomes of DPPC at 10°C has a GP of +0.60, and the liquid-disordered phase in liposomes of POPC at 60°C has a GP of -0.33.

Discussion of the membrane fluidity of the LUV used in this study

In this article, we have studied the activity of the pore-forming protein ESAT-6 in lipid membranes of different fluidities, containing or not the mycobacterial lipids DIM. To aid in the interpretation of the results, we have characterized the membrane fluidity of these liposomes using C-Laurdan. We will now discuss the temperature variation of the membrane fluidity of these liposomes in the light of our discussion of the properties of C-Laurdan. In the case of POPC, which has a melting temperature $T_m = -2^\circ\text{C}$, liposomes are in the liquid-disordered phase over the entire temperature range explored. This is reflected in the GP value, which is slightly positive at the lowest temperatures and becomes negative for $T > 20^\circ\text{C}$. Nevertheless, within the liquid-disordered phase the GP-value monotonously decreases as the temperature increases. This indicates that the liquid-disordered phase becomes more fluid as temperature increases, like a viscous liquid becoming less viscous with increasing temperature. At the other end, DPPC has a melting temperature $T_m = 41^\circ\text{C}$. Indeed, the GP value of DPPC shows a steep drop at this temperature, reflecting the transition from the solid-ordered phase to the liquid disordered phase. A third case is provided by liposomes made of POPC-cholesterol-sphingomyelin (1:1:1). This lipid composition represents the so-called “raft phase”, an example of a liquid-ordered phase. As can be seen from Fig. S6, this membrane composition shows a gradual evolution from a rigid phase to a fluid phase upon increasing temperature, without any phase transition. Cholesterol rigidifies a fluid membrane. This is seen in the POPC/Chol (9:1) liposomes, made by adding 10% cholesterol to POPC, which have a higher GP than POPC liposomes and are therefore more rigid. Nevertheless, this composition was chosen in order to contain an essential constituent of cell membranes—cholesterol—while remaining in a liquid-disordered phase at room temperature (de Almeida *et al.*, 2003). Addition of GM1 ganglioside or sphingomyelin further rigidifies the membrane. For these compositions, however, phase separation may occur in the membrane, resulting in inhomogeneous membranes containing microdomains enriched in cholesterol and

sphingomyelin or GM1. Finally, according to the GP value, the liposomes made from THP-1 lipids represent the most rigid membranes on which the activity of ESAT-6 was evaluated. Nevertheless, due to the complexity of the THP-1 cell membrane, it is likely that this composition represents a mixture of different phases with different compositions and rigidities.

We observe in Fig. S6 that the GP of C-Laurdan changes little when 10% DIM is incorporated in the liposome's membrane composition, even though DIM have been reported to decrease the membrane polarity and to rigidify the membrane (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Only liposomes made with THP-1 lipids show an increase in GP upon DIM incorporation, for temperatures above 30°C. This lack of response may be explained by taking into account the position of the fluorescent moiety of the probe in the membrane, which determines the region of the membrane the probe senses. In Laurdan and C-Laurdan, the fluorescent naphthalene group is positioned close to the surface of the bilayer. Therefore, these probes respond to changes in lipid order occurring close to the membrane surface, but are insensitive to polarity changes in the hydrophobic core of the membrane. If DIM were located in the hydrophobic core of the lipid bilayer, then C-Laurdan would not be sensitive to their presence. The results reported in (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009) have been obtained using the fluorescent cholesterol analogue Py-met-cho, which is unsuitable for confocal microscopy. That molecule carries a fluorescent pyrene group at the extremity of the aliphatic tail of cholesterol, hence close to the hydrophobic membrane core. So, by combining observations obtained using these two different probes, information on the localization of DIM in the membrane can be deduced.

Extraction and analysis of extractible lipids and EsxA secretion.

For DIM and SL analyses, Mtb strains were grown to exponential growth phase in 10 ml 7H9 liquid medium supplemented with ADC and 0.05% Tween 80 and labelled by incubation with 0.4 Ci. ml⁻¹ [1-¹⁴C] propionate (specific activity of 54Ci.mol⁻¹). Lipids were extracted and separated on TLC plates as described previously (Constant *et al.*, 2002). Alternatively, non-labelled lipids were extracted from 10 mL cultures and analysed by High Performance TLC run in petroleum ether/ethyl acetate (98:2). Lipids were visualized by spraying the plate with 10% phosphomolybdic acid in ethanol followed by heating.

When specified, bacterial cells were harvested from 10 mL cultures and extraction of DIM was performed as described previously (Siméone *et al.*, 2007). Identification of DIM was performed using ESI-MS. The samples were solubilized in 500µl of freshly prepared solvent

(isopropanol/methanol, 70:30 (v/v), formic acid 0.01% (m/v), ammonium hydroxide 0.01%). Data were collected and analysed with software Analyst QS 1.1 software (ABSCIEX).

For ESAT-6 secretion analysis, Mtb strains were grown for three weeks in Sauton liquid medium or 7H9 liquid medium supplemented with 0.2% (w/v) dextrose and 0.085% (w/v) NaCl (to avoid albumin contamination in the secreted protein fraction). The cultures were pelleted by centrifugation and supernatants containing the secreted proteins were filtered (0.22 μ M) and concentrated by ultracentrifugation using Amicon Ultra 3 kDa units (Millipore). Equivalent amounts of secreted protein preparations were loaded and separated on SDS-PAGE 15% gels or NUPAGE bis-Tris pre-cast gel 12% (Invitrogen). Protein quantity and absence of albumin contamination was checked by SDS-PAGE and Coomassie staining. Then, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using wet transfer method (BioRad), and immunodetection was performed using a mouse monoclonal anti-ESAT-6 antibodies (Abcam and Antibodyshop), anti-Groel2 (MyBioSource) as a control lysis, a HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody (BioRad) and chemiluminescent substrates (GE Healthcare Life Science).

II- Supplementary Figures and legends

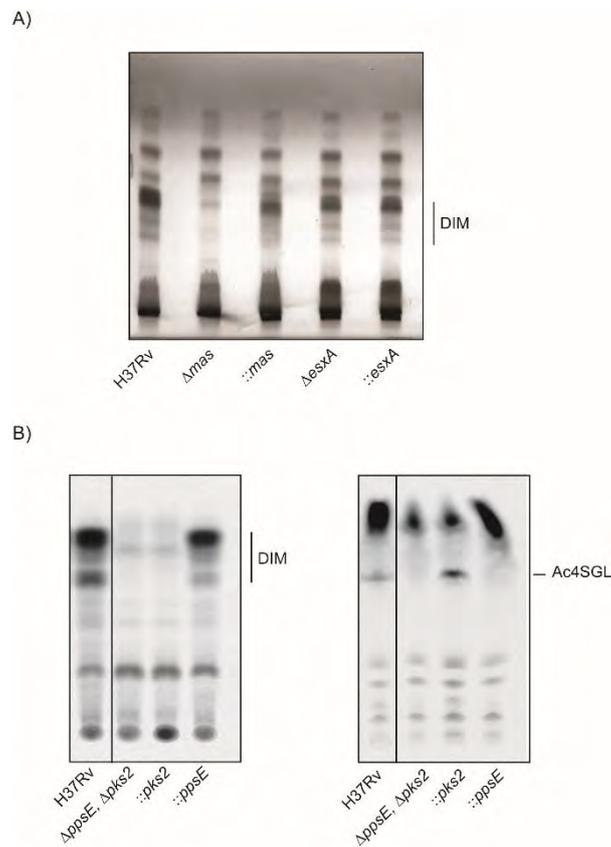


Figure S1: Production of phthiocerol dimycocerosates and sulfolipids in Mtb H37Rv and recombinant strains. TLC analysis of the lipid content of wild-type H37Rv and lipid-deficient mutants. Lipids were radiolabelled with [1-¹⁴C]-propionate. The TLC was run in petroleum ether/ethyl acetate (98:2).

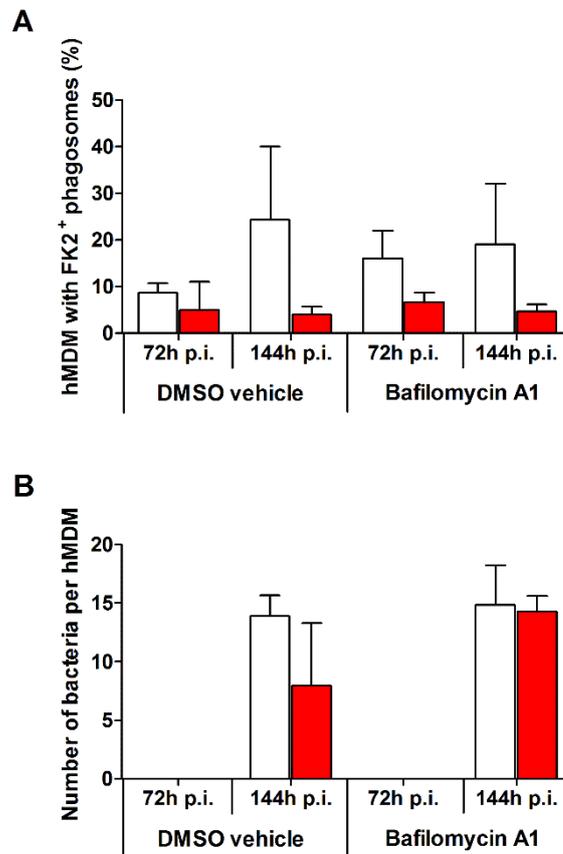


Figure S2: Mtb mutants lacking DIM fail to induce phagosomal membrane damage independently of their ability to accumulate in an acidified compartment in Mtb-infected hMDMs. The cells were treated for 1h before infection and during the time after infection with 100 nM bafilomycin A1 or vehicle control (DMSO). hMDMs were infected for 1h with GFP-expressing Mtb H37Rv (white bars) and the (DIM, SL)-deficient mutant ($\Delta ppsE$, $\Delta pks2$) (red bars). At 72h p.i. (MOI 10:1) and 144h (MOI 2:1) p.i., cells were fixed and processed to quantify: **(A)** the percentage of infected hMDMs having at least one FK2-positive phagosome and **(B)** the number of GFP-positive bacteria per macrophage. The values reported are the means \pm SEM of three independent experiments.

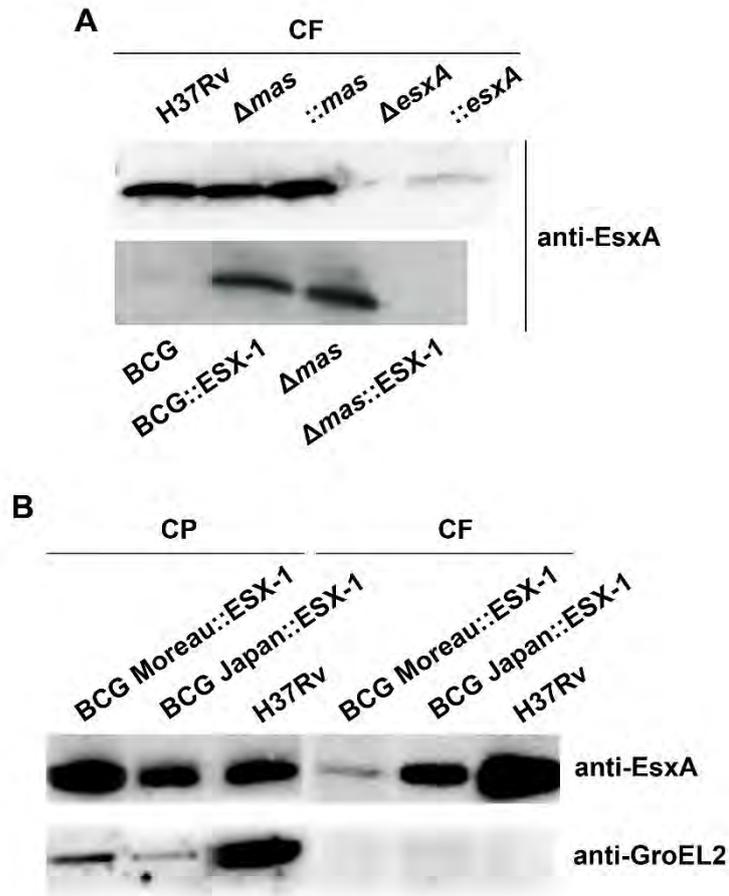


Figure S3. Analysis of EsxA production in recombinant H37Rv and BCG strains. Cell pellet (CP) and cell filtrate (CF) from recombinant H37Rv and BCG strains were subjected to SDS-PAGE 15% gels **(A)** or NUPAGE bis-Tris pre-cast gel 12% **(B)** and tested by Western blotting using a monoclonal anti-EsxA antibody from Abcam **(A)** and Antibodyshop **(B)**. Lysis control using antibodies against GroEL2 indicated that the samples were not contaminated with cytosolic proteins.

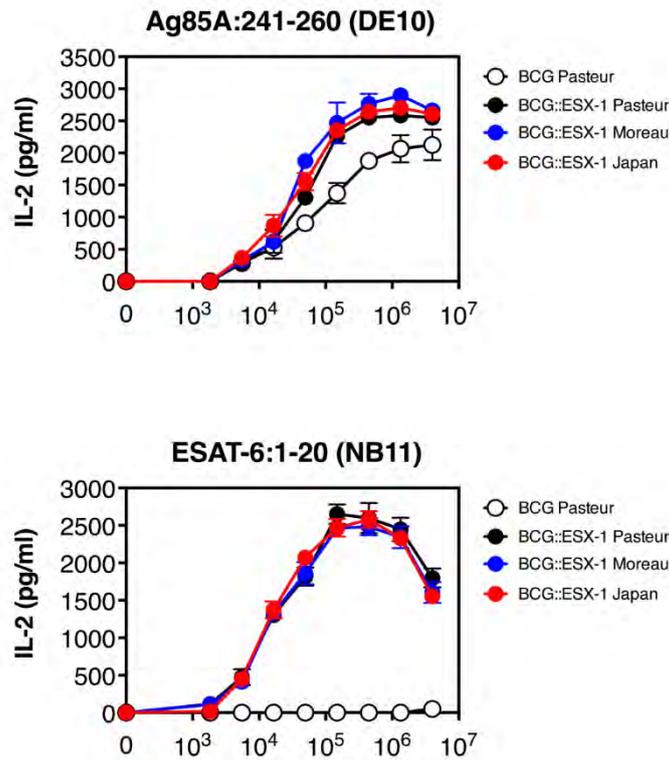


Figure S4. *In vitro* presentation of EsxA or Ag85A by BM-DC (H-2^b) to specific MHC-II-restricted T-cell hybridomas. Bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC-(H-2^b)) were infected with various concentrations of different mycobacterial strains and presentation of EsxA or Ag85A were measured by their capacity to stimulate the I-A^b-restricted T cell hybridomas, specific to EsxA:1-20 (NB11) or Ag85A:241-260 (DE10), respectively. Briefly, after overnight incubation, cells were washed and incubated with NB11 T-cell hybridoma (EsxA:1-20) or DE10 T-cell hybridoma (Ag85A:241-260). Production of IL-2 by specific T cell hybridomas was measured by ELISA. Both strains, BCG::ESX-1 Moreau or BCG::ESX-1 Japan, are able to present comparable amount of EsxA. All strains behaved comparably towards the Ag85A control, emphasizing the specificity of the observed phenomenon for EsxA.

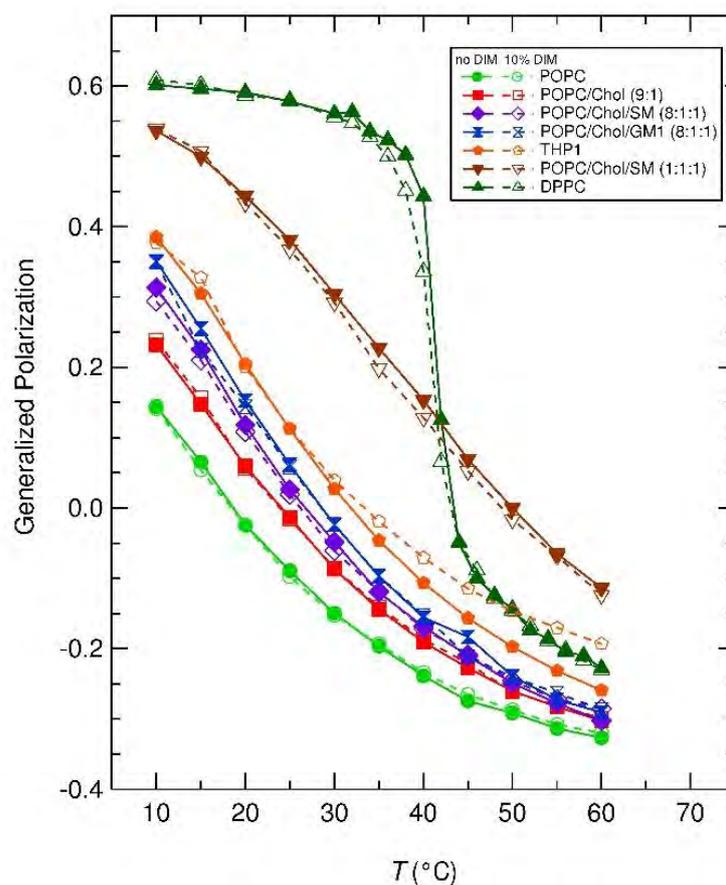


Figure S5. Temperature variations of the membrane fluidity of liposomes with different compositions. The fluidity was characterized using the fluorescence of the membrane probe C-Laurdan and expressed as the Generalized Polarization (GP). High values of GP indicate a rigid membrane, low values of GP a fluid membrane. The solid lines correspond to membranes without DIM, the dashed lines to membranes containing 10% (mol/mol) of DIM. The increasing order of fluidity of the lipid compositions in Figure 6 is derived from the GP at 25°C. DPPC shows the well-known sharp rigid-to-fluid phase transition at 41°C.

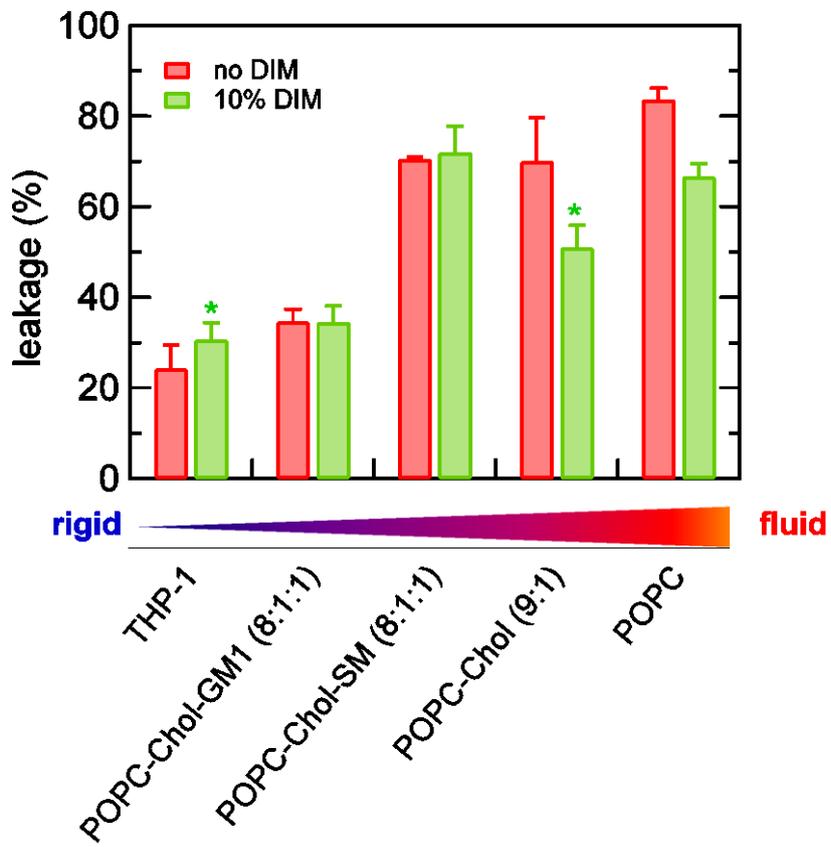


Figure S6. Percentage of calcein leakage induced by 10 μ M ESAT-6 in LUV of different compositions with or without DIM. The indicated values are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ for $n = 3$ independent experiments. The other values are averages of 2 independent experiments.

III- Supplementary table

Table S1. Strains and plasmids used in this study.

Name	Relevant characteristics	Ref./source
<i>Strains</i>		
BCG	<i>M. bovis</i> BCG Pasteur stain 1173P2	This study
BCG Δ <i>mas</i>	<i>M. bovis</i> BCG Δ <i>mas</i> :: <i>res</i>	This study
H37Rv	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (strain Pasteur)	This study
H37Rv Δ <i>mas</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>mas</i> :: <i>res</i>	This study
H37Rv Δ <i>esxA</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>esxA</i> :: <i>res</i>	This study
H37Rv Δ <i>ppeE</i> , Δ <i>pks2</i>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>ppeE</i> :: <i>res</i> , Δ <i>pks2</i> :: <i>res</i>	(Passemar <i>et al.</i> , 2014)
<i>Plasmids</i>		
pYUB412	<i>E. coli</i> -mycobacteria shuttle cosmid vector, Hyg ^R	(Bange <i>et al.</i> , 1999)
pRD1-2F9	pYUB412 derivative carrying the extended RD1 region (<i>Rv3860</i> to <i>Rv3885</i>) from <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, Hyg ^R	(Pym <i>et al.</i> , 2002)
pCG211	pMIP12 derivative containing the <i>gfp</i> gene, Km ^R	(Astarie-Dequeker <i>et al.</i> , 2009)
pMAS3	pMV361 derivative containing the upstream sequence and the coding region of <i>mas</i> , Hyg ^R	This study

pMVesxBA	pMV361 derivative containing the <i>esxB</i> and <i>esxA</i> genes behind the <i>pblaF</i> * promoter, Hyg ^R	This study
pMVE	pMV361 derivative containing the <i>ppsE</i> gene behind the <i>pblaF</i> * promoter, Hyg ^R	(Astarie-Dequeker <i>et al.</i> , 2009)
cosmid CIE526	The CIE526 cosmid carries the <i>pks2</i> locus region (4279kb to 4321kb) from H37Rv	Unpublished data

IV- Supplementary References

- de Almeida, R.F.M., Fedorov, A., and Prieto, M. (2003). Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.* **85**: 2406–2416.
- 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.
- Bange, F.C., Collins, F.M., and Jacobs, W.R. (1999). Survival of mice infected with *Mycobacterium smegmatis* containing large DNA fragments from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* **79**, 171–180.
- Constant, P., Perez, E., Malaga, W., Lan elle, M.-A., Saurel, O., Daff e, 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.
- Kaiser, H.-J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J.L., Kalvodova, L., Rajendran, L., and Simons, K. (2009). Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16645–16650.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50.
- Mazeres, S., Joly, E., Lopez, A., and Tardin, C. (2014). Characterization of M-laurdan, a versatile probe to explore order in lipid membranes. *F1000Research* **3**, 172.
- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124.
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M., and Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **60**, 179–189.
- Passemar, C., Arbués, A., Malaga, W., Mercier, I., Moreau, F., Lepourry, L., Neyrolles, O., Guilhot, C., and Astarie-Dequeker, C. (2014). Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **16**, 195–213.

- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. and Cole, S.T. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**: 709-717.
- Siméone, R., Constant, P., Guilhot, C., Daffé, M., and Chalut, C. (2007). Identification of the missing trans-acting enoyl reductase required for phthiocerol dimycocerosate and phenolglycolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **189**, 4597–4602.
- Simons, K., and Sampaio, J.L. (2011). Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004697.

3) Discussion

Nos travaux démontrent que *M. tuberculosis* exploite les DIM de concert avec le système ESX-1 pour induire la rupture de la membrane phagosomale et provoquer la mort par apoptose des macrophages infectés. Une analyse plus approfondie indique que les DIM potentialisent l'activité membranolytique de la protéine EsxA/ESAT-6 dans des membranes modèles formées de lipides de cellules THP-1.

Des approches de cryomicroscopie ont révélé que *M. tuberculosis* s'échappe du phagosome et s'accumule dans le cytosol (Houben *et al.*, 2012, Jamwal *et al.*, 2016, van der Wel *et al.*, 2007). Cette translocation dans le cytosol nécessite que *M. tuberculosis* parvienne à endommager la membrane phagosomale et à la rompre (Simeone *et al.*, 2012, Wong and Jacobs Jr, 2011). Jusqu'à très récemment, cette étape de rupture phagosomale était exclusivement attribuée au système de sécrétion ESX-1 et à ESAT-6. Nos travaux indiquent que les DIM aussi sont requis pour ce processus. Ce constat a depuis été confirmé dans d'autres études lors de l'infection de macrophages (Barczak *et al.*, 2017, Quigley *et al.*, 2017) et de cellules endothéliales lymphatiques (Lerner *et al.*, 2018). Les travaux de Barczak et collaborateurs corrélient l'absence de rupture phagosomale avec une baisse de la sécrétion d'ESAT-6, consécutive à l'absence de DIM dans des mutants de transposition ou de délétion de *M. tuberculosis* (Barczak *et al.*, 2017). Ce n'est pas le cas du mutant déficient en DIM utilisé par Quigley et collaborateurs (Quigley *et al.*, 2017), ni de notre mutant de *M. tuberculosis* délété du gène *mas*, qui sécrètent ESAT-6 à un niveau comparable à celui de la souche sauvage (Article, Figure S3A). Cependant, nos données ne permettent pas de conclure quant au rôle des DIM dans l'échappement de *M. tuberculosis* dans le cytosol. Pour cela, il faudrait visualiser l'échappement par cryo-microscopie électronique comme décrit précédemment pour *M. tuberculosis* (Jamwal *et al.*, 2016, van der Wel *et al.*, 2007). Cependant, Lerner et collaborateurs ont pu montrer par cette technique que les DIM contribuent à l'accumulation de *M. tuberculosis* dans le cytosol de cellules endothéliales humaines (Lerner *et al.*, 2018).

Le phénomène de rupture phagosomale est largement décrit et est associé à la pathogénicité de plusieurs agents infectieux, comme *Listeria monocytogenes* ou *Shigella Flexneri* (Friedrich *et al.*, 2012). Classiquement, ce processus fait intervenir des protéines membranolytiques sécrétées par les bactéries capables de perméabiliser la membrane phagosomale. *L. monocytogenes*, par exemple, sécrète une lysine, appelée lystériolysine, et des phospholipases qui permettent la destruction de la vacuole bactérienne (Alberti-Segui *et al.*, 2007). En revanche, sur membranes modèles les DIM seuls n'induisent pas de lyse. Ils collaborent avec le système ESX-1/ESAT-6 de *M. tuberculosis*, connu depuis longtemps

pour être responsable de la lyse membranaire, comme celle observée dans le phagosome. Cette collaboration entre ces facteurs majeurs de virulence est inédite. Pour tenter de comprendre de quelle manière les DIM participent à la lyse membranaire, nous avons recherché si les DIM affectent l'activité membranolytique d'ESAT-6 dans différents modèles de liposomes. En effet, lorsqu'ils sont insérés dans une membrane constituée de lipides de cellules THP-1, les DIM augmentent l'activité membranolytique d'ESAT-6. Cet effet potentialisateur des DIM dépend toutefois de la composition lipidique des liposomes. Leur insertion dans des liposomes de POPC seul et de POPC enrichi en cholestérol diminue l'activité lytique d'ESAT-6. Cela suggère que l'effet de potentialisation passe par un ou plusieurs lipides spécifiques non-identifiés, présents dans l'extrait lipidique de THP-1.

