### UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE

### THESE

présentée par

### YOANN ROMBOUTS

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Sciences de la vie et de la santé Spécialité : Biochimie

### Analyse structurale et fonctionnelle des glycolipides pariétaux de *Mycobacterium marinum* : une mycobactérie modèle dans l'étude de la tuberculose

Soutenue le 7 Décembre 2010 devant la commission d'examen :

Président :	Docteur Jean-Claude Michalski				
Rapporteurs :	Docteur Muriel Delepierre Docteur Mamadou Daffé				
Examinateurs :	Professeur Anne Dell Professeur Elisabeth Elass-Rochard Docteur Laurent Kremer Docteur Yann Guérardel				

Ces travaux ont été réalisés sous la direction du Dr Yann Guérardel et du Pr Elisabeth Elass-Rochard au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS (Directeur : Dr Jean-Claude Michalski), Université Lille1 Sciences et Technologies.

Nous avons bénéficié d'une allocation de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

# À ma famille, À ma fille.

### Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie plus particulièrement Madame le Docteur Muriel Delepierre et Monsieur le Docteur Mamadou Daffé d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je remercie également Madame le Professeur Anne Dell et Monsieur le Docteur Laurent Kremer qui ont bien voulu examiner ce travail. Merci à Monsieur le Dr Jean-Claude Michalski qui me fait le plaisir de présider le jury de cette thèse. Merci aussi pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR 8576 CNRS).

Je remercie sincèrement mes encadrants le Docteur Yann Guérardel et le Professeur Elisabeth Elass-Rochard pour la confiance qu'ils m'ont accordé. Yann, merci de m'avoir accueilli dans ton groupe, dirigé et fais part de tes connaissances. Elisabeth, merci pour nos discussions très enrichissantes et merci d'avoir su me recadrer sur mes intérêts premiers quand il le fallait.

Un grand merci aux Docteurs Bernadette Coddeville et Emmanuel Maes de m'avoir fait partager leur savoir-faire et de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. Je vous remercie également pour votre patience.

Encore merci au Dr Laurent Kremer ainsi qu'à toute son équipe pour cette collaboration fructueuse. Merci Laurent pour tes conseils précieux. Merci à Adeline Burguière, Laetitia Alibaud et Belinda Brust. Je remercie également le Dr Emma Colucci-Guyon pour son travail sur le poisson zèbre.

Bien sûr un grand merci à toute l'équipe de « Biodiversité structurale associée aux glycoconjugués » et à mes camarades de bureau pour leur aide et leur soutien. Merci à Eliane Aïssi, Christophe Biot, Colette Brassart, Florence Delplace, Faustine Dubar, Emeline Fabre, Estelle Garenaux, Ossarath Kol, Frédéric Krzewinski, Gérard Strecker, Xavier Trivelli et Jorick Vanbeselaere.

Merci à toute ma famille et à mes amis pour leur soutien. Un grand merci à Emeline pour tout son amour. Enfin, merci Louise pour tes sourires qui font tellement de bien.

### **Abréviations :**

Ac: Acétyle ACP: Acyl Carrier Protein. ADN: Acide DésoxyriboNucléique Aft: Arabinofuranosyltransférase Ag: Antigène **aGPL:** apolar GlycoPeptidoLipid Araf: Arabinofuranose **ARN:** Acide RiboNucléique **ARNr:** ARN ribosomique AT: AcylTransferase **ATP:** Adénosine TriPhosphates BCG: Bacille de Calmette et Guérin Car: Caryophyllose **CCM** : Chromatographie Couche Mince CFP-10: 10 kDa Culture Filtrate Protein CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité **CPA:** Cellules Présentatrices d'Antigènes CO: Carbon monOxide ou monoxyde de carbone **COSY:** COrrelation SpectroscopY **CR:** Complement Receptor **CRD:** Carbohydrate Recognition Domain CTLA-4: T-Lymphocyte Antigen 4 CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand **DAT(s):** Di-*O*-acyltrehalose(s) DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin **DH:** DeHydratase **DIMs:** Phthiocerol DImycocerosates DMDA: Di-Mycolyl-Di-Arabinoglycerol Dos: Dormancy survival **DPA:** Decaprenyl PhosphoArabinose **DPM:** Decaprenyl PhosphoMannose dTDP: deoxyThymidyl DiPhosphate **EEA1**: Early Endosomal Antigen 1 EI-MS: Electron Ionization-Mass Spectrometry **ER**: EnovlReductase ESAT-6: 6kDa Early Secreted Antigenic Target Galf: Galactofuranose Galp: Galactopyranose GC: Gas Chromatography GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry **GDP:** Guanosine DiPhosphate Glcp: Glucopyranose GlcA: Glucuronic Acid GlcNAc: *N*-acetylglucosamine GlfT: GalactofuranosylTransférase GMM: Glucose MonoMycolate GM-CSF: Granulocyte macrophage-**Colony Stimulating Factor GPL(s):** GlycoPeptidoLipid(s) HLA: Human Leukocyte Antigen HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence hVPS34: human Vacuolar Protein Sorting 34 ICAM: Inter-Cellular Adhesion Molecule **IFN:** InterFeroN **Ig:** Immunoglobulines **IL:** InterLeukin

iNK: invariant Natural Killer Ins: Inositol **IRAK-M:** Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase-M **KR:** KetoReductase **KS:** KetoacylSynthase LAM: LipoArabinoMannane LAMP1: Lysosome-Associated Membrane Protein LB: Lymphocytes B LBP: LPS-Binding Protein LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen LM: LipoMannane **LOS(s)**: LipoOligoSaccharide(s) LPS: LipoPolySaccharide LTreg: Lymphocyte T régulateur **LT**: Lymphocytes Thymiques LXA<sub>4</sub>: LipoXine A4 MAC: *Mycobacterium* avium-intracellulare Complex mAGP: mycolyl-ArabinoGalactane Peptidoglycanne MALDI-TOF-MS : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight -Mass Spectrometry Manp: Mannopyranose MARCO: Macrophage Receptor with **COllagenous Structure MBL:** Mannose Binding Lectin MDR: Multi-Drug Resistant Me: Méthyle MMDA: Mono-Mycolyl-Di-Arabinoglycerol MMG: Mono-Mycolyl-Glycerol **MMMA:** Mono-Mycolyl-Mono-Arabinoglycerol **MMP:** Matrix MetalloPeptidase **MmpL:** Mycobacterial membrane protein Large MNT: Mycobactéries non tuberculeuses MR: Mannose Receptor MS: Mass Spectrometry NADH: Nicotinamide Adénine Dinucleotide NDH: Nicotinamide adénine dinucleotide DesHydrogenase NK: Natural Killer NKT : Natural Killer T cell NLR: Nod-Like Receptor NMR: Nuclear Magnetic Resonance **NO:** Nitrogen Oxide ou monoxyde d'azote **NOD:** Nucleotide Oligomerization Domain NRAMP: Natural Resistance-Associated Macrophage Protein OMS: Organisation Mondiale de la Santé Pap: Polyketide-associated Protein **PAT(s):** Poly-*O*-acyltrehalose(s) **PE<sub>2</sub>**: Prostaglandine E2 PD-1: Programme Death (receptor) 1 PDL: Programme Death Ligand **PGL(s)**: Phenolic Glycolipid(s)

### **Abréviations :**

PGL-tb : Phenolic Glycolipid-tuberculosis pGPL : polar GlycoPeptidoLipid **PI:** PhosphatidylInositol PIM(s): Phosphatidyl-myo-Inositol Mannoside(s) PI3P: PhosphatidylInositol-3-Phosphate **PKS:** PolyKetide Synthase **Pol-P:** Polyprenol Phosphate PRR: Pathogen Recognition Receptor Rhap: Rhamnopyranose RMN: Résonance Magnétique Nucléaire **RNI:** Reactive Nitrogen Intermediate **ROESY:** Rotating Overhauser Effect SpectroscopY ROI: Reactive Oxygen Intermediate SIDA: Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise SL: SuLfatide ou SuLfolipide SP-A/D: Surfactant Protein A/D SR: Scavenger Receptor TACO: Triptophan-Aspartate-Containing cOat TCR: T-Cell Receptor TDM: Tréhalose-6,6'-Di-Mycolates TGF: Transforming Growth Factor Th1/Th2 /Th17: T helper 1/2/17 TLR: Toll-Like Receptor TMM: Tréhalose-6-Mono-Mycolate **TNF:** Tumor Necrosis Factor **TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor TOCSY:TOtal Correlation SpectroscopY **UDP:** Uridyl DiPhosphate **VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine VPS33B: Vacuolar Protein Sorting 33B WHO: World Health Organization **XDR:** eXtremely Drug Resistant ZMP1: Zinc Metallo Protein 1

### Table des matières

### Table des matières

AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	
Generalites	
CHAPITRE I - LA TUBERCULOSE, LE GRANULOME ET LE MODELE HOTE/PATHOGENE DE <i>Danio rerio/Mycobacterium marinum</i>	17
A. La tuberculose	
1. Etiologie de la tuberculose et cycle de vie du pathogène	
a. Les mycobactéries	19
i. Le complexe de Mycobacterium tuberculosis	
ii. Les mycobactéries non tuberculeuses	21
b. Cycle infectieux de la tuberculose	
B. Le granulome	
1. Entrée des mycobactéries dans les cellules pulmonaires	
a. La phagocytose	28
b. Autre voie d'endocytose	30
2. Survie, multiplication et localisation intracellulaire	
a. Mécanismes de survie des mycobactéries dans les cellules	30
i. Inhibition de la maturation du phagosome	30
ii. Inhibition des mécanismes de défense des cellules phagocytaires	34
b. Multiplication des mycobactéries : accès aux nutriments	37
c. Localisation intracellulaire	
3. Réponse immunitaire de l'hôte et formation du granulome	39
a. Introduction	39
b. La réponse immunitaire innée : première barrière contre l'infection	
c. Recrutement et activation de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulair	re 43
d. Rôle des lymphocytes T dans la formation du granulome	
4. Maintien du granulome et réactivation	50
a. Phase latente de l'infection : maintien du granulome ou réactivation dynamique	50
i. Maintien du granulome	50
ii. Réactivation dynamique	53
b. Réactivation finale	55
5. Conclusion	56

C. <i>Mycobacterium marinum et Danio rerio :</i> modèle pathogène/ hôte dans l'étude du granulome	58
1. Mycobacterium marinum	58
a. Les mycobactéries modèles dans l'étude de la tuberculose	58
b. Découverte de <i>M. marinum</i>	59
c. Comparaison des granulomes induits par M. marinum et M. tuberculosis	60
d. Comparaison de la vie intracellulaire de M. marinum et de M. tuberculosis	62
e. Comparaison des génomes de M. marinum et M. tuberculosis	63
f. Conclusion	64
2. Le poisson zèbre (Danio rerio)	65
a. Les hôtes expérimentaux de <i>M. marinum</i>	65
b. Présentation du poisson zébré	66
c. Génétique et génomique	66
d. Système immunitaire	67
3. Le modèle du poisson zèbre dans la pathogénèse mycobactérienne	68
HAPITRE II - STRUCTURE, BIOSYNTHESE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES	
LYCOCONJUGUES DE L'ENVELOPPE MYCOBACTERIENNE	71
A. Structure et biosynthèse des glycoconjugués	73
1. Ultrastructure de l'enveloppe	73
2. Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne	77
a. Le peptidoglycanne	77
b. L'arabinogalactane	79
c. Les acides mycoliques	83
3. Les glycolipides et les lipoglycannes de la paroi	87
a. Structure et biosynthèse des glycolipides et les lipoglycannes à ancre phosphatidyl-myo- inositol	87
i. Structure des phosphatidyl-myo-inositol mannosides	88
ii. Structure du lipomannane et du lipoarabinomannane	89
iii. Biosynthèse des phosphatidyl-myo-inositol mannosides	92
iv. Biosynthèse du lipomannane et du lipoarabinomannane	95
b. Structure des glycolipides à noyau phénolique	96
i. Structure	96
ii. Biosynthèse	100
c. Les glycolipides composés de tréhalose	102
i. Les tréhaloses mono- et di-mycolates	104
ii. Les sulfatides	105
iii. Les tréhaloses polvacylés	107

d. Les glycopeptidolipides	116
e. Les autres glycolipides	121
4. Les polysaccharides capsulaires	122
5. Les glycoprotéines	
B. Activités biologiques des glycoconjugués lors de l'infection mycobactérienne.	125
1. Les récepteurs	125
2. Les glycoconjugués modulent la réponse immunitaire innée	128
a. Internalisation des mycobactéries	128
b. Inhibition de la fusion phagolysosomale	129
c. Régulation des fonctions microbicides de la cellule hôte	130
d. Modulation de la sécrétion de cytokines	131
e. Les glycoconjugués et les autres cellules de l'immunité innée	132
3. Les glycoconjugués modulent la réponse immunitaire adaptative	
a. Modulation de la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et de la présen antigènes aux lymphocytes	ntation des 133
b. Interactions directes avec les lymphocytes	134
4. Les glycoconjugués et la maturation du granulome	
5. Conclusion	
<b>DESULTATS</b>	145
RESULTATS Chapitre III - Extraction et purification des glycolipides et	
RESULTATS Chapitre III - Extraction et purification des glycolipides e' lipoglycannes	145 т 147
RESULTATS CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES E' LIPOGLYCANNES A. Extraction	T T 147 
RESULTATS CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES E LIPOGLYCANNES	T T 147 
RESULTATS CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES E' LIPOGLYCANNES	<b>T 145 T 147</b> 150 150 151 -
RESULTATS CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET LIPOGLYCANNES	T 145 T 147 150 - 150 - 151 - 151 -
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES E'   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes	T
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires	T
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires   3. Purification des lipoglycannes	<b>T 145 T 147 </b>
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES E'   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires   3. Purification des glycolipides apolaires   4. Purification des glycolipides apolaires	T T 145 T 147 150 - 150 - 151 - 151 - 151 - 152 - 155 - 155 - 156 -
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires   3. Purification des glycolipides polaires   4. Purification des glycolipides apolaires   5. Conclusion	T T 145 T 147 150 - 150 - 151 - 151 - 151 - 152 - 155 - 155 - 156 -
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires   3. Purification des glycolipides apolaires   4. Purification des glycolipides apolaires   5. Conclusion	T 
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires   3. Purification des lipoglycannes   4. Purification des glycolipides apolaires   5. Conclusion   Chapitre IV - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES POLAIRES	T T 145 T 147 150 - 150 - 151 - 151 - 151 - 152 - 155 - 155 - 155 - 156 - 159
RESULTATS	<b>T 145 T 147 </b>
RESULTATS   CHAPITRE III - EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES   A. Extraction   1. Extraction des glycolipides   2. Extraction des lipoglycannes   B. Purification   1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes   2. Purification des glycolipides polaires   3. Purification des glycolipides apolaires   4. Purification des glycolipides apolaires   5. Conclusion   Chapitre IV - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOLIPIDES ET   LIPOGLYCANNES POLAIRES   A. Les lipooligosaccharides (LOSs)   1. Introduction	<b>T 145 T 147 </b>

a. Analyse structurale et fonctionnelle	162
i. Résumé du premier article	163
ii. Résumé du second article	185
b. Etude de l'acylation des lipooligosaccharides	219
i. Analyse des acides gras et des positions d'acylation	219
ii. Analyse bioinformatique de la région génétique intervenant dans la synthèse d dans l'acylation des LOSs	les acides gras et 225
3. Conclusion	
B. Les glycolipides et lipoglycannes à ancre phosphatidyl- <i>myo</i> -inositol	
1. Introduction	
2. Résultats	
a. Les phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIMs)	233
b. Le lipommannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM)	236
i. Analyse de l'ancre phosphatidyl-myo-inositol	236
ii. Analyse du domaine mannane et arabinomannane	237
iii. Analyse de la coiffe et des substitutions	238
3. Conclusion	
CHAPITRE V - ANALYSE STRUCTURALE DES GLYCOLIPIDES APOLAI	IRES 241
A. Les glycolipides phénoliques et les tréhaloses di-mycolates	
1. Les glycolipides phénoliques (PGLs)	
a. Spectrométrie de masse	243
b. Chromatographie en phase gazeuse	245
c. Résonance magnétique nucléaire	246
d. Conclusion	251
2. Le tréhalose di-mycolates (TDM)	
a. Résonance magnétique nucléaire	252
b. Spectrométrie de masse	255
c. Conclusion	257
<b>B.</b> Etude du glycolipide X1 : description d'une nouvelle famille de glycolipide <i>Mycobacterium marinum</i>	<b>s chez</b> 260
1. Analyse structurale du glycolipide X1	
a. Spectrométrie de masse	
b. Chromatographie en phase gazeuse	
c. Résonance magnétique nucléaire	
2. Etude structurale des glycolipides X2 et X3	
a. Le glycolipide X2	
b. Le glycolipide X3	272
3. Conclusion	

C. Etude du glycolipide X1 chez <i>M. bovis</i> BCG	
1. Identification du glycolipide X1 chez Mycobacterium bovis BCG	
2. Inhibition de la synthèse du DMDA par la thiacétazone	
3. Le DMDA : produit du métabolisme de l'arabinogalactane	
D. Conclusion	
DISCUSSION	
ANNEXE	
MATERIEL ET METHODES	
A. Extraction et purification des glycolipides et lipoglycannes	
1. Souches de mycobactéries et conditions de cultures	
2. Extraction et purification des glycolipides	
a. Extraction des glycolipides	
b. Purification des glycolipides apolaires	
c. Purification des glycolipides polaires	
3. Extraction et purification des lipoglycannes	
a. Extraction des lipoglycannes	
b. Purification des lipoglycannes	
B. Dérivation des glycolipides	
1. Déacylation des glycolipides	
2. Perméthylation	
3. Peracétylation	
4. Analyse de la composition molaire en monosaccharides des glycolipides	
C. Méthodes analytiques	
1. Chromatographie sur couche mince	
2. Chromatographie en phase gazeuse (GC)	
3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	
4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF MS	
5. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	
BIBLIOGRAPHIE	

## **Avant-propos**

Les premières traces caractéristiques de la tuberculose ont été mises en évidence sur un fossile d'*Homo erectus,* datant du Pléistocène moyen (-510 000 à -490 000 ans) (Kappelman *et al.*, 2008). Au cours des siècles, cette maladie a été désignée sous diverses appellations telles que phtisis, du grec « phthio » signifiant dépérissement, ou peste blanche (Figure 1).