Une étude récente a montré que la lyse dépendante du système ESX-1 nécessite un contact physique entre la bactérie et la cellule cible (ici l'érythrocyte) (Conrad *et al.*, 2017). En effet, la séparation physique des bactéries avec les érythrocytes, à l'aide d'inserts de culture cellulaire permettant la diffusion de petites molécules, inhibe totalement l'hémolyse induite par ESX-1 (Conrad *et al.*, 2017). Cette nécessité d'un contact est intéressante pour notre modèle d'étude selon lequel les DIM s'insèrent dans la membrane plasmique du macrophage lors du contact entre la bactérie et la cellule. La collaboration entre les DIM et ESAT-6 dans l'activité membranolytique pourrait donc avoir lieu au point de contact entre la bactérie et la cellule. Cependant, l'étude de Conrad et collaborateurs a soulevé un problème sérieux concernant ESAT-6 et sa production sous forme recombinante. Ils ont utilisé dans leurs expériences ESAT-6 recombinante fournie par l'agence américaine BEI (Biodefense and Emerging Infections) Resources. Les résultats montrent qu'après la digestion d'ESAT-6 recombinante à la protéinase K, l'activité membranolytique restait préservée, contrairement à celle d'autres protéines membranolytiques (Conrad *et al.*, 2017). Les auteurs avancent que l'activité observée serait en fait due à la présence résiduelle de détergent dans l'échantillon, utilisé lors de la purification de la protéine. Pour notre étude, nous avons également utilisé ESAT-6 recombinante fournie par le BEI. L'observation de Conrad et collaborateurs soulève donc un potentiel biais dans nos résultats, car l'activité d'ESAT-6 observée sur les liposomes pourrait être due au détergent résiduel et non à ESAT-6 elle-même. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mis en place une campagne d'expériences pour vérifier la présence du détergent et son activité dans nos conditions de lyse de liposomes. Les résultats seront présentés dans le chapitre suivant de ce manuscrit. Néanmoins, nos résultats en condition d'infection montrent sans équivoque que les DIM et ESAT-6 collaborent dans l'induction de la rupture phagosomale. En revanche, le mécanisme d'action sous-jacent reste encore à déterminer. La capacité des DIM à moduler une activité membranolytique est intéressante car il est envisageable que cette modulation ne soit pas spécifique d'ESAT-6, mais concerne

aussi d'autres effecteurs impliqués dans la rupture phagosomale. De plus, il a récemment été montré que l'induction de la rupture phagosomale ne dépend pas uniquement de la sécrétion d'ESAT-6 mais aussi du recrutement de facteurs de l'hôte, en fonction de la souche de *M. tuberculosis* étudiée (Jamwal *et al.*, 2016). Leurs résultats montrent que la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) de l'hôte est activée rapidement après l'infection et contribue à la rupture phagosomale de manière non négligeable.

L'accès au cytosol est déterminant pour le devenir de la bactérie et de son hôte. Il conditionne notamment le programme de mort cellulaire qui est essentiel à la multiplication de *M. tuberculosis* et à sa propagation. Nos travaux indiquent que les DIM sont aussi impliqués dans la mort des macrophages humains infectés par *M. tuberculosis*. La comparaison du programme de mort cellulaire induit par la souche sauvage H37Rv et par son mutant H37Rv Δ mas indique qu'une partie des macrophages infectés meurent par apoptose et que cette apoptose est dépendante de la production de DIM (Article Figure 7). Une faible proportion des cellules apoptotiques qui ne sont pas prises en charge par les macrophages voisins entre en nécrose secondaire selon un processus qui nécessite aussi la présence des DIM. Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui rapporte que l'infection d'une lignée de macrophages humains par le mutant H37Rv Δ mmpL7, déficient pour le transport de DIM, engendre moins de mort cellulaire (Quigley *et al.*, 2017).

Comment les DIM agissent et quel est le lien avec la rupture du phagosome sont des points qui restent à élucider. Un lien entre la rupture du phagosome et l'induction de la nécrose des macrophages infectés par *M. tuberculosis* a été décrit (Simeone *et al.*, 2012, Wong and Jacobs Jr, 2011). Il impliquerait entre autre la protéine ESAT-6 et l'activation du récepteur cytosolique NLRP3 impliqué dans le déclenchement d'une nécrose de type pyroptose (Wong and Jacobs Jr, 2011). Cette activation peut d'ailleurs s'effectuer par un efflux d'ions K⁺ après perméabilisation de la cellule par des agents membranolytiques, comme la toxine bactérienne nigéricine (Muñoz-Planillo *et al.*, 2013). Ces observations représentent une piste sérieuse pour étudier plus précisément les propriétés nécrotiques des DIM décrites dans les THP-1 (Quigley *et al.*, 2017).

Dans nos conditions, nous observons plutôt une nécrose secondaire résultant de l'apoptose. Le mécanisme sous-jacent à l'activité pro-apoptotique des DIM n'est pas connu. Cependant, nous montrons qu'elle nécessite l'activation des caspases 3 et 9 qui sont associées à la voie d'apoptose dépendante des mitochondries (Figure 12). Comme il a été montré que les DIM ciblent les membranes de la cellule hôte (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009), ils pourraient aussi interagir avec la membrane mitochondriale, et par conséquent affecter l'activité des protéines membranaires de la famille Bcl-2, comme Bax et Bak qui perméabilisent la mitochondrie et

induisent le relargage de cytochrome *c* dans le cytosol (Figure 12). Dans ce sens, les travaux de Beatty et collaborateurs indiquent que des composés lipidiques de la paroi mycobactérienne sont exportés en dehors du phagosome via le trafic vésiculaire et s'associent à des organelles intracellulaires (Beatty *et al.*, 2000). Il n'est donc pas exclu que les DIM empruntent cette voie pour atteindre les mitochondries. Par ailleurs, la rupture phagosomale stimulée par les DIM pourrait faciliter la libération de composés bactériens dans le cytosol. Un certain nombre de facteurs pro-apoptotiques ont été décrits chez *M. tuberculosis* (Liu *et al.*, 2015), dont le système ESX-1 et ESAT-6. Nous montrons effectivement que les DIM contribuent à l'apoptose dépendante d'ESX-1 (Article Figure 8). Mais le lien entre les DIM et ESX-1 n'est pas clair. Le rôle pro-apoptotique d'ESX-1/ESAT-6 a été décrit pour la première fois dans des macrophages infectés par *M. tuberculosis*. Sa caractérisation a permis de montrer une activation des caspases 1,3,5,7 et 8 et la formation de pores à la membrane (Derrick and Morris, 2007). Par la suite, d'autres études ont proposé qu'un traitement de macrophages avec ESAT-6 induit un stress du réticulum endoplasmique qui conduit au relargage de calcium dans le cytosol (Choi *et al.*, 2010, Grover and Izzo, 2012). Ceci est une étape clé dans le déclenchement de la voie mitochondriale mais la pertinence physiologique de ces observations est incertaine. Plus récemment, Aguilo et collaborateurs ont proposé que *M. tuberculosis* via la protéine ESAT-6 déclenche un signal d'activation de la protéine pro-apoptotique Bim (aussi appelée Bcl-2-like protein 11), qui est activée notamment en condition de stress du RE (Puthalakath *et al.*, 2007) et conduit à l'activation de Bax et Bak pour déclencher l'apoptose dépendante des mitochondries (Figure 12) (Aguiló *et al.*, 2014). Cette étape pourrait faire le lien entre les DIM et ESAT-6 dans l'apoptose. Des études complémentaires doivent permettre de vérifier ces différentes pistes afin de progresser dans la compréhension des propriétés pro-apoptotiques des DIM.

Se pose aussi la question de l'importance de l'induction d'un programme de mort cellulaire particulier dans la contribution des DIM à la virulence du bacille. Une étude récente rapporte que *M. tuberculosis* se multiplie dans les macrophages nécrotiques avant de s'en échapper pour infecter de nouvelles cellules (Lerner *et al.*, 2017). L'activité pro-nécrotique des DIM pourrait donc participer à leur rôle dans la croissance intracellulaire du bacille (Passemar *et al.*, 2014). L'activité pro-apoptotique des DIM et d'ESAT-6 est plus difficile à concilier avec leur rôle dans la virulence car l'apoptose est classiquement considérée comme un mécanisme de défense anti-inflammatoire dédié à l'élimination des agents infectieux. Cependant, le rôle de l'apoptose dans la virulence de *M. tuberculosis* reste un sujet très débattu et des résultats contradictoires soutiennent à la fois une inhibition et une activation de l'apoptose. Le fait est que l'induction de l'apoptose est une caractéristique des souches

mycobactériennes exprimant ESX-1 (Aguiló *et al.*, 2013). Nous le confirmons avec les souches de *M. tuberculosis* et son mutant $\Delta esxA$, et la souche *M. bovis* BCG complétée avec RD1 (Article Figure 7-8). Or les souches exprimant ESX-1 sont capables de réinfecter de nouvelles cellules, contrairement aux souches qui en sont dépourvues (Aguiló *et al.*, 2013). L'importance de l'apoptose dépendante d'ESX-1 pour la propagation intercellulaire du bacille a également été observée *in vivo* dans le poisson-zèbre (Davis and Ramakrishnan, 2009). De manière remarquable, ce phénotype est partagé avec les souches produisant des DIM (Passemar *et al.*, 2014).

L'apoptose régule aussi la réponse inflammatoire. L'ingestion par efferocytose des corps apoptotiques contenant *M. tuberculosis* par les phagocytes environnants favorise l'élimination du bacille (Martin *et al.*, 2012), mais elle stimule aussi la production de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10. L'IL-10 est une cytokine pléiotrope qui exerce des fonctions antagonistes vis-à-vis de la réponse immunitaire lors de l'infection, qui vont de l'activité protectrice de l'hôte à l'induction de réponses favorables à la persistance de *M. tuberculosis* (Abdalla *et al.*, 2016). Elle peut augmenter la survie et la croissance du bacille au sein des macrophages en bloquant la maturation du phagosome (O'Leary *et al.*, 2011). L'IL-10 favorise aussi la polarisation des monocytes en macrophages permissifs (Mantovani *et al.*, 2004). Ainsi, il serait intéressant d'explorer le rôle des DIM et leurs propriétés pro-apoptotiques sur la réponse inflammatoire dans un modèle *in vivo*, dans les phases précoces de l'infection.

En résumé, nos travaux ont mis en lumière l'importance et le rôle des DIM dans des étapes cruciales de l'infection des macrophages par *M. tuberculosis*, et leur rôle pléiotrope dans le trafic intracellulaire de la bactérie. Les travaux précédents de l'équipe avaient montré l'implication des DIM dans la phagocytose de la bactérie (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009), sa capacité à inhiber la maturation phagosomale et à sa dissémination aux macrophages environnants (Passemar *et al.*, 2014). Nos résultats ont complété ces connaissances en montrant qu'ils sont aussi requis pour la rupture du phagosome et l'induction de l'apoptose. Les DIM sont donc cruciaux dès l'entrée jusqu'à la sortie de la bactérie de la cellule hôte, en altérant l'activité de plusieurs partenaires membranaires de l'hôte (notamment le CR3 et la pompe H^+ -ATPase) et mycobactérien (ESAT-6). Une hypothèse avancée est que les DIM modulent l'activité de ces effecteurs par leur impact au niveau des propriétés biophysiques de la membrane (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Ainsi, comprendre l'interaction des DIM avec la membrane et les conséquences de cette interaction sur les effecteurs membranaires pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies visant à contrer ses effets et à rendre la bactérie sensible aux réponses microbicides du macrophage.

II. Etude du mécanisme moléculaire d'action des DIM

1) Introduction

L'objectif de la seconde partie du projet a été de progresser dans l'identification du mécanisme moléculaire d'action des DIM. Les résultats précédents montrent qu'ils jouent un rôle dans un large spectre de processus cellulaires du macrophage, de l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte jusqu'à sa mort, favorisant la dissémination de la bactérie. Ce caractère pléiotrope des DIM renforce l'hypothèse selon laquelle ils agissent dans ces processus par une interaction ou une insertion avec la membrane du macrophage et par la modification des propriétés biophysiques membranaires (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Parmi ces processus cellulaires, nous avons montré que les DIM contribuent à l'induction de dommages membranaires et à la rupture phagosomale en collaboration ESAT-6.

Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire d'action des DIM, nous avons d'abord exploré la capacité d'interaction des DIM avec la membrane de la cellule, et leur capacité à modifier les propriétés biophysiques des membranes. Nous avons ensuite cherché à mieux comprendre les conséquences de cette interaction sur l'activité membranolytique d'ESAT-6.

Notre stratégie a été i) de déterminer si les DIM à la surface de la bactérie sont transférés à la membrane du macrophage, ii) de rechercher si l'impact des DIM sur la membrane est localisé uniquement au point de contact avec la bactérie ou est plus étendu, et enfin iii) de comprendre comment leurs effets sur la membrane peuvent impacter l'activité membranolytique d'ESAT-6.

2) Résultats partie 1 : Etude du transfert des DIM de la bactérie vers les membranes du macrophage

Les effets des DIM sur les propriétés biophysiques des membranes, observés dans les travaux antérieurs de l'équipe (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009), suggéraient que les DIM sont transférés de la bactérie au macrophage et s'insèrent dans la membrane. En accord avec cette hypothèse, des glycolipides de l'enveloppe mycobactérienne avaient été retrouvés dans les membranes du compartiment d'endocytose de macrophages murins infectés par *M. bovis* BCG (Beatty *et al.*, 2000). Le marquage radioactif de ces lipides et leur analyse par chromatographie en couche mince révélait la présence des glycolipides PIM, TMM/TDM, et des PGL (Rhoades *et al.*, 2003). Bien que structurellement proches des PGL, les DIM n'ont pas été décrits, mais le solvant utilisé n'était pas adapté à la migration des lipides apolaires sur plaque de CCM. Sur la base de ces travaux, nous avons recherché la présence de DIM

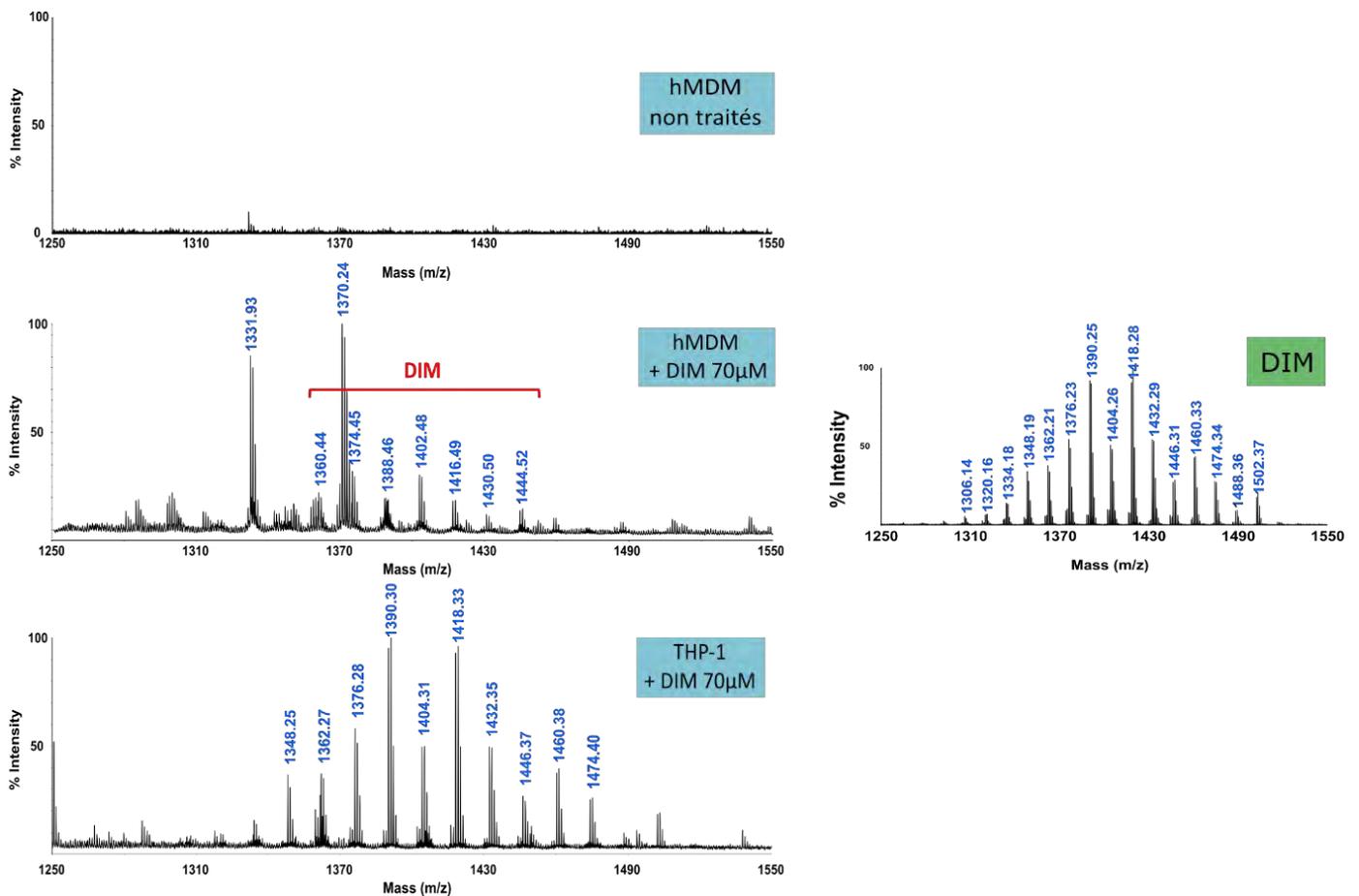


Figure 23: Analyse d'extraits lipidiques de macrophages primaires humains (hMDM) et de cellules THP-1 traités avec des DIM purifiés. Les cellules ont été incubées avec 70 µM de DIM pendant 1h à 37°C, puis les lipides totaux ont été extraits et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le spectre des DIM purifiés est présenté dans le panneau de droite. L'ensemble des pics de masses correspondent à la masse des DIM sous forme d'adduit Na^+ ($M + \text{Na}^+$). Les pics de 1331 Da et 1370 Da dans le spectre de l'extrait des hMDM traités par les DIM correspondent à la matrice de désorption.

dans des fractions membranaires de macrophages infectés par *M. bovis* BCG en adaptant le protocole de fractionnement précédemment décrit (Rhoades *et al.*, 2003) et nous avons mis au point une méthode de détection des DIM par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est très sensible mais elle est néanmoins affectée par les propriétés de désorption des molécules à analyser, qui dépendent de leur quantité et de leur pureté. Dans un premier temps, nous avons recherché les conditions optimales de détection des DIM. Pour cela, des macrophages primaires humains dérivés de monocytes (hMDM) et des cellules THP-1 ont été traités avec des DIM purifiés pendant 1h. Après traitement, les cellules sont récupérées et les lipides sont extraits par la méthode de Bligh et Dyer. L'extrait lipidique est ensuite analysé par spectrométrie de masse. Le spectre de masse des DIM purifiés de référence comprend un ensemble de pics allant d'une masse de 1306 Da à 1502 Da (Naka *et al.*, 2011) (Figure 23). Ces différentes masses représentent la variabilité de structures des DIM, en particulier de la longueur des chaînes d'acides gras des chaînes phthiocérols et mycocérosates (Tableau 3). Comme le montre la Figure 23, après traitement, le spectre des DIM est effectivement observé dans l'extrait lipidique des hMDM et THP-1. Ces données indiquent donc que les DIM interagissent avec les membranes des macrophages.

Néanmoins, pour des expériences en condition d'infection, la présence des autres lipides bactériens pourrait affecter la détection des DIM par MALDI-TOF. Nous avons donc ensuite vérifié que les DIM sont détectables à partir d'un extrait de lipides totaux de *M. bovis* BCG. L'analyse par spectrométrie de masse de l'extrait ne montre pas le spectre caractéristique des DIM (Figure 24B) bien qu'ils soient visibles en chromatographie sur couche mince (Figure 24A). Cela pourrait être dû à la présence d'autres lipides présents en plus grande quantité, comme les phospholipides et des lipides comme les PIM, dont les masses caractéristiques sont retrouvées à 1459 Da et 1698 Da. Cela pourrait aussi être lié à la capacité de ces lipides à mieux désorber de la matrice que les DIM. Une étape supplémentaire de purification des DIM a donc été nécessaire pour pouvoir les détecter par MALDI-TOF. L'extrait lipidique total a été repris dans différents mélanges de solvants à base d'éther de pétrole / éther (EP/E) pour déterminer les conditions optimales de purification, puis passé sur colonne de silice avant d'être analysé par MALDI-TOF. Comme l'indique la Figure 24C, le mélange EP/E (90:10) a permis de purifier des DIM mais également des triacylglycérols, qui correspondent aux pics de masse allant de 773 Da à 1025 Da, dont le signal gêne considérablement celui des DIM (Figure 24C). En revanche, les DIM purifiés avec le mélange EP/E (98:2) sont faiblement contaminés par d'autres espèces lipidiques (Figure 24D). Cette méthode de purification a donc été utilisée pour la détection des DIM dans les expériences présentées ci-après.

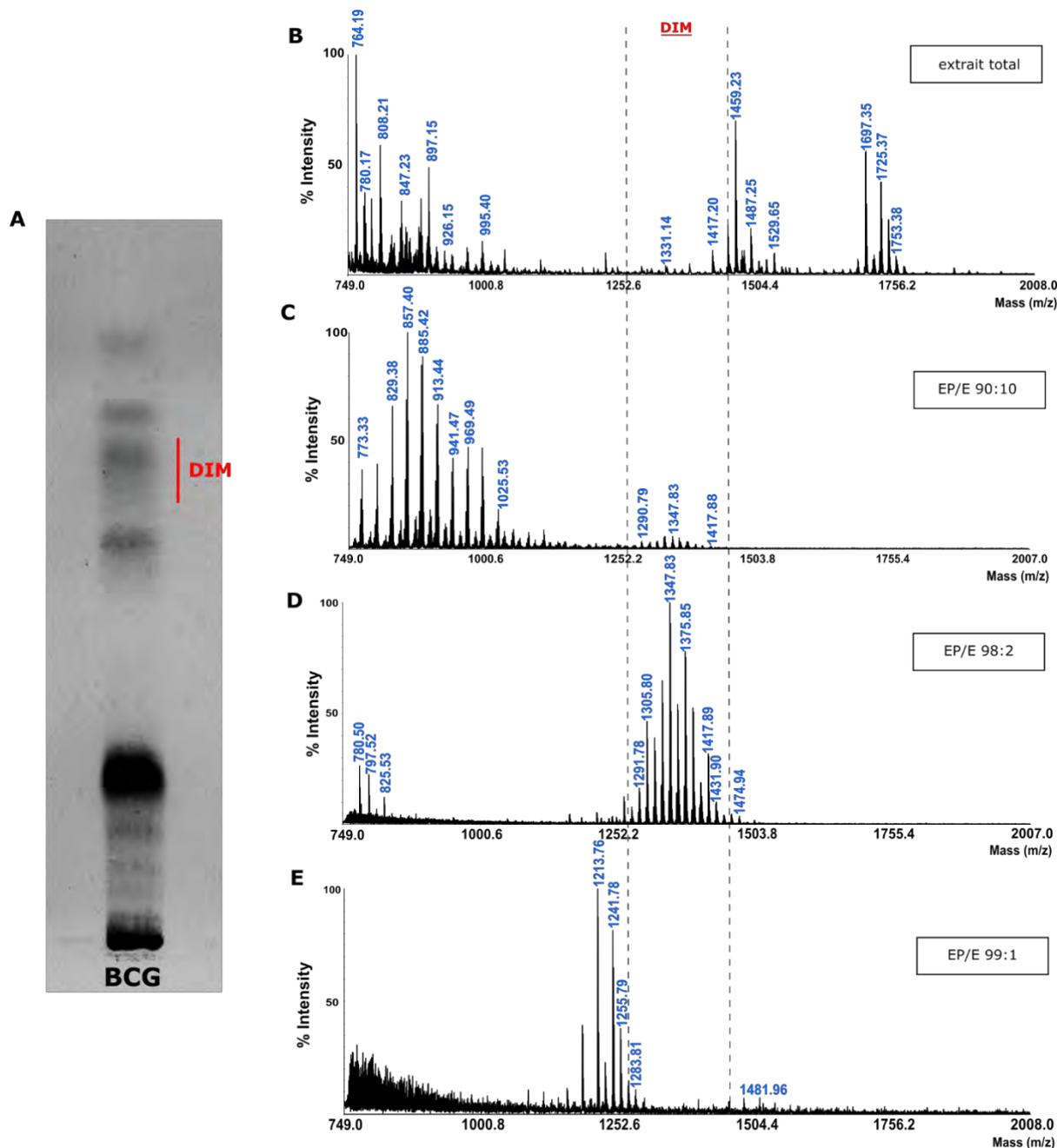


Figure 24: Optimisation de la détection des DIM par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir d'un extrait de lipides totaux de BCG.

(A) Lipides totaux de BCG analysés par chromatographie sur couche mince. La migration a été effectuée à l'aide d'un mélange de solvant EP/E (90:10) et la plaque a été révélée au phosphomolybdate. (B-E) Spectres de masse d'extraits lipidiques obtenus par MALDI-TOF (B) extrait de lipides totaux de BCG. (C-E) extraits lipidiques obtenus après purification des lipides sur colonne de florisol à l'aide de mélanges de solvants EP/E 90:10 (C), 98:2 (D), et 99:1 (E). La gamme des tailles attendues pour les DIM est située dans la zone délimitée par les traits en pointillés.

Une fois la détection des DIM optimisée, des macrophages THP-1 ont été infectés avec *M. bovis* BCG puis fractionnés sur gradient de sucrose pour récupérer la fraction enrichie en membrane plasmique selon la méthode de Rhoades et collaborateurs (Rhoades *et al.*, 2003) (Figure 25A). Après extraction des lipides et purification avec le solvant EP/E (98:2), l'analyse par spectrométrie de masse révèle la présence de DIM dans la fraction membranaire des cellules THP-1 infectés par BCG (Figure 25B). Des résultats comparables ont été obtenus avec des macrophages murins issus de moelle osseuse (Figure 25C). En dépit de nombreux lavages post-infection, 650 CFU (colony forming units) ont été dénombrées et pourraient être responsables de la détection des DIM. Pour le vérifier, la purification des DIM a été réalisée sur des suspensions bactériennes de densité connue. Nos données montrent que les DIM ne sont pas détectables en spectrométrie de masse en dessous de 10^7 CFU (Figure 25D). Cela montre aussi que la détection des DIM dans la fraction membranaire de macrophages n'est pas due aux bactéries présentes dans la fraction, ce qui suggère bien un transfert des DIM dans les membranes.

Pour confirmer que la détection des DIM est bien liée à leur présence à la surface des bactéries, l'expérience a été reproduite sur des macrophages THP-1 infectés par la souche de *M. tuberculosis* H37Rv et par une souche mutante déficiente dans le transport des DIM, H37Rv Δ *ppX* (Sulzenbacher *et al.*, 2006). La figure 26 B-C montre que les DIM sont détectés dans la fraction membranaire des cellules infectées par H37Rv, alors qu'ils ne sont pas détectés dans la fraction membranaire des cellules infectées par H37Rv Δ *ppX*, avec un taux de contamination des fractions comparable entre les souches (1.5×10^3 CFU). Nous avons également vérifié que les deux souches produisent des DIM en quantité équivalente (Figure 26A).

Ces résultats montrent que les DIM présents à la surface de *M. tuberculosis* sont transférés aux membranes du macrophage au cours de l'infection. Ce transfert des DIM pourrait donc être à l'origine des modifications des propriétés biophysiques des membranes qui avaient été initialement observées.

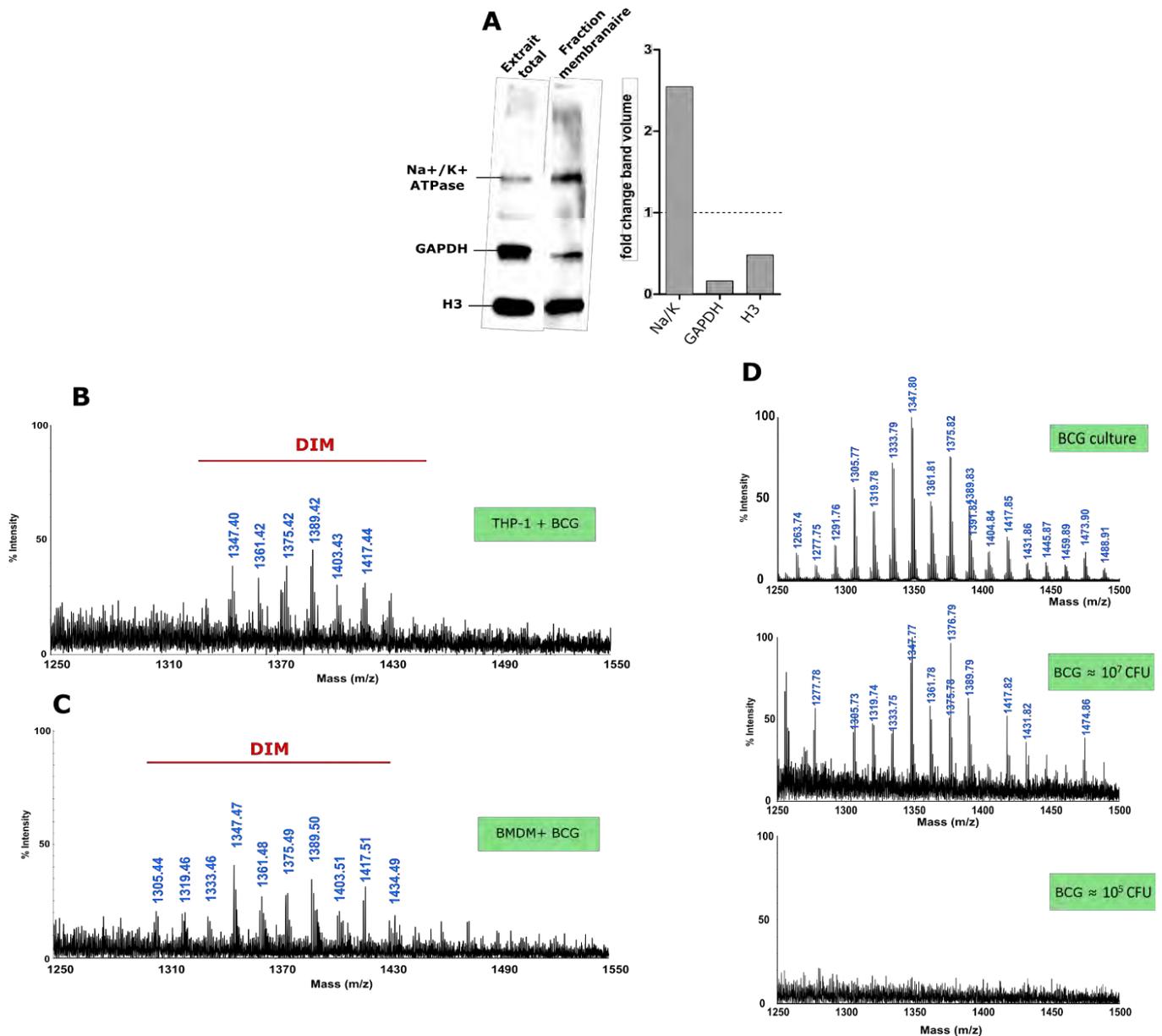


Figure 25: Détection des DIM dans la fraction membranaire de macrophages infectés par *M. bovis* BCG.

Les macrophages THP-1 et murins primaires issus de la moelle osseuse (BMDM) ont été infectés à MOI 50 et fractionnés sur gradient de sucrose 40 h post-infection. L'enrichissement membranaire a été vérifié par Western Blot, et les lipides de la fraction membranaire ont été extraits par la méthode de Bligh et Dyer puis purifiés sur colonne de florisil par un mélange EP/E (98:2). Les lipides ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (A) Analyse par Western Blot de l'enrichissement de la fraction membranaire. L'enrichissement de la membrane plasmique a été quantifié en calculant le rapport de l'intensité des bandes de la fraction membranaire de THP-1 par rapport à celle de l'extrait totale. Na⁺/K⁺ : Pompe Na⁺/K⁺ ATPase = membrane plasmique ; GAPDH : glycaldéhyde-3-phosphate déshydrogénase = cytoplasme ; H3 : histone H3 = noyau. (B) Détection des DIM par MALDI-TOF dans la fraction membranaire de cellules THP-1 infectées par BCG. (C) Détection des DIM dans la fraction membranaire de BMDMs infectés par BCG. (D) Détection des DIM à partir d'un extrait de lipides purifiés sur colonne par un mélange EP/E (98:2). Les extraits ont été obtenus à partir d'une culture bactérienne (BCG culture), et d'une suspension bactérienne dont la concentration a été définie (BCG ≈ 10⁷ CFU ; BCG ≈ 10⁵ CFU).

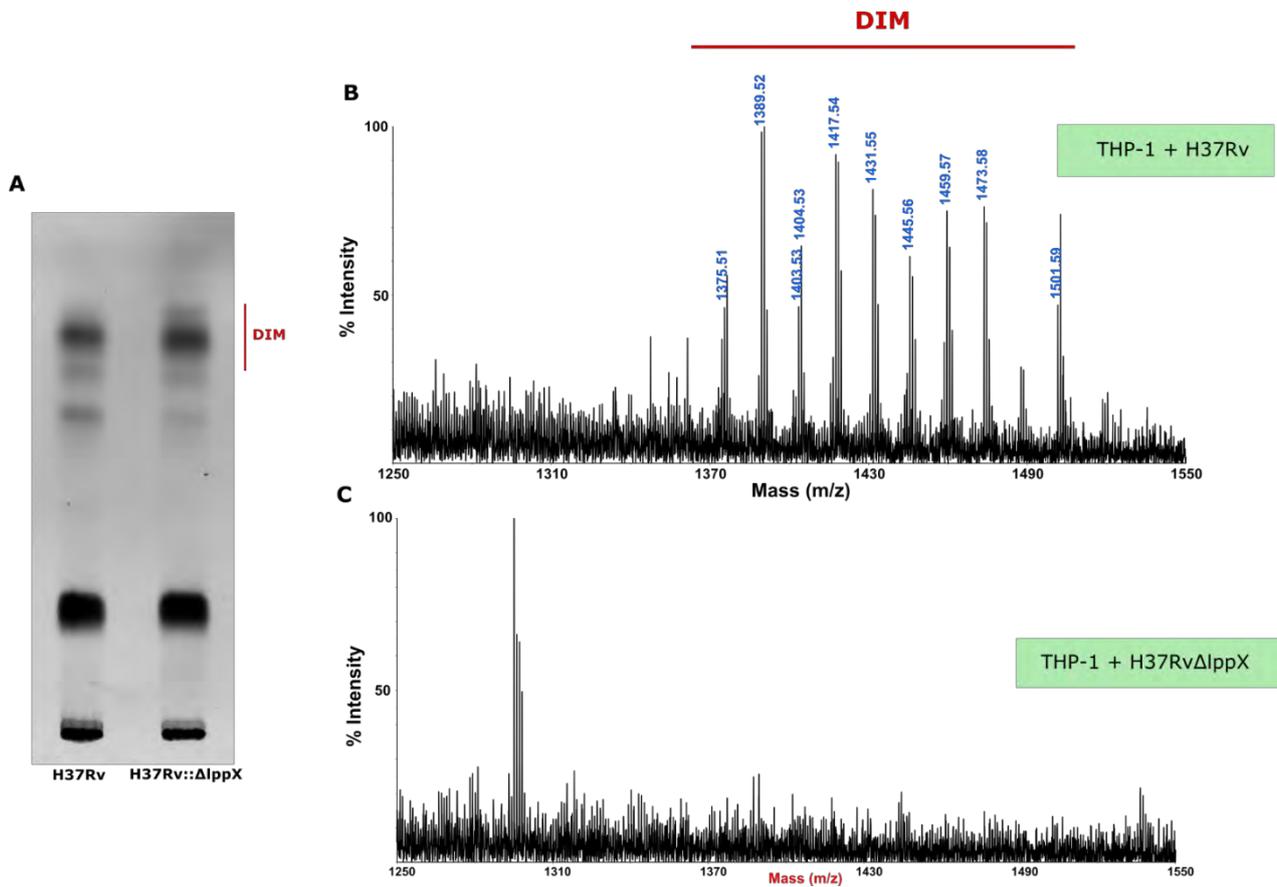


Figure 26 : Détection des DIM dans la fraction membranaire de macrophages THP-1 infectés par *M. tuberculosis* H37Rv et H37RvΔlppX.

Les macrophages THP-1 ont été infectés à MOI 15 pendant 2 h suivi d'un fractionnement 40 h post-infection. Les lipides de la fraction membranaire ont été extraits par la méthode de Bligh et Dyer, puis purifiés sur colonne de florisil avec un mélange EP/E (98:2). L'extrait lipidique a été séché et repris dans 20 μ L de chloroforme. 0.5 μ L d'extrait a été déposé sur la plaque d'analyse MALDI. **(A)** Analyse des lipides totaux par chromatographie sur couche mince, après extraction lipidique par la méthode de Bligh et Dyer. La migration a été effectuée avec un mélange de solvants EP/E (90:10) et les lipides ont été révélés au phosphomolybdate. **(B-C)** Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la fraction membranaire de macrophages THP-1 infectés par H37Rv **(B)** et par H37RvΔlppX **(C)**.

3) Résultats partie 2 : étude de l'impact des DIM au point de contact entre la bactérie et la membrane

a. *Étude de la polarité membranaire au point de contact entre la bactérie et le macrophage.*

Les travaux précédents de l'équipe ont montré que les DIM à la surface de *M. tuberculosis* sont responsables d'une baisse de la polarité membranaire lors du contact entre les bactéries et les macrophages. A partir de ces résultats, nous avons cherché à savoir si ce phénomène s'observe uniquement au point de contact entre la bactérie et la membrane du macrophage ou s'il est plus étendu. Pour cela, nous avons utilisé une approche par marquage des macrophages avec la sonde membranaire C-Laurdan, dont le spectre de fluorescence est sensible à la polarité membranaire, couplée à la microscopie biphotonique (Mazeres *et al.*, 2017). En effet, la sonde Py-Met-Chol utilisée dans les travaux précédents n'est pas adaptée pour ce type d'imagerie car son spectre de fluorescence consiste d'une série de pics fins entre 375 nm et 400 nm, des longueurs d'onde incompatibles avec le microscope biphoton et son spectromètre associé.

Développement et optimisation de méthodes d'analyse de la polarité membranaire

L'analyse de la polarité membranaire repose sur les propriétés spectrales de la sonde solvatochromique C-Laurdan. En effet, le spectre de fluorescence de C-laurdan est fonction de la polarité membranaire. Pour une membrane en phase liquide ordonné, le spectre de fluorescence de la sonde a un maximum autour de 440 nm, alors que pour une membrane en phase liquide désordonné ce maximum se situe vers 490 nm (Augenstreich *et al* 2017, Supplementary experimental procedure, Figure page 98). L'état de phase d'une membrane peut donc être caractérisé en calculant le rapport des intensités à ces deux longueurs d'onde. Classiquement, cela se fait par le calcul de la Polarisation Généralisée (GP) selon l'équation :

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

Dans cette formule, I_{440} et I_{490} représentent l'intensité de la fluorescence à 440 nm et 490 nm, respectivement. Une valeur positive du GP correspond à une membrane rigide avec une basse polarité membranaire, en phase L_o . Inversement, une valeur négative du GP correspond à une membrane fluide, de polarité membranaire plus élevée et en phase L_d .

Une autre méthode appliquée aux cellules marquées au C-Laurdan est l'analyse du spectre de fluorescence à l'aide d'un outil informatique appelé le « spectral phasor » (Fereidouni *et al.*, 2012). Cet outil permet de projeter le spectre de fluorescence de chaque pixel sur un point dans un graphique circulaire appelé spectral phasor (Figure 27A). Pour chaque pixel, les coordonnées du point correspondant du spectral phasor (notées g et s) sont calculées selon les équations :

$$g = \frac{\sum_{\lambda} I(\lambda) \cos(2\pi n\lambda / L)}{\sum_{\lambda} I(\lambda)}$$

$$s = \frac{\sum_{\lambda} I(\lambda) \sin(2\pi n\lambda / L)}{\sum_{\lambda} I(\lambda)}$$

où $I(\lambda)$ représente l'intensité de fluorescence mesurée à la longueur d'onde λ ; n est l'ordre de l'harmonique (en général $n = 1$) et L est la largeur de la plage des longueurs d'onde utilisées. La distance et l'orientation d'un point par rapport au centre du cercle dépend de la largeur du spectre de fluorescence : plus celui-ci est large, plus le point se rapproche du centre du cercle. La position angulaire d'un point dépend de la longueur d'onde du maximum d'intensité de fluorescence.

Pour une cellule, nous observons une répartition des spectres de fluorescence qui reflète la distribution de l'état de phase des différentes membranes cellulaires, comme cela est illustré dans la figure ci-contre (Figure 27B). L'avantage de cet outil d'analyse spectrale est que l'on peut sélectionner des régions du spectral phasor correspondant à un certain état de phase, et à partir de ces régions retrouver les pixels correspondants dans l'image originale. Cette méthode a été validée à l'aide d'images d'un mélange de liposomes de POPC et de DPPC-cholestérol, représentant l'état L_d et L_o , respectivement (données non montrées). Dans la Figure 27B, le spectral phasor est séparé en six secteurs correspondant à des régions membranaires avec une polarité membranaire croissante. Chacun des six secteurs permet de générer une image correspondante. La superposition des six images reconstruit une image complète des membranes cellulaires colorées en fonction de leur polarité (Figure 27C).

Analyse de la polarité membranaire de cellules THP-1 en contact avec *M. bovis* BCG

Pour mettre en place cette approche, des cellules THP-1 différenciées ont été marquées avec la sonde C-Laurdan. Les cellules ont ensuite été imagées par microscopie biphoton associée à la mesure du spectre de fluorescence du C-Laurdan dans chaque pixel de l'image, afin d'évaluer la polarité membranaire du macrophage. Enfin les spectres ont été analysés par la méthode du spectral phasor. Une première mise au point a été effectuée

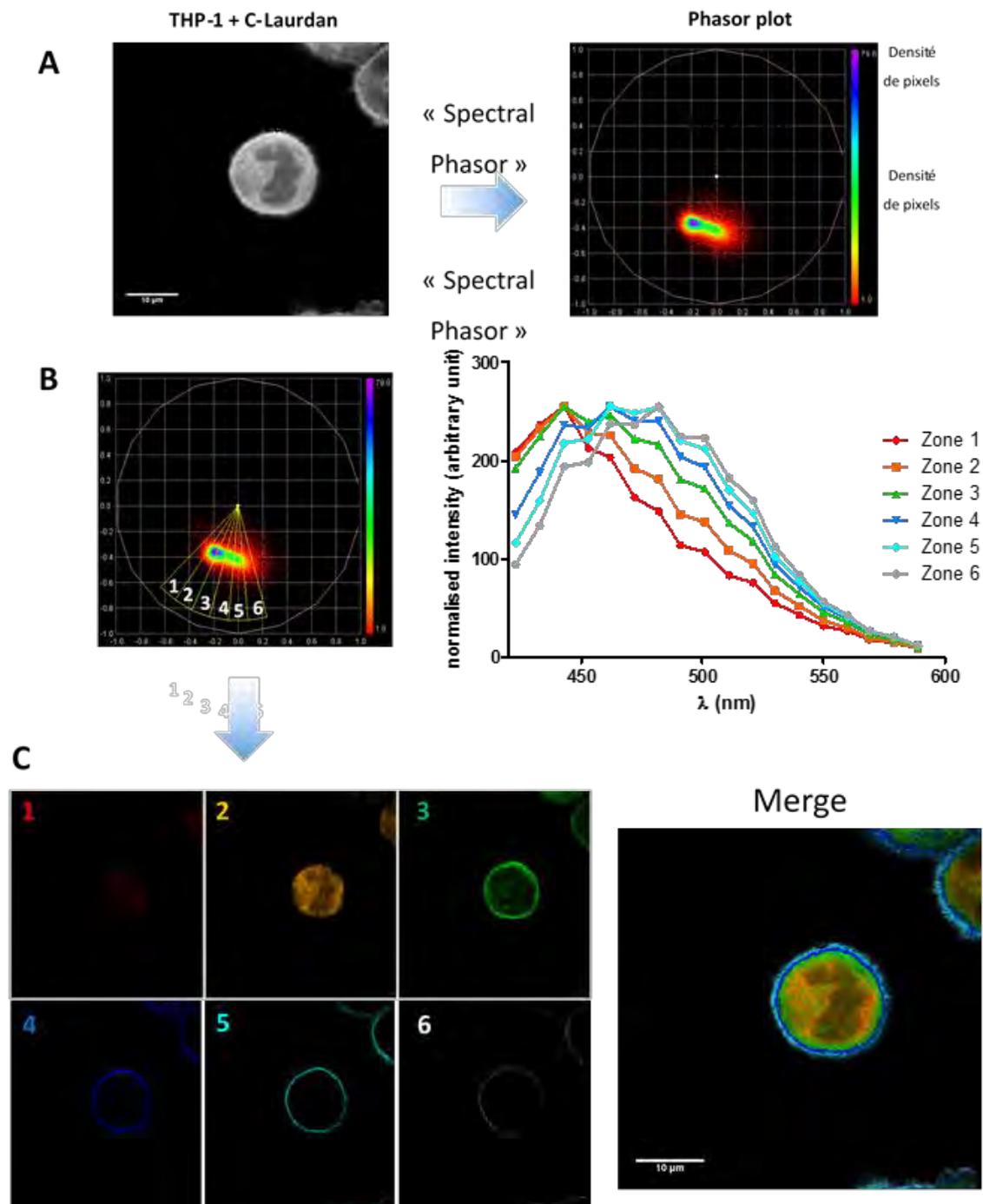


Figure 27: Analyse de la polarité membranaire avec l'outil « spectral phasor ».

Une préparation de cellules THP-1 différenciées sur lamelle de verre a été marquée au C-Laurdan et le spectre de fluorescence a été analysé par microscopie biphoton. (A) Panneau de gauche : fluorescence totale d'une cellule THP-1 marquée au C-Laurdan. Panneau de droite : analyse au spectral phasor des spectres de fluorescence pour chaque pixel de l'image de gauche, représenté sous forme d'un phasor plot. (B) Les pixels sont séparés en six groupes (1-6), et les spectres moyens de fluorescence de ces groupes sont représentés. Ces six groupes rassemblent des spectres correspondants à une polarité membranaire qui augmente du groupe 1 au groupe 6, ce qui se traduit par un décalage de la longueur d'onde du maximum d'intensité de 440 nm vers 490nm.

pour identifier précisément la zone de contact au niveau de la membrane plasmique. Le problème rencontré ici est que la zone analysée ne doit inclure que la membrane plasmique du macrophage mais pas les membranes internes. En effet, la fluidité des membranes varie entre les différents compartiments de la cellule (van Meer *et al.*, 2008), ce qui modifie le spectre du C-Laurdan. Cela a été vérifié dans d'autres modèles cellulaires également à l'aide d'un marquage avec le C-Laurdan (Kim *et al.*, 2007, Mazeret *et al.*, 2017). Pour identifier la membrane plasmique de la cellule, la fluorescence des cellules a été analysée à l'aide de l'outil « spectral phasor ».

L'analyse des membranes cellulaires (Figure 28A) montre bien que la région au voisinage de la membrane plasmique a une polarité plus basse (zones bleues, cyans et blanches) que les membranes internes (zones vertes, oranges et rouges), en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature (Kim *et al.*, 2007, Mazeret *et al.*, 2017). Dans nos observations, la zone membranaire a été définie comme celle regroupant les pixels les plus apolaires (Figure 28A).

Nous avons ensuite mis en contact les cellules avec *M. bovis* BCG ou avec la souche BCG Δ mas déficiente pour les DIM, et marquées au C-Laurdan. Ces deux souches expriment également la protéine fluorescente mCherry, permettant de localiser les bactéries sur la cellule. Le point de contact entre le macrophage et la bactérie a été identifié en combinant la fluorescence du C-Laurdan et la fluorescence des bactéries. Une première analyse qualitative n'a pas permis d'observer des différences notables entre les deux souches quant à la polarité de la membrane plasmique dans la zone de contact avec la bactérie (Figure 28B-C). Une analyse quantitative a donc été effectuée par le calcul de la polarisation généralisée (GP). Le GP a été calculé aux points de contact (ctc) et pour l'ensemble de la membrane en dehors des points de contact (mb) (Figure 28C). Les valeurs de GP des membranes plasmiques des cellules, non infectées ou infectées, montrent une très grande variabilité d'une cellule à l'autre. En moyenne, le GP des membranes des cellules en contact avec la souche BCG Δ mas semble plus bas que celui des cellules non infectées (Figure 28D). Pour évaluer plus spécifiquement l'effet des bactéries et des DIM sur la membrane, la valeur moyenne du GP de la membrane a été soustraite de la valeur du GP des points de contact de la même cellule. Pour les deux souches, la valeur moyenne du GP au point de contact semble plus élevée que celle de la membrane, mais cette baisse de polarité semble égale pour les deux souches, indépendamment de la production des DIM.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'analyse de la polarité membranaire au point de contact d'une bactérie avec la membrane plasmique d'un macrophage n'a pas permis de confirmer la baisse de polarité induite par les DIM observée qui a été dans les expériences précédentes (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce résultat. L'augmentation du GP sous l'influence des DIM pourrait ne pas être détectable par

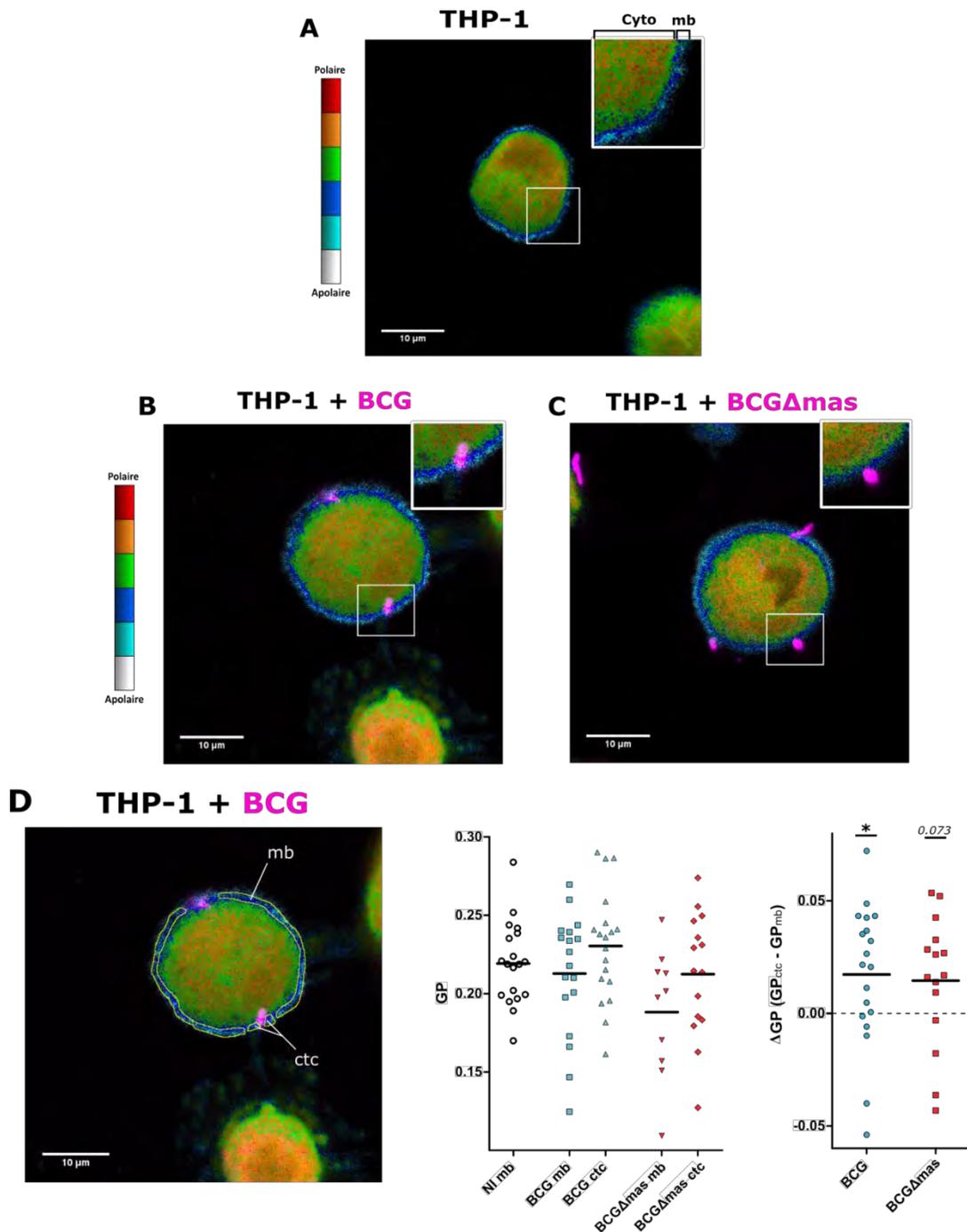


Figure 28 : Variation de la polarité membranaire au point de contact des souches BCG et BCG Δ mas avec la membrane plasmique de cellules THP-1.

Les cellules THP-1 sont mises en contact pendant 20 min avec *M. Bovis* BCG ou le mutant DIM⁻ BCG Δ mas (MOI 20, température ambiante), marquées au C-laurdan et examinées au microscope biphoton **(A)** Analyse de la polarité membranaire d'une cellule THP-1 marquée au C-laurdan par spectral phasor. Les zones bleues, cyans et blanches sont celles identifiées comme la membrane plasmique (« mb ») et les zones rouges, oranges et vertes celles des membranes cytoplasmiques (« Cyto »). **(B-C)** Observation de la polarité membranaire de cellules en contact avec les bactéries *M. Bovis* BCG **(B)** et BCG Δ mas **(C)** identifiées par la fluorescence de mCherry (magenta). **(D)** Analyse de la polarité membranaire dans les zones de contact avec la bactérie. La membrane de la cellule infectée (« mb ») est sélectionnée en excluant les zones de contact avec la bactérie (« ctc ») (gauche). Le GP des zones mb et ctc ont été calculés (panneau central). Pour s'affranchir de la variabilité inter-cellules, la différence de GP entre ctc et mb correspondant a été calculée (Δ GP) (panneau de droite). Les moyennes regroupent les valeurs d'au moins trois expériences indépendantes. Les moyennes des Δ GP ont été comparées à une moyenne théorique de 0 par le test « One-Sample t-test ». * $p < 0.05$.

le C-Laurdan. En effet, la membrane plasmique représente un environnement apolaire et le spectre du C-Laurdan pourrait être beaucoup moins sensible à l'ajout d'un lipide très hydrophobe dans un environnement lipidique déjà apolaire. De plus, la composition de la membrane plasmique est hétérogène, comportant notamment des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingomyéline. Si les DIM ont un impact très localisé dans des domaines ou des structures membranaires particulières, l'approche par microscopie pourrait ne pas être assez résolutive et sensible pour détecter cet effet. En comparaison, la baisse de la polarité membranaire provoquée par les DIM, rapportée précédemment sur cellules (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009), était observée à l'aide de la sonde Py-Met-Chol. Cette sonde dérivée du cholestérol pourrait être mieux adaptée à l'analyse d'un environnement plus apolaire.

Pour contourner les problèmes rencontrés avec le modèle cellulaire, nous avons décidé de simplifier notre modèle d'étude en analysant le contact des bactéries non pas avec une cellule mais avec une membrane lipidique supportée. Ce modèle permet de s'affranchir de l'hétérogénéité de la membrane et de réaliser les observations sur un système plan, ce qui augmente la surface de contact à analyser.

b. Étude des variations de la polarité membranaire au point de contact entre la bactérie et une membrane supportée

Les changements de polarité membranaire d'une bicouche lipidique de POPC marquée au C-Laurdan ont été mesurés aux points d'interaction avec des mycobactéries. Nous avons comparé les mêmes deux souches de bactéries *M. bovis* BCG et le mutant BCG Δ mas déficient pour les DIM. L'expression de mCherry par les bactéries permet de les localiser sur la bicouche. Après la formation de la bicouche sur une lamelle de microscopie, les bactéries sont ajoutées dans le tampon et la bicouche est centrifugée afin de favoriser le contact des bactéries avec la membrane. La majorité des bactéries est restée mobile au niveau de la membrane mais une fraction des bactéries s'est immobilisée. L'analyse n'a été réalisée que sur ces bactéries immobiles, dont nous considérons qu'elles seules pourraient éventuellement échanger des lipides avec la bicouche.