Aujourd'hui, la tuberculose est encore un problème mondial de santé publique. En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recensait 9.4 millions de nouvelles infections et 1,7 million de décès par la tuberculose (WHO., 2009b)<sup>1</sup>. 85% des cas de tuberculose recensés par l'OMS sont répartis entre l'Afrique (55%) et l'Asie (30%) (WHO., 2009a). La tuberculose serait actuellement responsable d'environ 2,5% de la mortalité humaine globale, se plaçant ainsi au 8 ème rang des causes de mortalité à travers le monde.

Depuis une vingtaine d'années, un programme de soin international a été lancé afin d'enrailler une recrudescence de la tuberculose dans le monde. Cependant, les traitements se sont révélés relativement inefficaces pour 3 raisons majeures.

En premier lieu, la tuberculose est la maladie infectieuse la plus meurtrière pour les personnes atteintes du VIH. En effet, environ 10% des individus co-infectés par le VIH et la tuberculose développent la maladie au bout d'une année de co-infection. En 2008, l'OMS estime qu'environ 23% des personnes infectées par le VIH sont décédées de la tuberculose. Inversement, sur les 9.4 millions de nouveaux cas de tuberculose déclarés en 2008, 15% des malades étaient infectés par le VIH.

De plus, depuis 1995, des cas de tuberculose multi-résistante (MDR), ultra-résistante (XDR) et récemment totalement résistante aux antibiotiques, ont émergé dans les pays industrialisés (Figure 1) (Dorman et Chaisson, 2007; Gandhi *et al.*, 2010). Les tuberculoses MDR et XDR représentent environ 5% des cas de tuberculose recensés dans le monde en 2008. Ce chiffre est supérieur à 20% dans certains pays d'Europe de l'Est tels que la Russie (21%) ou encore la Moldavie (29%) (WHO., 2009b). Les estimations les plus optimistes prévoient un maximum de 83% et 60% de rémission, pour les tuberculoses MDR et XDR respectivement, chez des patients séronégatifs pour le VIH. Le taux de mortalité d'une co-infection HIV/tuberculose est encore augmenté dans les cas de XDR et MDR car les effets secondaires des traitements sont trop lourds pour les patients aux systèmes immunitaires affaiblis (Gandhi *et al.*, 2010).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> WHO : World Health Organization

Enfin, à ce jour il n'existe aucun vaccin capable de protéger efficacement l'adulte contre la forme pulmonaire contagieuse de la tuberculose. En effet, le Bacille de Calmette et Guérin protège les jeunes enfants contre les formes graves de la tuberculose (Figure 1). Cependant, la protection des adultes contre la tuberculose pulmonaire, forme la plus fréquente de la maladie, varie entre 0 et 80% selon les pays (Fine, 1995; Andersen et Doherty, 2005).



**Figure 1 : Découvertes et événements marquants concernant la tuberculose.** MDR : Multi-Drug Resistant ; XDR : eXtremely-Drug Resistant; VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine.

## Introduction

Bien que de nouveaux traitements et vaccins antituberculeux sont en cours de développement, on estime qu'un tiers de la population mondiale est infecté par la tuberculose sous une forme latente et asymptomatique à l'intérieur des granulomes. Cette infection chronique est très difficile à éradiquer et constitue un réservoir constant pour de nouvelles réactivations. Ainsi, une meilleure compréhension de la physiopathologie tuberculeuse, et plus particulièrement des granulomes, est nécessaire pour lutter efficacement contre la maladie.

*Mycobacterium marinum* et son hôte naturel le poisson zèbre (*Danio rerio*) ont récemment émergé comme un modèle pathogène/hôte alternatif pour l'étude des granulomes (Pozos et Ramakrishnan, 2004; Stamm et Brown, 2004). De façon novatrice, il permet d'analyser *in vivo* et en temps réel l'implication des facteurs de l'hôte et/ou des mycobactéries dans la phase précoce de l'infection et dans la formation des granulomes.

L'enveloppe des mycobactéries joue un rôle essentiel dans leur virulence. Les glycoconjugués, en particulier les glycolipides et lipoglycannes, comptent parmi les constituants majoritaires de l'enveloppe. Certains d'entre-deux sont ubiquitaires chez les mycobactéries, mais possèdent des variations subtiles dans leur structure, qui influencent la pathogénicité du micro-organisme. D'autres sont spécifiques d'espèces ou de souches, et nécessitent des études plus approfondies pour comprendre leurs rôles dans la virulence des mycobactéries pathogènes.

Aujourd'hui, *Mycobacterium marinum* est une des mycobactéries modèles les plus utilisées pour étudier la tuberculose. Néanmoins, peu d'informations sont disponibles quant à la nature des constituants de son enveloppe qui influence probablement sa pathogénicité (Tobin et Ramakrishnan, 2008).

Dans ce contexte, le travail de cette thèse porte sur l'identification et la caractérisation structurale des glycolipides et lipoglycannes d'une souche témoin de *Mycobacterium marinum* (souche ATCC BAA-535 / M), couramment utilisée en laboratoire.

Après une présentation de l'état des connaissances actuelles concernant la tuberculose, les granulomes et le modèle *Mycobacterium marinum/Danio rerio* (Chapitre I), une description détaillée des glycoconjugués mycobactériens incluant leurs structures, leurs voies de biosynthèses et leurs activités biologiques, sera exposée dans le chapitre II. Les résultats des travaux de thèse seront ensuite présentés en trois parties. La première partie (chapitre III) décrira l'optimisation de l'extraction et de la purification des glycolipides de *M. marinum* en fonction de leurs polarités. La seconde partie des résultats (Chapitre IV) sera consacrée à l'analyse structurale des glycolipides et lipoglycannes polaires, par l'utilisation de plusieurs techniques physicochimiques incluant la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse. Ces études ont essentiellement porté sur une famille de glycolipides spécifiques à certaines espèces de mycobactéries : les lipooligosaccharides. La suite de ce chapitre concernera l'analyse d'autres composés polaires et ubiquitaires chez les mycobactéries : les glycolipides et les lipoglycannes à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol. Dans la dernière partie de nos travaux (Chapitre V), nous présenterons l'analyse structurale des glycolipides apolaires de la souche témoin *M. marinum*. Ainsi, en plus de l'étude détaillée des deux familles de glycolipides apolaires connues dans cette espèce (les tréhaloses mono- et di-mycolates, et les glycolipides à noyau phénolique), ce chapitre présentera l'identification d'une nouvelle famille de glycolipides apolaires, également présente dans d'autres espèces incluant *M. bovis* BCG.

## Généralités

### Chapitre I – La tuberculose, le granulome et le modèle hôte/pathogène de *Danio rerio/Mycobacterium marinum*

### Chapitre I- La tuberculose, le granulome et le modèle hôte/pathogène de *Danio rerio/Mycobacterium marinum*

### A. La tuberculose

### 1. Etiologie de la tuberculose et cycle de vie du pathogène

#### a. Les mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*, à l'ordre des Actinomycétales et à la classe des Actinomycètes. Le genre *Mycobacterium* a été introduit par Lehman et Neumann en 1896 pour désigner les agents bactériens responsables de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et de la lèpre (*Mycobacterium leprae*); deux des plus grands fléaux qui ravagent l'humanité depuis des millénaires. Aujourd'hui, le genre compte plus de 120 espèces dont la plupart, présentes dans l'environnement, sont dites atypiques ou non tuberculeuses (Falkinham, 1996; Tortoli, 2003; Tortoli, 2006). Les mycobactéries sont des bactéries à Gram-positif qui ont la particularité de posséder une membrane externe, normalement caractéristique des bactéries à Gram-négatif. Cette membrane est majoritairement constituée d'acides gras à longues chaines (les acides mycoliques), de glycolipides et de porines. Elle procure aux mycobactéries une résistance aux traitements par des acides forts et par de l'éthanol concentré, permettant leur caractérisation par microscopie suite à la coloration de Ziehl-Neelsen. Ce principe est à la base d'un test de diagnostic couramment utilisé pour mettre en évidence une infection mycobactérienne. Les mycobactéries sont aussi remarquables du fait de leurs génomes riches en G/C.

#### i. Le complexe de Mycobacterium tuberculosis

Les mycobactéries ont été classées par Runyon sur la base de leurs vitesses de croissance et de leurs caractéristiques pigmentaires (Tableau I-1) (Runyon, 1981; Tortoli, 2003). Les mycobactéries responsables de la tuberculose, à croissance lente et non-chromogène, forment un groupe (ou complexe) à part entière. Le complexe de *Mycobacterium tuberculosis* comprend 8 espèces (et de nombreuses souches) de mycobactéries incluant *M. tuberculosis*, *M. bovis* (et *M. bovis* BCG : souches vaccinales), *M. africanum* et *M. canettii* (appartenant au groupe ancestral *M. prototuberculosis*) (Figure I-1).

Ces mycobactéries pathogènes pour l'Homme et/ou pour les animaux présentent entre elles des homologies de séquence nucléotidique supérieures à 99,95 % (Brosch *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2009). Les espèces du complexe de *M. tuberculosis* ont évolué à partir d'un ancêtre commun aux mycobactéries pathogènes pour l'homme (Gutierrez *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2009). L'acquisition de matériel génétique exogène (transposon bactérien, prophage..) suite aux transferts de gènes horizontaux et la perte de régions génétiques non essentielles ont permis aux espèces de conquérir des niches écologiques spécifiques (Figure I-1) (Tsolaki *et al.*, 2004; Rosas-Magallanes *et al.*, 2006; Becq *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009).



#### Figure I-1 : Le complexe de *M. tuberculosis*.

Schéma proposé de l'évolution des bacilles tuberculeux, illustrant les pertes successives d'ADN (cases grises) dans les différentes lignées. Le raisonnement est fondé sur la présence ou l'absence de régions génétiques (Tbd1 et RD), ainsi que sur des polymorphismes de séquence dans cinq gènes sélectionnés (cases blanches). La perte d'ADN mais aussi l'acquisition d'ADN exogène par transferts horizontaux (non représenté) ont permis aux lignées de conquérir des niches écologiques spécifiques. Notez que les distances entre certaines branches ne correspondent pas à de véritables différences phylogénétiques (Falkinham, 1996; Brosch *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2005).

M. tuberculosis est l'espèce la plus étudiée du complexe en conséquence de sa spécificité de pathogénicité pour l'Homme. Il existe de nombreuses souches de M. tuberculosis qui se différencient essentiellement par des mutations ponctuelles ou des délétions de fragments génomiques (Tsolaki et al., 2004; Dos Vultos et al., 2008). Ces petites modifications génétiques entrainent parfois l'apparition de souches aux phénotypes importants pour la pathologie, puisque certaines d'entre-elles sont hyper-virulentes, plus résistantes aux antibiotiques, spécifiques d'un type d'infection ou encore adaptées à des populations humaines particulières (Kong et al., 2005; Gagneux et al., 2006; Gagneux et Small, 2007; Nicol et Wilkinson, 2008; ten Bokum et al., 2008). A titre d'exemple, les souches Beijing de M. tuberculosis (groupe 1 « moderne »), principalement retrouvées en Asie et ex-Union Soviétique, présentent une virulence plus importante chez l'Homme et dans un modèle murin, inhibent la réponse immunitaire pro-inflammatoire dans des modèles cellulaires, et deviennent plus facilement résistantes aux drogues (Manca et al., 2004; Manca et al., 2005; Ordway et al., 2007; Wong et al., 2007; Li et al., 2010). Ces avantages sont en partie conférés par la présence d'un gène codant pour une polycétide synthase Pks 15/1 intervenant dans la synthèse d'un glycolipide pariétal à noyau phénolique (PGL). Ce dernier est un important inhibiteur de la réponse inflammatoire (Constant et al., 2002; Reed et al., 2004; Sinsimer et al., 2008).

#### ii. Les mycobactéries non tuberculeuses

En plus des mycobactéries responsables de la tuberculose et de la lèpre, certaines mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont de formidables pathogènes opportunistes responsables d'infections sévères (mycobactérioses) principalement chez les enfants ou chez des individus immuno-déprimés (Tableau I-1) (Falkinham, 1996; Katoch, 2004; Tortoli, 2009). Les mycobactérioses sont par de nombreux aspects similaires aux différents types d'infections tuberculeuses. Les MNT sont divisées en 4 groupes bien distincts selon la classification de Runyon (Tableau I-1) (Runyon, 1981; Tortoli, 2003). Néanmoins, le regroupement des mycobactéries selon les études phylogénétiques, basées en partie sur la comparaison de séquences d'ADN codant pour la petite sous unité ribosomale d'ARN 16S, ne corrobore pas toujours avec la classification de Runyon (Gey van Pittius *et al.*, 2006). A titre d'exemple, *M. marinum* et *M. ulcerans* sont des espèces génétiquement très proches, classées respectivement dans les groupes I et III selon Runyon (Tableau I-1, Figure I-2) (Tonjum *et al.*, 1998). La spécificité pigmentaire de *M. marinum* est probablement la conséquence d'une adaptation environnementale.

Tableau I-1 : Pouvoir pathogène pour l'Homme des mycobactéries du complexe de M.tuberculosis et des mycobactéries atypiques (ou non tuberculeuses, MNT).Les MNT sontclassées en quatre groupes selon Runyon. (Runyon, 1981; Katoch, 2004; Tortoli, 2009; Falkinham, 2010).

Groupe de Runyon	Espèce	Infection disséminée	Infection pulmonaire	Infection ganglionnaire	Infection de la peau et des tissus mous	Infection des os et des articulations
Complexe de <i>M.</i> tuberculosis	M. tuberculosis,					
	M. africanum,	***	***	**	**	**
	M.canettii					
Mycobactéries non tuberculeuses (MNT)						
I Croissance lente, Photochromogène: pigmentation à la lumière	M. kansasii	***	****	0	**	**
	M. marinum	*	0	0	****	***
	M. simiae	*	***	0	0	0
II Croissance lente, Scotochromogène: pigmentation à l'obscurité	M. szulgai	0	****	*	**	**
	M. xenopi	**	****	0	0	*
	M. scrofulaceum	*	*	****	*	0
III Croissance lente, Non chromogène	M. avium- intracellulare	****	****	***	**	**
	M. malmoense	***	****	**	0	*
	M. haemophyllum	***	0	*	***	***
	M. ulcerans	0	0	0	****	**
IV Croissance rapide, Non chromogène	M. fortuitum	**	*	0	***	0
	M. thermoresistibile	0	0	0	0	**
	M. chelonae	**	0	0	***	0



**Figure I-2 :** Arbre phylogénétique des membres du genre *Mycobacterium*. Consensus strict de 230 arbres les plus parcimonieux à partir de l'alignement des 1286 nucléotides de la séquence en ADN codant pour les ARN ribosomaux 16S de 80 espèces du genre *Mycobacterium* et de l'espèce *Gordonia aichiensis* en dehors du genre. Les espèces de mycobactéries dont le génome est séquencé sont surlignées (en jaune). La ligne en pointillés sépare les mycobactéries à croissance rapide (colonies bactériennes visibles de moins d'une semaine) de celles à croissance lente. Les espèces soulignées sont pathogènes pour l'Homme. Les membres du complexe de *M. tuberculosis* et du complexe de *M. avium* sont indiqués. \* = *M. farcinogenes* est une mycobactérie à croissance rapide (Gey van Pittius *et al.*, 2006).