Les observations montrent d'abord que l'intensité de la fluorescence au point de contact entre les bactéries et la bicouche est plus élevée que celle de la bicouche seule (Figure 29A), alors que celle-ci est marquée de manière homogène en absence de bactéries (Figure 29A). Cela suggère que le C-Laurdan s'accumule au niveau des bactéries lorsqu'elles sont en contact avec la bicouche. Pour le vérifier, des bactéries ayant été en contact avec la bicouche ont été récupérées et leur intensité de fluorescence a été analysée

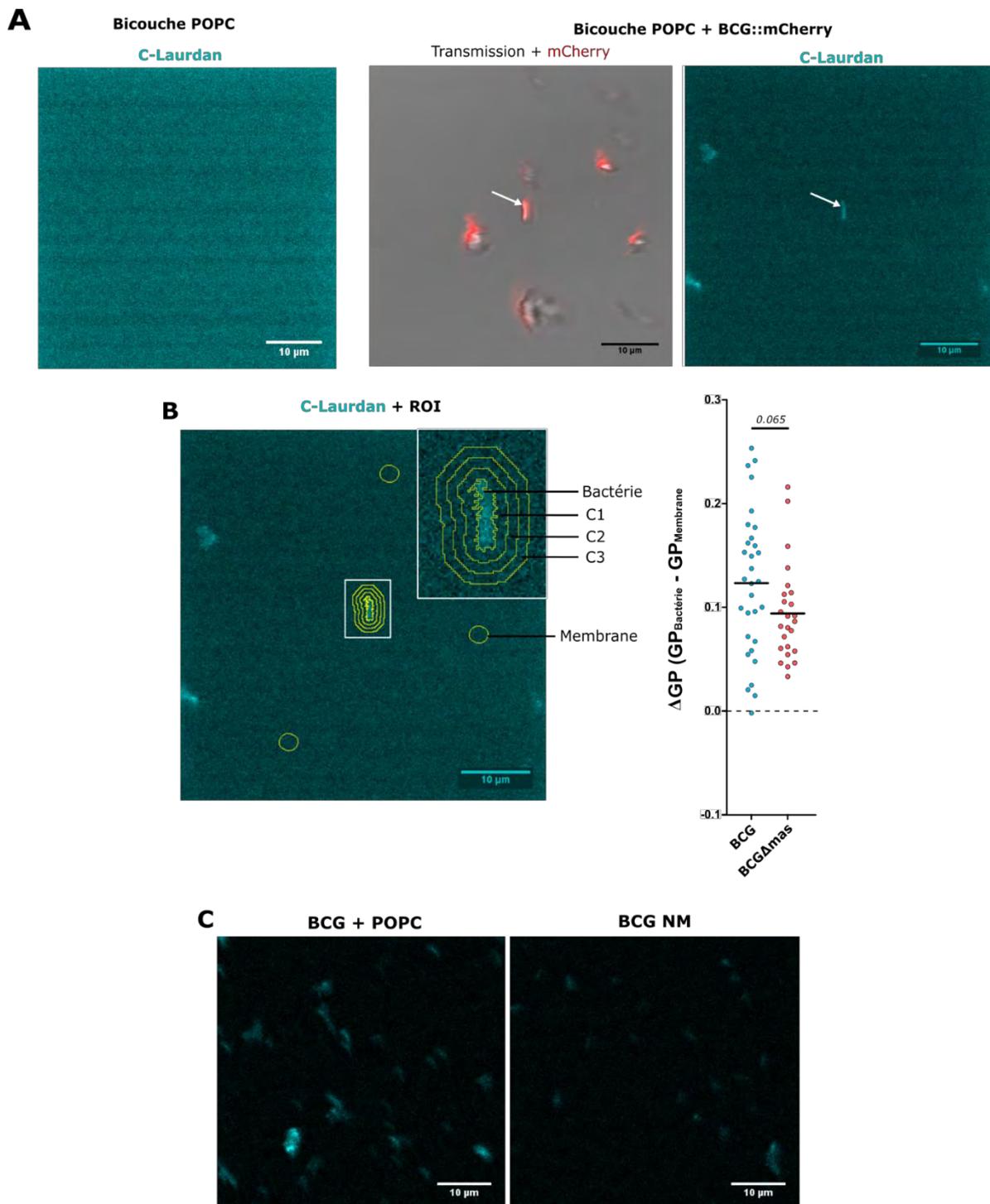


Figure 29: Analyse de la polarité membranaire au point de contact entre les souches *M. bovis* BCG et BCG Δmas et une membrane supportée de POPC.

La membrane de POPC marquée par construction au C-Laurdan est incubée avec BCG ou BCG Δmas pendant 20 min à température ambiante, puis la fluorescence est analysée par microscopie biphoton.

(A) Panneau de gauche : fluorescence d'une membrane de POPC avant incubation avec les bactéries. Panneau de droite : Image en transmission d'une bactérie BCG::mCherry immobile sur la bicouche après incubation (flèche blanche), et image correspondante de la fluorescence de la bicouche. **(B)** Panneau de gauche : Exemple de la sélection des différentes régions de l'image correspondant à la bactérie et à trois zones membranaires concentriques autour d'elle. Trois zones membranaires ont été sélectionnées loin des bactéries pour mesurer la valeur de GP de référence pour la membrane. Panneau de droite : la variation de GP (ΔGP) représente la différence entre le GP de la bactérie ($GP_{bactérie}$) et la valeur de GP de référence de la membrane ($GP_{membrane}$). Les moyennes correspondent à au moins 3 expériences indépendantes. BCG : $n = 31$; BCG Δmas $n = 25$, l'analyse statistique a été réalisée par le test de Mann-Whitney.

(C) Fluorescence des bactéries après contact avec la membrane (BCG + POPC), ou de bactéries non marquées (BCG NM).

(Figure 29C). Effectivement, la fluorescence de ces bactéries est supérieure à l'auto-fluorescence des bactéries qui n'ont pas été en contact avec la membrane, ce qui montre qu'elles ont été marquées au C-Laurdan lors du contact avec la bicouche (Figure 29A). Ainsi, l'analyse de la polarité membranaire au point de contact de la bactérie avec la membrane ne permet pas de discriminer entre la contribution de la membrane et la contribution des bactéries. Le calcul du GP à l'endroit des bactéries sur la bicouche montre que cette zone est nettement plus apolaire que la membrane (Figure 29B). De plus, la zone de contact avec la souche BCG a une valeur de GP supérieure à celle avec la souche BCG Δ mas, suggérant que la souche BCG est plus apolaire que la souche BCG Δ mas. Cette caractéristique est en accord avec le fait que les DIM contribuent à l'imperméabilité de l'enveloppe mycobactérienne (Camacho *et al.*, 2001).

Dans ces conditions, nous avons cherché à savoir si les bactéries sont capables de modifier la polarité membranaire localement autour du point de contact. Pour cela, nous nous sommes servis de la fluorescence du C-Laurdan au niveau de la bactérie pour définir son contour par seuillage (Figure 29B). Ce contour a ensuite été élargi par informatique par pas de 5 pixels (\approx 520 nm), générant ainsi trois régions concentriques à distance croissante autour de la bactérie, notées C1, C2 et C3 (Figure 29B). Les spectres moyens de fluorescence de chacune des trois zones ont été relevés et le GP correspondant calculé. Nous avons également mesuré les GP dans trois zones de la membrane loin des bactéries, afin de servir comme valeur de référence du GP intrinsèque de la membrane. Cette valeur de référence a été soustraite des GP des différentes zones pour quantifier la variation de GP autour des bactéries. Les expériences ont montré une augmentation du GP dans la zone C1 par rapport à la valeur de référence de la membrane, et ceci pour les deux souches (Figure 30). De plus, l'augmentation de GP est plus importante avec la souche BCG que pour la souche BCG Δ mas. Néanmoins, dans cette zone, la variation de GP pourrait être biaisée par le signal de fluorescence de la bactérie à proximité, car dans nos conditions expérimentales la résolution optique est d'environ 250 nm. À plus grande distance de la bactérie, pour la souche BCG Δ mas le Δ GP diminue progressivement dans les zones C2 et C3 pour atteindre la valeur caractéristique de la membrane (Figure 30). De manière intéressante, pour la souche BCG, l'augmentation de GP est toujours observée dans les zones C2 et C3, donc jusqu'à une distance d'au moins 1,5 μ m (Figure 30).

Ainsi, les DIM sont responsables d'une diminution locale de la polarité membranaire autour du point de contact entre la bactérie et la bicouche supportée. Cette observation est donc en accord avec la baisse de la polarité membranaire des macrophages mis en contact avec les bactéries BCG (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009).

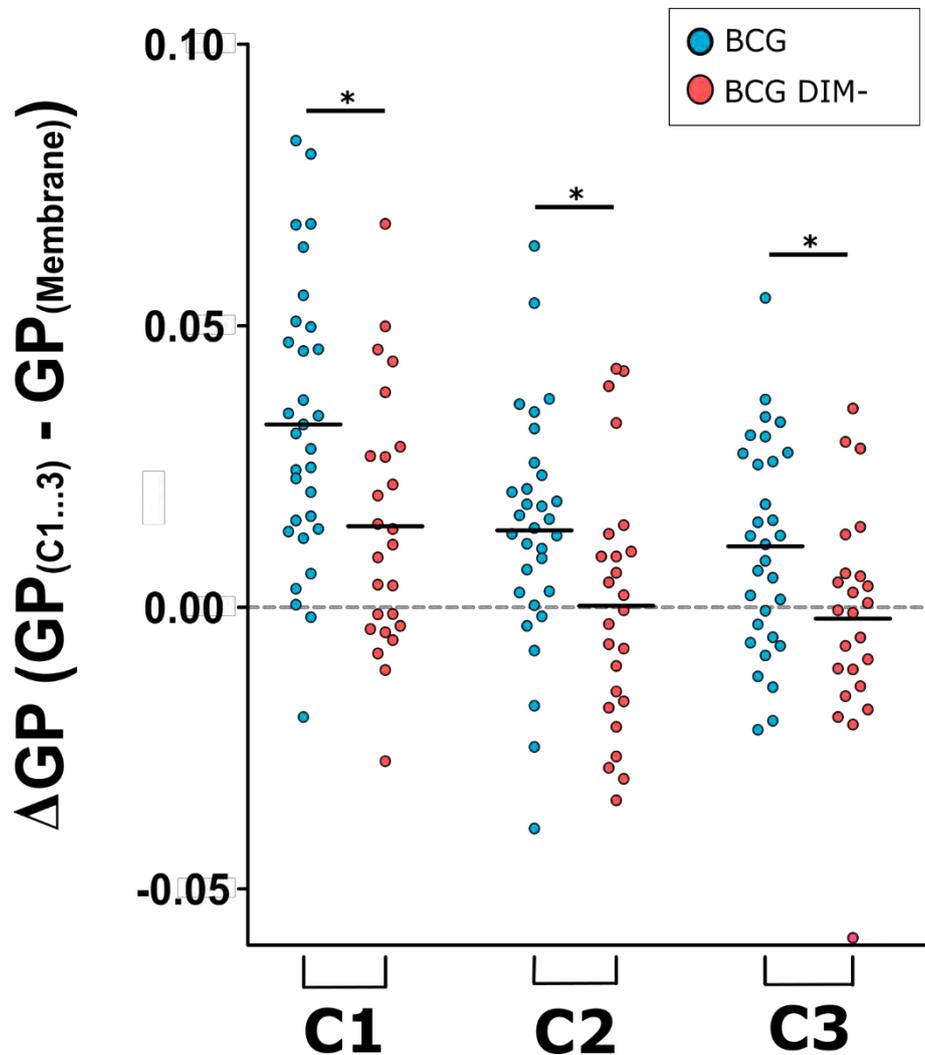


Figure 30: Variation de la polarité membranaire mesurée à distance croissante du point de contact avec *M. bovis* BCG et BCG Δ mas. Les membranes supportées de POPC marquées au C-Laurdan sont incubées pendant 20 min à température ambiante avec BCG (●) et BCG Δ mas (●) et la polarité membranaire a été mesurée dans les zones C1, C2 et C3 (Figure 25). Seules les zones autour de bactéries immobiles ont été analysées. Les résultats correspondent à au moins trois expériences indépendantes. Nombre de bactéries analysées : BCG : n= 31 ; BCG Δ mas : n=25. L'analyse statistique de la différence entre les deux souches a été faite par t-test après le test de normalité de Shapiro-Wilk. * $p < 0.05$.

Sur la base de ces résultats nous avons ensuite voulu déterminer quel est l'impact de la présence des DIM dans la membrane sur l'activité de l'effecteur membranaire ESAT-6.

4) Résultats partie 3 : Rôle des DIM dans l'activité membranolytique d'ESAT-6

Nous avons montré que les DIM potentialisent l'activité d'ESAT-6 in vitro sur des liposomes constitués de lipides de cellules THP-1. Nous avons utilisé pour nos travaux ESAT-6 sous forme recombinante fournie par le BEI (ESAT-6-BEI). Peu après la publication de nos travaux Conrad et collaborateurs ont publié un article qui met en doute l'activité membranolytique de la version recombinante d'ESAT-6 obtenue du BEI (Conrad *et al.*, 2017). En effet, les auteurs attribuent la lyse de membranes lipidiques observée avec cette protéine à la présence résiduelle de détergent dans l'échantillon.

Sur la base de ces travaux, nous avons voulu confirmer la présence du détergent ASB-14 dans les préparations d'ESAT-6 utilisées dans notre précédente étude. D'abord, nous avons reproduit l'expérience qui consiste à digérer ESAT-6-BEI avec de la protéinase K (Figure 31A) et à analyser son activité sur des liposomes de POPC. Les résultats montrent que l'échantillon d'ESAT-6-BEI digéré exerce une activité lytique au moins aussi importante que la protéine non digérée (Figure 31B). En comparaison, nous avons vérifié que la digestion par la protéinase K de la mélittine, un peptide bien connu pour son activité membranolytique, abolit complètement son activité (Figure 31B).

Pour confirmer directement la présence du détergent ASB-14 dans ESAT-6-BEI, nous avons analysé notre échantillon par spectrométrie de masse MALDI-TOF. D'abord, nous avons enregistré le spectre de masse de l'ASB-14 pur. Ce spectre montre trois pics majoritaires pour des masses de 435 Da, 457 Da et 473 Da (Figure 31C). Le pic à 435 Da correspond à la forme protonée ($M+H^+$) de l'ASB-14, ceux à 457 Da et 473 Da correspondent à ASB-14 lié aux adduits Na^+ ($M+Na^+$) et K^+ ($M+K^+$), respectivement (Figure 31C). Un spectre de masse identique a été détecté dans l'échantillon d'ESAT-6-BEI (Figure 31C). Ainsi, le détergent est effectivement présent dans l'échantillon d'ESAT-6-BEI et pourrait être responsable de l'activité membranolytique observée après la digestion par la protéinase K.

Nous avons également vérifié l'activité lytique d'ASB-14 à faible concentration sur une suspension de liposomes de POPC, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les expériences de fuite de calcéine publiées dans l'article. Nous avons préparé une solution d'ASB-14 à 0.5% dans un tampon PBS. Cette concentration est identique à celle utilisée dans le protocole de purification d'ESAT-6 par le BEI. En incubant une suspension de liposomes de POPC avec un petit volume de cette solution (concentration finale 0.027%

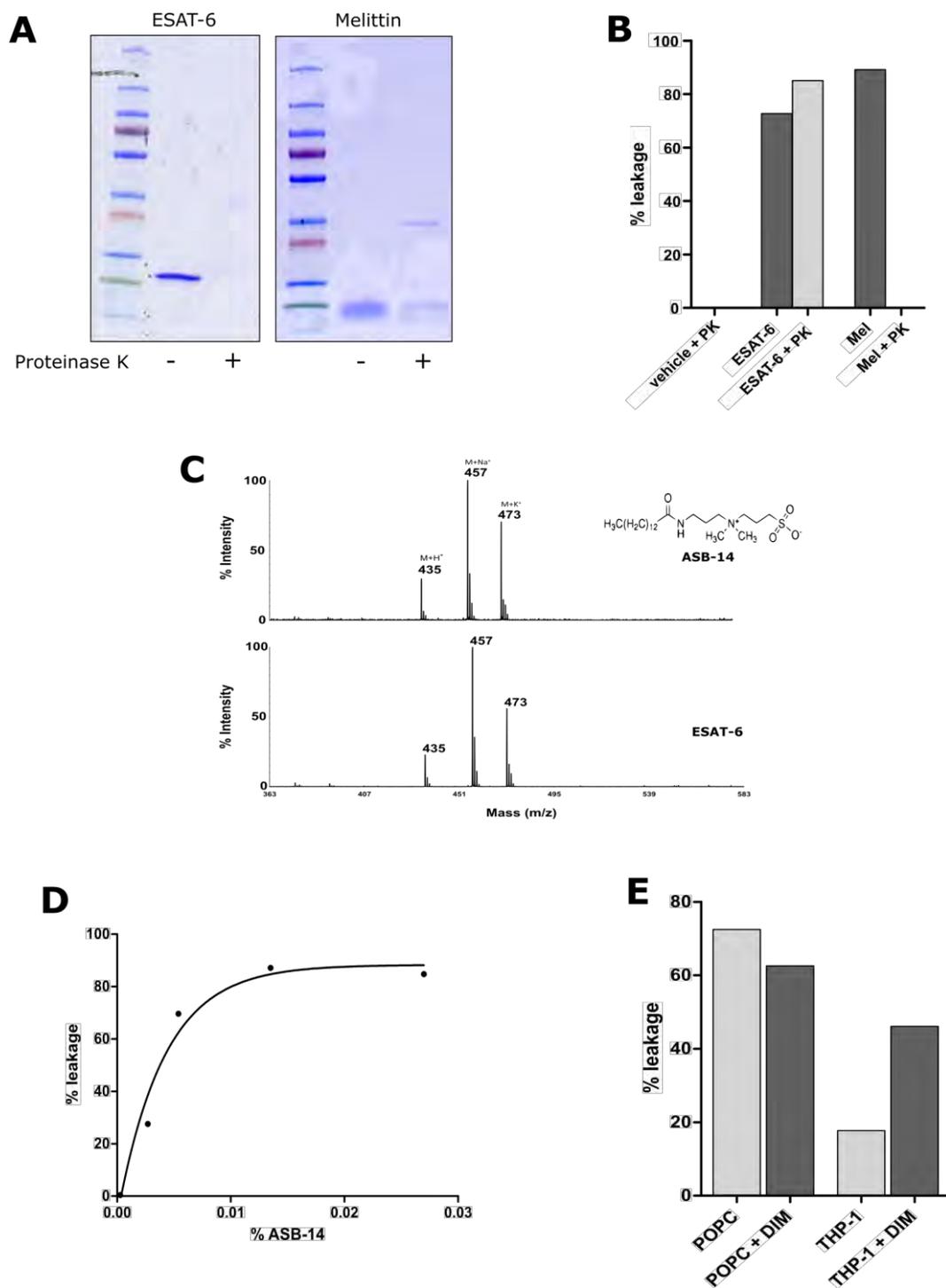


Figure 31 : Le détergent ASB-14 est présent dans l'échantillon d'ESAT-6-BEI et exerce une activité membranolytique.

(A) Digestion d'ESAT-6-BEI et de la mélittine par la protéinase K (PK) et analyse par SDS-PAGE. 3 μg d'ESAT-6 et 1 μg de Melittine ont été déposés. Après migration, le gel a été révélé au bleu de Coomassie. (B) Expérience de fuite de calcéine sur des liposomes de POPC incubés avec 10 μM d'ESAT-6-BEI ou 50 nM de mélittine, sans et après digestion par la PK. (C) Spectres de masse obtenus par MALDI-TOF du détergent ASB-14 (2.5 μg) et d'ESAT-6-BEI (1 μg). (D) Pourcentage de fuite de calcéine des liposomes de POPC traités avec des dilutions sériées d'ASB-14. (E) Pourcentage de fuite de calcéine des liposomes de POPC \pm DIM 10% (mol/mol) et de THP-1 \pm DIM 10% (w/w) traités avec de l'ASB-14 (concentration finale 0.005%).

d'ASB-14), nous observons une fuite de calcéine importante (Figure 31D). Cette fuite de calcéine est dose-dépendante et reste à un niveau non-négligeable, même après dilution (27.5% de lyse pour 0.0027% d'ASB-14). Ceci montre clairement que des traces d'ASB-14, qui auraient pu rester complexées avec ESAT-6 lors de la purification, ont la capacité de provoquer la fuite de calcéine telle que nous l'avons observée dans nos expériences qui visaient à sonder l'activité membranolytique d'ESAT-6. Finalement, nous avons aussi testé l'influence des DIM sur l'action d'ASB-14, pour vérifier si l'effet rapporté dans notre article se vérifie. Nous avons incubé des suspensions de liposomes de POPC et de lipides extraits de cellules THP-1, supplémentés ou non avec 10% de DIM, avec une solution d'ASB-14 (concentration finale 0.005%). Les résultats montrent que le niveau de fuite de calcéine diminue dans les liposomes de POPC supplémentés en DIM, tandis que ce niveau augmente pour les liposomes de lipides THP-1 en présence des DIM (Figure 33). En accord avec notre précédente étude, les DIM inhibent donc l'activité d'un agent membranolytique pour POPC, tandis qu'ils potentialisent cette activité sur des liposomes formés avec des lipides extraits de cellules THP-1. Pour conclure, l'échantillon d'ESAT-6 (BEI) est bien contaminé par des résidus du détergent ASB-14. L'effet des DIM sur l'activité d'ESAT-6 que nous avons montré précédemment était en fait imputable à la présence du détergent.

Ces résultats confirment les travaux publiés par Conrad et collaborateurs. Nous avons donc décidé de vérifier l'impact des DIM sur l'activité membranolytique d'ESAT-6 purifiée sans détergent.

a. Effet des DIM sur l'activité d'ESAT-6 purifiée native ou recombinant sans détergent

Pour la suite de cette étude nous avons utilisé plusieurs lots d'ESAT-6 native (nESAT-6) ou recombinante (rESAT-6), purifiées sans utilisation de détergent. La forme native a été isolée de surnageant de culture de *M. tuberculosis* et nous a été fournie gracieusement par Roland Brosch (Institut Pasteur, Paris). La forme recombinante d'ESAT-6 (rESAT-6) a été produite à partir du vecteur d'expression pMRLB.7 fourni par le BEI et purifiée selon le protocole du BEI adapté pour exclure l'utilisation de détergents. La production et la purification de la protéine ont été réalisés par Valérie Guillet, (équipe de biophysique structurale à l'IPBS).

Nous avons d'abord vérifié l'activité de nESAT-6 à l'aide de liposomes de POPC et de lipides de THP-1, supplémentés ou non avec DIM. Dans une première expérience de fuite de calcéine, des liposomes de POPC ont été incubés avec 10 μ M de nESAT-6 à pH5 et à pH7,4. Le pourcentage de fuite de calcéine est de 60% à pH 5, et descend à environ 20% à pH 7.4 (Figure 32A), Cette observation montre que la forme native d'ESAT-6 a bel et bien une

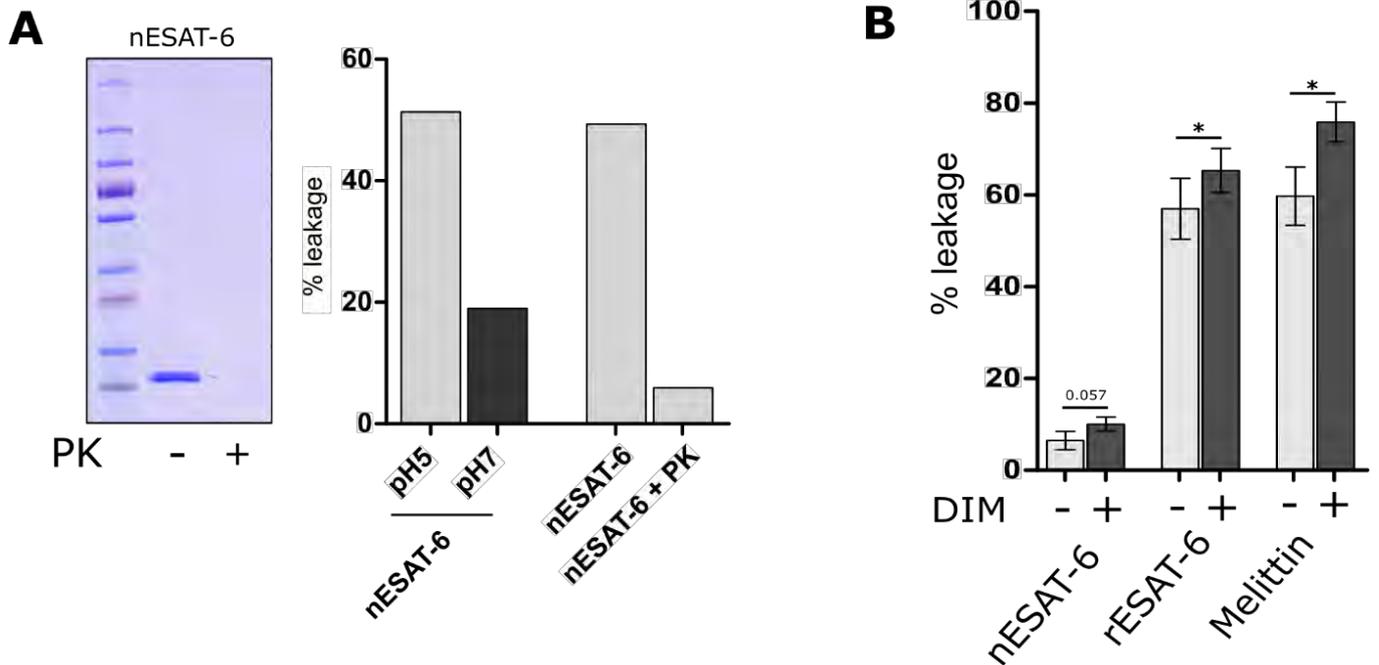


Figure 32: Les DIM potentialisent l'activité lytique d'ESAT-6 et de la méllittine.

(A) Gauche : digestion de nESAT-6 par la protéinase K (PK) et analyse par SDS-PAGE. 3 μ L de nESAT-6 ont été déposés et le gel a été coloré au bleu de Coomassie après la migration. Droite : pourcentages de fuite de calcéine des liposomes de POPC. nESAT-6 (10 μ M) a été ajoutée à une suspension de liposomes de POPC dilués dans un tampon Tris (Tris 10 mM NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4) ou dans un tampon NaAc (acétate de sodium 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 5). L'activité de nESAT-6 est plus élevée à pH acide qu'à pH neutre. La digestion de nESAT-6 par la PK abolit l'activité lytique. **(B)** pourcentages de fuite de calcéine des liposomes THP-1 sans ou avec 10% (w/w) de DIM. La présence des DIM augmente le pourcentage de fuite. nESAT-6 et rESAT-6 ont été utilisées à une concentration de 10 μ M et à pH 5. La méllittine a été testée à 50 nM et à pH 7,4. n=6, *p < 0.05, paired t-test avec Shapiro-Wilk normality test.

activité membranolytique, et que cette activité est plus importante à pH acide qu'à pH neutre, en accord avec les résultats de la littérature indiquant que l'acidité stimule l'activité membranolytique d'ESAT-6 (de Jonge *et al.*, 2007). De plus, l'activité membranolytique à pH 5 est nettement diminuée après digestion par la protéinase K, écartant de fait l'éventualité de la présence d'un détergent ou d'une activité résiduelle de la protéine dégradée (Figure 32A)

Sur la base de ces résultats, nous avons cherché à savoir si les DIM modulent l'activité de nESAT-6 sur des liposomes formés de lipides de THP-1, supplémentés ou non avec 10% de DIM à pH5, en condition optimale de l'activité de la protéine (Figure 32B). En l'absence de DIM, l'activité lytique de nESAT-6 à pH 5 est de moins de 10% (Figure 32B), donc bien inférieure à celle observée sur liposomes de POPC qui est d'environ 50%. Cette différence s'explique par la plus grande rigidité de la membrane des liposomes de THP-1 par rapport aux liposomes de POPC, que nous avons observée dans nos travaux précédents (Augenreich et al 2017, Figure S5, voir page 105). Néanmoins, la présence des DIM dans les liposomes tend à potentialiser l'activité membranolytique de nESAT-6 (Figure 32B). Nous avons aussi vérifié si l'effet des DIM pouvait également s'appliquer à la forme recombinante d'ESAT-6 (rESAT-6) qui possède une étiquette de six histidines et qui est largement utilisée dans la littérature pour l'étude de son activité membranolytique (Conrad *et al.*, 2017, de Jonge *et al.*, 2007, De Leon *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2015, Refai *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2016). Nous avons observé que les DIM augmentent aussi l'activité de rESAT-6 (Figure 32B). Ces résultats démontrent que les DIM sont effectivement capables de potentialiser l'activité d'ESAT-6, qu'elle soit sous forme native ou recombinante.

Nos précédents résultats montrent aussi une augmentation de l'activité du détergent ASB-14 en présence de DIM dans les liposomes THP-1, suggérant un effet non spécifique de ces lipides sur l'activité d'agents membranolytiques. Pour explorer cette propriété, nous avons également vérifié l'impact des DIM sur la mélittine, sur des liposomes THP-1 à pH 7. De manière surprenante, les DIM augmentent clairement l'activité membranolytique de la mélittine (Figure 32B). Les DIM sont donc bien capables de potentialiser l'activité de molécules membranolytiques de structures bien distinctes. Cette non sélectivité des DIM est en faveur de l'hypothèse que la potentialisation de l'activité membranolytique est due aux effets membranaires des DIM plutôt qu'à une interaction directe entre les DIM et les agents membranolytiques. Néanmoins, nous avons montré que cet effet est spécifique aux liposomes constitué de lipides de THP-1, ce qui indique que l'effet des DIM passe par un ou plusieurs composés membranaires qui stimulent par la suite l'activité membranolytique, ou alors ils modifient l'organisation membranaire d'une manière qui favoriserait les activités membranolytiques.

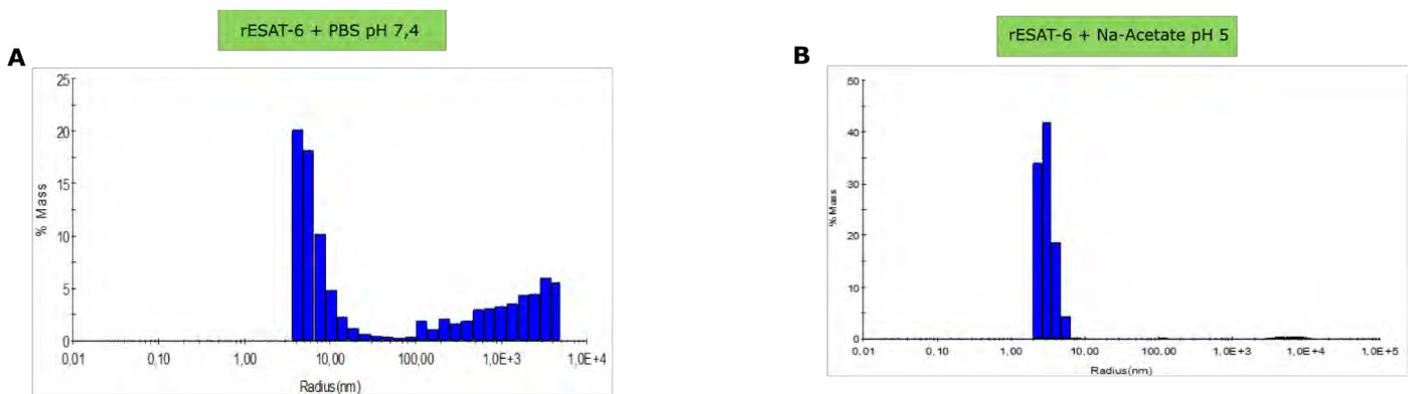


Figure 33 : Etat d'agrégation de rESAT-6 en fonction du pH observé par DLS.

rESAT-6 lyophilisée a été solubilisée dans un tampon PBS à pH 7.4 ou dans un tampon d'acétate de sodium à pH 5 (acétate de sodium 50 mM, NaCl 100mM, EDTA 0.1 mM, pH 5) à 2.5 mg/mL et 2 mg/mL, respectivement, et mesurée en DLS. Le graphique représente la distribution massique en fonction du rayon hydrodynamique.

Finalement, l'activité de rESAT-6 sur les liposomes THP-1 est nettement plus importante que celle de nESAT-6 (Figure 34B). Or il avait été montré que l'ajout d'un tag His à ESAT-6 n'affectait pas sa capacité à se lier aux membranes et à lyser des liposomes (de Jonge *et al.*, 2007). Une hypothèse pour expliquer cette différence d'activité des deux formes d'ESAT-6 pourrait se trouver dans l'état d'agrégation de la protéine purifiée à pH neutre, un aspect encore peu étudié. Une étude a relevé qu'ESAT-6 purifiée sans détergent serait capable de se dimériser voire se multimériser après purification (Refai *et al.*, 2015). En effet, ESAT-6 possède une structure très similaire à son partenaire de sécrétion CFP-10, et il est admis que le complexe ESAT-6/CFP-10 n'est pas membranolytique du fait de l'inaccessibilité des résidus hydrophobes dans l'hétérodimère (Renshaw *et al.*, 2006). Ceci laisse penser que les formes dimériques ou multimériques d'ESAT-6 sont inactives (Refai *et al.*, 2015). Il est logique d'envisager que l'acidification à un pH 5 pourrait séparer les dimères ou multimères d'ESAT-6 et restaurer son activité membranolytique.

b. Etat d'agrégation de rESAT-6 en fonction du pH

Nous avons examiné si ESAT-6 s'agrège lors de sa purification et si cela affecte son activité membranolytique. Les travaux ci-après ont été réalisés en collaboration avec Valérie Guillet à l'IPBS.

L'état d'agrégation d'ESAT-6 a été analysé par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) sur la base des hypothèses de Refai et collaborateurs (Refai *et al.*, 2015). ESAT-6 recombinante lyophilisée a été solubilisée dans un tampon PBS à pH 7.4 ou dans un tampon d'acétate de sodium à pH 5. Nous avons observé que 40% de la masse totale de la protéine est effectivement agrégée à pH 7.4, avec une fraction majoritaire de protéines non agrégées (Figure 33A). A pH 5, peu d'agrégats sont détectables, avec une fraction de protéines non agrégées représentant environ 99% de la masse totale et un rayon hydrodynamique de 3.2 nm (Figure 33B). Ces résultats montrent que le pH a une conséquence directe sur l'état d'agrégation d'ESAT-6. Une analyse plus approfondie par SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography – Multi-Angle Light Scattering) a aussi été réalisée. C'est une technique de diffusion de lumière statique et dynamique couplée à la chromatographie d'exclusion de taille permettant d'analyser l'état d'agrégation de la protéine et de mesurer la masse moléculaire des composés séparés par la phase de chromatographie. Les résultats préliminaires confirment qu'ESAT-6 solubilisée dans un tampon à pH 7.4 est partiellement agrégée (30% de la masse) et que la fraction non agrégée est sous forme dimérisée (masse molaire de 29 kDa). Lorsqu'elle est solubilisée à pH 5, ESAT-6 n'est pas agrégée. La masse molaire n'a pas pu être déterminée mais la protéine

est éluée à différents volumes d'éluion suggérant l'apparition d'espèces monomériques en plus du dimère (données non montrées). Ces résultats sont encore à confirmer, notamment par des approches de spectrométrie de masse. En résumé, cette différence d'état d'agrégation que nous avons observée pourrait expliquer l'augmentation de la membranolyse par ESAT-6 avec la baisse du pH. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de tester ESAT-6 initialement solubilisée dans du tampon à pH 5 et par conséquent potentiellement dans un état monomérique, et de tester son activité en la diluant dans une suspension de liposomes à pH 7.4 et à pH 5. Un résultat attendu serait alors qu'à ces deux pH, l'activité d'ESAT-6 initialement à pH 5 ne devrait pas ou peu varier, en comparaison à l'activité d'ESAT-6 initialement solubilisée dans un tampon à pH 7.4. Cela permettrait de démontrer qu'ESAT-6 peut être parfaitement active à pH neutre mais qu'elle a besoin pour cela d'être à l'état monomérique pour être totalement active. Une donnée qui semble aller dans ce sens est que la forme native nESAT-6 est tout de même active à pH neutre sur des liposomes de POPC (Figure 34B).

c. Rôle des DIM dans l'hémolyse dépendante d'ESAT-6 par *M. tuberculosis*

Nos résultats sur des liposomes formés à partir de lipides de cellules THP-1 montrent que les DIM potentialisent l'activité d'ESAT-6. Nous avons voulu vérifier si les DIM sont aussi impliqués dans la lyse membranaire dépendante d'ESAT-6 induite par la bactérie. Pour cela, nous avons étudiée l'activité hémolytique des mutants de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* BCG, en nous basant sur des travaux précédents qui ont montré une activité hémolytique de la bactérie (Conrad *et al.*, 2017, Smith *et al.*, 2008, Speer *et al.*, 2015).

Dans un premier temps, nous avons testé le niveau d'hémolyse induite par *M. tuberculosis* H37Rv et par des souches mutantes déficientes pour la production d'ESAT-6 ($\Delta esxA$) ou pour la synthèse des DIM (Δmas). Ces différentes souches ont été incubées à MOI 50 en présence d'érythrocytes humains pendant 48h. Les résultats montrent que les souches H37Rv $\Delta esxA$ et H37Rv Δmas sont significativement moins hémolytiques que la souche sauvage H37Rv (Figure 34). Le plus remarquable est que la souche déficiente pour DIM induit un niveau d'hémolyse plus faible que celle déficiente pour ESAT-6 (Figure 34). Cette observation suggère que les DIM collaborent *in situ* avec ESAT-6, et démontre le rôle majeur des DIM dans l'activité membranolytique des mycobactéries. Pour valider la collaboration entre ESAT-6 et DIM, un double mutant H37Rv $\Delta mas\Delta esxA$ a été construit dans l'équipe, mais il présente un important défaut de croissance en milieu liquide et n'a pas pu être utilisé pour les tests d'hémolyse.

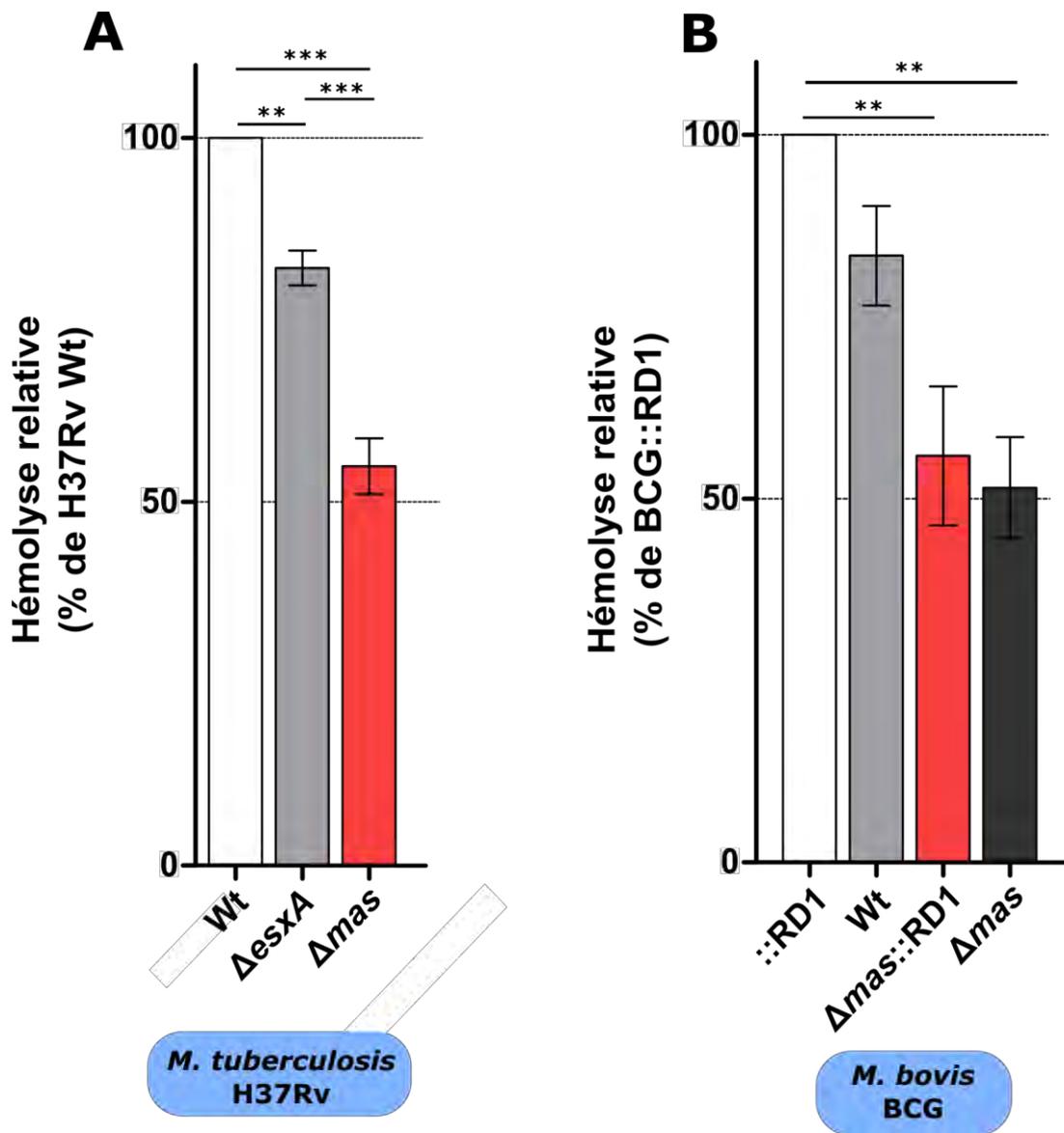


Figure 34: Rôle des DIM dans l'hémolyse dépendante d'ESAT-6.

Une suspension de 1×10^7 érythrocytes humains a été incubée à MOI 50 pendant 48 h avec différentes souches de *M. tuberculosis* H37Rv et de *M. bovis* BCG qui expriment une combinaison de facteurs de virulence DIM et ESAT-6/ESX-1. Le surnageant a été récupéré et son absorbance à 415 nm a été mesurée. Les données sont représentées en % par rapport à H37Rv pour les souches de H37Rv (A), et par rapport à BCG::RD1 pour les souches de BCG (B). L'expérience a été réalisée sur cinq donneurs avec les différentes souches dérivées de BCG et sur quatre donneurs avec les différentes souches dérivées de H37Rv. * $p < 0.05$, test ANOVA avec le test de comparaison multiple de Bonferroni.

Pour explorer la collaboration entre les DIM et ESAT-6 dans l'hémolyse, nous avons tiré parti de la souche *M. bovis* BCG qui n'exprime pas naturellement le système de sécrétion ESX-1, et des souches recombinantes de BCG exprimant une combinaison de DIM et d'ESAT-6. Les résultats de l'hémolyse montrent (Figure 34) que la souche complémentée en ESAT-6, *M. bovis* BCG::RD1, tend à être plus hémolytique que la souche sauvage BCG, en accord avec ce que nous avons observé pour *M. tuberculosis*. Le niveau d'hémolyse de BCG est aussi nettement plus élevé que celui de BCG Δ mas déficiente en DIM (Figure 34), montrant l'importance de ces lipides. De façon comparable, BCG::RD1 est plus hémolytique que BCG Δ mas::RD1 déficiente en DIM. Enfin, l'expression de RD1 dans la souche déficiente en DIM n'a eu que très peu d'effet sur le taux d'hémolyse, ce qui montre qu'il n'y a pas d'effet additif de l'absence des DIM et d'ESAT-6 sur l'hémolyse.

Ces données démontrent que les DIM contribuent *in situ* à l'activité hémolytique dépendante de la sécrétion d'ESAT-6 en accord avec les résultats obtenus *in vitro* sur les liposomes. Les DIM sont également requis dans l'hémolyse induite par *M. tuberculosis* indépendamment de la présence d'ESAT-6. Comme les DIM seuls n'ont pas d'activité lytique cela sous-entend l'implication d'autres effecteurs bactériens impliqués dans ce processus, qui sont eux-aussi influencés par les DIM.

III. Discussion

La deuxième partie de ma thèse avait pour objet l'étude du mécanisme d'action des DIM dans la virulence de *M. tuberculosis* lors de l'infection des macrophages. Nous avons montré par spectrométrie de masse qu'au cours de l'infection les DIM sont transférés des bactéries aux membranes des macrophages. Nos expériences de microscopie ont permis de visualiser que les DIM sont localement responsables d'une baisse de la polarité membranaire lors du contact entre *M. bovis* BCG et une membrane supportée. Finalement, par des mesures de fuite de calcéine nous avons montré que les DIM sont capables de moduler l'activité de l'effecteur bactérien ESAT-6.

En faveur d'un scénario de transfert des DIM, nous avons analysé et montré, par des approches de fractionnement et de spectrométrie de masse, que les DIM sont effectivement détectés dans la fraction membranaire des macrophages infectés par *M. tuberculosis*. Cet événement n'a lieu que lorsque les DIM sont transportés à la surface de la bactérie. Cela indique que les DIM sont transférés de la surface de la bactérie vers les membranes du macrophage, par un mécanisme qui reste à déterminer. Ce transfert pourrait s'effectuer par contact direct entre la bactérie et la membrane du macrophage. En effet, il est connu que les DIM sont présents non seulement dans la mycomembrane, mais aussi dans la capsule (Ortalo-Magne *et al.*, 1996). Il est envisageable que les DIM présents en surface puissent s'insérer dans la membrane des macrophages lors du contact avec *M. tuberculosis*. Ce mode de transfert par contact direct a été suggéré pour d'autres lipides mycobactériens, comme les PIM, les TDM ou encore les PGL (Rhoades *et al.*, 2003). En outre, il a été démontré chez d'autres bactéries pathogènes, comme *Borrelia burgdorferi* (Crowley *et al.*, 2013), que des lipides peuvent être échangés entre la bactérie et son hôte par contact direct, ce qui rend l'hypothèse également plausible chez *M. tuberculosis*.

Les vésicules extracellulaires (VE) sont secrétées par de nombreuses espèces bactériennes dont *M. tuberculosis* (Prados-Rosales *et al.*, 2011) et constituent aussi un mécanisme potentiel pour le transfert des DIM aux cellules de l'hôte. Chez de nombreuses bactéries pathogènes, y compris chez *M. tuberculosis* (Athman *et al.*, 2017, Athman *et al.*, 2015, Prados-Rosales *et al.*, 2014), le rôle important des VE dans la virulence est reconnu, notamment dans la modulation de la réponse immunitaire (Kaparakis-Liaskos and Ferrero, 2015). Les VE participent au transfert de lipides de *Borrelia burgdorferi* vers la membrane de l'hôte (Crowley *et al.*, 2013). La fusion des VE émises par *Pseudomonas aeruginosa* avec la membrane plasmique a été observée (Bomberger *et al.*, 2009). Les VE de *M. tuberculosis* n'ont pas encore été caractérisées de manière exhaustive, en particulier concernant leur

composition lipidique et la présence des DIM. Néanmoins, il serait intéressant d'explorer plus en détail leur rôle éventuel dans le transfert des lipides de la bactérie vers le macrophage.

Concernant l'impact des DIM sur les propriétés membranaires, nous n'avons pas pu observer d'effet des DIM sur la polarité membranaire dans la zone de contact entre la bactérie et la membrane des macrophages. Pour aller plus loin avec ce modèle d'étude, il pourrait être intéressant d'étudier la variation de polarité membranaire non pas au point de contact d'une bactérie avec la membrane plasmique mais plutôt d'une bactérie internalisée avec la membrane phagosomale. En effet, dans le cas d'une bactérie en interaction avec la membrane plasmique, la surface analysée est perpendiculaire au plan focale, et ne permet donc de sonder qu'une faible fraction de la surface totale en contact avec la bactérie. L'observation de la mycobactérie à l'intérieur du phagosome, dont la membrane a une composition lipidique différente de la membrane plasmique et qui est moins apolaire que celle-ci, pourrait permettre d'analyser les changements induits par l'échange des lipides bactériens sur des temps de contact plus long, et sur une surface d'échange plus importante.

Cependant, nous avons observé que les DIM provoquent une baisse de la polarité membranaire autour de la bactérie en contact avec une bicouche supportée, en accord avec les résultats précédents obtenus sur une population de macrophages (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009) (Figure 21). De plus, cette baisse de polarité s'étend sur une distance d'au moins 1.5 μm autour de la bactérie. Ces résultats sont aussi en accord avec le transfert des DIM observé et soutiennent l'hypothèse non seulement d'une insertion des DIM, mais aussi d'une diffusion des DIM dans la bicouche. En effet, les DIM sont des molécules très hydrophobes, non chargés et sans tête polaire. Une interaction de surface est énergétiquement défavorable étant donné la présence des têtes polaires des phospholipides. Il semble plus plausible que les DIM s'insèrent dans le cœur hydrophobe de la membrane, entre les chaînes d'acides gras des phospholipides. Un changement de la polarité membranaire en présence des DIM, détectable avec la sonde C-Laurdan, pourrait donc impliquer le passage de la membrane vers un état plus ordonné ou rigide. Pour valider l'hypothèse de l'insertion des DIM de la surface des bactéries dans la membrane suivie de leur diffusion, il serait important de détecter la présence des DIM dans la membrane par une approche indépendante. Une méthode intéressante pour analyser les bactéries et la zone de contact membranaire pourrait être la microspectroscopie Raman. C'est une méthode qui associe la microscopie confocale et la spectroscopie Raman. Elle permet d'analyser chimiquement un échantillon sans marquage (Loiseau *et al.*, 2016). Du fait de l'absence de méthode de marquage des DIM actuellement, cette méthode pourrait être intéressante pour sonder la présence des DIM dans la bicouche.

Ces observations sur une membrane supportée de POPC sont prometteuses mais nécessitent d'être confirmées et complétées. Pour valider l'effet observé, il serait intéressant d'élargir notre système modèle en y incluant des membranes supportées de composition lipidique plus complexe, contenant par exemple du cholestérol, ou en formant des bicouches supportées avec des lipides extraits de membranes cellulaires, comme les extraits lipidiques de cellules THP-1 utilisés précédemment.

Enfin, nous avons étudié les conséquences de la présence dans la membrane des DIM sur l'activité de l'effecteur membranaire bactérien, ESAT-6. Nous avons montré à l'aide de liposomes THP-1 que les DIM sont capables de potentialiser l'activité membranolytique d'ESAT-6, qu'elle soit sous forme native ou sous forme recombinante, et purifiée sans détergent. Cet effet de potentialisation n'est pas spécifique d'ESAT-6 car il a été aussi observé pour la mélittine, un peptide membranolytique retrouvé dans le venin d'abeille, et pour le détergent ASB-14. Dans un modèle d'interaction d'érythrocytes avec la bactérie entière, nous avons montré que les DIM interviennent dans l'hémolyse dépendante d'ESAT-6, en cohérence avec nos observations sur liposomes. Là encore, les DIM jouent un rôle dans l'hémolyse indépendante d'ESAT-6. Comme les DIM seuls n'ont pas d'activité de lyse membranaire, cela implique qu'ils favorisent l'activité d'autres agents membranolytiques de *M. tuberculosis*. En effet, d'autres facteurs de virulence contribuant à l'activité hémolytique de la bactérie sont connus, comme la sphingomyélinase SpmT (Speer *et al.*, 2015), ou encore TlyA qui est une protéine apparentée à une hémolysine (Rahman *et al.*, 2010).

Concernant le mécanisme d'action, la non-spécificité de l'effet des DIM sur des activités membranolytiques, à la fois *in vitro* et dans un contexte de la bactérie entière, suggère fortement que ces lipides agissent par une modulation de l'organisation membranaire, et non par une interaction directe avec les différents effecteurs membranolytiques. De manière intéressante, il a été montré que l'hémolyse induite par la bactérie dépend d'un contact physique entre la bactérie et l'érythrocyte. Or nous avons montré que ce contact s'accompagne d'un transfert des DIM à la membrane et d'une baisse locale de la polarité membranaire. Ces observations sont cohérentes avec l'idée que le site de contact est le lieu d'un transfert des DIM vers la membrane cible, où la présence des DIM potentialise l'activité lytique d'effecteurs bactériens, dont ESAT-6.

Le mécanisme moléculaire d'action des DIM sur l'activité d'ESAT-6 reste cependant à éclaircir. Nous avons constaté que l'effet potentialisateur des DIM dépend de la composition lipidique des liposomes dans lesquels ils sont insérés. En effet, dans des liposomes de composition simple (POPC) les DIM tendent à inhiber l'activité d'ESAT-6 (données non montrées), contrairement aux liposomes formés d'un mélange naturel de lipides (THP-1)

(Figure 32). La potentialisation des DIM sur l'activité d'ESAT-6 semble donc impliquer un ou plusieurs autres composés présents dans l'extrait lipidique de THP-1. Mais pour comprendre le mécanisme d'action par lequel les DIM exercent leur effet, il faut d'une part, comprendre de quelle manière ESAT-6 est capable de lyser les membranes, et d'autre part, décrypter les altérations de l'organisation membranaire induites par les DIM.

Le mécanisme de membranolyse actuellement proposé pour ESAT-6 passerait par la formation d'un pore (Smith *et al.*, 2008), classant de fait cette protéine dans la famille des « pore forming toxins » (PFT). Cependant, l'observation par cryo-microscopie électronique de liposomes incubés avec ESAT-6 a révélé une destruction membranaire mais pas de pores apparents (de Jonge *et al.*, 2007). Or, les PFT sont des protéines de grande taille connues pour former des pores bien définis à la membrane (Ros and García-Sáez, 2015). Par sa petite taille (≈ 10 kDa), sa structure majoritairement en hélice- α asymétrique, avec une face hydrophile et une face hydrophobe (Renshaw *et al.*, 2005), ESAT-6 posséderait plutôt les caractéristiques d'un peptide anti-microbien (PAM) membranolytique (Lee and Lee, 2015). Certains PAM, comme la mélittine que nous avons testé, possèdent d'ailleurs un mode d'action passant par la formation de pores (Vogel and Jahnig, 1986). Plus globalement, les mécanismes d'action membranolytiques des PAM ont été intensément décrits et discutés (Lee and Lee, 2015, Teixeira *et al.*, 2012, Zasloff, 2002). Au niveau membranaire, la composition lipidique de la bicouche, sa charge globale ou encore son état de phase sont connus pour moduler l'activité membranolytique des PAM. Au niveau de leur structure, leur nombre de charges et leur hydrophobicité sont tout autant de caractéristiques qui modulent leur interaction avec la membrane et leur activité membranolytique. Pour ESAT-6, peu de choses sont connues concernant son mécanisme d'action membranolytique, sa structure à la membrane ou l'influence de la composition lipidique. Une étude a malgré tout montré qu'ESAT-6 semblait posséder une affinité plus importante pour des membranes modèles enrichies en cholestérol (de Jonge *et al.*, 2007). Les DIM pourraient avoir une influence sur beaucoup de ces paramètres pouvant contribuer à potentialiser l'activité d'ESAT-6. Il est aussi nécessaire de mieux comprendre comment les DIM sont insérés dans la membrane et de quelle manière ils peuvent modifier son organisation pour favoriser l'activité lytique d'effecteurs.

Néanmoins, l'effet des DIM sur l'activité d'ESAT-6 *in vitro* ne reproduit que partiellement ce qui est observé dans le cadre de leur collaboration dans la rupture phagosomale. Le mécanisme de cette collaboration pourrait passer par un évènement initiateur qui précède l'induction de la lyse membranaire par ESAT-6. D'ailleurs, certaines disparités ont été constatées entre les études *in vitro* sur ESAT-6 et les études réalisées avec la bactérie entière. Que ce soit en contact avec des érythrocytes ou dans le phagosome, la lyse

membranaire induite par les bactéries ou la rupture du phagosome a lieu à un pH légèrement acide ($\approx 6,5$) (Conrad *et al.*, 2017, Simeone *et al.*, 2015, Smith *et al.*, 2008, Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). L'arrêt de la maturation du phagosome et de son acidification serait aussi un prérequis au processus de rupture phagosomale (Simeone *et al.*, 2015). De plus, les résultats de cette étude, confirmés aussi par nos travaux, montrent que l'arrêt de l'acidification par la bafilomycine, stimule le processus d'induction de rupture phagosomale. Cette observation est en contradiction avec le modèle actuel qui stipule la nécessité d'un environnement acide pour permettre la séparation du complexe ESAT-6/CFP-10 et pour observer l'activité membranolytique d'ESAT-6. Conrad et collaborateurs ont proposé que ce n'est peut-être pas ESAT-6 qui est à l'origine de l'activité membranolytique, mais que cette activité nécessite d'autres partenaires bactériens, potentiellement produits par le système ESX-1 (Conrad *et al.*, 2017). Pourtant, le rôle crucial d'ESAT-6 dans la rupture phagosomale a été montré par la mutation d'un acide aminé dans sa séquence qui inhibe à la fois son activité membranolytique et la capacité de *M. marinum* et *M. tuberculosis* à avoir accès au cytosol (Zhang *et al.*, 2016). Une autre étude avance que ces disparités sont dues à un état dimérique ou oligomérique d'ESAT-6 lorsqu'elle est à pH neutre, qui empêcherait toute activité lytique (Refai *et al.*, 2015) comme cela est le cas pour le complexe ESAT-6/CFP-10. Cela suggère que le pH acide utilisé dans les expériences de lyse *in vitro* permet de désagréger ESAT-6 et ainsi de restaurer l'activité du monomère. En ce sens, nos travaux préliminaires montrent qu'un pH acide favorise un état désagrégé de la protéine. Basé sur le constat d'une activité lytique à pH neutre, il existerait donc un mécanisme pour séparer le complexe ESAT-6/CFP-10 de manière pH-indépendante, et qui pourrait impliquer un ou plusieurs autres partenaires bactériens participant à la rupture phagosomale. Refai et collaborateurs proposent que la séparation du complexe se fait sous l'action de l'intercalation de lipides à longues chaînes entre les deux protéines, sur la base des effets qu'ils ont observés avec l'ASB-14 (Refai *et al.*, 2015). Dans un scénario similaire, il est envisageable que les DIM jouent ce rôle, puisque le complexe pourrait entrer en contact avec des DIM de l'enveloppe lors de sa sécrétion. Ainsi, après sa séparation de CFP-10, ESAT-6 pourrait exercer son activité membranolytique à pH neutre, qui en plus est potentialisée par la présence de DIM dans la membrane.