#### b. Cycle infectieux de la tuberculose

La tuberculose est transmise par voie aérienne suite à l'expectoration des bacilles par un individu infecté et leur inhalation par un individu sain (Figure I-3). Des bacilles sont conduits jusqu'aux alvéoles pulmonaires où ils interagissent avec les cellules du système immunitaire de l'hôte. Les mycobactéries sont phagocytées par les macrophages alvéolaires mais survivent et se répliquent à l'intérieur de ces cellules. Rarement, chez les enfants et les personnes immunodéprimées, une tuberculose dite « primaire » se développe à la suite de la dissémination précoce des bacilles dans l'organisme (Figure I-3). Néanmoins, dans une grande majorité des cas (≥ 90%), une réponse immunitaire adaptative se met en place, aboutissant à la formation d'un agrégat cellulaire organisé : le granulome (Figure I-3). Ce dernier est nécessaire pour contenir l'infection mais ne permet pas d'éradiquer la totalité des bacilles qui persistent au sein des cellules phagocytaires. Cette infection dite « latente », est asymptomatique et très difficile à éradiquer. A ce stade, les individus (~10%) aux systèmes immunitaires déficients à cause du SIDA, de médicaments immunosuppresseurs, de la vieillesse, de troubles génétiques ou d'autres facteurs, développeront une tuberculose secondaire (Figure I-3). Cette dernière est la conséquence d'une réactivation des bacilles qui se multiplient dans les granulomes. Affaiblis, les granulomes ne peuvent plus contenir les mycobactéries qui peuvent alors disséminer dans tout l'organisme. Lors de la réactivation, la maladie est symptomatique et devient de nouveau transmissible à d'autres individus. La tuberculose secondaire se caractérise par l'accumulation de matériel lipidique dans les poumons (pneumopathie lipidique) en conséquence de la multiplication des bacilles, suivie d'une obturation des bronches et le plus souvent d'une insuffisance respiratoire (Hunter et al., 2006). A partir des poumons, les bacilles peuvent également disséminer dans tout l'organisme et provoquer l'infection d'autres organes.

En conclusion, le granulome est au cœur de l'infection mycobactérienne, permettant au pathogène de résider en toute « impunité » dans les individus infectés, en attente de la réactivation. La question clé est de savoir comment *M. tuberculosis* stimule tout d'abord la réponse immunitaire de l'hôte sans se faire éliminer, puis dans un deuxième temps échappe à cette réponse pour se multiplier et disséminer.


**Figure I-3: Cycle infectieux de la tuberculose.** Les bacilles de la tuberculose sont transmis par voies aériennes d'un individu infecté à un individu sain. 5% des personnes infectées, principalement des enfants et personnes immuno-déficientes, déclarent une tuberculose primaire pouvant entrainer la mort suite à la dissémination des bacilles dans l'organisme. 90 % des individus ont un système immunitaire qui contrôle l'infection en formant des agrégats de cellules immunitaires appelés granulomes. Cette infection est latente car quelques bacilles restent en vie dans le granulome. Lorsque le système immunitaire devient déficient, les bacilles se multiplient et le granulome s'effondre. Cette phase de réactivation entraine une pneumopathie lipidique puis la dissémination des bacilles dans l'organisme (Kaufmann *et al.*, 2005).

### **B.** Le granulome

Le granulome est une structure formée de différentes cellules du système immunitaire servant à contenir les bacilles en attente de leur destruction. Cependant, en empêchant son éradication, Mycobacterium tuberculosis détourne le granulome à son avantage pour en faire une structure protectrice lui permettant de se multiplier et d'attendre la défaillance du système immunitaire pour disséminer (Cosma et al., 2003). Cette infection granulomateuse est conduite par une séquence d'événements relativement bien définie (Figure I-4) (Russell, 2007). Les bacilles arrivant dans les poumons sont immédiatement phagocytés par les macrophages alvéolaires et par les cellules dendritiques interstitielles. Une fois dans la cellule phagocytaire, le bacille arrête la maturation du phagosome afin d'éviter sa destruction et permettre sa réplication (Vergne et al., 2004a). Les cellules infectées envahissent le tissu épithélial des poumons et sont rejointes, sous l'action de différentes cytokines et chimiokines, par des monocytes, des neutrophiles et des cellules NK (« Natural Killer ») (Cooper et Khader, 2008; Korbel et al., 2008). Le système immunitaire adaptatif est recruté dans les ganglions lymphatiques et les lymphocytes migrent dans les tissus pulmonaires. Il en résulte une cascade inflammatoire qui amplifie le recrutement cellulaire et remodèle le site de l'infection, pour donner naissance au granulome. Au centre du granulome se trouvent les macrophages infectés et des cellules géantes (fusion de macrophages), entourés de macrophages spumeux (gorgés de lipides) et de cellules épithéloïdes (macrophages différenciés). En périphérie, le granulome est composé essentiellement d'un manteau de cellules lymphocytaires (Figure I-4) (Russell, 2007).

Le granulome évolue ensuite par un processus de néo-vascularisation et par la production d'une chape fibreuse composée principalement de collagène qui sépare le centre du granulome de sa périphérie (Figure I-4). Lors de la réactivation, les mycobactéries se multiplient dans le granulome qui devient alors nécrotique en son centre et caséifie. Ensuite, le granulome s'effondre et libère les bacilles qui disséminent dans l'organisme (Figure I-4). Cette dernière étape fait suite à une défaillance du système immunitaire (Cosma *et al.*, 2003).



**Figure I-4 : Formation, maturation et rupture du granulome.** Les bacilles arrivant dans les poumons sont phagocytés par les macrophages et les cellules dendritiques alvéolaires. La réponse proinflammatoire résultante conduit au recrutement des cellules de l'immunité innée (monocytes, neutrophiles,...) puis de l'immunité adaptative (lymphocytes). Afin de contenir l'infection, les cellules forment un agrégat cellulaire organisé nommé granulome. Ce dernier mature ensuite par un processus de néo-vascularisation et par la production d'une chape fibreuse (collagène et matrice extracellulaire). Au centre du granulome se trouvent les macrophages infectés et des cellules géantes issues de la fusion des macrophages. Ces dernières sont entourées par des macrophages spumeux (gorgés de lipides), des cellules épithéloïdes (macrophages différenciés) et par la chape fibreuse. Les lymphocytes sont en périphérie du granulome. Chez la plupart des individus, le granulome se maintient dans cet état stable (latence bactérienne). Lorsque la maladie évolue, les mycobactéries se multiplient et le granulome nécrose puis caséifie en son centre. Ne pouvant plus contenir les bacilles, le granulome se rompt et libère le pathogène dans les poumons (Russell, 2007).

### 1. Entrée des mycobactéries dans les cellules pulmonaires

### a. La phagocytose

Dès leur arrivée dans les poumons, les bacilles de la tuberculose sont phagocytés par les macrophages alvéolaires, cellules immunitaires majoritaires dans les poumons, et par les cellules dendritiques interstitielles (von Garnier et al., 2005). Cependant, les bacilles survivent au processus de phagocytose et se multiplient dans les cellules immunitaires. Après cette première rencontre, les cellules dendritiques et les macrophages dérivés de monocytes sont recrutés sur le site de l'infection pour participer au processus de phagocytose. La fixation des mycobactéries aux cellules phagocytaires a lieu dans des domaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et met en jeu de nombreux récepteurs cellulaires (Figure I-5). Ces derniers sont engagés soit dans la liaison directe aux mycobactéries (voie non-opsonique), soit dans la reconnaissance d'opsonines (protéines solubles) fixées à la surface du pathogène. Dans les premiers stades de l'infection tuberculeuse, la voie de phagocytose est principalement non opsonique et fait intervenir les récepteurs lectiniques de type C nommés DC-SIGN (Dendritic cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non Integrin) et récepteur à mannose (MR), ainsi que le domaine lectinique (Carbohydrate Recognition Domain, CRD) du récepteur 3 du complément (CR3) (Schlesinger, 1993; Astarie-Dequeker et al., 1999). Les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques dérivées ou non de monocytes reconnaissent et phagocytent M. tuberculosis grâce à DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2003; Tailleux et al., 2003b; Tailleux et al., 2005). Le récepteur à mannose et le CR3 interviennent plutôt dans la phagocytose des mycobactéries conduite par les macrophages dérivés de monocytes. De plus, de nombreux autres récepteurs cellulaires (ex : récepteurs « scavenger »,....) et opsonines (ex : SP-A, protéines du complément,...) jouent un rôle dans la phagocytose de M. tuberculosis (Cf. chapitre II partie B) (Zimmerli et al., 1996; El-Etr et Cirillo, 2001; Schafer et al., 2009; Court et al., 2010).

La fixation des mycobactéries aux récepteurs lectiniques de type C (MR, DC-SIGN, Dectine-1,...) ainsi qu'aux récepteurs membranaires et intra-cytoplasmiques nommés TLRs (Toll-like receptor) et NLRs (Nucleotide oligomerization domain (Nod) like receptors), participe grandement à la régulation et à l'induction des voies de signalisation impliquées dans l'expression et/ou la sécrétion des médiateurs (ex : cytokines, chimiokines, antigènes de surface,...) de la réponse inflammatoire (Figure I-5) (Jo, 2008; Schafer *et al.*, 2009).

Alors que les macrophages sont les maîtres d'œuvre de la réponse immunitaire innée dans les poumons, les cellules dendritiques sont essentielles pour le recrutement de la réponse immunitaire adaptative et la formation du granulome.



# Figure I-5 : Récepteurs et opsonines proposés intervenant dans la reconnaissance et/ou la phagocytose de *M. tuberculosis*.

Les mycobactéries sont phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques dans des zones de la membrane plasmique riches en cholestérol. La phagocytose se fait par une voie opsonisante ou non. Les récepteurs impliqués reconnaissent soit directement des antigènes bactériens saccharidiques (lectines) et lipidiques (récepteurs « Scavenger ») (voie non opsonisante), soit des opsonines liées au pathogène (voie opsonisante). Les récepteurs intervenant dans la fixation des opsonines ne sont pas indiqués. Les récepteurs lectiniques de type C ainsi que d'autres récepteurs reconnaissant des motifs bactériens (TLR : récepteurs « Toll like »,...) sont impliqués dans la régulation et l'activation des voies de signalisation intracellulaire conduisant par exemple à la sécrétion de cytokines (Schafer *et al.*, 2009).

### b. Autre voie d'endocytose

Les mycobactéries arrivant dans les poumons entrent aussi en contact avec les cellules épithéliales pulmonaires, les pneumocytes. Les pneumocytes de type II internalisent les mycobactéries via un processus de macropinocytose (Garcia-Perez *et al.*, 2003; Garcia-Perez *et al.*, 2008). Les bacilles de la tuberculose survivent et se répliquent également dans ces cellules. Bien que cette voie d'endocytose primaire soit spontanée, elle peut être stimulée par l'activation de certains récepteurs tels que les TLR (West *et al.*, 2004; Swanson, 2008; Lee *et al.*, 2009a). De plus, la macropinocytose des mycobactéries peut être favorisée par la fixation des bacilles à la surface des pneumocytes. A titre d'exemple, *M. tuberculosis* synthétise une adhésine de surface lui permettant d'adhérer aux cellules épithéliales pulmonaires (Menozzi *et al.*, 2006). Les mycobactéries entrent aussi en contact avec les pneumocytes au travers de récepteurs cellulaires (ex :dectin-1,...) et/ou d'opsonines (SP-A et fibronectine) (Kresch *et al.*, 1998; Hall-Stoodley *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009a; Kresch *et al.*, 2010). La macropinocytose est aussi utilisée par les cellules phagocytaires, en particulier les cellules dendritiques, pour capturer les antigènes microbiens qui serviront au recrutement de la réponse immunitaire adaptative (Sallusto *et al.*, 1995; West *et al.*, 2004).

Bien que l'étude de l'infection des pneumocytes dans la pathologie tuberculeuse soit récente, ce processus est indispensable à la bonne mise en place de la réponse immunitaire et donc à la formation des granulomes (Mendez-Samperio *et al.*, 2008)(Kresch, 2010 #226)(Volkman *et al.*, 2010). De plus, les cellules épithéliales infectées pourraient être la source principale de la réactivation mycobactérienne (Ehlers, 2009).

### 2. Survie, multiplication et localisation intracellulaire

# a. Mécanismes de survie des mycobactéries dans les cellules *i. Inhibition de la maturation du phagosome*

L'invasion des cellules alvéolaires par le bacille de tuberculose est critique dans l'établissement de l'infection. Durant le processus de phagocytose, mais aussi durant celui de la macropinocytose, les vésicules formées subissent une série d'événements de fusion avec d'autres compartiments endocytaires afin d'acquérir des propriétés microbicides (Figure I-6) (Koul *et al.*, 2004; Vergne *et al.*, 2004a; Flannagan *et al.*, 2009). Immédiatement après l'internalisation, les phagosomes expriment des marqueurs membranaires tels que les protéines Rab5 (de la famille des petites GTPase), EEA1 (pour Early Endosomal Antigen 1) et hVPS34 (human Vacuolar Protein, requis pour la fusion avec les premiers compartiments endocytaires. Au cours de la maturation du phagosome, la protéine Rab5 est remplacée par Rab7, une autre GTPase intervenant aussi dans la fusion vésiculaire. Le phagosome tardif fusionne ensuite avec le lysosome pour donner naissance au phagolysosome, organelle de digestion. Le phagolysosome est caractérisé par des marqueurs membranaires tels que LAMP1 (Lysosome-Associated Membrane Protein 1), le récepteur au mannose-6-phosphate et la cathepsine D (protéase) (Xu *et al.*, 1994; Clemens et Horwitz, 1996; Fratti *et al.*, 2003). La maturation du phagosome entraine son acidification progressive et l'acquisition d'effecteurs microbicides tels que des protéases, des intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) et de l'azote (RNI), des peptides antimicrobiens (cathélicidines, défensines, lipocaline,...) et des systèmes de privation en nutriments (NRAMP) (Figure I-6) (Koul *et al.*, 2004; Vergne *et al.*, 2009).

*Mycobacterium tuberculosis* a développé différentes stratégies afin d'inhiber la maturation des phagosomes. Le pathogène bloque tout d'abord l'accumulation de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), facteur essentiel au recrutement de la protéine EEA1 impliquée dans la fusion vésiculaire. Pour ce faire, les mycobactéries inhibent l'activité de la PI-3-kinase hVPS34 qui convertit les PI en PI3P à la membrane du phagosome (Figure I-6) (Via *et al.*, 1997; Vergne *et al.*, 2004a). L'inhibition de hVPS34 est induite par des glycolipides et lipoglycannes synthétisés par les mycobactéries (cf. chapitre III) (Fratti *et al.*, 2003; Indrigo *et al.*, 2003; Vergne *et al.*, 2003; Hmama *et al.*, 2004). *M. tuberculosis* empêche aussi le recrutement de EEA1 en sécrétant une phosphatase acide (SapM) qui, une fois dans le cytosol, hydrolyse le PI3P en PI (Vergne *et al.*, 2005).

En plus d'inhiber le recrutement de EEA1, les mycobactéries pathogènes maintiennent activement la protéine TACO (triptophan-aspartate-containing coat), sur la membrane phagosomale (Ferrari *et al.*, 1999). TACO, aussi appelé coronine-1, se fixe à l'actine, régule la polymérisation du cytosquelette et participe à l'internalisation des mycobactéries (Yan *et al.*, 2005). Pour que la fusion phagolysosomale ait lieu, TACO doit impérativement être libérée de la membrane du phagosome. Dans le cas contraire, TACO active de manière constante une calcineurine dépendante du Ca<sup>2+</sup>, qui inhibe la fusion phagolysosomale (Jayachandran *et al.*, 2007; Trimble et Grinstein, 2007). *M. tuberculosis* sécrète une lipoamine deshydrogénase (LpdC) qui se fixe au cholestérol membranaire et retient la protéine TACO

dans le phagosome (Figure I-6) (Deghmane *et al.*, 2007). La rétention phagosomale de TACO est indispensable à la survie des mycobactéries (Ferrari *et al.*, 1999; Jayachandran *et al.*, 2007).

D'autres mécanismes permettent à *M*.*tuberculosis* d'inhiber la fusion du phagosome avec les vésicules endosomales tardives et le lysosome. Le pathogène produit la tyrosinephosphatase PtpA qui déphosphoryle et inactive la protéine VPS33B (Vacuolar Protein Sorting 33B) nécessaire pour l'activation de Rab7 et la fusion phagolysomale (Figure I-6) (Bach *et al.*, 2008; Philips, 2008). *M. tuberculosis* secrète aussi la protéine kinase mycobactérienne PknG qui lyse la protéine kinase hôte PKC- $\alpha$  indispensable à l'interaction du phagosome avec les endososmes tardifs et le lysosome (Chaurasiya et Srivastava, 2009).