Conclusion et perspectives

Le pouvoir pathogène de *M. tuberculosis* repose en partie sur sa capacité à manipuler les réponses microbicides du macrophage au sein du phagosome et de s'en échapper pour induire la mort du macrophage et se disséminer. De nombreux lipides de l'enveloppe mycobactérienne, en majorité des glycolipides, interviennent dans ces processus, mais leur mécanisme d'action reste mal connu. Celui des glycolipides est généralement attribué à la partie glycosylée mais l'impact de leur partie lipidique est très peu exploré. C'est d'autant plus vrai pour le facteur majeur de virulence DIM qui est un lipide entièrement hydrophobe.

Le projet de thèse avait pour objectif d'étudier le rôle et le mécanisme moléculaire d'action des lipides de *M. tuberculosis* dans le dialogue du bacille avec les macrophages. Pour cette étude, nous nous sommes concentrés sur les DIM qui ont servi de molécule pilote à l'étude des lipides de l'enveloppe mycobactérienne. Les travaux antérieurs ont montré que les DIM sont impliqués dans l'internalisation du bacille et dans l'inhibition de l'acidification du phagosome (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Passemar *et al.*, 2014). Nous avons montré que les DIM contribuent aussi à l'induction de la rupture phagosomale et de la mort de la cellule hôte, en particulier de l'apoptose, en collaboration avec un autre facteur majeur de virulence, ESAT-6. Les DIM jouent donc un rôle majeur et pléiotropique dès l'entrée du bacille dans le macrophage jusqu'à la mort de la cellule hôte. Leur présence conditionne donc le devenir de *M. tuberculosis* dans le macrophage. Sur la base de ce rôle, la question maintenant est de savoir si les DIM agissent aussi sur les autres partenaires de l'immunité présents lors de l'infection, comme d'autres populations de macrophages (tissulaires), les cellules dendritiques ou encore les neutrophiles qui sont recrutés dans les phases précoces de l'infection. Il est maintenant envisagé d'étudier plus finement le rôle des DIM *in vivo* dans le modèle murin et leur influence sur la réponse inflammatoire dans le poumon, notamment lors de la formation du granulome.

Le deuxième objectif de ce projet a été de caractériser le mécanisme moléculaire d'action des DIM. Lors du contact des macrophages avec les bactéries, il avait été observé que les DIM contribuent à une baisse de polarité membranaire du macrophage (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les effets membranaires des DIM sont liés à une insertion de ces lipides dans la membrane. Nous avons pu montrer que les DIM sont effectivement transférés dans les membranes de macrophages infectés par *M. tuberculosis*, et que cet événement est dépendant de la présence des DIM à la surface des bactéries. Sur la base de ces résultats, nous proposons que le transfert des DIM est associé à une insertion dans la membrane qui est à l'origine de la rigidification observée.

Dans un deuxième temps nous avons cherché à déterminer si cet effet a lieu uniquement au point de contact ou est plus étendu. Nous avons pu visualiser que cet effet a lieu localement autour de la bactérie en contact avec la membrane, suggérant une insertion et une diffusion des lipides dans la membrane. En diffusant, les DIM pourraient ainsi altérer l'activité d'autres effecteurs membranaires du macrophage comme les PRR.

Nous avons ensuite étudié les conséquences de la présence des DIM dans la membrane sur l'activité de l'effecteur membranaire bactérien ESAT-6. Les résultats montrent que la présence des DIM à la membrane peut d'une part, potentialiser l'activité membranolytique d'ESAT-6, mais également celle d'autres effecteurs comme la mélittine et le détergent ASB-14. Cette non spécificité a été confirmée dans le contexte de lyse cellulaire avec des bactéries entières. En effet, les DIM sont impliqués dans l'hémolyse induite par *M. tuberculosis* dépendante et indépendante d'ESAT-6, suggérant l'implication d'un ou plusieurs autres partenaires bactériens. Un candidat potentiel serait la sphingomyélinase SpmT qui possède une activité hémolytique et joue un rôle dans l'acquisition et le catabolisme des lipides de l'hôte (Speer *et al.*, 2015). Une collaboration de ce facteur avec les DIM ouvrirait donc un nouveau champ de recherche sur un rôle des DIM dans l'acquisition des lipides de l'hôte lors de l'infection.

Au niveau du macrophage, d'autres effecteurs membranaires affectés par les DIM sont maintenant envisagés pour de futures études. Par exemple, il a été montré que les DIM stimulent la phagocytose de la bactérie par les macrophages via les récepteurs de phagocytose CR3 et le récepteur au mannose (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Des travaux préliminaires de l'équipe montrent que l'effet des DIM est plus spécifique du CR3, qui s'active après traitement de macrophages avec des DIM purifiés. Ces résultats suggèrent que cette activation du CR3 est associée à un changement de conformation du récepteur qui favorise la reconnaissance et la phagocytose de la bactérie. En effet, une activation du CR3 par un traitement au Phorbol-Myristate-Acétate (PMA) permet également de restaurer la phagocytose par les macrophages d'une souche de *M. tuberculosis* déficiente en DIM à un niveau comparable à la souche sauvage. Il est connu que l'activation du CR3 par la PMA s'opère par une signalisation de type « inside out », caractérisée par l'activation de la PKC et un changement de conformation du récepteur (Abram and Lowell, 2009). Par sa structure très différente de la PMA, il n'est pas attendu que les DIM soient directement capables d'induire ce type d'activation « inside-out ». Il est donc envisagé que cet effet passe par la présence des DIM à la membrane et leur impact sur l'organisation de la membrane plasmique. Nous avons d'ailleurs montré que les DIM sont effectivement retrouvés dans les membranes de macrophages traités (Figure 27). Une hypothèse serait que les DIM interagissent avec le CR3 au niveau des domaines transmembranaires, induisant un

changement de conformation du récepteur. Néanmoins, peu de choses sont connues sur la structure du CR3 et de son activation. Pour d'autres intégrines, il a été montré qu'une modification de l'interaction des domaines transmembranaires par mutagenèse peut augmenter l'affinité de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ pour son ligand (Luo *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant d'analyser la structure du CR3 en présence des DIM dans la membrane et de vérifier s'ils favorisent l'activation du récepteur sans passer par des voies de signalisation. Pour compléter ces travaux préliminaires, des expériences sont en cours pour visualiser la dynamique du CR3 à la membrane plasmique par suivi de particule unique (SPT = Single Particle Tracking). En effet, la diffusion du récepteur dépend de son état d'activation (Vachon *et al.*, 2007). Cette méthode de SPT permet d'analyser la trajectoire de récepteurs individuels et est donc adaptée à l'étude de la dynamique du CR3 en regard de son activation par les DIM. Enfin, des expériences de microscopie de force atomique vont être réalisées en collaboration avec Franck Lafont et Sébastien Janel (Institut Pasteur, Lille) pour visualiser la distribution du CR3 à la membrane des macrophages en présence de DIM. Cela permettra aussi d'étudier leur capacité à reconnaître un ligand à l'aide d'un stylet fonctionnalisé avec des ligands du CR3. Toutes ces approches devraient nous permettre de décrypter finement les mécanismes d'activation en présence des DIM. Enfin, si cet effet des DIM sur le CR3 passe bien par la présence et l'effet des DIM à la membrane, il sera intéressant d'élargir ces études sur l'activité d'autres récepteurs membranaires, comme les PRR, impliqués dans l'interaction avec *M. tuberculosis*.

D'autres effecteurs membranaires de l'hôte au niveau du phagosome sont aussi connus pour être influencés par la présence des DIM. En effet, ces derniers contribuent à l'exclusion de la pompe H^+ V-ATPase du phagosome empêchant ainsi l'acidification du phagosome (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009, Passemar *et al.*, 2014). Il a été proposé que cet événement passe par un défaut de fusion du phagosome avec les lysosomes. Il est donc possible que la rigidification membranaire induite par les DIM inhibe directement les phénomènes de fusion membranaire, ou indirectement en altérant l'activité des protéines SNARE qui sont des effecteurs majeurs dans la fusion entre vésicules intracellulaires, notamment au phagosome. Des expériences sont actuellement en cours pour tester l'impact des DIM sur la fusion membranaire, dans le système modèle du liposome.

Pour progresser dans la compréhension du mécanisme d'action des DIM, il est encore nécessaire d'étudier de manière détaillée leur capacité à altérer l'organisation membranaire et de quelle façon ils interagissent avec ses différents constituants. Une piste serait d'étudier par résonance magnétique nucléaire (RMN) l'impact des DIM sur l'organisation de la membrane, couplée à des approches de simulation de dynamique moléculaire. Celles-ci devraient nous apporter une image précise de l'interaction des DIM avec les constituants

membranaires, tout en donnant des informations sur ses propriétés biophysique (Vermeer *et al.*, 2007).

Finalement, les travaux de la thèse en particulier sur la compréhension des effets des DIM au niveau moléculaire peuvent maintenant servir de base à l'étude des autres lipides de virulence de *M. tuberculosis*, comme les DAT/PAT, les SL, les TDM ou encore les PGL, dont les mécanismes d'action sont encore largement méconnus. Ils sont essentiellement connus pour leur rôle de modulateurs de la réponse inflammatoire (cf introduction). Cependant l'insertion de ces lipides, comme les TDM et les PGL, qui est suggérée par plusieurs études, et leur impact sur l'organisation membranaire ne sont que peu ou pas étudiés. Les PGL qui partagent le même cœur lipidique que les DIM pourraient montrer également des propriétés similaires au niveau de la membrane. D'ailleurs, à l'instar des DIM, les PGL semblent eux-aussi impliqués dans l'inhibition de la maturation phagosomale (Robinson *et al.*, 2008). De plus, les précédents travaux de l'équipe ont montré une redondance fonctionnelle des SL et DAT/PAT avec les DIM, notamment dans l'inhibition de la maturation phagosomale (Passemar *et al.*, 2014). Il est proposé qu'ils pourraient avoir un mécanisme d'action en partie similaire à celui des DIM lié à l'insertion de ces lipides dans les membranes. Ainsi, les outils développés et utilisés pendant ma thèse pourraient s'appliquer à l'étude de ces lipides et servir à voir si cette redondance fonctionnelle vient aussi d'une insertion de ces lipides dans la membrane et d'une altération de son organisation.

Décrypter cette interaction pourrait à terme amener à développer de nouvelles approches thérapeutiques antituberculeuses ciblant la membrane et sa composition pour contrer l'effet lié à la présence des DIM. Ce type d'approche « membranaire », qui vise à moduler l'organisation membranaire à l'aide de lipides, est connue sous le nom de « Membrane Lipid Therapy » (Escribá, 2017). Elle est déjà à l'essai dans le traitement de certaines maladies, par exemple dans la lutte contre le cancer par l'acide oléique 2-hydroxylé (Minerval©) (Lladó *et al.*, 2014). Dans le cadre de la tuberculose, il a été montré qu'un traitement par des statines, induisant une diminution de la quantité de cholestérol intracellulaire, restaure la fusion du phagosome avec les lysosomes de macrophages infectés, et favorise l'élimination du bacille (Parihar *et al.*, 2014). Ainsi, en supposant que les effets membranaires des DIM constituent leurs mécanismes d'action, contrer ces effets pourrait donc sensibiliser *M. tuberculosis* aux réponses microbicides de la cellule hôte et donc de favoriser l'élimination de la bactérie.

Annexes

I. Matériel et méthodes

a. Anticorps et réactifs

Les anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la pompe Na^+/K^+ ATPase, la GAPDH et l'histone H3 ont été obtenus sous forme de mélange prêt à l'emploi (Plasma Membrane Fraction Western Blot Cocktail, Abcam). Le C-Laurdan a été synthétisé et caractérisé à l'IPBS, comme décrit précédemment (Mazeres *et al.*, 2014). Le 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) a été obtenu chez Avanti et stocké à -20°C . Des solutions-mère chloroformiques de POPC à 1mg/mL ont été préparées et conservées à 4°C . Les extraits lipidiques de membrane de THP-1 ont été obtenus par la méthode de cavitation comme décrite dans l'article.

b. Culture des macrophages

Les cellules THP-1 sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI 1640 complet, (Fisher), supplémenté avec glutamine 2mM (Fisher), 5mM d'acides aminés non essentiels (DMEM Fisher), 5mM de pyruvate de sodium (Fisher), et en sérum de veau fœtal 10% inactivé à la chaleur (Sigma-Aldrich), à 37°C , 5% de CO_2 . La différenciation des cellules en macrophages a été induite avec 30nM de Phorbol-Myristate-Acetate (Sigma) pendant 72h dans du milieu RPMI complet supplémenté à 37°C , 5% de CO_2 .

Les macrophages primaires humains (hMDM = human Monocyte-derived macrophages) ont été isolés à partir de sang humain obtenu de donneurs anonymes à l'établissement français du sang (EFS). Brièvement, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells) ont été récupérées après centrifugation sur Ficoll et préparées comme décrits précédemment (Voir article). Les cellules sont ensuite rincées et les monocytes sont incubés pendant 7 jours à 37°C , 5% CO_2 , en milieu RPMI complet contenant 7% de sérum humain AB (Sigma) à la place du sérum de veau fœtal, pour induire leur différenciation en macrophages.

c. Culture bactérienne

Les différentes souches de BCG et de H37Rv utilisées (Tableau 4) sontensemencées pour une pré-culture dans du milieu Middlebrook 7H9 Broth supplémenté en ADC à 10% (Albumine Dextrose Catalase, Difco), tween-80 0.05%.

Tableau 4 : Liste des différentes souches de *M. bovis* BCG et de *M. tuberculosis* H37Rv utilisées.
 (+) : la souche H37Rv Δ LppX produit des DIM mais ne les transporte pas à la surface de la bactérie

	Souches	Production des DIM	Production d'ESAT-6	Références
Souches BCG	BCG pasteur	+	-	Augenstreich <i>et al.</i> , 2017
	BCG Δ mas	-	-	
	BCG::RD1	+	+	
	Δ mas::RD1	-	+	
Souches H37Rv	H37Rv	+	+	Sulzenbacher <i>et al.</i> , 2006
	H37Rv Δ mas	-	+	
	H37Rv Δ LppX	(+)	+	Augenstreich <i>et al.</i> , 2017
	H37Rv Δ esxA	+	-	

Les différentes souches utilisées et leur production de DIM ou d'ESAT-6 ont été construites dans l'équipe et sont listées dans le tableau ci-contre (Tableau 4).

d. Etude du transfert des DIM dans les macrophages

- Extraction des lipides

Les extraits totaux de lipides bactériens et de lipides des macrophages ont été obtenus par la méthode de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959). A 0,8 volumes de suspension cellulaire ou bactérienne, 2 volumes de CH₃OH et 1 volume de CHCl₃ sont ajoutés. Ces proportions permettent d'obtenir un mélange homogène de solvants. Le mélange est incubé pendant 48 h à température ambiante. Pour induire la séparation de phase, 1 volume de CHCl₃ puis 1 volume d'H₂O milliQ sont ajoutés au mélange, qui est ensuite incubé pendant au moins 24 h à température ambiante, pour s'assurer que la phase organique et la phase aqueuse sont bien séparées. La phase organique contenant les lipides est récupérée, puis séchée sous un flux d'air.

- Etude du transfert des DIM purifiés après traitement de macrophages

Cette expérience a été réalisée sur des cellules cultivées sur lamelle de verre de diamètre de 25 mm. Les DIM purifiés ont été extraits de *Mycobacterium canetti* et purifiés dans l'équipe comme décrit précédemment (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Les DIM ont été préparés selon la méthode décrite ailleurs (Villeneuve *et al.*, 2005). Un résidu sec de DIM a d'abord été dissous dans un mélange CHCl₃/CH₃OH (2:1) (concentration 20 mg/mL) et ajouté à un milieu RPMI-G (concentration finale 100 µg/mL correspondant à 70 µM de DIM). Cette suspension est soniquée dans un bain à sonication pendant 20 min à 40-45°C pour disperser les DIM. Pour traiter des cellules avec les DIM, 3 x 10⁶ macrophages sur lamelle de verre sont transférés dans une boîte de pétri en verre et incubés avec le milieu RPMI-G supplémenté en DIM pendant 1 h à 37°C, 5% CO₂. Les cellules sont lavées 3 fois avec du milieu RPMI-G puis décollées des lamelles par un traitement à la trypsine. Les cellules sont centrifugées à 150 g pendant 10 min et le culot est repris dans du milieu RPMI-G. Les lipides sont extraits par la méthode de Bligh et Dyer.

- Etude du transfert des DIM dans les membranes des macrophages après infection par BCG

La préparation des bactéries pour l'infection a été faite selon la méthode décrite précédemment (voir article).

Les macrophages ont été incubés avec BCG (MOI 25) et H37Rv (MOI 15) pendant 2h à 37°C, 5% CO₂, puis les macrophages ont été rincés et conservés à 37°C, 5% CO₂. Au bout de 40h, les cellules ont été traitées à la trypsine et transférés dans un tube de 50mL. Les cellules ont été culottées par centrifugation à 150 g, puis avec dans 1mL de tampon d'homogénéisation (HEPES 20mM, sucrose 250mM, EDTA 1mM) à 4°C. Les macrophages ont ensuite été lysés par 25 passages dans une seringue de 26G. Le lysat a été centrifugé à 3000g 10 min à 4°C pour sédimenter les noyaux et les gros débris cellulaires et le surnageant est récupéré. Cette étape est répétée deux fois. Le surnageant a été déposé sur gradient de sucrose continu 12%-30% et centrifugé à 2000g sans frein pendant une heure à 4°C. La portion supérieure du gradient contenant la fraction membranaire a été récupérée et déposée sur un gradient de sucrose discontinu 25%/50%, puis centrifugée à 2000g sans frein pendant 30 min à 4°C. La fraction au-dessus de la portion à 25% contenant la fraction membranaire a été récupérée et culottée à 110000 g pendant 1h à 4°C. Le culot a été repris dans du tampon d'homogénéisation et les lipides ont été extraits par la méthode Bligh et Dyer.

- Analyse des lipides par chromatographie sur couche mince spectrométrie de masse MALDI-TOF

Pour l'analyse des lipides totaux par chromatographie sur couche mince, les résidus secs de lipides ont été repris à 1mg/mL dans du CHCl₃ et 3 volumes de capillaire en verre ont été déposés sur la plaque de chromatographie. La migration a été effectuée avec un mélange Ether de pétrole / Diéthyl-Ether (90:10). Les lipides ont été révélés au phosphomolybdate par chauffage de la plaque à 120-150°C.

Pour l'analyse des lipides par spectrométrie de masse, les résidus secs de lipides ont été repris dans 20 µL de CHCl₃ et 0,5 µL et déposés sur la plaque d'analyse et séchés. 0.5µL d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque à 10mg/mL dans un mélange CHCl₃/CH₃OH (1:1) ont été déposés sur l'échantillon puis laissé à cristalliser à température ambiante. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été réalisée sur une analyseur 5800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems/AB SCIEX) équipé d'un laser Nd:YAG ($\lambda = 349$ nm). Les spectres de masse ont été obtenus en accumulation de 10 spectres de 250 tirs de lasers. L'acquisition a été effectuée en mode balayage continu, en mode positif avec une intensité laser de 3500 (unité arbitraire du logiciel).

- Analyse du fractionnement membranaire par western blot

Les extraits cellulaires totaux ou issu du fractionnement ont été supplémentés en tampon de Laemmli commercial (Biorad) (Laemmli *et al.*, 1970) et chauffés à 90°C pendant 10 min. Les extraits ont ensuite été déposés sur gel gradient de polyacrylamide 4%-20% pré-coulé (Precast gel, Biorad). La migration a été effectuée à 100V pendant 1h puis les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à 100V pendant 45 min. La membrane a ensuite été saturée avec un mélange PBS-Tween20 0.1%-Lait 5% pendant 1h à température ambiante. Le cocktail d'anticorps « Plasma Membrane Fraction Western Blot Cocktail » est ajouté au 1/100ème et incubé sur la nuit à 4°C. La membrane a ensuite été incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps secondaire Goat α -mouse HRP (Biorad) dilué au 1/1000ème dans du mélange PBS-Tween20 0.1%-Lait 5%. La révélation a été effectuée par chimiluminescence à l'aide du Kit ECL Immobilon (Merck Millipore). La membrane a été ensuite observée via l'imageur ChemiDoc-Touch (Biorad) et l'analyse de l'intensité des bandes a été réalisée sur le logiciel ChemiDoc. L'intensité des bandes a été calculée par intégration du signal par rapport à la ligne de base.

e. Etude de la variation de polarité membranaire au point de contact entre la bactérie et la membrane

- Etude sur membrane supportée

La membrane lipidique supportée a été formée selon la méthode de fusion de liposomes sur un support hydrophile, ici une lamelle de verre de ϕ 25 mm. Des liposomes multilamellaires (MLV) ont été préparés par hydratation d'un résidu sec de POPC contenant 1% de C-Laurdan, dans un tampon MOPS (10 mM MOPS, 10 μ M EDTA, 100 mM NaCl, pH 7.0) en vortexant pendant 3 min. Les MLV sont dilués à 200 μ g/mL puis transformés en petites vésicules unilamellaires (SUV) par extrusion avec un Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids) en faisant 15 passages à travers une membrane de polycarbonate (taille de pore 0.03 μ m). Les SUV sont dilués à 100 μ g/mL et 200 μ L de cette suspension est déposés sur une lamelle de verre nettoyée à l'éthanol puis par un plasma d'Ar et d'O₂. Après un temps d'incubation de 10 min, l'excédent de vésicules est éliminé par plusieurs lavages avec 1 mL de tampon MOPS.

Une suspension de 2×10^6 bactéries, préparée comme décrit précédemment, est déposée sur la bicouche, qui est ensuite centrifugée à 1500 g pendant 5 min à température ambiante. La membrane est incubée avec les bactéries pendant 20 min à température ambiante avant l'observation de la fluorescence par microscopie biphotonique.

- Etude sur cellules

Des cellules THP-1 différenciées au PMA ont été infectées avec des bactéries à MOI 20 pendant 20 min à température ambiante pour limiter l'internalisation des bactéries. Les cellules sont lavées puis incubées dans du milieu RPMI-G supplémenté avec 0.2 μ M de C-Laurdan (dissous dans du DMSO) pour le marquage. Les cellules sont directement observées dans le milieu de marquage puisque le C-Laurdan a un faible rendement quantique dans l'eau, mais un rendement quantique élevé dans un milieu apolaire, *i.e.* les membranes des cellules.

- Analyse de la fluorescence par microscopie biphotonique

Les clichés ont été réalisés avec un microscope confocal inversé (Zeiss LSM710), équipé d'un objectif à immersion 40X et d'un laser pulsé femtoseconde (Chameleon Vision II, Coherent, plage de longueurs d'onde 680 nm-1080 nm, puissance 3 W à 800 nm). Le microscope est aussi équipé d'un module de détection spectrale permettant l'acquisition d'un spectre de fluorescence. Pour le C-Laurdan, le spectre de fluorescence a été collecté dans 18 canaux allant de 418 nm à 593 nm (largeur d'un canal 9.7 nm), la puissance laser a été fixée à 7%, le temps d'acquisition par pixel réglé à 3 μ sec avec 16 balayages par ligne et le pinhole ouvert à 100 (unité arbitraire du logiciel). La méthode d'excitation biphotonique permet en soi l'acquisition d'images en mode confocal, mais la fermeture du pinhole permet d'affiner l'analyse de la fluorescence (Mazeres *et al.*, 2017). L'image obtenue est présentée sous la forme d'un stack de 18 images correspondant aux 18 longueurs d'onde analysées (λ -stack).

f. Etude du rôle des DIM sur l'activité membranolitique d'ESAT-6 sur liposomes THP-1

ESAT-6 purifiée sous forme native nous a été gracieusement fournie par R. Brosch (Institut Pasteur, Paris). ESAT-6 recombinante a été produite par V. Guillet (IPBS, équipe Biophysique Structurale). La production de la protéine a été réalisée en transformant la souche *E. coli* BL21 (DE3) pLysS avec le plasmide pMRLB.7 (NR-50170, BEI Resources) qui contient le gène Rv3875 codant pour ESAT-6 de *M. tuberculosis* avec un tag de 6 histidines en position C-terminal. La purification de la protéine a été effectuée et adaptée du protocole fourni par le BEI en éliminant l'étape de rinçage avec un tampon contenant le détergent ASB-14.

- Préparation de liposomes et expérience de fuite de Calcéine

Les liposomes ont été formés comme décrit précédemment (voir article matériel et méthodes). Pour l'expérience de fuite de calcéine à différents pH, la concentration en liposomes a été ajustée à 1.3×10^{10} liposomes/mL par dilution d'un facteur 2 à 5 dans un tampon acétate à pH 5 (acétate de sodium 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 5) ou un tampon Tris à pH 7.4 (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4).

L'expérience de fuite de calcéine a été réalisée par la mesure de la fluorescence de la calcéine à l'aide d'un spectrofluorimètre (FLSP920 spectrometer, Edinburgh Instruments), avec une longueur d'onde d'excitation de 491 nm et une longueur d'onde d'émission à 517 nm et des fentes d'excitations et d'émission à 1nm. Les mesures ont été réalisées à température ambiante, sur une cinétique d'environ 2h avec une mesure de fluorescence toute les 5 secondes. Pour la mesure la solution de liposomes est diluée au 1/10eme dans du tampon Acétate à pH5 ou du tampon Tris à pH 7,4 dans une cuve en Quartz de 100µL. La fluorescence est mesurée pendant 10 min pour déterminer la valeur de fluorescence basale (I_0). Puis les liposomes sont incubés avec ESAT-6 à 10µM finale pendant environ 2h jusqu'à atteindre un plateau (I). Du Triton X-100 est ensuite ajouté pour libérer toute la calcéine encapsulée pour déterminer la valeur maximale de fluorescence (I_{TX}). Le pourcentage de fuite de calcéine a été calculée selon l'équation :

$$\% \text{ fuite} = \frac{I - I_0}{I_{TX} - I_0}$$

L'expérience de fuite a également été réalisée en incubant les liposomes avec 50nM de Melittine (Sigma), ou avec le détergent ASB-14 à différentes concentrations.

g. Etude du rôle des DIM dans l'hémolyse dépendante d'ESAT-6

Les érythrocytes humains ont été isolés à partir de prélèvement sanguins issus de donneurs volontaires (EFS). Le sang total a été centrifugé à 200g pendant 5 minutes. Le culot d'érythrocytes a été lavé dans une solution de NaCl 150mM puis deux fois avec du DPBS 1X (Gibco) par centrifugation à 200g pendant 5 min. Les cellules ont été comptées et diluée à la concentration voulue dans du tampon DPBS 1X.

Des cultures des différentes souches de bactéries (BCG +/- DIM +/- RD1 et H37Rv +/- DIM +/- *esxA*) dans du 7H9-ADC-Tween 80 0.05% ont été centrifugées à 10 000 g pendant 2 min et les culots bactériens ont été lavés deux fois avec du tampon DPBS 1X. La densité bactérienne a été évaluée par la mesure de la densité optique à 600nm (DO 0.1 correspond à 2×10^7 bactéries/mL).

Pour les expériences d'hémolyse, 10^7 érythrocytes ont été mélangés avec des bactéries à MOI 50. La suspension de cellules et de bactéries a ensuite été centrifugée à 3200g pendant 8 min puis laissée à incuber pendant 48h à 37°C dans du DPBS 1X. Le culot a été resuspendu et culotté à 10000g pendant 2 min, puis le surnageant a été récupéré et filtré. Le niveau d'hémolyse a été quantifié en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine à 415 nm. Le maximum d'hémolyse est obtenu en ajoutant 0.1% de Triton X-100 en ajoutant 0.1% de Triton X-100 aux érythrocytes à la fin de l'incubation de 48h

Références bibliographiques

<tuberculosis2007.pdf>.