M. tuberculosis synthétise également d'autres facteurs essentiels à la survie des mycobactéries dans le compartiment phagocytaire tels que le système de sécrétion ESX-1 (Simeone et al., 2009). ESX-1 permet aux mycobactéries de sécréter des protéines parmi lesquelles les antigènes CFP-10 (10 kDa Culture Filtrate Protein) et ESAT-6 (6kDa Early Secreted Antigenic Target). L'abolition de la synthèse de ESX-1 entraîne une perte de virulence des mycobactéries incapables d'inhiber la maturation du phagosome (Tan et al., 2006b; MacGurn et Cox, 2007). D'ailleurs, ESX-1 et ses substrats sont codés par des gènes localisés dans la région de délétion RD1 qui est absente dans le BCG, souche vaccinale atténuée de M. bovis (Figure I-1) (Hsu et al., 2003; Simeone et al., 2009). De nombreuses études suggèrent un rôle de ESAT-6 dans la lyse des membranes de la cellule hôte (Hsu et al., 2003; Guinn et al., 2004; de Jonge et al., 2007; Kinhikar et al., 2010). Récemment, en utilisant Mycobacterium marinum comme modèle, Smith et collaborateurs ont démontré qu'ESAT-6 produit des pores dans la membrane du phagosome permettant la libération d'antigènes mycobactériens et des mycobactéries dans le cytosol (Figure I-6) (Smith et al., 2008). Parmi les antigènes mycobactériens libérés dans le cytosol, on peut citer SapM, PknG ou encore la metallo-protéinase Zmp1. La présence d'antigènes microbiens dans le cytosol des cellules infectées induit l'activation d'un complexe multi-protéique nommé inflammasome (Bergsbaken et al., 2009; Carlsson et al., 2010). Ce dernier est impliqué dans la sécrétion macrophagique de la cytokine pro-inflammatoire IL-1ß qui relance la fusion phagolysosomale. La protéine mycobactérienne Zmp1 empêche l'activation de l'inflammasome (Lazarevic et Martinon, 2008; Master et al., 2008).

En conclusion, les bacilles résident dans des phagosomes immatures, non microbicides et poreux. En plus d'arrêter la maturation du phagosome, *M. tuberculosis* produit d'autres effecteurs microbiens qui inhibent les mécanismes de défense de la cellule hôte.



**Figure I-6 : Processus mis en jeu par** *M. tuberculosis* **pour inhiber la maturation du phagosome suite à son internalisation.** Les mycobactéries synthétisent de nombreuses protéines (en rouge) et glycoconjugués (ex : lipoarabinomannane, ou LAM) qui permettent de bloquer le relarguage ou le recrutement de protéines cellulaires (en bleu) intervenant dans la maturation des phagosomes.

### ii. Inhibition des mécanismes de défense des cellules phagocytaires

Pour survivre et se répliquer dans les phagosomes, les mycobactéries doivent aussi lutter contre les mécanismes de défense des cellules phagocytaires incluant la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) et de l'azote (RNI), la privation en nutriments, l'acidification du milieu, l'apoptose, la pyroptosis ou encore l'autophagie (Figure I-7). Ces mécanismes de défense sont stimulés par la présence de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu extracellulaire incluant le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha »), produit par les macrophages eux-même, et l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ), sécrété par les lymphocytes T (Chan *et al.*, 1992; Via *et al.*, 1998; MacMicking *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2004).

*M. tuberculosis* synthétise plusieurs enzymes qui permettent la détoxification des ROI et RNI. A titre d'exemple, les superoxyde dismutases SOD convertissent les anions superoxyde  $(O_2^{-})$  toxiques en peroxyde d'hydrogène  $(H_2O_2)$ , qui est ensuite décomposé en eau et oxygène par la catalase peroxydase KatG (Figure I-7)(Ehrt et Schnappinger, 2009). *M. tuberculosis* survit dans des conditions de pH acide en régulant son propre pH intracellulaire en partie grâce à la sérine-protéase transmembranaire Rv3671c (Vandal *et al.*, 2008; Vandal *et al.*, 2009). De plus, en maintenant activement TACO à la membrane du phagosome, le pathogène inhibe le recrutement d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) (Figure I-7) (Davis et Ramakrishnan, 2009).

*M. tuberculosis* interfère également avec la mise en place de l'apoptose, mécanisme de mort cellulaire programmé. Ce processus est considéré depuis longtemps comme un mécanisme de défense contre le parasitisme intracellulaire des virus ou de certaines bactéries (Hengartner, 2000; Keane *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009b). L'apoptose peut être activée selon deux voies : intrinsèque ou extrinsèque. Les deux voies conduisent au recrutement de caspases qui dégradent des substrats nécessaires à la survie cellulaire (ex : enzymes de réparation de l'ADN, protéines du cycle cellulaire...) ou activent des protéines promotrices de la mort cellulaire (ex : endonucléase,..). Finalement, l'apoptose entraine la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques composés d'une membrane intacte contenant des éléments cytoplasmiques (organelles, fragments d'ADN, antigènes bactériens). Les corps apoptotiques sont ensuite endocytés par les cellules voisines. La phagocytose des corps apoptotiques par les cellules présentatrices d'antigènes permet de capter des antigènes mycobactériens, de les apprêter sur des protéines présentatrices et d'activer la réponse immunitaire adaptative (Winau *et al.*, 2004; Hinchey *et al.*, 2007; Divangahi *et al.*, 2010).

La voie intrinsèque de l'apoptose est induite par des stress intracellulaires tels que des dommages de l'ADN, une privation en nutriments ou encore un stress oxydatif (ROI, RNI,..). Ces déclencheurs induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale, suivie de la translocation du cytochrome-C dans le cytosol pour former l'apoptosome. Les mycobactéries pathogènes empêchent la mise en place d'un stress oxydatif en détoxifiant les RNI et ROI (Ehrt et Schnappinger, 2009). D'autres protéines et glycoconjugués tels que le transporteur SecA, la serine-thréonine kinase PknE, la NADH déshydrogénase NDH-1 et le lipoarabinomannane sont impliqués dans cette activité inhibitrice (Maiti *et al.*, 2001; Koul *et al.*, 2004; Boom, 2007; Hinchey *et al.*, 2007; Briken et Miller, 2008; Miller *et al.*, 2010). A titre d'exemple, NDH-1 supprime l'activité de l'oxydase NOX2 intervenant dans la production de ROI (Miller *et al.*, 2010). De manière intéressante, les ROI, normalement impliqués dans l'induction intrinsèque de l'apoptose, influencent aussi la voie extrinsèque. Ainsi, la suppression des ROI par *M. tuberculosis* entraine une diminution de la sécrétion macrophagique de TNF- $\alpha$  et par conséquent une diminution de l'induction extrinsèque de l'apoptose (Miller *et al.*, 2010).

La voie extrinsèque est induite suite à l'interaction des récepteurs de mort cellulaire, incluant TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor) et FAS, avec leurs ligands respectifs, le TNF- $\alpha$  et FasL (Fas-Ligand). Cette voie apoptotique est inhibée par *M. tuberculosis* selon plusieurs modalités. La fixation des mycobactéries et des antigènes mycobactériens sur des récepteurs cibles réduit l'expression du récepteur FAS à la surface des macrophages et induit la synthèse de la protéine FLIP qui court-circuite la signalisation intracellulaire apoptotique (Oddo *et al.*, 1998; Loeuillet *et al.*, 2006). De plus, le pathogène induit la sécrétion macrophagique de cytokines anti-apoptotiques telles que l'interleukine-10 (IL-10) qui bloque la synthèse de TNF- $\alpha$  et promeut la production d'une forme soluble de TNF-R, chélateur du TNF- $\alpha$  dans le milieu extracellulaire (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998; Fratazzi *et al.*, 1999; Nigou *et al.*, 2002; Koul *et al.*, 2004; Rajasingh *et al.*, 2006).

En plus de l'apoptose, une autre forme de mort cellulaire appelée pyroptose peut se mettre en place (Bergsbaken *et al.*, 2009). Ce processus a été décrit dans les monocytes, macrophages et cellules dendritiques infectées par de nombreux pathogènes intracellulaires tels que *Salmonella*, *Francisella* et *Legionella* (Labbe et Saleh, 2008; Bergsbaken *et al.*, 2009). L'activation de la pyroptose est dépendante de la caspase-1. La présence d'antigènes microbiens est perçue par des récepteurs intracellulaires tels que les NLR qui activent la caspase 1 et la formation d'un complexe multi-protéique nommé inflammasome. En plus de permettre la sécrétion de la cytokine pro-phagocytaire IL-1 $\beta$ , l'inflammasome provoque la formation des pores dans la membrane plasmique, entrainant une entrée d'eau dans le cytosol, suivie de la lyse cellulaire (Bergsbaken *et al.*, 2009). Comme énoncé précédemment, *M. tuberculosis* empêche l'activation de l'inflammasome et donc de la pyroptose, en synthétisant la métalloprotéase Zmp1 (Lazarevic et Martinon, 2008; Master *et al.*, 2008).

Enfin, la survie des mycobactéries pathogènes dépend du contrôle d'un autre mécanisme de défense cellulaire : l'autophagie. L'autophagie est un processus cellulaire ancestral permettant aux cellules eucaryotes de dégrader et de recycler le matériel intracellulaire. Au cours du processus, les protéines et organelles sont séquestrées dans des vésicules à double membrane appelées autophagosomes. Une fois la séquestration accomplie, l'autophagie peut être activée par différents signaux extracellulaires tels que des cytokines (ex : IFN-γ,...) ou la fixation d'antigènes microbiens sur les récepteurs TLR (Levine et Deretic, 2007; Deretic et Levine, 2009). L'autophagie a tout d'abord été décrite comme un mécanisme efficace pour détruire les mycobactéries intracellulaires (MacMicking *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006; Biswas *et al.*, 2008; Jagannath *et al.*, 2009; Jo, 2010). Récemment, Kumar et collaborateurs proposent que *M. tuberculosis* active une voie de signalisation intracellulaire qui inhibe le processus d'autophagie (Behr *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010).

L'inhibition des mécanismes de défense de la cellule hôte permet à *M. tuberculosis* de survivre et de se multiplier dans les cellules hôtes (Figure I-7). Ces cellules vont lentement mourir par un processus de nécrose régulé encore une fois par le pathogène (Park *et al.*, 2006; Behar *et al.*, 2010). En induisant chez son hôte la production d'un acide gras, le LXA<sub>4</sub> (lipoxine A4), le pathogène inhibe la synthèse de prostaglandine E2 (PE<sub>2</sub>) (Chen *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2008; Divangahi *et al.*, 2009). Lors de l'infection de macrophages par des mycobactéries non virulentes, la synthèse de PE<sub>2</sub> empêche la détérioration de la mitochondrie et initie la réparation de la membrane plasmique. Ces deux mécanismes sont cruciaux pour induire l'apoptose. L'inhibition des deux membranes mitochondriales et à la dégradation progressive de la membrane plasmique. Ces événements sont spécifiques de la nécrose (Behar *et al.*, 2010). La nécrose de cellules infectées permet la libération des mycobactéries qui vont infecter des cellules voisines.

### b. Multiplication des mycobactéries : accès aux nutriments

Les mycobactéries adoptent deux modes de vie au cours de l'infection : la réplication ou la dormance (Zhang, 2004; Boshoff et Barry, 2005; Ehlers, 2009; Gill *et al.*, 2009). Dans les premiers stades de l'infection, les mycobactéries se répliquent activement dans les vésicules phagosomales. Durant la formation du granulome, les mycobactéries passent d'un mode réplicatif à un mode non-réplicatif (ou dormance). La dormance des mycobactéries perdure jusqu'à la phase de réactivation. Cette dernière est caractérisée par une forte réplication des mycobactéries qui vont ensuite disséminer. Pour des raisons encore indéterminées, les mycobactéries sont incapables de se multiplier dans les cellules dendritiques (Tailleux *et al.*, 2003a). Par contre, elles se répliquent très fortement dans les macrophages qui peuvent contenir jusqu'à environ 20 bacilles (Lee *et al.*, 2006b; Park *et al.*, 2006). De même, les bacilles sont tout à fait capables de se répliquer dans les pneumocytes (Garcia-Perez *et al.*, 2003; Garcia-Perez *et al.*, 2008).

Qu'elles soient en mode réplicatif ou non, les mycobactéries ont besoin de prélever des nutriments dans le milieu extracellulaire pour vivre. Le phagosome immature est en contact avec les vésicules d'endocytose précoces contenant les nutriments (Clemens et Horwitz, 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1996; Vergne et al., 2004a). L'absorption des nutriments nécessite leur transport à travers l'enveloppe mycobactérienne. De nombreuses études ont identifié et caractérisé les protéines permettant le transport du phosphate, du fer, du sulfate, des lipides, des sucres ou encore de certains acides aminés dans la paroi des mycobactéries. Néanmoins, les phagosomes sont des environnements plutôt pauvres pour certains nutriments tels que les acides aminés, les sucres ou le fer. Pour palier à cette privation, les mycobactéries se servent du catabolisme des lipides (β-oxydation) et du cholestérol intracellulaire comme source principale de carbone (Boshoff et Barry, 2005; Cook et al., 2009; Singh et al., 2009; Eisenreich et al., 2010). Le cycle de Krebs et la voie du glyoxylate permettent ensuite la synthèse des acides aminés et des sucres. Les mycobactéries synthétisent aussi des sidérophores qui captent le fer du milieu extracellulaire et le ramènent dans le phagosome (Rodriguez, 2006). Les nombreuses autres protéines impliquées dans la nutrition des mycobactéries et plus généralement dans la physiologie mycobactérienne ont été récemment décrites dans la revue de Cook et al, 2009.

### c. Localisation intracellulaire

Si la plupart des études démontrent que les mycobactéries résident dans les phagosomes immatures, d'autres observations par microscopie électronique suggèrent qu'après quelques jours, les bacilles sortent du phagosome et persistent dans le cytosol des cellules infectées (Myrvik *et al.*, 1984; McDonough *et al.*, 1993). Récemment, Van der Wel et collaborateurs observent que *M. tuberculosis* est majoritairement localisée dans le cytosol des macrophages et des cellules dendritiques après 96 heures d'infection *in vitro* (van der Wel *et al.*, 2007). Pour sortir du phagosome, les mycobactéries sont capables de lyser la membrane de l'organelle (van der Wel *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). La lyse de la membrane phagosomale impliquerait la protéine ESAT-6 sécrétée par les mycobactéries pathogènes (Smith *et al.*, 2008). Bien que l'évasion des mycobactéries dans le cytoplasme soit un sujet très controversé, ce mécanisme pourrait permettre aux mycobactéries d'échapper une fois pour toutes au processus de phagocytose et aux molécules bactéricides. A la suite de leur évasion, les bacilles pourraient passer de cellule en cellule sans être détectés par le système immunitaire de l'hôte (Carlsson et Brown, 2009).



**Figure I-7 : Survie de** *M. tuberculosis* dans la cellule infectée. L'inhibition des mécanismes de défense et l'accès aux nutriments permettent à *M. tuberculosis* de se multiplier dans la cellule infectée qui meurt lentement par nécrose.

# 3. Réponse immunitaire de l'hôte et formation du granulome

### a. Introduction

Comme nous venons de le décrire, les bacilles de la tuberculose arrivant dans les poumons sont phagocytés par les macrophages et les cellules dendritiques ou endocytés par les pneumocytes de type II. Une fois internalisés, les bacilles inhibent leur destruction intracellulaire et se multiplient dans les macrophages et les pneumocytes. Les mycobactéries et les antigènes mycobactériens dans les poumons sont perçus par de nombreux récepteurs membranaires et intracellulaires (TLR, lectines de type C, NLR,...), capables d'activer des cascades de transductions intracellulaires, aboutissant à la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires (Jo, 2008; Schafer et al., 2009). Les molécules proinflammatoires permettent le recrutement et l'activation d'autres cellules de l'immunité innée (monocytes, neutrophiles, cellules « Natural killer »), qui vont à leur tour lutter contre les mycobactéries. Les cellules dendritiques activées migrent dans les ganglions lymphatiques où elles présentent les antigènes mycobactériens (peptides et lipides) aux cellules lymphocytaires. Sous l'action de différentes cytokines (ex : IL-12), les cellules dendritiques recrutent majoritairement les lymphocytes T de l'immunité à médiation cellulaire (Cooper, 2009). Néanmoins, l'immunité à médiation humorale (lymphocytes B, anticorps) joue aussi un rôle durant l'infection tuberculeuse (Abebe et Bjune, 2009; Maglione et Chan, 2009). Après leur activation, les lymphocytes migrent vers le site de l'infection où ils sont à nouveau stimulés par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques). Les lymphocytes T sécrètent des effecteurs microbicides afin d'enrailler la croissance bactérienne et agrègent autour des cellules de l'immunité innée pour contenir les bacilles dans les granulomes. Chez les personnes infectées par la tuberculose, le développement de l'immunité adaptative nécessite 5-6 semaines, comme en témoignent les tests cutanés de la tuberculine (Winslow et al., 2008).

Nos connaissances sur l'immuno-pathologie tuberculeuse proviennent essentiellement de l'étude du modèle murin infecté à la suite de la nébulisation ou de l'inoculation intranasale d'une très grande quantité de bacilles (Cooper, 2009). Dans ce modèle, l'infection tuberculeuse se caractérise par 3 phases bien distinctes aboutissant à la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire au bout d'environ 3 semaines (Figures I-8) (Cooper et Khader, 2008). Durant les trois premiers jours suivants l'infection, les mycobactéries se multiplient rapidement mais sont toutes aussi activement détruites par les cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles) (Munoz-Elias *et al.*, 2005; Cooper et Khader, 2008; Gill *et al.*, 2009). De ce fait, le nombre de bacilles n'augmente pas. Du  $3^{eme}$  au  $18^{eme}$  jour, les mycobactéries sont dans une phase de croissance exponentielle. Durant cette période, *M. tuberculosis* inhibe la réponse immunitaire innée et retarde la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. A partir du  $19^{eme}$  jour, la croissance mycobactérienne est ralentie puis stabilisée. Cette phase concorde avec la formation de granulomes suite à l'arrivée des lymphocytes T sur le site de l'infection (Figures I-8).



Figure I-8 : Observation de la croissance bactérienne suite à l'infection pulmonaire de souris avec *M. tuberculosis*.

(1) Suite à l'infection de souris par nébulisation, le système immunitaire adaptatif combat les bacilles tuberculeux. Ces derniers se multiplient mais sont tous rapidement éliminés. (2) Du 3<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour, les effecteurs mycobactériens (glycoconjugués, protéines,...) inhibent la réponse immunitaire innée et la croissance des bacilles est exponentielle. Cette période de temps correspond au recrutement et à l'activation du système immunitaire adaptatif. La lenteur de la réaction immunitaire est spécifique du pathogène et du lieu de l'infection. (3) Les lymphocytes arrivés au site d'infection, éliminent une partie des mycobactéries. Le reste des bacilles est contenu dans les granulomes (Cooper et Khader, 2008)

### b. La réponse immunitaire innée : première barrière contre l'infection

Les macrophages jouent un rôle clef dans l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire. Une fois infectés, les macrophages sécrètent de nombreuses cytokines proinflammatoires (ex : TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12,...) et chimiokines (ex : CCL5, CXCL9, CXCL10) (Flynn et Chan, 2001). La sécrétion d'IL-12 polarise la réponse immunitaire vers le type Th-1 (Lymphocytes T-helper 1). Cette cytokine est aussi produite par les cellules dendritiques infectées ou activées. Cependant, les cellules dendritiques sensibilisées aux mycobactéries peuvent aussi sécréter de l'IL-10, qui régule négativement la réponse immunitaire Th-1 (Gagliardi *et al.*, 2005). L'IL-10 cause la réduction de la production d'IL-12 par les cellules phagocytaires infectées. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle majeur dans le contrôle initial et à long terme de la tuberculose (Lin *et al.*, 2007). Cette cytokine induit la production de chimiokines et de facteurs d'adhésion et augmente le pouvoir microbicide (Ex : apoptose, autophagie...) des cellules phagocytaires (Lopez Ramirez *et al.*, 1994; Keane *et al.*, 2002; Roach *et al.*, 2002). Elle est aussi nécessaire au maintien des granulomes et donc à la contention de l'infection (Clay *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2010).

La sécrétion des cytokines et chimiokines par les cellules phagocytaires conduit au recrutement et à l'activation des monocytes, des neutrophiles et des cellules NK (Natural Killer) (Ma *et al.*, 2003; Algood *et al.*, 2005; Korbel *et al.*, 2008). Ces cellules utilisent différents processus pour détruire les mycobactéries. Les monocytes se différencient en macrophages et cellules dendritiques pour phagocyter les mycobactéries et amplifier la sécrétion de cytokines (Skold et Behar, 2008).

En arrivant sur le site d'infection, les neutrophiles jouent plusieurs rôles dans la défense contre *M. tuberculosis* (Appelberg, 2007). Ils sont capables de phagocyter le microorganisme mais ils sécrètent aussi des molécules anti-microbiennes telles que des protéases ou des défensines contenues dans des granules (vésicules) intracellulaires. Les substances microbicides produites ont uniquement un effet sur les mycobactéries dans le milieu extracellulaire. Afin de détruire les bacilles contenus dans les phagosomes, une coopération se met en place entre les neutrophiles et les macrophages infectés (Tan *et al.*, 2006a). Suite à l'apoptose des neutrophiles induite par le pathogène, les granules sont libérés dans le milieu extracellulaire et phagocytés par les macrophages infectés. Les granules fusionnent avec le phagosome dans lequel ils relâchent leur contenu microbicide (Perskvist *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2006a). Récemment, un nouveau phénomène de mort cellulaire appelé nétose a été découvert chez les neutrophiles, entrainant la libération de NETs (Neutrophil Extracellular Traps), réseaux extracellulaires de fibres composées d'ADN et d'histones parsemées de granules dont le contenu est intact (Brinkmann et Zychlinsky, 2007). Les NETs activés durant l'infection tuberculeuse participent à la réponse immunitaire innée en piégeant et tuant les bacilles extracellulaires (Ramos-Kichik *et al.*, 2009). En plus de leur pouvoir microbicide, les neutrophiles sécrètent aussi des cytokines (INF- $\gamma$ , IL-12...) et chimiokines nécessaires au recrutement des lymphocytes T (Ex : CXCL-9, -10, -11) (Appelberg, 2007). L'implication des neutrophiles dans l'infection tuberculeuse est encore mal comprise. Certaines études démontrent que ces cellules jouent un rôle protecteur important (Pedrosa *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2004; Persson *et al.*, 2008), alors que d'autres proposent que les neutrophiles contribuent à la pathologie (Eruslanov *et al.*, 2005; Aleman *et al.*, 2007; Hedlund *et al.*, 2010).

Par ailleurs, des cellules lymphocytaires NK lysent également le pathogène extracellulaire et les cellules phagocytaires infectées grâce à divers mécanismes dépendant des perforines, des granzymes, des granulysines et des systèmes pro-apoptotiques FasL et Nkp46 (Garg et al., 2006; Korbel et al., 2008; Moretta et al., 2008; Vankayalapati et Barnes, 2009). La granulysine est une enzyme qui altère la perméabilité des membranes cellulaires entrainant la mort des macrophages infectés et des bacilles de M. tuberculosis présents dans le milieu extracellulaire (Ernst et al., 2000). La perforine est une protéine qui forme des pores dans les membranes cellulaire. L'association des deux protéines lytiques est capable d'affecter la viabilité intracellulaire de M. tuberculosis (Stenger et al., 1998; Stegelmann et al., 2005). La perforine est aussi indispensable à l'activité de la granzyme (Berthou et al., 1998). Une fois dans la cellule, la granzyme est une sérine protéase qui induit l'apoptose (Berthou *et al.*, 1998). L'apoptose est aussi activée par la fixation de la protéine membranaire FasL au récepteur Fas des macrophages, des monocytes et des cellules dendritiques. Le récepteur Nkp46 est impliqué dans la lyse des cellules phagocytaires par un mécanisme qui est encore en cours d'élucidation (Vankayalapati et al., 2002; Marcenaro et al., 2003; Zilka et al., 2005; Garg et al., 2006; Vankayalapati et Barnes, 2009). Les cellules NK secrètent également de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et du GM-CSF (Granulocyte-macrophage colonystimulating factor) sur le site de l'infection (Moretta et al., 2008). Enfin, l'inflammation locale va conduire au recrutement de cellules iNKT (invariant Natural killer T), lymphocytes intermédiaire entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Chiba et al., 2008; Sada-Ovalle et al., 2008). Les iNKT arrivant sur le site de l'inflammation sont activés par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques). Ces dernières présentent aux cellules iNKT des antigènes microbiens lipidiques grâce aux récepteurs CD1 (Moody *et al.*, 2000a; Moody *et al.*, 2000b; Moody et Besra, 2001; Moody *et al.*, 2004; Layre *et al.*, 2009)(cf. chapitre II-B). Une fois activées, les cellules iNKT jouent un rôle similaire aux cellules NK en produisant des effecteurs lytiques (perforines, granulysine, FasL,...) et en sécrétant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, GM-CSF...). Comme énoncé précédemment, l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  augmentent le pouvoir microbicide des cellules phagocytaires en relançant notamment la maturation du phagosome, l'apoptose, l'autophagie, la production de ROI, de RNI et des peptides antimicrobiens, et l'acidification des vésicules. En réponse à l'IFN, les cellules monocytaires et endothéliales sécrètent aussi des chimio-attractants (CXCL-9, -10, -11...) pour les lymphocytes T.

Durant les trois premiers jours de l'infection, les activités antimicrobiennes des cellules de l'immunité innée sont suffisantes pour contenir l'infection. Cependant, *Mycobacterium tuberculosis* produit et/ou sécrète des antigènes (Ex : glycoconjugués, protéines, ...) qui inhibent progressivement la réponse immunitaire innée (pour les glycoconjugués, Cf. chapitre III). Les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de la phagocytose sont assez bien compris. Les études s'attèlent aujourd'hui à décrypter les processus permettant aux bacilles de prendre le contrôle de l'ensemble des cellules de l'immunité innée. Une fois le système immunitaire inné inhibé, les mycobactéries se multiplient de façon exponentielle. Cette période de temps correspond aussi à la phase de recrutement de l'immunité adaptative à médiation cellulaire.

# c. Recrutement et activation de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire

De manière générale, le développement de l'immunité adaptative à médiation cellulaire dépend de l'activation et de la migration tissulaire des cellules présentatrices d'antigènes. Suite à la reconnaissance d'un micro-organisme, les cellules présentatrices d'antigènes migrent dans les ganglions lymphatiques. Pendant leur migration, ces cellules subissent une maturation qui se caractérise par l'expression en surface de protéines co-stimulatrices telles que CD40, CD80 et CD86 et de molécules présentatrices d'antigènes dont les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) et les protéines CD1 (Schreiber et Sandor, 2010). Une fois la migration et maturation achevées, les cellules présentatrices d'antigènes activent les lymphocytes T qui se différencient et se multiplient. Ces derniers migrent sur le

site de l'infection et rencontrent d'autres cellules présentatrices d'antigènes qui leur signalent la présence du pathogène. Les lymphocytes T stimulent alors l'activité microbicide des cellules phagocytaires et lysent les cellules infectées ou les bactéries.

Dans le cadre de la tuberculose, les cellules présentatrices d'antigènes qui migrent dans les ganglions lymphatiques sont les cellules dendritiques alvéolaires ou dérivées des monocytes (Reinhardt *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2007). La migration des cellules dendritiques activées vers les ganglions lymphatiques dépend de l'IL-12, ainsi que des chimiokines CCL19 et CCL21 (Khader *et al.*, 2006; Cooper et Khader, 2008; Schreiber et Sandor, 2010). Comme décrit précédemment, l'IL-12 est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques. Cette cytokine est primordiale pour que les cellules dendritiques quittent les tissus pulmonaires. Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont secrétées par les organes lymphoïdes secondaires et guident la migration des cellules dendritiques vers ces organes (Cyster, 1999a; Cyster, 1999b).

De manière intéressante, la reconnaissance des antigènes mycobactériens par les cellules dendritiques n'est pas suffisante pour initier la réponse adaptative à médiation cellulaire (Wolf *et al.*, 2007). Les cellules dendritiques doivent impérativement phagocyter les mycobactéries et les transporter dans les ganglions lymphatiques (Chackerian *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2008). Une fois dans les organes lymphoïdes, les cellules dendritiques pulmonaires infectées par les mycobactéries sont incapables d'activer directement les lymphocytes T. En effet, seule la perception d'antigènes mycobactériens et/ou du microorganisme vivant par les cellules dendritiques ganglionnaires permet d'activer la réponse immunitaire adaptative (Wolf *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008).

Cette activation dépend de plusieurs signaux incluant (Figure I-9):

 La présentation de l'antigène mycobactérien aux récepteurs spécifiques des lymphocytes T (TCR) par l'intermédiaire des complexes majeurs d'histocompatibilité de type I et II (antigènes protéiques) et des protéines CD1 (antigènes lipidiques).

- l'interaction des protéines co-stimulatrices (CD40, CD80, CD86, ...) des cellules dendritiques matures et des protéines de surface (CD40L, CD28,...) des lymphocytes. Par opposition, la fixation de CD80/CD86 ou du PDL (Programme Death Ligand) des cellules dendritiques sur les récepteurs CTLA-4 (T-Lymphocyte Antigen 4) et PD-1 (Programme Death) empêche l'activation des lymphocytes T (Kaufmann et Parida, 2008; Schreiber et Sandor, 2010).

- la sécrétion de cytokines (IL-12, IL-6, IL-18, IL-23, IL-27...et le TGF-β) par les cellules dendritiques (Cooper et Khader, 2008; Cooper, 2009).



### Figure I-9 : Les trois signaux de recrutement et d'activation des lymphocytes T.

Le recrutement et l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) nécessitent trois signaux simultanés. (1) Les CPAs présentent aux lymphocytes naïfs des antigènes microbiens de nature peptidique grâce aux deux complexes majeurs d'histocompatibilités (CMH-I et -II), ou de nature lipidique grâce aux protéines CD1. Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  reconnaissent des antigènes microbiens phospholipidiques insérés dans la membrane des CPAs. (2) Les lymphocytes T CD4 peuvent se subdiviser en plusieurs cellules Th selon le type de cytokine secrétée. Les lymphocytes Th1 sont essentiels pour la protection contre la tuberculose. Ils produisent généralement l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , la LT, IL-2 et le GM-CSF. Les cellules Th2 stimulent la réponse immunitaire humorale via la sécrétion d'IL-4 et IL-5. Les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-6, IL-17, IL-21 et IL-22, qui contribuent sans doute à la protection précoce contre la maladie. Les cellules Treg produisent du TGF- $\beta$  et de l'IL-10, qui suppriment la réponse immunitaire. Les cytokines sont également importantes pour la polarisation de cellules CD4<sup>+</sup> en cellules Th. Ainsi, l'IL-12, IL-18 et IFN-γ promeuvent le développement des cellules Th1, IL-33 ainsi que l'IL-4 et IL-25 induisent le développement des cellules Th2, le TGF-β ainsi que l'IL-21 entrainent la polarisation vers la cellule  $T_{h17}$  chez l'homme, et le TGF- $\beta$  avec l'acide rétinoïque favorise la maturation des cellules. (3) Les lymphocytes doivent être co-stimulés par la reconnaissance de protéines membranaires (CD80, CD86, CD40...) présentes sur les cellules présentatrices activées. Si les CPAs et les lymhocytes T expriment des protéines membranaires de type PDL/PD ou CTLA-4, l'activation n'aura pas lieu. CTLA-4°: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; IFN-γ: Interféron gamma; IL°: Interleukine; PD°: Progamme Death; PDL°: Porgramme Death Ligand; LT°: Lymphotoxine; TNF :Tumor necrosis factor alpha; TGFβ :Tumor growth factor beta; Th°:T helper; Treg°:T régulateur (Kaufmann et Parida, 2008).

Suite à leur activation, les lymphocytes T se différencient en plusieurs populations cellulaires puis se multiplient (Figure I-9) (Cooper, 2009). La différenciation des lymphocytes T dépend du type d'interleukine sécrétée par les cellules dendritiques. La sécrétion des interleukines est fonction de la stimulation des différents récepteurs (récepteurs « Toll-like », récepteurs lectiniques...) (Jo, 2008; Schafer et al., 2009). A titre d'exemple, la fixation d'un antigène mycobactérien (lipomannane, motif CpG de l'ADN bactérien,...) sur le TLR-2 et/ou TLR9 des cellules dendritiques induit la sécrétion d'IL-12 (Bafica et al., 2005; Doz et al., 2007). La sécrétion d'IL-12 entraine la différenciation des lymphocytes naïfs en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, acteurs principaux de la réponse de type Th1. L'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> nécessite la présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I), alors que celle des lymphocytes CD8<sup>+</sup> est conduite par le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) (Harding et al., 1991; Ladel et al., 1995; Canaday et al., 1999). Là encore, les mycobactéries influencent grandement le type de CMH exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (Baena et Porcelli, 2009; Harding et Boom, 2010). En effet, les antigènes microbiens de nature peptidique présents dans le phagosome sont transmis au CMH-I, alors que ceux présents dans le cytosol sont chargés sur le CMH-II. En conséquence de la localisation phagosomale des mycobactéries, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont majoritairement activés au cours de l'infection tuberculeuse (Cooper et Khader, 2008; Cooper, 2009).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent aussi se différencier en deux autres souspopulations nommées lymphocytes Th17 et lymphocytes Treg (T-régulateur) (Figure I-9)(Belkaid et Tarbell, 2009; Korn *et al.*, 2009). La différenciation en lymphocytes Th17 est promue par la sécrétion de TGF- $\beta$  et l'IL-21 (interleukine sécrétée de manière autocrine par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) (Yang *et al.*, 2008). L'IL-6 et l'IL-23 (produites par les cellules dendritiques) favorisent aussi la différenciation des cellules Th1 en cellules Th17. Le TGF- $\beta$ et l'acide rétinoïque permettent la formation des lymphocytes Treg (Kaufmann et Parida, 2008).