- Abdalla, A.E., Lambert, N., Duan, X. and Xie, J. (2016) Interleukin-10 Family and Tuberculosis: An Old Story Renewed. *International Journal of Biological Sciences* **12**: 710-717.
- Abram, C.L. and Lowell, C.A. (2009) The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annual Review of Immunology* **27**: 339-362.
- Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Aguilo, J.I., Alonso, H., Uranga, S., Marinova, D., Arbués, A., de Martino, A. *et al.* (2013) ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology* **15**: 1994-2005.
- Aguiló, N., Marinova, D., Martín, C. and Pardo, J. (2013) ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: to be or not to be, that is the question. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.
- Aguiló, N., Uranga, S., Marinova, D., Martín, C. and Pardo, J. (2014) Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Death & Disease* **5**: e1343-e1343.
- Aguilo, N., Uranga, S., Marinova, D., Monzon, M., Badiola, J. and Martin, C. (2016) MTBVAC vaccine is safe, immunogenic and confers protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* in newborn mice. *Tuberculosis* **96**: 71-74.
- Alberti-Segui, C., Goeden, K.R. and Higgins, D.E. (2007) Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cellular Microbiology* **9**: 179-195.
- Allen, M., Bailey, C., Cahatol, I., Dodge, L., Yim, J., Kassissa, C. *et al.* (2015) Mechanisms of Control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK Cells: Role of Glutathione. *Frontiers in Immunology* **6**.
- Alloatti, A., Kotsias, F., Magalhaes, J.G. and Amigorena, S. (2016) Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunol Rev* **272**: 97-108.
- 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* **104**: 6031-6036.
- Amaral, E.P., Lasunskaja, E.B. and D'Império-Lima, M.R. (2016) Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and Infection* **18**: 11-20.
- Andersen, P. and Doherty, T.M. (2005) The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* **3**: 656-662.
- Antonny, B., Vanni, S., Shindou, H. and Ferreira, T. (2015) From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle function. *Trends in Cell Biology* **25**: 427-436.
- Arbues, A., Lugo-Villarino, G., Neyrolles, O., Guilhot, C. and Astarie-Dequeker, C. (2014) Playing hide-and-seek with host macrophages through the use of mycobacterial cell envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**.

- Arbués, A., Malaga, W., Constant, P., Guilhot, C., Prandi, J. and Astarie-Dequeker, C. (2016) Trisaccharides of Phenolic Glycolipids Confer Advantages to Pathogenic Mycobacteria through Manipulation of Host-Cell Pattern-Recognition Receptors. *ACS Chemical Biology* **11**: 2865-2875.
- Armstrong, J.A. and Hart, P.D. (1975) Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* **142**: 1-16.
- Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F.K., Chalut, C., Lopez, A. *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.
- Athman, J.J., Sande, O.J., Groft, S.G., Reba, S.M., Nagy, N., Wearsch, P.A. *et al.* (2017) Mycobacterium tuberculosis Membrane Vesicles Inhibit T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **198**: 2028-2037.
- Athman, J.J., Wang, Y., McDonald, D.J., Boom, W.H., Harding, C.V. and Wearsch, P.A. (2015) Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of Mycobacterium tuberculosis Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages. *The Journal of Immunology* **195**: 1044-1053.
- Azad, A.K., Sirakova, T.D., Rogers, L.M. and Kolattukudy, P.E. (1996) Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in Mycobacterium bovis BCG produces a mutant that lacks mycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4787-4792.
- Barczak, A.K., Avraham, R., Singh, S., Luo, S.S., Zhang, W.R., Bray, M.A. *et al.* (2017) Systematic, multiparametric analysis of Mycobacterium tuberculosis intracellular infection offers insight into coordinated virulence. *PLoS Pathog* **13**: e1006363.
- Barry, C.E., 3rd, Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A. *et al.* (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* **37**: 143-179.
- Barry, C.E., Boshoff, H.I., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J. *et al.* (2009) The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 845-855.
- Beatty, W.L., Rhoades, E.R., Ullrich, H.J., Chatterjee, D., Heuser, J.E. and Russell, D.G. (2000) Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* **1**: 235-247.
- Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.X. *et al.* (2011) Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunology* **4**: 279-287.
- Bénard, A., Sakwa, I., Schierloh, P., Colom, A., Mercier, I., Tailleux, L. *et al.* (2018) B Cells Producing Type I IFN Modulate Macrophage Polarization in Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **197**: 801-813.
- Bishop, P.J. and Neumann, G. (1970) The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* **51**: 196-206.
- Blanc, L., Gilleron, M., Prandi, J., Song, O.-r., Jang, M.-S., Gicquel, B. *et al.* (2017) Mycobacterium tuberculosis inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: 11205-11210.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* **173**: 17-26.

- Bomberger, J.M., Maceachran, D.P., Coutermarsh, B.A., Ye, S., O'Toole, G.A. and Stanton, B.A. (2009) Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog* **5**: e1000382.
- Boom, W.H., Canaday, D.H., Fulton, S.A., Gehring, A.J., Rojas, R.E. and Torres, M. (2003) Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* **83**: 98-106.
- Bosedasgupta, S. and Pieters, J. (2014) Inflammatory stimuli reprogram macrophage phagocytosis to macropinocytosis for the rapid elimination of pathogens. *PLoS Pathog* **10**: e1003879.
- Bourigault, M.L., Vacher, R., Rose, S., Olleros, M.L., Janssens, J.P., Quesniaux, V.F. *et al.* (2013) Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances *Mycobacterium tuberculosis* clearance and reduces lung pathology. *Am J Clin Exp Immunol* **2**: 124-134.
- Bowdish, D.M., Sakamoto, K., Kim, M.J., Kroos, M., Mukhopadhyay, S., Leifer, C.A. *et al.* (2009) MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **5**: e1000474.
- Brill, K.J., Li, Q., Larkin, R., Canaday, D.H., Kaplan, D.R., Boom, W.H. *et al.* (2001) Human Natural Killer Cells Mediate Killing of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via Granule-Independent Mechanisms. *Infection and Immunity* **69**: 1755-1765.
- Bruns, H., Stegelmann, F., Fabri, M., Dohner, K., van Zandbergen, G., Wagner, M. *et al.* (2012) Abelson Tyrosine Kinase Controls Phagosomal Acidification Required for Killing of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Macrophages. *The Journal of Immunology* **189**: 4069-4078.
- Bryant, J.M., Grogono, D.M., Rodriguez-Rincon, D., Everall, I., Brown, K.P., Moreno, P. *et al.* (2016) Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* **354**: 751-757.
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. *et al.* (1992) The Small Gtpase Rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytic Pathway. *Cell* **70**: 715-728.
- Butler, R.E., Krishnan, N., Garcia-Jimenez, W., Francis, R., Martyn, A., Mendum, T. *et al.* (2017) Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*-infected host cells to phospho-MLKL driven necroptosis is dependent on cell type and presence of TNF α . *Virulence* **8**: 1820-1832.
- Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Lan elle, M.-A., Triccas, J.A., Gicquel, B. *et al.* (2001) Analysis of the Phthiocerol Dimycocerosate Locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *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. *Mol Microbiol* **34**: 257-267.
- Cambier, C.J., Falkow, S. and Ramakrishnan, L. (2014) Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **159**: 1497-1509.
- Cambier, C.J., O'Leary, S.M., O'Sullivan, M.P., Keane, J. and Ramakrishnan, L. (2017) Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* **47**: 552-565.e554.
- Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B. *et al.* (2013) Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* **505**: 218-222.

- Cardenal-Munoz, E., Arafah, S., Lopez-Jimenez, A.T., Kicka, S., Falaise, A., Bach, F. *et al.* (2017) Mycobacterium marinum antagonistically induces an autophagic response while repressing the autophagic flux in a TORC1- and ESX-1-dependent manner. *PLoS Pathog* **13**: e1006344.
- Caron, E. and Hall, A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-1721.
- Chalut, C. (2016) MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis* **100**: 32-45.
- Chan, J., Mehta, S., Bharrhan, S., Chen, Y., Achkar, J.M., Casadevall, A. *et al.* (2014) The role of B cells and humoral immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Seminars in Immunology* **26**: 588-600.
- Chandra, P., Ghanwat, S., Matta, S.K., Yadav, S.S., Mehta, M., Siddiqui, Z. *et al.* (2015) Mycobacterium tuberculosis Inhibits RAB7 Recruitment to Selectively Modulate Autophagy Flux in Macrophages. *Sci Rep* **5**.
- Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D.S.J., Hong, S., Lee, D.M. *et al.* (2008) Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med* **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. *The Journal of Immunology* **176**: 3707-3716.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S. *et al.* (2007) High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human 2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science* **318**: 1258-1265.
- Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G. *et al.* (2017) Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep* **7**.
- Chiricozzi, E., Loberto, N., Schiumarini, D., Samarani, M., Mancini, G., Tamanini, A. *et al.* (2018) Sphingolipids role in the regulation of inflammatory response: From leukocyte biology to bacterial infection. *Journal of Leukocyte Biology* **103**: 445-456.
- Choi, H.-H., Shin, D.-M., Kang, G., Kim, K.-H., Park, J.B., Hur, G.M. *et al.* (2010) Endoplasmic reticulum stress response is involved in Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis. *FEBS Letters* **584**: 2445-2454.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D. *et al.* (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins, Angela C., Cai, H., Li, T., Franco, Luis H., Li, X.-D., Nair, Vidhya R. *et al.* (2015) Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for Mycobacterium tuberculosis. *Cell Host & Microbe* **17**: 820-828.
- Conrad, W.H., Osman, M.M., Shanahan, J.K., Chu, F., Takaki, K.K., Cameron, J. *et al.* (2017) Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: 1371-1376.
- Cooper, A.M. (2009) Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. *Annual Review of Immunology* **27**: 393-422.
- Corleis, B., Korbel, D., Wilson, R., Bylund, J., Chee, R. and Schaible, U.E. (2012) Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils. *Cellular Microbiology* **14**: 1109-1121.

- Court, N., Vasseur, V., Vacher, R., Fremond, C., Shebzukhov, Y., Yeremeev, V.V. *et al.* (2010) Partial Redundancy of the Pattern Recognition Receptors, Scavenger Receptors, and C-Type Lectins for the Long-Term Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology* **184**: 7057-7070.
- 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.
- Crowley, J.T., Toledo, A.M., LaRocca, T.J., Coleman, J.L., London, E. and Benach, J.L. (2013) Lipid exchange between *Borrelia burgdorferi* and host cells. *PLoS Pathog* **9**: e1003109.
- Cywes, C., Godenir, N.L., Hoppe, H.C., Scholle, R.R., Steyn, L.M., Kirsch, R.E. *et al.* (1996) Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* **64**: 5373-5383.
- Cywes, C., Hoppe, H.C., Daffe, M. and Ehlers, M.R. (1997) Nonopsonic binding of Mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* **65**: 4258-4266.
- Daffé, M., Quémar, A. and Marrakchi, H. (2017) Mycolic Acids: From Chemistry to Biology. 1-36.
- Dallenga, T., Repnik, U., Corleis, B., Eich, J., Reimer, R., Griffiths, G.W. *et al.* (2017) M. tuberculosis -Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host & Microbe* **22**: 519-530.e513.
- Daniel, J., Deb, C., Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Morbidoni, H.R. *et al.* (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. *Journal of Bacteriology* **186**: 5017-5030.
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T.D. and Kolattukudy, P.E. (2011) Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog* **7**: e1002093.
- Daniel, T.M. (2006) The history of tuberculosis. *Respir Med* **100**: 1862-1870.
- Datta, M., Via, L.E., Kamoun, W.S., Liu, C., Chen, W., Seano, G. *et al.* (2015) Anti-vascular endothelial growth factor treatment normalizes tuberculosis granuloma vasculature and improves small molecule delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 1827-1832.
- Davis, J.M. and Ramakrishnan, L. (2009) The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell* **136**: 37-49.
- Day, T.A., Mittler, J.E., Nixon, M.R., Thompson, C., Miner, M.D., Hickey, M.J. *et al.* (2014) Mycobacterium tuberculosis Strains Lacking Surface Lipid Phthiocerol Dimycocerosate Are Susceptible to Killing by an Early Innate Host Response. *Infection and Immunity* **82**: 5214-5222.
- de Jonge, M.I., Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M.M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P. *et al.* (2007) ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of Bacteriology* **189**: 6028-6034.
- De Leon, J., Jiang, G., Ma, Y., Rubin, E., Fortune, S. and Sun, J. (2012) Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 Exhibits a Unique Membrane-interacting Activity That Is Not Found in Its Ortholog from Non-pathogenic Mycobacterium smegmatis. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 44184-44191.
- de Meyer, F. and Smit, B. (2009) Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 3654-3658.

- Deb, C., Lee, C.M., Dubey, V.S., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T.D. *et al.* (2009) A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS One* **4**: e6077.
- Delafont, V., Mougari, F., Cambau, E., Joyeux, M., Bouchon, D., Hechard, Y. *et al.* (2014) First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environ Sci Technol* **48**: 11872-11882.
- Derrick, S.C. and Morris, S.L. (2007) The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology* **9**: 1547-1555.
- Dibya, D., Arora, N. and Smith, E.A. (2010) Noninvasive Measurements of Integrin Microclustering under Altered Membrane Cholesterol Levels. *Biophysical Journal* **99**: 853-861.
- Dieli, F., Ivanyi, J., Marsh, P., Williams, A., Naylor, I., Sireci, G. *et al.* (2003) Characterization of Lung T Cells Following Intranasal Infection with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *The Journal of Immunology* **170**: 463-469.
- Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* **141**: 2407-2412.
- Dinic, J., Riehl, A., Adler, J. and Parmryd, I. (2015) The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor. *Sci Rep* **5**.
- Divangahi, M., Chen, M., Gan, H., Desjardins, D., Hickman, T.T., Lee, D.M. *et al.* (2009) *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature Immunology* **10**: 899-906.
- Dustin, M.L. (2016) Complement Receptors in Myeloid Cell Adhesion and Phagocytosis. *Microbiol Spectr* **4**.
- Ehrt, S. and Schnappinger, D. (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular Microbiology* **11**: 1170-1178.
- Elliott, M.R., Koster, K.M. and Murphy, P.S. (2017) Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology* **198**: 1387-1394.
- Ernst, J.D. (2012) The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* **12**: 581-591.
- Escribá, P.V. (2017) Membrane-lipid therapy: A historical perspective of membrane-targeted therapies — From lipid bilayer structure to the pathophysiological regulation of cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1859**: 1493-1506.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* **148**: 2207-2216.
- Feazel, L.M., Baumgartner, L.K., Peterson, K.L., Frank, D.N., Harris, J.K. and Pace, N.R. (2009) Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16393-16399.
- Feng, L., Chen, S., Hu, Y. and Stock, A.M. (2018) PhoPR Positively Regulates whiB3 Expression in Response to Low pH in Pathogenic *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology* **200**: e00766-00717.

- Fereidouni, F., Bader, A.N. and Gerritsen, H.C. (2012) Spectral phasor analysis allows rapid and reliable unmixing of fluorescence microscopy spectral images. *Optics Express* **20**: 12729-12741.
- Filio-Rodríguez, G., Estrada-García, I., Arce-Paredes, P., Moreno-Altamirano, M.M., Islas-Trujillo, S., Ponce-Regalado, M.D. *et al.* (2017) In vivo induction of neutrophil extracellular traps by *Mycobacterium tuberculosis* in a guinea pig model. *Innate Immunity* **23**: 625-637.
- Fine-Coulson, K., Giguère, S., Quinn, F.D. and Reaves, B.J. (2015) Infection of A549 human type II epithelial cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces changes in mitochondrial morphology, distribution and mass that are dependent on the early secreted antigen, ESAT-6. *Microbes and Infection* **17**: 689-697.
- Flesch, I.E. and Kaufmann, S.H. (1990) Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* **58**: 2675-2677.
- Fletcher, H.A. and Schrager, L. (2016) TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **110**: 212-218.
- 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.
- Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I. and Deretic, V. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 5437-5442.
- Friedrich, N., Hagedorn, M., Soldati-Favre, D. and Soldati, T. (2012) Prison Break: Pathogens' Strategies To Egress from Host Cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**: 707-720.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P. *et al.* (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **25**: 486-541.
- Gatfield, J. and Pieters, J. (2000) Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* **288**: 1647-1650.
- Gaullier, J.-M., Rønning, E., Gillooly, D.J. and Stenmark, H. (2000) Interaction of the EEA1 FYVE Finger with Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Early Endosomes. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 24595-24600.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J. *et al.* (2000a) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**: 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y. *et al.* (2000b) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**: 575-585.
- Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmek, B. *et al.* (2003) *Mycobacteria* Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J Exp Med* **197**: 7-17.
- Gilleron, M., Nigou, J., Nicolle, D., Quesniaux, V. and Puzo, G. (2006) The Acylation State of *Mycobacterial* Lipomannans Modulates Innate Immunity Response through Toll-like Receptor 2. *Chemistry & Biology* **13**: 39-47.

- Golfetto, O., Hinde, E. and Gratton, E. (2013) Laurdan Fluorescence Lifetime Discriminates Cholesterol Content from Changes in Fluidity in Living Cell Membranes. *Biophysical Journal* **104**: 1238-1247.
- 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. *Infect Immun* **9**: 150-158.
- Griffith, D.E. and Aksamit, T.R. (2016) Nontuberculous Mycobacterial Disease Therapy: Take It to the Limit One More Time. *Chest* **150**: 1177-1178.
- Grohmann, U., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M.C. *et al.* (1998) IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* **9**: 315-323.
- Grossfield, A., Feller, S.E. and Pitman, M.C. (2006) A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by -3 polyunsaturated lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 4888-4893.
- Grover, A. and Izzo, A.A. (2012) BAT3 regulates *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6-mediated apoptosis of macrophages. *PLoS One* **7**: e40836.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. and Lambrecht, B.N. (2014) The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature Reviews Immunology* **14**: 94-108.
- Gutierrez, M.C., Supply, P. and Brosch, R. (2009) Pathogenomics of mycobacteria. *Genome Dyn* **6**: 198-210.
- 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.
- Hakomori, S., Handa, K., Iwabuchi, K., Yamamura, S. and Prinetti, A. (1998) New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology* **8**: xi-xix.
- Harayama, T. and Riezman, H. (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**: 281-296.
- Harris, J., Hope, J.C. and Keane, J. (2008) Tumor Necrosis Factor Blockers Influence Macrophage Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **198**: 1842-1850.
- 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.
- Hayakawa, E., Tokumasu, F., Nardone, G.A., Jin, A.J., Hackley, V.A. and Dvorak, J.A. (2007) A *Mycobacterium tuberculosis*-Derived Lipid Inhibits Membrane Fusion by Modulating Lipid Membrane Domains. *Biophysical Journal* **93**: 4018-4030.
- He, W.-t., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z. *et al.* (2015) Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1β secretion. *Cell Res* **25**: 1285-1298.
- Hildebrand, J.M., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Young, S.N., Spall, S.K., Sharma, P. *et al.* (2014) Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to

- induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 15072-15077.
- Hmama, Z., Pena-Diaz, S., Joseph, S. and Av-Gay, Y. (2015) Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Rev* **264**: 220-232.
- Hossain, M.M. and Norazmi, M.-N. (2013) Pattern Recognition Receptors and Cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection—The Double-Edged Sword? *BioMed Research International* **2013**: 1-18.
- Houben, D., Demangel, C., van Ingen, J., Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M. *et al.* (2012) ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cellular Microbiology* **14**: 1287-1298.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M. *et al.* (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 12420-12425.
- Hu, D., Wu, J., Wang, W., Mu, M., Zhao, R., Xu, X. *et al.* (2015) Autophagy regulation revealed by SapM-induced block of autophagosome-lysosome fusion via binding RAB7. *Biochem Biophys Res Commun* **461**: 401-407.
- Huang, D. and Bao, L. (2016) *Mycobacterium tuberculosis* EspB protein suppresses interferon- γ -induced autophagy in murine macrophages. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **49**: 859-865.
- Huang, L., Nazarova, E.V., Tan, S., Liu, Y. and Russell, D.G. (2018) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J Exp Med* **215**: 1135-1152.
- Huynh, K.K., Eskelinen, E.-L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P. and Grinstein, S. (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO Journal* **26**: 313-324.
- Hybiske, K. and Stephens, R.S. (2008) Exit strategies of intracellular pathogens. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 99-110.
- Ikonen, E. (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 125-138.
- Indrigo, J., Hunter, R.L., Jr. and Actor, J.K. (2003) Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* **149**: 2049-2059.
- Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H. and Zuckermann, M.J. (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* **905**: 162-172.
- Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O. *et al.* (2009) Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* **206**: 2879-2888.
- Jackson, M., Stadthagen, G. and Gicquel, B. (2007) Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis, transport, regulation and biological activities. *Tuberculosis* **87**: 78-86.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 5133-5138.

- Jamwal, S.V., Mehrotra, P., Singh, A., Siddiqui, Z., Basu, A. and Rao, K.V.S. (2016) Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. *Sci Rep* **6**.
- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K. *et al.* (2007) Survival of Mycobacteria in Macrophages Is Mediated by Coronin 1-Dependent Activation of Calcineurin. *Cell* **130**: 37-50.
- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R.E. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **19**: 491-511.
- Jeschke, A. and Haas, A. (2016) Deciphering the roles of phosphoinositide lipids in phagolysosome biogenesis. *Communicative & Integrative Biology* **9**: e1174798.
- Jones, B.W., Means, T.K., Heldwein, K.A., Keen, M.A., Hill, P.J., Belisle, J.T. *et al.* (2001) Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol* **69**: 1036-1044.
- Junqueira-Kipnis, A.P., Kipnis, A., Jamieson, A., Juarrero, M.G., Diefenbach, A., Raulet, D.H. *et al.* (2003) NK Cells Respond to Pulmonary Infection with Mycobacterium tuberculosis, but Play a Minimal Role in Protection. *The Journal of Immunology* **171**: 6039-6045.
- 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. *et al.* (2005) The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* **202**: 987-999.
- Kaparakis-Liaskos, M. and Ferrero, R.L. (2015) Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology* **15**: 375-387.
- Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S. *et al.* (2015) Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**: 666-671.
- Killick, K.E., Ní Cheallaigh, C., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D.E. and Harris, J. (2013) Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cellular Microbiology* **15**: 1484-1495.
- Kim, H.M., Choo, H.-J., Jung, S.-Y., Ko, Y.-G., Park, W.-H., Jeon, S.-J. *et al.* (2007) A Two-Photon Fluorescent Probe for Lipid Raft Imaging: C-Laurdan. *ChemBioChem* **8**: 553-559.
- Koch, R. (1982) The Etiology of Tuberculosis. *Reviews of Infectious Diseases* **4**: 1270-1274.
- Kolloli, A. and Subbian, S. (2017) Host-Directed Therapeutic Strategies for Tuberculosis. *Frontiers in Medicine* **4**.
- Kuijl, C., Savage, N.D., Marsman, M., Tuin, A.W., Janssen, L., Egan, D.A. *et al.* (2007) Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1. *Nature* **450**: 725-730.
- Kursar, M., Koch, M., Mittrucker, H.W., Nouailles, G., Bonhagen, K., Kamradt, T. *et al.* (2007) Cutting Edge: Regulatory T Cells Prevent Efficient Clearance of Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology* **178**: 2661-2665.
- Lamkanfi, M., Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A.C., Amer, A.O., Wewers, M.D. *et al.* (2010) Inflammasome-Dependent Release of the Alarmin HMGB1 in Endotoxemia. *The Journal of Immunology* **185**: 4385-4392.

- Lastrucci, C., Bénard, A., Balboa, L., Pingris, K., Souriant, S., Poincloux, R. *et al.* (2015) Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16⁺ monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Res* **25**: 1333-1351.
- Ledeen, R.W. and Wu, G. (2015) The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. *Trends in Biochemical Sciences* **40**: 407-418.
- Lee, D.G. and Lee, J. (2015) Antimicrobial Peptides (AMPs) with Dual Mechanisms: Membrane Disruption and Apoptosis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**: 759-764.
- Lee, J., Repasy, T., Papavinasasundaram, K., Sasseti, C. and Kornfeld, H. (2011) Mycobacterium tuberculosis induces an atypical cell death mode to escape from infected macrophages. *PLoS One* **6**: e18367.
- Leitinger, B. and Hogg, N. (2002) The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J Cell Sci* **115**: 963-972.
- Lerner, T.R., Borel, S., Greenwood, D.J., Repnik, U., Russell, M.R.G., Herbst, S. *et al.* (2017) Mycobacterium tuberculosis replicates within necrotic human macrophages. *The Journal of Cell Biology* **216**: 583-594.
- Lerner, T.R., Borel, S. and Gutierrez, M.G. (2015) The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular Microbiology* **17**: 1277-1285.
- Lerner, T.R., Queval, C.J., Fearn, A., Repnik, U., Griffiths, G. and Gutierrez, M.G. (2018) Phthiocerol dimycocerosates promote access to the cytosol and intracellular burden of Mycobacterium tuberculosis in lymphatic endothelial cells. *BMC Biology* **16**.
- Levitte, S., Adams, Kristin N., Berg, Russell D., Cosma, Christine L., Urdahl, Kevin B. and Ramakrishnan, L. (2016) Mycobacterial Acid Tolerance Enables Phagolysosomal Survival and Establishment of Tuberculous Infection In Vivo. *Cell Host & Microbe* **20**: 250-258.
- Li, Y., Wang, Y. and Liu, X. (2012) The Role of Airway Epithelial Cells in Response to Mycobacteria Infection. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**: 1-11.
- Liang, M., Habib, Z., Sakamoto, K., Chen, X. and Cao, G. (2017) Mycobacteria and Autophagy: Many Questions and Few Answers. *Curr Issues Mol Biol* **21**: 63-72.
- Lim, Y.-J., Yi, M.-H., Choi, J.-A., Lee, J., Han, J.-Y., Jo, S.-H. *et al.* (2016) Roles of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in M1-polarized macrophages during mycobacterial infections. *Sci Rep* **6**.
- Liu, M., Li, W., Xiang, X. and Xie, J. (2015) Mycobacterium tuberculosis effectors interfering host apoptosis signaling. *Apoptosis* **20**: 883-891.
- Liu, S.-L., Sheng, R., Jung, J.H., Wang, L., Stec, E., O'Connor, M.J. *et al.* (2016) Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol. *Nature Chemical Biology* **13**: 268-274.
- Lladó, V., López, D.J., Ibarguren, M., Alonso, M., Soriano, J.B., Escribá, P.V. *et al.* (2014) Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by NaChOleate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1838**: 1619-1627.
- Loiseau, C., Augenstreich, J., Marchand, A., Harte, E., Garcia, M., Verdon, J. *et al.* (2016) Specific Anti-Leukemic Activity of the Peptide Warnericin RK and Analogues and Visualization of Their Effect on Cancer Cells by Chemical Raman Imaging. *PLoS One* **11**: e0162007.

- Lu, C.-C., Wu, T.-S., Hsu, Y.-J., Chang, C.-J., Lin, C.-S., Chia, J.-H. *et al.* (2014) NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin. *Journal of Leukocyte Biology* **96**: 1119-1129.
- Luo, B.H., Carman, C.V., Takagi, J. and Springer, T.A. (2005) Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 3679-3684.
- Lyadova, I.V. (2017) Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? *Mediators of Inflammation* **2017**: 1-11.
- Ma, Y., Keil, V. and Sun, J. (2015) Characterization of Mycobacterium tuberculosis EsxA membrane insertion: roles of N- and C-terminal flexible arms and central helix-turn-helix motif. *J Biol Chem* **290**: 7314-7322.
- Machelart, A., Song, O.-R., Hoffmann, E. and Brodin, P. (2017) Host-directed therapies offer novel opportunities for the fight against tuberculosis. *Drug Discovery Today* **22**: 1250-1257.
- Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J.-L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P.H. *et al.* (2003) The Cell Surface Receptor DC-SIGN Discriminates between Mycobacterium Species through Selective Recognition of the Mannose Caps on Lipoarabinomannan. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 5513-5516.
- Maglione, P.J., Xu, J., Casadevall, A. and Chan, J. (2008) Fc Receptors Regulate Immune Activation and Susceptibility during Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology* **180**: 3329-3338.
- Mahamed, D., Boule, M., Ganga, Y., Mc Arthur, C., Skroch, S., Oom, L. *et al.* (2017) Intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife* **6**.
- Malik, Z.A., Denning, G.M. and Kusner, D.J. (2000) Inhibition of Ca(2+) signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med* **191**: 287-302.
- Man, S.M. and Kanneganti, T.D. (2015) Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis. *Cell Res* **25**: 1183-1184.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* **25**: 677-686.
- Marinova, D., Gonzalo-Asensio, J., Aguilo, N. and Martin, C. (2014) Recent developments in tuberculosis vaccines. *Expert Review of Vaccines* **12**: 1431-1448.
- Martin, Constance J., Booty, Matthew G., Rosebrock, Tracy R., Nunes-Alves, C., Desjardins, Danielle M., Keren, I. *et al.* (2012) Efferocytosis Is an Innate Antibacterial Mechanism. *Cell Host & Microbe* **12**: 289-300.
- Mazeres, S., Fereidouni, F. and Joly, E. (2017) Using spectral decomposition of the signals from laurdan-derived probes to evaluate the physical state of membranes in live cells. *F1000Res* **6**: 763.
- Mazeres, S., Joly, E., Lopez, A. and Tardin, C. (2014) Characterization of M-laurdan, a versatile probe to explore order in lipid membranes. *F1000Res* **3**: 172.
- McDonough, K.A. and Kress, Y. (1995) Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **63**: 4802-4811.