En plus de ces cellules T  $CD4^+$  et T  $CD8^+$ , des lymphocytes T  $CD4^-/CD8^-$ (principalement des lymphocytes NKT) et des lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont stimulés respectivement par la reconnaissance d'antigènes lipidiques présentés par la protéine CD1 et par des phospholipides mycobactériens de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (Figure I-9)(Tanaka *et al.*, 1995; Hayday, 2000; Brigl et Brenner, 2004; Kronenberg, 2005). Une fois l'activation, la différentiation et l'expansion des lymphocytes T finalisées, ces cellules migrent dans les poumons entre le 15<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour après l'infection.

La phase d'activation et de développement de la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire dans le cas d'une infection tuberculeuse prend beaucoup plus de temps qu'avec d'autres pathogènes intracellulaires (Cooper et Khader, 2008; Winslow *et al.*, 2008). Le lieu de l'infection et la spécificité du pathogène peuvent expliquer ce phénomène :

- Les mycobactéries arrivant dans les alvéoles pulmonaires sont principalement phagocytées par des macrophages, présents en plus grand nombre que les cellules dendritiques (Lohmann-Matthes *et al.*, 1994; Laskin et Cowin, 2001; Gordon et Read, 2002; Holt *et al.*, 2008). La rencontre plus tardive des mycobactéries avec les cellules dendritiques peut engendrer du retard dans l'établissement de la réponse immunitaire adaptative.

- Les macrophages et cellules dendritiques pulmonaires sont des cellules présentatrices d'antigènes peu efficaces pour les lymphocytes T naifs (von Garnier *et al.*, 2005; Kugathasan *et al.*, 2008). De plus, l'environnement des cellules dendritiques alvéolaires, comprenant notamment les macrophages et les protéines du surfactant pulmonaire, peut limiter leur capacité à répondre rapidement à l'infection (Holt *et al.*, 1993; Brinker *et al.*, 2003).

- Enfin, *M. tuberculosis* inhibe la migration et la maturation des cellules dendritiques en diminuant la production d'IL-12 et des récepteurs aux chimiokines CCL19 et CCL21, et en dérégulant l'expression des protéines costimulatrices et présentatrices d'antigènes de surface (Hanekom *et al.*, 2003; Briken *et al.*, 2004; Baena et Porcelli, 2009; Harding et Boom, 2010). Par conséquent, les cellules dendritiques immatures arrivant dans les organes lymphatiques sont incapables d'activer les lymphocytes T (Wolf *et al.*, 2007). Ce phénomène explique pourquoi l'activation de la réponse immunitaire adaptative n'est possible qu'après le transport de mycobactéries vivantes dans les ganglions lymphatiques, le développement d'une réponse inflammatoire locale et la reconnaissance d'antigènes mycobactériens par les cellules dendritiques ganglionnaires.(Chackerian *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008).

Le retard dans le développement et l'activation de la réponse immunitaire adaptative est une étape clé dans la multiplication et la dissémination de *M*.*tuberculosis* dans les poumons. L'activation des lymphocytes T au site d'infection permet d'enrailler la croissance des mycobactéries et de contenir les bacilles dans des granulomes matures.



# Figure I-10 : La réponse immunitaire adaptative et le granulome tuberculeux

La tuberculose induit principalement une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les lymphocytes T activés par les cellules présentatrices d'antigènes sécrètent de nombreuses cytokines impliquées dans l'expansion des lymphocytes (ex : IL-2) et l'activation des cellules de l'immunité innée (Ex : IFN-1). L'IL-17 régule également la production par les cellules endothéliales et macrophagiques de cytokines, chimiokines et protéines d'adhésion (ex : ICAM-1) permettant le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée (Ex : neutrophiles, macrophages) et des lymphocytes. Les lymphocytes T CD8 et cellules T restreintes au CD1 lysent directement les cellules infectées et les bacilles tuberculeux grâce à des enzymes lytiques (perforine, granulysine) et des protéines pro-apoptotiques (FAS/FASL). Ces événements entrainent une stabilisation de la croissance bactérienne et la inhibés par les lymphocytes Treg et Th2, ne suffisent pas à contenir les bacilles dans le granulome. IFN-y : Interféron gamma; IL°: Interleukine; ICAM-1 : Inter-Cellular Adhesion remplacés peu à peu par des lymphocytes T mémoires (T<sub>M</sub>), T régulateurs (Treg) et Th2. Lors de la phase de réactivation bactérienne, le petit nombre de lymphocytes T<sub>M</sub>, de surcroit contention des bacilles dans des granulomes. Durant de nombreuses années, les bacilles dormants restent au sein des granulomes dans lesquels les lymphocytes T effecteurs sont Molecule 1 PD°: Progamme Death; PDL°: Porgramme Death Ligand. {Kaufmann et Parida, 2008}

### d. Rôle des lymphocytes T dans la formation du granulome

Dans les poumons, les lymphocytes T sont également stimulés par la présentation des antigènes mycobactériens. Ce signal provoque une réaction locale des lymphocytes qui sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et lysent les cellules infectées et les mycobactéries (Figure I-10). La réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> joue un rôle central dans la protection contre l'infection tuberculeuse. Ils produisent une grande quantité d'interleukine-2 (IL-2) et d'IFN- $\gamma$  (Boom *et al.*, 1991; Tsukaguchi *et al.*, 1995; Millington *et al.*, 2007; Cooper, 2009). L'IL-2 est impliquée dans l'expansion de la population des lymphocytes en agissant comme un facteur de croissance (Hancock *et al.*, 1989). Comme décrit précédemment, l'IFN- $\gamma$  augmente le pouvoir microbicide des cellules phagocytaires infectées. D'ailleurs, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est corrélée avec l'arrêt de la croissance des mycobactéries dans les poumons (Cooper et Khader, 2008).

L'IFN- $\gamma$  est aussi produit par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pendant la phase chronique de l'infection (Lazarevic *et al.*, 2005). Durant la phase aigüe, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent plutôt un rôle cytotoxique en sécrétant la perforine et la granulysine (Lazarevic *et al.*, 2005; Stegelmann *et al.*, 2005).

Les lymphocytes T CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> possèdent également une activité lytique sur les macrophages. Ce mécanisme est différent de celui des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et met en jeu le système pro-apoptotique Fas/FasL (Stenger *et al.*, 1997; Thoma-Uszynski *et al.*, 2000). Les lymphocytes NKT (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) libèrent aussi la granulysine (Gansert *et al.*, 2003).

Une fois activés, les lymphocytes T $\gamma\delta$  sécrètent de la perforine, de la granulysine, de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et surtout de l'IL-17 (Figure I-10)(Tsukaguchi *et al.*, 1995; Tsukaguchi *et al.*, 1999). L'interleukine 17, également produite par les cellules Th17, n'a été étudiée que très récemment pour son rôle dans la protection contre l'infection tuberculeuse (Khader *et al.*, 2005; Khader *et al.*, 2007; Khader et Cooper, 2008). Pourtant, cette cytokine participe à de nombreuses fonctions dans la stimulation du système immunitaire en induisant notamment la sécrétion d'un grand nombre de cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ ...) et de chimiokines (IL-8, GRO- $\alpha$ , MCP-1, CXCL-10...) à partir de plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les macrophages (Korn *et al.*, 2009). La libération de cytokines/chimiokines provoque le remodelage du site de l'infection qui conduit au recrutement et à l'activation de neutrophiles (Ye *et al.*, 2001). Dernièrement, une étude a démontré le rôle de l'IL-17 dans la formation du granulome, puisqu'elle induit l'expression de

molécules d'adhésion sur les cellules phagocytaires et sur les lymphocytes (Okamoto Yoshida *et al.*, 2010). Aux vues de son rôle dans le développement du processus inflammatoire, cette cytokine joue un rôle prépondérant dans les maladies auto-immunes.

A l'opposé des cellules produisant l'IL-17, les lymphocytes Treg, et probablement des cellules Th2, inhibent le processus inflammatoire en sécrétant de l'IL-10, de l'IL-4 et du TGF- $\beta$  (Figure I-10) (Belkaid et Tarbell, 2009; Kaufmann, 2010). Ces trois cytokines antiinflammatoires bloquent l'activation des cellules de l'immunité innée ainsi que la différenciation des lymphocytes en cellules Th1. Les lymphocytes Treg et Th2 sont des régulateurs négatifs de la réponse inflammatoire au cours de l'infection (Figure I-10).

Chez l'homme, le granulome est une structure organisée dans laquelle les lymphocytes T forment une barrière cellulaire autour des cellules infectées et limitent la croissance des mycobactéries. En plus des lymphocytes T, un petit nombre de lymphocytes B s'accumulent dans des follicules lymphatiques ressemblant à des tissus lymphoïdes naissants (Ulrichs *et al.*, 2004). Ces derniers sont tributaires de chimiokines spécifiques et jouent certainement un rôle dans la régulation de l'immunité sur le site (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 2001; Kahnert *et al.*, 2007; Cooper, 2009; Maglione et Chan, 2009).

### 4. Maintien du granulome et réactivation

- a. Phase latente de l'infection : maintien du granulome ou réactivation dynamique
  - i. Maintien du granulome

Suite à sa formation, le granulome est néo-vascularisé grâce à une forte production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par les macrophages et neutrophiles (Figure I-4) (Saita *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2000; Alatas *et al.*, 2004). Au centre du granulome, les macrophages se transforment en cellules épithéloïdes et en macrophages spumeux (gorgés de lipides) ou fusionnent pour donner naissance à des cellules géantes multinuclées de Langherans (Ordway *et al.*, 2005; Puissegur *et al.*, 2007; Danila et Zurauskas, 2008; Peyron *et al.*, 2008). Des fibroblastes recrutés au cours de l'inflammation synthétisent une chape fibreuse composée de collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire qui entoure les cellules epithéloïdes et spumeuses (Kaarteenaho-Wiik *et al.*, 2007; Gonzalez-Avila *et al.*, 2009). En périphérie du granulome, se trouvent les cellules lymphocytaires (Russell, 2007).

Les mycobactéries persistent durant de nombreuses années, parfois toute une vie, au sein des granulomes. La diminution de l'oxygène et des nutriments ainsi que l'augmentation de monoxyde de carbone (CO) ou de monoxyde d'azote (NO) activent un opéron nommé Dos (Dormancy survival), qui régule le métabolisme des mycobactéries (Kumar *et al.*, 2007a; Kumar *et al.*, 2008; Rustad *et al.*, 2008; Shiloh *et al.*, 2008; Rustad *et al.*, 2009). L'activation de Dos entraine une répression des voies métaboliques impliquées dans la réplication des mycobactéries et une augmentation du métabolisme des lipides et du cholestérol, source principale de carbone et d'énergie dans le granulome (Boshoff et Barry, 2005; Miner *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010). A ce stade, les mycobactéries sont dites dormantes (Zhang, 2004; Ehlers, 2009).

S'il est vrai qu'une partie des bacilles sont dormants, des études suggèrent que les mycobactéries se répliquent tout au long de l'infection (Gill et al., 2009). Cette hypothèse est appuyée par l'efficacité des drogues antituberculeuses de première ligne, telle que l'isoniazide, qui ne sont actives que sur des bactéries en mode réplicatif (Stover et al., 2000). La réplication des mycobactéries durant la phase chronique induit une activation constante du système immunitaire qui détruit les bacilles dans le granulome (Figure I-11). La sécrétion constante de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires permet un renouvellement des cellules immunitaires (dont les macrophages) et le maintien des granulomes (Saunders et Britton, 2007; Barry *et al.*, 2009). D'ailleurs, certaines cytokines, telle que le TNF- $\alpha$ , sont indispensables au maintien des granulomes (Lin et al., 2007; Clay et al., 2008; Lin et al., 2010). A l'opposé, si tous les bacilles sont dormants, le système immunitaire non stimulé « a l'impression » que le pathogène est éliminé. Dans ce cas, les lymphocytes Treg (et Th2) inhibent le processus inflammatoire et les lymphocytes T sont remplacés par des lymphocytes T mémoires tout aussi actifs contre le pathogène mais en nombre moins important (Figure I-10 et I-11) (Kaufmann, 2010). Ainsi, la mise en dormance des mycobactéries a plutôt tendance à fragiliser le granulome. N'est-ce pas là la stratégie qu'emploie M. tuberculosis pour rendre les granulomes plus propices à la réactivation ?

Dans ces deux hypothèses (dormance ou réplication constante), le granulome est considéré comme une structure solide et étanche, rendant la fuite impossible pour les bacilles de *M. tuberculosis* (Figure I-11).



Figure I-11 : Hypothèses non exclusives et implications de la dormance ou de la réplication constante des bacilles lors de l'infection tuberculeuse latente.

Si les bacilles sont dormants pendant la phase chronique, le système immunitaire est moins stimulé et le granulome se fragilise. La fragilisation des granulomes est favorable à la phase de réactivation tuberculeuse. Si les bacilles se multiplient à l'intérieur des granulomes, le système immunitaire est actif et les cellules sont renouvelées. L'activation constante du système immunitaire permet de maintenir le granulome et empêche la dissémination des bacilles. Une déficience du système immunitaire entraine la rupture des granulomes et la libération des mycobactéries. Dans les deux hypothèses, le granulome est considéré comme une structure étanche peu dynamique qui contient les bacilles de *M. tuberculosis* durant de nombreuses années.

### ii. Réactivation dynamique

Récemment, des études proposent une vision plus dynamique de l'infection tuberculeuse latente (ou chronique) dans laquelle les granulomes se forment et se dégradent tout au long de l'infection (Figure I-12) (Caceres *et al.*, 2009). Selon cette hypothèse, les macrophages infectés par des mycobactéries en dormance sont capables de sortir du granulome (Cardona, 2009). De manière concordante, Cosma et collaborateurs ont démontré que le granulome est une structure cellulaire poreuse permissive aux cellules et aux mycobactéries (Cosma *et al.*, 2004; Cosma *et al.*, 2008). Les cellules phagocytaires infectés par les mycobactéries à l'extérieur d'un granulome sont capables de migrer au centre d'un granulome préexistant. Il est tout à fait possible que les macrophages infectés, en particulier les macrophages spumeux, sortent du granulome (Cardona, 2009). Les macrophages spumeux sont gorgés de lipides et constituent donc un réservoir énergétique nécessaire à la survie et à la multiplication de *M. tuberculosis* (Peyron *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2009). De plus, si l'on considère que les mycobactéries pathogènes sortent du phagosome et passent du cytosol de la cellule infectée au cytosol des cellules voisines, il est fort probable que les mycobactéries non dormantes puissent sortir du granulome (van der Wel *et al.*, 2007; Carlsson et Brown, 2009).

Une fois sortis du granulome, les macrophages spumeux infectés sont évacués par le liquide alvéolaire vers l'arbre bronchique supérieur où ils peuvent être avalés et détruits (Cardona, 2009). Quelques macrophages spumeux infectés pourront coloniser les voies bronchiques supérieures dans lesquelles se formeront de nouveaux granulomes suite à la réactivation des mycobactéries (Figure I-12). Les granulomes anciens ne contenant plus de bacilles sont progressivement éliminés. L'hypothèse de la réactivation dynamique explique plus concrètement comment l'isoniazide, actif contre les mycobactéries en mode réplicatif, réduit le nombre de granulomes pulmonaires et pourquoi les personnes infectées par la tuberculose possèdent des granulomes à différents stades de maturation (Behr *et al.*, 1999; Cardona, 2009). De plus, l'hypothèse de la réactivation dynamique implique que les personnes infectées de manière latente puissent transmettre la maladie à tout moment (Behr *et al.*, 1999; Tostmann *et al.*, 2008; Cardona, 2009). Enfin, en considérant les poumons dans leur ensemble, la réactivation dynamique explique pourquoi certains travaux ont caractérisé des mycobactéries en mode réplicatif et d'autres des bacilles dormants pendant l'infection latente (Munoz-Elias *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2009).



# Figure I-12 : Hypothèse de la réactivation dynamique lors de l'infection tuberculeuse latente.

1) Les macrophages spumeux (gorgés de lipides) infectés par les bacilles tuberculeux peuvent sortir du granulome. 2) La fuite des macrophages spumeux infectés entraine l'absence de bacilles dans le granulome, l'inhibition de la réponse immunitaire pro-inflammatoire et la disparition du granulome préexistant. 3) Les macrophages spumeux infectés sont drainés par le liquide alvéolaire et colonisent d'autres régions du poumon *via* l'arbre respiratoire. 4) Les bacilles dormants sont réanimés et la multiplication des mycobactéries conduit à la formation de nouveaux granulomes. 5) Une déficience du système immunitaire entraine la réactivation tuberculeuse.

### b. Réactivation finale

Chez les personnes immunodéprimées, la baisse d'efficacité du système immunitaire permet aux mycobactéries de croitre de façon plus importante. Ce processus est nommé réactivation tuberculeuse. Durant la lente réactivation, les mycobactéries en dormance sont réanimées par des facteurs nommés Rpf (Resuscitation-promoting factors). Les Rpfs sont des enzymes sécrétées par les mycobactéries en mode réplicatif qui hydrolysent le peptidoglycanne bactérien et relancent la multiplication des cellules dormantes (Russell-Goldman et al., 2008; Cardona, 2009; Kana et Mizrahi, 2010). Les mycobactéries se multiplient dans le granulome qui devient alors nécrotique en son centre, caséifie puis s'effondre. La multiplication des mycobactéries engendre la mort des cellules phagocytaires et la nécrose au centre du granulome (Fayyazi et al., 2000). La caséification correspond à l'accumulation de lipides (cholesterol, triglycerides, phospholipides). Au cours de l'infection, les macrophages se transforment en macrophages spumeux suite à l'accumulation de vésicules saturées en lipides (gouttelettes lipidiques) dans leur cytoplasme. L'apparition de gouttelettes lipidiques dans les macrophages est induite par M. tuberculosis qui augmente la production de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique du macrophage (Kim et al., 2010). Ces protéines interviennent notamment dans la biosynthèse des acides gras à longues chaines, la séquestration du cholestérol ou encore le catabolisme des sphingolipides. Les mycobactéries en mode réplicatif utilisent les lipides comme source principale de carbone et d'énergie dans le granulome (Cook et al., 2009; Singh et al., 2009; Eisenreich et al., 2010). L'utilisation nutritionnelle des lipides de l'hôte en milieu hypoxie conduit à la synthèse de triglycérides et de lipides/glycolipides pariétaux par les mycobactéries, qui augmentent la virulence des bacilles (Singh et al., 2009). La réplication des mycobactéries entraine la mort des cellules spumeuses (nécrose du granulome) et la libération de gouttelettes lipidiques au centre du granulome (caséification) (Russell et al., 2009). La pneumopathie lipidique est symptomatique de la caséification. Par la suite, la maladie progresse vers une nécrose massive et la formation de cavités pulmonaires : la tuberculose secondaire (Hunter et al., 2006; Ehlers, 2009). Les personnes suffisamment immunocompétentes pour contenir l'infection dans les poumons développent une infection pulmonaire et meurent d'une insuffisance respiratoire (Hunter et al., 2006). Chez les patients immunologiquement trop faibles, les mycobactéries peuvent disséminer dans tout l'organisme.

### 5. Conclusion

La formation du granulome est un événement important de la pathologie tuberculeuse. Dans un premier temps, *M. tuberculosis* inhibe la réponse immunitaire innée et ralentit le recrutement de l'immunité adaptative. Durant cette période les bacilles se multiplient dans les poumons de façon exponentielle. Suite à l'activation de l'immunité adaptative, la croissance bactérienne est stoppée et les granulomes se forment. Ces derniers servent à contenir la prolifération des mycobactéries et restreindre l'infection aux poumons. Dans le granulome, le manque d'oxygène et de nutriments entraine la mise en dormance de nombreux bacilles de *M. tuberculosis*. Dans la majorité des infections chroniques, le système immunitaire est suffisant pour contenir le pathogène dans les granulomes durant toute une vie. Lors d'une déficience du système immunitaire, les bacilles dormants sont réanimés et le granulome nécrose, caséifie puis s'effondre. Les mycobactéries sont libérées dans l'organisme et colonisent d'autres organes, ce qui entraine la mort de l'individu infecté.

La formation des granulomes n'est pas une spécificité de la réponse immunitaire contre *M. tuberculosis*. En effet, les mycobactéries provoquant des mycobactérioses se multiplient également dans les cellules de l'hôte et induisent une réponse granulomateuse.

La plupart des études sur l'immuno-pathologie tuberculeuse ont été réalisées chez la souris. Aujourd'hui encore, ce modèle permet de découvrir de nombreux médiateurs immunologiques impliqués dans la défense contre les mycobactéries et dans l'instauration des granulomes (Ex : IL-17). Cependant, les granulomes retrouvés dans la souris infectée par *M. tuberculosis* ou *M. bovis* BCG présentent des différences en comparaison de ceux identifiés chez l'Homme. En effet, alors que les granulomes humains sont paucibacillaires, les lésions murines contiennent de nombreuses mycobactéries. De plus, les granulomes murins sont désorganisés en conséquence de l'infiltration des lymphocytes au centre des lésions (Rhoades *et al.*, 1997). La chappe fibreuse est remplacée par une fine couche de fibrine qui s'accumule en périphérie (Rhoades *et al.*, 1997). Contrairement à d'autres modèles animaux, aucune diminution de la tension en oxygène ni aucune néo-vascularisation des granulomes n'ont pu être observées chez la souris (Aly *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2006; Via *et al.*, 2008). Enfin, les granulomes murins ne nécrosent et ne caséifient pas comme chez l'Homme (Tsai *et al.*, 2006). Ainsi, la plupart des évènements caractéristiques des granulomes et de la pathologie tuberculeuse humaine sont absents dans le modèle murin. Une des raisons évoquées serait que la souris n'est pas un hôte naturel de *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG.

Afin d'étudier plus précisément les granulomes, les recherches se sont tournées vers d'autres modèle animaux incluant le lapin, le cochons d'Inde et le macaque (Rustad *et al.*, 2009). Dans ces modèles, les granulomes ont les mêmes caractéristiques que les lésions observées chez l'Homme. Cependant, l'utilisation de ces modèles est difficile en raison de leur susceptibilité variable à l'infection par *M. tuberculosis*, du manque d'outils biologiques disponibles, du coût de l'élevage, ou des problèmes d'éthiques. Par conséquent, ces modèles ont été relayés par le développement d'hôtes alternatifs comme le modèle du poisson zèbre (*Danio rerio*), infecté naturellement par *M. marinum* (Pozos et Ramakrishnan, 2004).

## C. *Mycobacterium marinum et Danio rerio :* modèle pathogène/ hôte dans l'étude du granulome

### 1. Mycobacterium marinum

### a. Les mycobactéries modèles dans l'étude de la tuberculose

Bien que les études directes sur le pathogène Mycobacterium tuberculosis soient nécessaires pour comprendre sa virulence, elles sont en pratique difficilement réalisables pour deux raisons majeures : la première est que Mycobacterium tuberculosis est un pathogène hautement infectieux qui nécessite pour son étude un laboratoire de haute protection (niveau 3) ; la seconde est qu'avec un temps de génération de 22 heures, Mycobacterium tuberculosis croît très lentement en milieu de culture et environ trois semaines sont nécessaires pour visualiser une colonie (O'Toole, 2010). Pour ces raisons et depuis très longtemps, de nombreuses mycobactéries moins pathogènes, plus ou moins proches génétiquement de M. tuberculosis, ont été utilisées afin d'étudier la tuberculose (O'Toole, 2010). Trois mycobactéries modèles, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium bovis (souche BCG) et Mycobacterium marinum, sont aujourd'hui préférentiellement utilisées en laboratoire (Shiloh et DiGiuseppe Champion, 2010). Mycobacterium smegmatis est une mycobactérie saprophyte nichant dans le sol qui est considérée comme étant non virulente. Avec un temps de génération de 4 heures et une très faible pathogénicité chez l'homme, cette mycobactérie permet d'obtenir une grande quantité de matériel biologique en utilisant un laboratoire de protection minimum (niveau 1). M. smegmatis possède également l'avantage d'être facilement manipulable génétiquement ce qui autorise, la production de protéines mycobactériennes recombinantes (Daugelat et al., 2003; Zhang et al., 2009). Cette mycobactérie est aussi souvent utilisée pour étudier les gènes de ménage mycobactériens ou l'activité de gènes spécifiques à M. tuberculosis suite à leurs insertions dans M. smegmatis (Reyrat et Kahn, 2001). Cependant, la validité de ce modèle dans l'étude de la tuberculose est souvent remise en cause car M. smegmatis est incapable de survivre dans des cellules phagocytaires *in vitro* ou de provoquer une infection *in vivo* chez la souris (Reyrat et Kahn, 2001; Anes et al., 2006; Jordao et al., 2008). La souche BCG de M. bovis est une souche atténuée de M. bovis qui est à la base des vaccins contre la tuberculose. Sa croissance en milieu de culture est aussi lente que celle de M. tuberculosis mais un laboratoire de protection modérée (niveau 2) suffit pour cultiver cette mycobactérie. Ces restrictions expérimentales moins importantes ont conduit à l'utilisation préférentielle de M. bovis BCG pour infecter le

modèle murin. Enfin, *M. marinum* est une mycobactérie pathogène génétiquement proche du complexe des mycobactéries de *Mycobacterium tuberculosis* (Cf. Figure I-2) qui n'a été utilisée comme modèle de la tuberculose que très récemment (Tonjum *et al.*, 1998). Cette mycobactérie possède beaucoup d'avantages expérimentaux incluant notamment une faible pathogénicité pour l'homme et un temps de génération en culture trois fois plus rapide que *M. tuberculosis*. En quelques années, *M. marinum* s'est révélé être un modèle remarquable notamment dans l'étude des étapes précoces de la réponse granulomateuse et des facteurs de virulence mycobactériens. Dans les chapitres suivants, nous exposerons les similarités entre *M. tuberculosis* et *M. marinum* qui ont conduit à l'utilisation de cette dernière pour la compréhension de la tuberculose.

### b. Découverte de M. marinum

*M. marinum* est une mycobactérie pathogène atypique génétiquement proche de *Mycobacterium tuberculosis* (Tonjum *et al.*, 1998). Elle fut découverte pour la première fois en 1926 comme l'agent tuberculeux d'un poisson tropical de l'aquarium de Philadelphie (Aronson, 1926). *M. marinum* possède une température optimale de croissance comprise entre 25 et 35°C et n'est donc pas capable, sauf exception, de croître à 37°C comme le fait *M. tuberculosis*. En conséquence de sa faible température de croissance, *M. marinum* provoque des ulcérations cutanées dans des souris infectées mais n'est pas capable de s'installer dans les organes internes (Collins *et al.*, 1975). Par contre, une dissémination est observée lors de l'infection d'animaux poïkilothermes (dits « à sang froid »), tels que les poissons, les amphibiens et les reptiles, ou dans des souris dont la température corporelle à été baissée (Clark et Shepard, 1963).

Trente années après sa découverte dans le poisson, *M. marinum* fut redécouverte, sous le nom de *Mycobacterium balnei*, comme un pathogène humain, provoquant des lésions granulomateuses cutannées, contractées dans les piscines publiques (Linell et Norden, 1954). Des infections tuberculeuses de la peau, attrapées à la piscine, avaient déjà été décrites par Hellerström dès 1939 (Greenberg et Kupka, 1957). Ces infections ont donc été nommées « granulome des piscines » puis plus récemment « granulome des aquariums ». La transmission du pathogène s'effectue par contact de la peau (souvent blessée) avec une eau contaminée, un poisson déjà infecté, voire même par les griffes d'un chat. L'infection est principalement limitée chez les sujets immunocompétents au niveau de la peau et se caractérise par l'apparition de granulomes au site même de l'infection (Aubry *et al.*, 2000;

Bhatty *et al.*, 2000; Galdiero *et al.*, 2005; Cennimo *et al.*, 2009; Phan et Relic, 2010). Ponctuellement, l'infection peut atteindre des tissus plus profonds comme les tendons, les articulations ou les os, notamment lors d'une absence de traitement prolongé ou lorsque les personnes ont un système immunitaire affaibli (Clark *et al.*, 1990; Aubry *et al.*, 2000; Lahey, 2003; Lee *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2007; Sivan *et al.*, 2008; Sanal *et al.*, 2009). Dans de rares cas et uniquement chez les patients immunodéprimés, *M. marinum* peut disséminer dans tout l'organisme et conduire à la mort de la personne infectée (Lacaille *et al.*, 1990; Tchornobay *et al.*, 1992; Vazquez et Sobel, 1992; Parent *et al.*, 1995; Holmes *et al.*, 1999; Gould *et al.*, 2004; Streit *et al.*, 2006; Pandian *et al.*, 2008).

Du fait des infections principalement cutanées qu'elle provoque chez l'homme et de sa température optimale de croissance assez basse, *M. marinum* fut dans un premier temps rapprochée de *Mycobacterium leprae* et proposée comme mycobactérie modèle dans l'étude de la lèpre (Clark et Shepard, 1963; Shepard et Habas, 1967; Ng *et al.*, 1973). Cependant, en l'absence de similitudes plus poussées entre les deux mycobactéries, ces études furent rapidement arrêtées (Collins *et al.*, 1975). Il faudra ensuite attendre les années 1990 pour que *M. marinum* soit proposé comme mycobactérie modèle dans l'étude de la tuberculose (Ramakrishnan et Falkow, 1994).

# c. Comparaison des granulomes induits par *M. marinum* et *M. tuberculosis*

L'intérêt de *M. marinum* en tant que pathogène modèle de la tuberculose a émergé suite à l'observation microscopique des « granulomes des aquariums » (Ramakrishnan et Falkow, 1994). En effet, les granulomes causés par *M. marinum* chez l'Homme sont indiscernables de ceux retrouvés lors d'une infection cutanée causée par *M. tuberculosis* (Travis *et al.*, 1985; Gluckman, 1995; MacGregor, 1995). Plus encore, les « granulomes des aquariums » ressemblent en de très nombreux points à ceux observés dans les poumons humains infectés par *M. tuberculosis* (Figure I-13). En particulier, les granulomes sont constitués de différents types de cellules (cellules phagocytaires, neutrophiles, lymphocytes), d'un faible nombre de bacilles et de centres nécrotiques (Figure I-13) (Stamm et Brown, 2004).

Comme décrit précédemment, *M. marinum* est capable d'infecter la souris et d'entrainer la formation de granulomes (Robinson *et al.*, 2007). Pour certains auteurs, l'infection de souris immunocompétentes reste localisée au niveau cutané en accord avec sa
température optimale de croissance bien inferieure à 37°C (Collins *et al.*, 1975). D'autres études décrivent au contraire que *M. marinum* peut disséminer dans des organes internes comme le foie ou la rate de souris immunocompétentes (Kent *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2007). De manière intéressante, les granulomes causés par *M. marinum* et par *M. tuberculosis* dans les organes des souris sont similaires (Robinson *et al.*, 2007).

Chez les animaux ectothermes, M. marinum provoque des infections systémiques caractérisées par l'apparition de granulomes localisés dans les organes internes. Certains de ces animaux comme les grenouilles ou les poissons sont faciles à élever et à manipuler en laboratoire (Cosma et al., 2006). Les granulomes observés dans les grenouilles ou dans les poissons exhibent de réelles ressemblances histologiques avec ceux retrouvés dans les poumons des Hommes infectés par M. tuberculosis (Pozos et Ramakrishnan, 2004). Dans la grenouille léopard (Rana pipiens), M. marinum provoque une infection asymptomatique qui se développe tout au long de la vie de l'animal. Les granulomes sont hautement organisés au niveau cellulaire mais ne nécrosent pas en leur centre (Ramakrishnan et al., 1997; Bouley et al., 2001). Chez le poisson, l'infection chronique est symptomatique et se manifeste notamment par l'apparition de granulomes dans de nombreux organes incluant le foie, les reins, la rate, le pancréas et les gonades (Figure I-13) (van der Sar et al., 2004a). Dans certains poissons, dont le poisson rouge (Carassius auratus), le bar rayé (Morone saxatilis), le médaka (Oryzias latipes) et le poisson zèbre (Danio rerio), les granulomes caséifient et nécrosent en leur centre, évoquant ceux induits par M. tuberculosis chez l'homme (Figure I-13) (Talaat et al., 1998; Gauthier et al., 2004; Stamm et Brown, 2004; Swaim et al., 2006; Broussard et Ennis, 2007). Cependant, alors que les granulomes humains causés par M. marinum sont constitués de nombreux lymphocytes, ceux dans Rana pipiens et de Danio rerio n'en possèdent que très peu (Bouley et al., 2001; Swaim et al., 2006). Toutefois, comme chez l'Homme, la réponse immunitaire adaptative dans ces animaux est essentielle pour contrôler l'infection et protéger contre d'éventuelles réinfections (Cosma et al., 2004; Swaim et al., 2006).