- McDonough, K.A., Kress, Y. and Bloom, B.R. (1993) Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* **61**: 2763-2773.
- Miller, B.H., Fratti, R.A., Poschet, J.F., Timmins, G.S., Master, S.S., Burgos, M. *et al.* (2004) Mycobacteria Inhibit Nitric Oxide Synthase Recruitment to Phagosomes during Macrophage Infection. *Infection and Immunity* **72**: 2872-2878.
- Mishra, A., Akhtar, S., Jagannath, C. and Khan, A. (2017) Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. *Molecular Immunology* **87**: 240-248.
- Mishra, B.B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hacoen, N., Griffiths, G., Moita, L.F. *et al.* (2010) Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cellular Microbiology* **12**: 1046-1063.
- Mizushima, N. and Komatsu, M. (2011) Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* **147**: 728-741.
- Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L. and Kwaik, Y.A. (2004) Disruption of the Phagosomal Membrane and Egress of *Legionella pneumophila* into the Cytoplasm during the Last Stages of Intracellular Infection of Macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infection and Immunity* **72**: 4040-4051.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, Brenna L., Rajendiran, Thekkelnaycke M. and Núñez, G. (2013) K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**: 1142-1153.
- Murry, Jeffrey P., Pandey, Amit K., Sasseti, Christopher M. and Rubin, Eric J. (2009) Phthiocerol Dimycocerosate Transport Is Required for Resisting Interferon- γ -Independent Immunity. *J Infect Dis* **200**: 774-782.
- Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Wright, M.J. (1984) Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence. *Am Rev Respir Dis* **129**: 322-328.
- Naka, T., Maeda, S., Niki, M., Ohara, N., Yamamoto, S., Yano, I. *et al.* (2011) Lipid Phenotype of Two Distinct Subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 Substrain. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 44153-44161.
- Nakayama, H., Yoshizaki, F., Prinetti, A., Sonnino, S., Mauri, L., Takamori, K. *et al.* (2008) Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. *Journal of Leukocyte Biology* **83**: 728-741.
- Neyrolles, O. and Guilhot, C. (2011) Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* **91**: 187-195.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A. and Niederweis, M. (2015) Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol Rev* **264**: 249-263.
- Nicolson, G.L. (2014) The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1838**: 1451-1466.
- Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M. and Puzo, G. (2001) Mannosylated Lipoarabinomannans Inhibit IL-12 Production by Human Dendritic Cells: Evidence for a Negative Signal Delivered Through the Mannose Receptor. *The Journal of Immunology* **166**: 7477-7485.

- Niko, Y., Didier, P., Mely, Y., Konishi, G.-i. and Klymchenko, A.S. (2016) Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes. *Sci Rep* **6**.
- O'Leary, S., O'Sullivan, M.P. and Keane, J. (2011) IL-10 Blocks Phagosome Maturation in Mycobacterium tuberculosis–Infected Human Macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **45**: 172-180.
- Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H.R. and Meylan, P.R. (1998) Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology* **160**: 5448-5454.
- Oehlers, S.H., Cronan, M.R., Scott, N.R., Thomas, M.I., Okuda, K.S., Walton, E.M. *et al.* (2014) Interception of host angiogenic signalling limits mycobacterial growth. *Nature* **517**: 612-615.
- Okamoto Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K. *et al.* (2010) Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *The Journal of Immunology* **184**: 4414-4422.
- Ong, C.W., Elkington, P.T., Brilha, S., Ugarte-Gil, C., Tome-Esteban, M.T., Tezera, L.B. *et al.* (2015) Neutrophil-Derived MMP-8 Drives AMPK-Dependent Matrix Destruction in Human Pulmonary Tuberculosis. *PLoS Pathog* **11**: e1004917.
- Onwueme, K.C., Vos, C.J., Zurita, J., Ferreras, J.A. and Quadri, L.E.N. (2005) The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Progress in Lipid Research* **44**: 259-302.
- Ortalo-Magne, A., Lemassu, A., Laneelle, M.A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P. *et al.* (1996) Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacterial species. *Journal of Bacteriology* **178**: 456-461.
- Ostrop, J., Jozefowski, K., Zimmermann, S., Hofmann, K., Strasser, E., Lepenies, B. *et al.* (2015) Contribution of MINCLE–SYK Signaling to Activation of Primary Human APCs by Mycobacterial Cord Factor and the Novel Adjuvant TDB. *The Journal of Immunology* **195**: 2417-2428.
- Pabst, M.J., Gross, J.M., Brozna, J.P. and Goren, M.B. (1988) Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology* **140**: 634-640.
- Panday, A., Sahoo, M.K., Osorio, D. and Batra, S. (2014) NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology* **12**: 5-23.
- Parihar, S.P., Guler, R., Khutlang, R., Lang, D.M., Hurdal, R., Mhlanga, M.M. *et al.* (2014) Statin Therapy Reduces the Mycobacterium tuberculosis Burden in Human Macrophages and in Mice by Enhancing Autophagy and Phagosome Maturation. *J Infect Dis* **209**: 754-763.
- Park, J.S., Tamayo, M.H., Gonzalez-Juarrero, M., Orme, I.M. and Ordway, D.J. (2006) Virulent clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **79**: 80-86.
- Pasparakis, M. and Vandenabeele, P. (2015) Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**: 311-320.
- Passemar, C., Arbués, A., Malaga, W., Mercier, I., Moreau, F., Lepourry, L. *et al.* (2014) Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of Mycobacterium

- tuberculosis reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **16**: 195-213.
- Pathak, S.K., Basu, S., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Kundu, M. and Basu, J. (2005) Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan-mediated IRAK-M Induction Negatively Regulates Toll-like Receptor-dependent Interleukin-12 p40 Production in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 42794-42800.
- Payet, L.-A., Pineau, L., Snyder, E.C.R., Colas, J., Moussa, A., Vannier, B. *et al.* (2013) Saturated Fatty Acids Alter the Late Secretory Pathway by Modulating Membrane Properties. *Traffic* **14**: 1228-1241.
- Peng, X. and Sun, J. (2016) Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis. *Toxicon* **116**: 29-34.
- Perochon, E., Lopez, A. and Tocanne, J.F. (1992) Polarity of lipid bilayers. A fluorescence investigation. *Biochemistry* **31**: 7672-7682.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 13642-13647.
- Peyron, P., Bordier, C., N'Diaye, E.N. and Maridonneau-Parini, I. (2000) Nonopsonic Phagocytosis of Mycobacterium kansasii by Human Neutrophils Depends on Cholesterol and Is Mediated by CR3 Associated with Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins. *The Journal of Immunology* **165**: 5186-5191.
- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L.A., Ferreira, T. *et al.* (2014) Lipid cell biology. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* **345**: 693-697.
- Ponpuak, M., Davis, A.S., Roberts, E.A., Delgado, M.A., Dinkins, C., Zhao, Z. *et al.* (2010) Delivery of Cytosolic Components by Autophagic Adaptor Protein p62 Endows Autophagosomes with Unique Antimicrobial Properties. *Immunity* **32**: 329-341.
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martinez, L.R., Luque-Garcia, J., Kalscheuer, R., Veeraraghavan, U. *et al.* (2011) Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *Journal of Clinical Investigation* **121**: 1471-1483.
- Prados-Rosales, R., Weinrick, B.C., Pique, D.G., Jacobs, W.R., Casadevall, A. and Rodriguez, G.M. (2014) Role for Mycobacterium tuberculosis Membrane Vesicles in Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology* **196**: 1250-1256.
- Prevots, D.R. and Marras, T.K. (2015) Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med* **36**: 13-34.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D. *et al.* (2007) ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349.
- Queiroz, A. and Riley, L.W. (2017) Bacterial immunostat: Mycobacterium tuberculosis lipids and their role in the host immune response. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **50**: 9-18.
- Quesniaux, V.J., Nicolle, D.M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J. *et al.* (2004) Toll-Like Receptor 2 (TLR2)-Dependent-Positive and TLR2-Independent-Negative Regulation of Proinflammatory Cytokines by Mycobacterial Lipomannans. *The Journal of Immunology* **172**: 4425-4434.
- Queval, C.J., Song, O.-R., Carralot, J.-P., Saliou, J.-M., Bongiovanni, A., Deloison, G. *et al.* (2017) Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Reports* **20**: 3188-3198.

- Quigley, J., Hughitt, V.K., Velikovskiy, C.A., Mariuzza, R.A., El-Sayed, N.M., Briken, V. *et al.* (2017) The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **8**: e00148-00117.
- Rahman, A., Srivastava, S.S., Sneh, A., Ahmed, N. and Krishnasastry, M.V. (2010) Molecular characterization of tlyA gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: a non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase. *BMC Biochem* **11**: 35.
- Rajaram, M.V.S., Arnett, E., Azad, A.K., Guirado, E., Ni, B., Gerberick, A.D. *et al.* (2017) *M. tuberculosis* -Initiated Human Mannose Receptor Signaling Regulates Macrophage Recognition and Vesicle Trafficking by FcRγ-Chain, Grb2, and SHP-1. *Cell Reports* **21**: 126-140.
- Ramakrishnan, L. (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* **12**: 352-366.
- Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñoz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O. *et al.* (2009) Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **89**: 29-37.
- Ramstedt, B. and Slotte, J.P. (1999) Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length. *Biophys J* **76**: 908-915.
- Rao, M., Valentini, D., Poiret, T., Doodoo, E., Parida, S., Zumla, A. *et al.* (2015) B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* **61**: S225-S234.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N. and Forsthuber, T.G. (2015) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74**: 5-17.
- Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N. *et al.* (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* **431**: 84-87.
- Refai, A., Haoues, M., Othman, H., Barbouche, M.R., Moua, P., Bondon, A. *et al.* (2015) Two distinct conformational states of *Mycobacterium tuberculosis* virulent factor early secreted antigenic target 6 kDa are behind the discrepancy around its biological functions. *FEBS Journal* **282**: 4114-4129.
- Reid, D.M., Gow, N.A.R. and Brown, G.D. (2009) Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current Opinion in Immunology* **21**: 30-37.
- Renshaw, P.S., Lightbody, K.L., Veverka, V., Muskett, F.W., Kelly, G., Frenkiel, T.A. *et al.* (2005) Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *Embo Journal* **24**: 2491-2498.
- Rhoades, E., Hsu, F., Torrelles, J.B., Turk, J., Chatterjee, D. and Russell, D.G. (2003) Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Microbiol* **48**: 875-888.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A. *et al.* (2011) In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 2638-2645.
- Robinson, N., Kolter, T., Wolke, M., Rybniker, J., Hartmann, P. and Plum, G. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* Phenolic Glycolipid Inhibits Phagosome Maturation and Subverts the Pro-inflammatory Cytokine Response. *Traffic* **9**: 1936-1947.

- Roca, Francisco J. and Ramakrishnan, L. (2013) TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria via Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell* **153**: 521-534.
- Romagnoli, A., Etna, M.P., Giacomini, E., Pardini, M., Remoli, M.E., Corazzari, M. *et al.* (2014) ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *Autophagy* **8**: 1357-1370.
- Roos, W.P. and Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* **12**: 440-450.
- Rooyackers, A.W.J. and Stokes, R.W. (2005) Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of Mycobacterium tuberculosis but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microbial Pathogenesis* **39**: 57-67.
- Ros, U. and García-Sáez, A.J. (2015) More Than a Pore: The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *The Journal of Membrane Biology* **248**: 545-561.
- Rousseau, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.C. *et al.* (2003) Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of Mycobacterium tuberculosis with host cells. *Cell Microbiol* **5**: 405-415.
- Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Ave, P. *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.
- Russell, D.G. (2006) Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology* **5**: 39-47.
- Russell, D.G. (2011) Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. *Immunol Rev* **240**: 252-268.
- Russell, D.G., Mwandumba, H.C. and Rhoades, E.E. (2002) Mycobacterium and the coat of many lipids. *The Journal of Cell Biology* **158**: 421-426.
- Saiga, H., Kitada, S., Shimada, Y., Kamiyama, N., Okuyama, M., Makino, M. *et al.* (2012) Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. *International Immunology* **24**: 637-644.
- Saini, V., Farhana, A. and Steyn, A.J.C. (2012) Mycobacterium tuberculosis WhiB3: A Novel Iron-Sulfur Cluster Protein That Regulates Redox Homeostasis and Virulence. *Antioxidants & Redox Signaling* **16**: 687-697.
- 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.
- Sano, R. and Reed, J.C. (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**: 3460-3470.
- Schäfer, G., Jacobs, M., Wilkinson, R.J. and Brown, G.D. (2009) Non-Opsonic Recognition of Mycobacterium tuberculosis by Phagocytes. *J Innate Immun* **1**: 231-243.
- 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. *Journal of Immunology* **150**: 2920-2930.
- Schoenen, H., Bodendorfer, B., Hitchens, K., Manzanero, S., Werninghaus, K., Nimmerjahn, F. *et al.* (2010) Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of

- the Mycobacterial Cord Factor and its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate. *The Journal of Immunology* **184**: 2756-2760.
- Scordo, J.M., Knoell, D.L. and Torrelles, J.B. (2016) Alveolar Epithelial Cells in Mycobacterium tuberculosis Infection: Active Players or Innocent Bystanders? *J Innate Immun* **8**: 3-14.
- Sendide, K., Reiner, N.E., Lee, J.S.I., Bourgoin, S., Talal, A. and Hmama, Z. (2005) Cross-Talk between CD14 and Complement Receptor 3 Promotes Phagocytosis of Mycobacteria: Regulation by Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cytohesin-1. *The Journal of Immunology* **174**: 4210-4219.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. and Eggeling, C. (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**: 361-374.
- Shi, J., Gao, W. and Shao, F. (2017) Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences* **42**: 245-254.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H. *et al.* (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**: 660-665.
- Shui, W., Petzold, C.J., Redding, A., Liu, J., Pitcher, A., Sheu, L. *et al.* (2011) Organelle membrane proteomics reveals differential influence of mycobacterial lipoglycans on macrophage phagosome maturation and autophagosome accumulation. *J Proteome Res* **10**: 339-348.
- Silva, J.P., Appelberg, R. and Gama, F.M. (2016) Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. *Biotechnology Advances* **34**: 924-940.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R. *et al.* (2012) Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* **8**: e1002507.
- Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Groschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R. *et al.* (2015) Cytosolic access of Mycobacterium tuberculosis: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog* **11**: e1004650.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- Singh, A., Crossman, D.K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M.I., Renfrow, M.B. *et al.* (2009) Mycobacterium tuberculosis WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog* **5**: e1000545.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A. and Deretic, V. (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* **313**: 1438-1441.
- Smith, J., Manoranjan, J., Pan, M., Bohsali, A., Xu, J., Liu, J. *et al.* (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.
- Soetaert, K., Rens, C., Wang, X.-M., De Bruyn, J., Lanéelle, M.-A., Laval, F. *et al.* (2015) Increased Vancomycin Susceptibility in Mycobacteria: a New Approach To Identify Synergistic Activity against Multidrug-Resistant Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**: 5057-5060.

- Speer, A., Sun, J., Danilchanka, O., Meikle, V., Rowland, J.L., Walter, K. *et al.* (2015) Surface hydrolysis of sphingomyelin by the outer membrane protein Rv0888 supports replication of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Molecular Microbiology* **97**: 881-897.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-491.
- Stamm, L.M., Morisaki, J.H., Gao, L.-Y., Jeng, R.L., McDonald, K.L., Roth, R. *et al.* (2003) *Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. *J Exp Med* **198**: 1361-1368.
- Stanley, S.A. and Cox, J.S. (2013) Host-Pathogen Interactions During *Mycobacterium tuberculosis* infections. *374*: 211-241.
- Stone, M.B., Shelby, S.A., Nunez, M.F., Wisser, K. and Veatch, S.L. (2017) Protein sorting by lipid phase-like domains supports emergent signaling function in B lymphocyte plasma membranes. *Elife* **6**.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K. *et al.* (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**: 678-681.
- Sulzenbacher, G., Canaan, S., Bordat, Y., Neyrolles, O., Stadthagen, G., Roig-Zamboni, V. *et al.* (2006) LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *Embo Journal* **25**: 1436-1444.
- Sun, J., Wang, X., Lau, A., Liao, T.Y., Bucci, C. and Hmama, Z. (2010) Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine RAW 264.7 macrophages. *PLoS One* **5**: e8769.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D. *et al.* (2012) Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell* **148**: 213-227.
- Sutton, V.R. and Trapani, J.A. (2010) Proteases in lymphocyte killer function: redundancy, polymorphism and questions remaining. *Biological Chemistry* **391**.
- Suzuki, K.G.N. (2015) New Insights into the Organization of Plasma Membrane and Its Role in Signal Transduction. **317**: 67-96.
- Tailleux, L., Neyrolles, O., Honore-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.P. *et al.* (2003) Constrained Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **170**: 1939-1948.
- Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J.L., Charles, P., Schwartz, O. *et al.* (2005) DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med* **2**: e381.
- Teixeira, V., Feio, M.J. and Bastos, M. (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **51**: 149-177.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.
- Thornton, B.P., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R.C. and Ross, G.D. (1996) Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology* **156**: 1235-1246.
- 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. *The Journal of Immunology* **177**: 1805-1816.
- Touchette, M.H. and Seeliger, J.C. (2017) Transport of outer membrane lipids in mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**: 1340-1354.
- Trapani, J.A. and Sutton, V.R. (2003) Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Current Opinion in Immunology* **15**: 533-543.
- Troegeler, A., Mercier, I., Cougoule, C., Pietretti, D., Colom, A., Duval, C. *et al.* (2017) C-type lectin receptor DCIR modulates immunity to tuberculosis by sustaining type I interferon signaling in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E540-E549.
- Uribe-Querol, E. and Rosales, C. (2017) Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens. *Frontiers in Immunology* **8**.
- Vachon, E., Martin, R., Kwok, V., Cherepanov, V., Chow, C.W., Doerschuk, C.M. *et al.* (2007) CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages. *Blood* **110**: 4492-4502.
- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J. *et al.* (2007) M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* **129**: 1287-1298.
- van Meer, G. (2011) Dynamic Transbilayer Lipid Asymmetry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**: a004671-a004671.
- van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 112-124.
- van der Vaart, M., Korbee, Cornelis J., Lamers, Gerda E.M., Tengeler, Anouk C., Hosseini, R., Haks, Mariëlle C. *et al.* (2014) The DNA Damage-Regulated Autophagy Modulator DRAM1 Links Mycobacterial Recognition via TLR-MYD88 to Autophagic Defense. *Cell Host & Microbe* **15**: 753-767.
- Vartabedian, V.F., Savage, P.B. and Teyton, L. (2016) The processing and presentation of lipids and glycolipids to the immune system. *Immunol Rev* **272**: 109-119.
- Vazquez, C.L., Bianco, M.V., Blanco, F.C., Forrellad, M.A., Gutierrez, M.G. and Bigi, F. (2017) Mycobacterium bovis Requires P27 (LprG) To Arrest Phagosome Maturation and Replicate within Bovine Macrophages. *Infect Immun* **85**.
- Velasco-Velázquez, M.A., Barrera, D., González-Arenas, A., Rosales, C. and Agramonte-Hevia, J. (2003) Macrophage—Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3. *Microbial Pathogenesis* **35**: 125-131.
- Vergne, I., Chua, J., Singh, S.B. and Deretic, V. (2004) Cell Biology Of mycobacterium Tuberculosis phagosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**: 367-394.
- Vergne, I., Gilleron, M. and Nigou, J.r.m. (2015) Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**.
- Vermeer, L.S., de Groot, B.L., Réat, V., Milon, A. and Czaplicki, J. (2007) Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with 2H NMR experiments. *European Biophysics Journal* **36**: 919-931.
- Via, L.E., Lin, P.L., Ray, S.M., Carrillo, J., Allen, S.S., Eum, S.Y. *et al.* (2008) Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits, and Nonhuman Primates. *Infection and Immunity* **76**: 2333-2340.

- Vieira, O.V., Botelho, R.J. and Grinstein, S. (2002) Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* **366**: 689-704.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W. *et al.* (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *Journal of Cell Biology* **155**: 19-25.
- Vilchèze, C., Hartman, T., Weinrick, B. and Jacobs, W.R. (2013) Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. *Nat Commun* **4**.
- Vilchèze, C., Kim, J. and Jacobs, W.R. (2018) Vitamin C Potentiates the Killing of Mycobacterium tuberculosis by the First-Line Tuberculosis Drugs Isoniazid and Rifampin in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **62**: e02165-02117.
- Villeneuve, C., Gilleron, M., Maridonneau-Parini, I., Daffé, M., Astarie-Dequeker, C. and Etienne, G. (2005) Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *Journal of Lipid Research* **46**: 475-483.
- Vogel, H. and Jahnig, F. (1986) The structure of melittin in membranes. *Biophys J* **50**: 573-582.
- Wang, J., Yang, K., Zhou, L., Minhaowu, Wu, Y., Zhu, M. *et al.* (2013) MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. *PLoS Pathog* **9**: e1003697.
- Wassermann, R., Gulen, Muhammet F., Sala, C., Perin, Sonia G., Lou, Y., Rybniker, J. *et al.* (2015) Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. *Cell Host & Microbe* **17**: 799-810.
- Watson, Robert O., Bell, Samantha L., MacDuff, Donna A., Kimmey, Jacqueline M., Diner, Elie J., Olivas, J. *et al.* (2015) The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host & Microbe* **17**: 811-819.
- Watson, Robert O., Manzanillo, Paolo S. and Cox, Jeffery S. (2012) Extracellular M. tuberculosis DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell* **150**: 803-815.
- Welin, A., Eklund, D., Stendahl, O. and Lerm, M. (2011a) 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., Raffetseder, J., Eklund, D., Stendahl, O. and Lerm, M. (2011b) Importance of Phagosomal Functionality for Growth Restriction of Mycobacterium tuberculosis in Primary Human Macrophages. *J Innate Immun* **3**: 508-518.
- Welin, A., Winberg, M.E., Abdalla, H., Sarndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O. *et al.* (2008) Incorporation of Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan into Macrophage Membrane Rafts Is a Prerequisite for the Phagosomal Maturation Block. *Infection and Immunity* **76**: 2882-2887.
- Wolf, A.J., Linas, B., Trevejo-Nunez, G.J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K. *et al.* (2007) Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo. *The Journal of Immunology* **179**: 2509-2519.
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z. and Av-Gay, Y. (2011) Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 19371-19376.

- Wong, K.-W. and Jacobs Jr, W.R. (2011) Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology* **13**: 1371-1384.
- Xu, S., Cooper, A., Sturgill-Koszycki, S., van Heyningen, T., Chatterjee, D., Orme, I. *et al.* (1994) Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *Journal of Immunology* **153**: 2568-2578.
- 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.
- Yamashita, A., Hayashi, Y., Matsumoto, N., Nemoto-Sasaki, Y., Oka, S., Tanikawa, T. *et al.* (2014) Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases. *Biology* **3**: 801-830.
- Yang, X., Nesbitt, N.M., Dubnau, E., Smith, I. and Sampson, N.S. (2009) Cholesterol Metabolism Increases the Metabolic Pool of Propionate in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **48**: 3819-3821.
- Yates, R.M., Hermetter, A. and Russell, D.G. (2005) The Kinetics of Phagosome Maturation as a Function of Phagosome/Lysosome Fusion and Acquisition of Hydrolytic Activity. *Traffic* **6**: 413-420.
- Yu, R.K., Nakatani, Y. and Yanagisawa, M. (2009) The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *Journal of Lipid Research* **50**: S440-S445.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.
- 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.
- Zhang, Q., Wang, D., Jiang, G., Liu, W., Deng, Q., Li, X. *et al.* (2016) EsxA membrane-permeabilizing activity plays a key role in mycobacterial cytosolic translocation and virulence: effects of single-residue mutations at glutamine 5. *Sci Rep* **6**.
- Zheng, R.B., Jégouzo, S.A.F., Joe, M., Bai, Y., Tran, H.-A., Shen, K. *et al.* (2017) Insights into Interactions of *Mycobacteria* with the Host Innate Immune System from a Novel Array of Synthetic *Mycobacterial* Glycans. *ACS Chemical Biology* **12**: 2990-3002.

Résumé / summary

Mycobacterium tuberculosis est la bactérie responsable de la tuberculose (TB), une infection pulmonaire grave. La TB est un problème majeur de santé publique mondiale ; un tiers de la population mondiale est porteur de *M. tuberculosis* et l'émergence de formes de TB résistantes aux antibiotiques confirme la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Pour atteindre cet objectif, il est crucial de mieux comprendre les mécanismes infectieux de *M. tuberculosis*.

L'équipe de C. Guilhot s'intéresse aux lipides de l'enveloppe bactérienne impliqués dans la virulence de *M. tuberculosis*, en particulier lors de l'interaction du bacille avec les macrophages de l'hôte. Un type de lipide en particulier s'est démarqué pour son rôle crucial dans cette interaction : les Dimycocérosates de Phthiocérol (DIM). Malgré leur importance, le mécanisme d'action moléculaire des DIM n'est toujours pas connu. Les objectifs de ma thèse ont été 1) d'étudier le rôle des DIM dans le trafic intracellulaire de *M. tuberculosis* au sein du macrophage, et 2) de comprendre les mécanismes d'action des DIM dans la virulence.

Par une combinaison de méthodes biologiques et biophysiques, nous avons montré que les DIM contribuent à l'induction de la rupture du phagosome et de l'apoptose du macrophage infecté par *M. tuberculosis*, en collaboration avec un autre facteur majeur de virulence bactérien, ESAT-6. Au niveau moléculaire, nous avons confirmé que les DIM sont transférés dans la membrane du macrophage au contact avec la bactérie, et y induisent une rigidification membranaire locale. Nous avons aussi montré que les DIM dans une membrane sont capables de potentialiser l'activité membranolytique d'ESAT-6 et d'autre(s) facteur(s) encore non identifiés.

Les DIM ont un rôle pléiotropique dans l'interaction de *M. tuberculosis* avec le macrophage. Leur mécanisme d'action impliquerait des modifications des propriétés biophysiques membranaires, modifiant l'activité des effecteurs membranaires bactériens et potentiellement de l'hôte. Ces travaux ouvrent la voie à l'étude du mécanisme d'action d'autres lipides de virulence dont certains pourraient également s'insérer dans la membrane du macrophage.

Mycobacterium tuberculosis is the bacterium responsible for tuberculosis (TB), a severe respiratory disease. TB is a major public health threat; one third of the world's population is latently infected by M. tuberculosis, and the emergence of antibiotic-resistant forms of TB confirms that there is a need to develop new therapeutic approaches to control the spread of TB. However, in order to attain that goal, it is crucial to decipher the infectious mechanisms of M. tuberculosis.

Research in the team of C. Guilhot focuses on lipids from the envelope of M. tuberculosis which are involved in virulence, in particular those implicated in the interaction of the bacteria with host macrophages. One of these lipids stands out for its crucial role in this interaction: Phthiocerol Dimycocerosate (DIM). Despite its importance, the molecular mechanism of action of DIM is still unknown. The objectives of my PhD were 1) to study the role of DIM in the intracellular trafficking of M. tuberculosis in macrophages, and 2) to decipher the molecular mechanism of action of DIM.

By a combination of biological and biophysical techniques, we showed that DIM contributes to phagosomal rupture and induction of apoptosis in macrophages infected with M. tuberculosis, in collaboration with another major virulence factor: ESAT-6. At the molecular level, we confirmed that DIM is transferred to the membrane of the macrophage on contact with M. tuberculosis and induces a local membrane rigidification around the point of contact with the bacterium. We observed that DIM incorporated in membranes is able to promote the membranolytic activity of ESAT-6, and other yet unidentified bacterial factor(s).

DIM has a pleiotropic role in the interaction between M. tuberculosis and macrophages, presumably through alterations of the membrane's biophysical properties that influence the activity of membrane effectors from both the bacteria and the host. Thus, this work paves the way for the study of the mechanisms of action of other virulence lipids, some of which could also be inserted in the macrophage membrane.