Par conséquent, la nécrose au centre du granulome et/ou la présence de nombreux lymphocytes dans les agrégats semble plus dépendre de l'espèce hôte infectée que d'une différence de pathogénicité entre *M. marinum* et *M. tuberculosis* (Tobin et Ramakrishnan, 2008). Dans la pathologie humaine, les lymphocytes jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les bacilles tuberculeux. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le faible recrutement de lymphocytes lors de l'infection mycobactérienne des poissons et des grenouilles (Ramakrishnan, 2004). La première hypothèse suggère que chez l'Homme, la

réponse immunitaire adaptative contre *M. tuberculosis* est exacerbée et conduit au recrutement de nombreux lymphocytes dans les granulomes. Selon la seconde hypothèse, les animaux ectothermes peuvent contrôler l'infection mycobactérienne en recrutant moins de lymphocytes mais d'une efficacité supérieure à ceux de l'Homme (Ramakrishnan, 2004).

Pour conclure, *M. marinum* et *M. tuberculosis* induisent chez leurs hôtes respectifs des réponses granulomateuses similaires, ce qui rend attractif l'utilisation de *M. marinum* comme modèle d'étude la tuberculose.



**Figure I-13 :** Granulomes nécrotiques en leur centre (flèches) retrouvés (A) dans les poumons d'un Homme infecté par *M. tuberculosis*, (B) sur la peau d'un Homme infecté par *M. marinum* et (C) dans les gonades d'un poisson zèbre infecté par *M. marinum*.

d. Comparaison de la vie intracellulaire de *M. marinum* et de *M. tuberculosis* 

Tout comme *M. tuberculosis, M. marinum* est capable de survivre et de se multiplier à l'intérieur de cellules macrophagiques (Ramakrishnan et Falkow, 1994; Barker *et al.*, 1997; El-Etr *et al.*, 2001; van der Sar *et al.*, 2004a). Suite à son entrée dans des cellules phagocytaires de mammifères ou de poissons, *M. marinum* inhibe la fusion phagolysosomale comme le démontre sa localisation dans des phagosomes non acidifiés (Barker *et al.*, 1997; El-Etr *et al.*, 2001). Les mécanismes inhibiteurs mis en jeu sont vraisemblablement similaires entre les deux mycobactéries pathogènes, ce qui valide encore l'utilisation *M. marinum* ne pousse en milieu de culture qu'à une température inférieure à 37°C (Clark et Shepard, 1963; Kent *et al.*, 2006). Par conséquent, la survie et la réplication de *M. marinum* dans les cellules phagocytaires de mammifères n'est possible qu'à une température restreinte à 33°C (Ramakrishnan et Falkow, 1994; Barker *et al.*, 1997; El-Etr *et al.*, 2001; van der Sar *et al.*, 2004a; Mehta *et al.*, 2006).

Des études récentes ont montré que M. marinum est capable de s'échapper du compartiment phagosomal pour accéder au cytosol des cellules phagocytaires infectées (Stamm et al., 2003). Ce mécanisme permettrait ensuite aux mycobactéries de passer de cellule en cellule sans être exposées au milieu extracellulaire (Carlsson et Brown, 2009). En accord avec cette idée, une minorité de bacilles de M. marinum peuvent activer la polymérisation de l'actine et se rendre motiles dans le cytosol (Stamm et al., 2003; Stamm et al., 2005). L'évasion de M. tuberculosis du phagosome des cellules phagocytaires infectées reste une hypothèse très controversée. Pourtant, la présence de M. tuberculosis dans le cytosol de macrophages et de cellules dendritiques a été observée à plusieurs reprises (Myrvik et al., 1984; McDonough et al., 1993; van der Wel et al., 2007). Le mécanisme mis en jeu dans l'évasion des mycobactéries du phagosome vers le cytosol n'est pas encore bien défini. Cependant, dans les deux espèces mycobactériennes, ce processus implique le système de sécrétion ESX-1 (manquant dans la souche BCG atténuée de M. bovis) qui permet la sécrétion de certaines protéines virulentes et antigéniques comme ESAT-6 et CFP-10 (van der Wel et al., 2007; Smith et al., 2008). Les protéines sécrétées, et en particulier ESAT-6, pourraient ainsi jouer un rôle dans la lyse de la membrane phagosomale et permettre la libération des mycobactéries dans le cytoplasme (Cf. Figure I-7) (Gao et al., 2004; van der Wel et al., 2007; Smith *et al.*, 2008).

Contrairement à *M. marinum*, *M. tuberculosis* ne semble pas être capable, une fois arrivée dans le cytosol, d'induire la polymérisation de l'actine. Néanmoins, considérant la faible proportion de bacilles de *M. marinum* qui deviennent motiles, il est possible que ce phénomène ne soit pas indispensable pour passer de cellule en cellule (Stamm *et al.*, 2003; Stamm et Brown, 2004). Il pourrait plutôt s'agir d'un processus adaptatif qui permettrait à *M. marinum* d'infecter spécifiquement ses hôtes par le tractus gastrointestinal (Stamm et Brown, 2004; Harriff *et al.*, 2007).

#### e. Comparaison des génomes de M. marinum et M. tuberculosis

Le séquençage et l'annotation du génome de *M. marinum* ont récemment été finalisés. Le génome de *M. marinum* est compris dans un chromosome circulaire de 6 636 827 paires de bases et comporte 5424 séquences codantes pour des protéines (Stinear *et al.*, 2008). De par son génome, *M. marinum* est le plus proche parent de *M. ulcerans*, responsable de l'ulcère de Burili (Stinear *et al.*, 2007). Cette maladie est la troisième cause de mort par infection mycobactérienne et touche principalement l'Afrique de l'Ouest (Johnson *et al.*, 2005; van der Werf *et al.*, 2005). Elle se caractérise par une nécrose lente et étendue des tissus sous-cutanés des personnes infectées. La maladie est associée à la vie à proximité d'eau stagnante et marécageuse où des insectes pourraient transmettre la mycobactérie (Silva *et al.*, 2007). La pathogénicité spécifique de *M. ulcerans* s'explique par la production d'une toxine immunosuppressive unique permettant une dissémination progressive des mycobactéries chez la personne infectée (Silva *et al.*, 2009). En effet, il semble que *M. ulcerans* ait évolué à partir de *M. marinum* en acquérant les gènes permettant la biosynthèse de la toxine appelée mycolactone A/B (Silva *et al.*, 2009).

La comparaison de l'ARN 16S de nombreuses espèces de mycobactéries a aussi permis d'établir que *M. marinum* est le plus proche parent des mycobactéries du complexe de *M. tuberculosis* (Tonjum *et al.*, 1998; Gey van Pittius *et al.*, 2006). La comparaison récente des génomes de *M. marinum* et *M. tuberculosis* démontre que le génome de *M. marinum* possède 80% de gènes orthologues à *M. tuberculosis* avec une identité en acides aminés de 85% (Stinear *et al.*, 2008). Par conséquent, la plupart des outils génétiques (vecteurs, transposons) développés pour *M. tuberculosis* sont adaptés aux études sur *M. marinum* (Tobin et Ramakrishnan, 2008).

Néanmoins, le génome de *M. marinum* est plus grand que celui de *M. tuberculosis* d'environ 2 200 000 paires de bases. Selon Stinear et collaborateurs, *M. tuberculosis* aurait dérivé de son ancêtre (commun avec *M. marinum*) en réduisant son nombre de gènes suite à l'abandon d'une niche environnementale et à une spécialisation dans la survie d'un hôte unique, l'Homme (Stinear *et al.*, 2008). De plus, *M. tuberculosis* possède 8% de génome unique qui proviendrait d'un transfert de gènes latéral de prophages ou de plasmides bactériens. Cependant, seuls quelques gènes spécifiques à *M. tuberculosis* ont été identifiés comme pouvant influencer sa virulence (Stinear *et al.*, 2008; Tobin et Ramakrishnan, 2008). En fait, la plupart des gènes connus comme étant impliqués dans la virulence de *M. tuberculosis* sont conservés dans *M. marinum* (Stinear *et al.*, 2008).

#### f. Conclusion

En dépit de quelques différences dues à l'adaptation à sa niche environnementale, *M. marinum* est un modèle de substitution très prometteur pour l'étude des pathologies induites par *M. tuberculosis*. Premièrement, *M. marinum* est génétiquement proche de *M. tuberculosis* et possède la plupart des gènes de virulence impliqués dans la pathologie tuberculeuse. D'ailleurs, la présence et/ou l'activité des molécules codées par les gènes de virulence dans

*M. marinum* sont déjà avérées pour bon nombre d'entre elles (Tobin et Ramakrishnan, 2008). Deuxièmement, *M. marinum* se cultive plus facilement et plus rapidement en laboratoire que *M. tuberculosis* et ne nécessite pas la mise en place de nouveaux outils génétiques. Troisièmement, *M. marinum* cause chez ses hôtes, l'Homme y compris, des granulomes comparables à ceux de provoqués par *M. tuberculosis*. Tous ces facteurs font de *M. marinum* la mycobactérie de choix pour étudier la tuberculose de la phagocytose au granulome mature aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans ses hôtes naturels.

#### 2. Le poisson zèbre (Danio rerio)

#### a. Les hôtes expérimentaux de M. marinum

Comme décrit précédemment, l'utilisation de M. marinum permet d'étudier l'implication des différents facteurs de virulence mycobactériens associés à l'infection tuberculeuse. Autour de cette mycobactérie, de nouveaux hôtes expérimentaux ont été développés afin d'étudier la réponse immunitaire dans les différentes étapes de l'infection tuberculeuse. La phagocytose, la réponse immunitaire innée, la formation du granulome, et la latence mycobactérienne peuvent être étudiées dans Dictyostellium discoideum, Drosophila melanogaster, Danio rerio et Rana pipiens. L'amibe du sol Dictyostellium discoideum est un organisme unicellulaire haploïde qui peut être considéré comme un modèle de « macrophage » génétiquement modifiable. Cet organisme est utilisé pour étudier la phagocytose et la survie de pathogènes intracellulaires comme Pseudomonas aeruginosa, legionella pneumophila et plus recemment M. avium et M. marinum. L'infection de Dictyostellium discoideum par des mycobactéries mutées permet d'identifier facilement les facteurs impliqués dans la survie intracellulaire des mycobactéries. De plus, l'infection mycobactérienne d'amibes mutés par exemple dans les gènes de la phagocytose permet de sélectionner facilement les composants de l'hôte impliqués dans la susceptibilité ou la résistance aux mycobactéries (Steinert et Heuner, 2005). Drosophila melanogaster, ou mouche à vinaigre, est un hôte modèle largement utilisé pour la compréhension du système immunitaire inné. Les cellules « macrophagiques » de Drosophila melanogaster sont utilisées afin d'étudier les récepteurs et les mécanismes de défense impliqués dans la phagocytose des mycobactéries (Philips et al., 2005; Koo et al., 2008).

Enfin, le poisson zèbre (*Danio rerio*) et la grenouille léopard (*Rana pipiens*) autorisent l'étude de la réponse granulomateuse dans son ensemble. Alors que l'infection chronique peut être analysée dans le poisson zèbre adulte et dans la grenouille léopard, les embryons de poisson zèbre offrent un modèle unique dans la compréhension de la phase aigüe de l'infection incluant la formation des granulomes.

#### b. Présentation du poisson zébré

Danio rerio, dit le poisson zèbre, est un petit poisson ovipare d'eau douce, populaire chez les aquariophiles, originaire de l'Inde, du Pakistan et du Bhoutan. Avec ses cousins que sont la carpe (Cyprinus carpio) et le poisson rouge (Carassius auratus), Danio rerio fait partie des poissons osseux téléostéens de la famille des Cyprinidés. Le poisson zèbre ne mesure que 2 à 5 centimètres de long, et arbore sur son corps des bandes horizontales bleues et argentées. Ce poisson est facile à élever car il se reproduit aisément (jusqu'à 200 œufs par femelle par semaine), ne demande pas beaucoup d'espace, et ne coute pas cher à nourrir. Il y a une trentaine d'années, certains biologistes se sont rendu compte du formidable potentiel de ce poisson dans l'étude du développement des vertébrés (Streisinger et al., 1981). Les embryons du poisson se développent ex utero en 24 heures et l'organogenèse est terminée dans la larve au bout de 72 heures. Durant tout ce temps, les embryons et les larves sont optiquement transparents et donc facilement observables par microscopie. Les manipulations génétiques et chimiques sont amplement réalisables notamment pendant le stade embryonnaire et permettent par exemple d'étudier le rôle d'un gène ou l'impact de sa nonexpression dans le développement du poisson. Enfin, Danio rerio possède un système immunitaire inné et adaptatif apparenté à celui des mammifères qui lui vaut d'être un organisme modèle dans l'ontogénie du système immunitaire des vertébrés, mais aussi un hôte pertinent pour être infecté par différents pathogènes bactériens et viraux, incluant Mycobacterium marinum (Traver et al., 2003; Trede et al., 2004; van der Sar et al., 2004b).

#### c. Génétique et génomique

Le génome *de Danio rerio*, en cours de séquençage et d'annotation, est compris dans 25 chromosomes et comporte 2,082,218,721 paires de bases (<u>http://www.sanger.ac.uk/Projects/D\_rerio/</u>). Les nombreuses banques de données d'étiquettes d'expression de séquence (EST) et le développement des puces à ADN permettent d'identifier les gènes exprimés dans les différents tissus et cellules (Mathavan *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2009). Les premières comparaisons génétiques démontrent que le poisson zèbre possède de nombreux gènes orthologues à ceux des mammifères avec conservation de la synténie (Barbazuk *et al.*, 2000). Cependant, suite à un événement de duplication du génome des poissons téléostéens, de nombreux paralogues sont présents dans le génome de *Danio rerio* (ex : il existe deux gènes pour la cytokine TNF codants pour TNF-a et TNF- $\alpha$ ). Ces gènes paralogues sont soit co-exprimés dans les tissus ou les cellules, soit au contraire exprimés de manière tissus- ou cellules-spécifiques.

Le poisson zèbre offre la possibilité d'utilisation de nombreux outils et de nombreuses méthodes génétiques (Dahm et Geisler, 2006). La facilité d'élevage ainsi que le développement rapide et observable des poissons permet d'identifier rapidement des mutants d'intérêt. La mutagenèse peut être réalisée par mutation insertionelle ou chimique. A l'inverse, il est aussi possible d'identifier le rôle d'un gène sélectionné au cours d'un événement en l'inhibant transitoirement par injection de morpholinos (molécules anti-sens) dans l'organisme. Les morpholinos vont permettre d'inhiber l'expression du gène suffisamment longtemps (pendant environ cinq jours) pour en percevoir les conséquences au cours du développement de l'organisme ou au cours d'une infection. Les embryons permettent aussi d'étudier la fonction des gènes par des expériences de transgénèse tels que les micro-injections d'ADN plasmidique (Gilmour *et al.*, 2002). Généralement, ces expériences sont réalisées pendant le stade unicellulaire de l'embryon. Ainsi, il est possible de créer des lignées stables de poissons transgéniques possédant des transgénes associés à des promoteurs inductibles ou à des gènes rapporteurs comme la GFP fluorescent (Gilmour *et al.*, 2002).

#### d. Système immunitaire

Tout comme les mammifères, le poisson zèbre possède un système immunitaire inné et adaptatif (Traver *et al.*, 2003; van der Sar *et al.*, 2004b; Meeker et Trede, 2008). Le système immunitaire inné est composé de cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques), de granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) et de cellules NK (Natural Killer) qui apparaissent respectivement dans l'embryon 24 et 48 heures post-fécondation (van der Sar *et al.*, 2004b; Moss *et al.*, 2009). Les récepteurs lectiniques (récepteur à mannose et DC-SIGN) indispensables à la reconnaissance et la phagocytose des mycobactéries sont présents sur les cellules présentatrices d'antigènes. *Danio rerio* possède aussi un système du complément similaire à celui de l'homme qui peut aussi être activé par la voie classique, la voie alternative ou par la voie lectinique (Mannose binding lectin) (Traver *et al.*, 2003; Boshra *et al.*, 2006). Pourtant, le récepteur du complément CR3 qui tient un rôle important dans la phagocytose de *M. tuberculosis* chez l'homme n'a pas encore été caractérisé au niveau

moléculaire dans le poisson zèbre (Traver *et al.*, 2003; Boshra *et al.*, 2006; Mikrou *et al.*, 2009). Enfin, les « Toll-like » et « Nod-like» récepteurs (TLR, NLR) impliqués dans la reconnaissance des biomolécules pathogéniques et dans la signalisation de l'immunité innée ont été en grande majorité identifiés (Meijer *et al.*, 2004; Laing *et al.*, 2008). L'immunité adaptative du poisson zèbre comprend la présence des lymphocytes T et B qui commencent à apparaitre dans l'embryon 72 heures post fécondation. Comme pour les mammifères, les récepteurs des lymphocytes T (TCR) ou B (BCR) et les immunoglobulines (Ig) sont exprimés suite au réarrangement de leurs gènes par les recombinases *rag* (van der Sar *et al.*, 2004b).

Enfin, les cellules du poisson zèbre sécrètent des cytokines, chimiokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-10, l'IL-12, le TGF- $\beta$  ou encore l'IFN, et expriment des antigènes de surface tels que ICAM-1.

## 3. Le modèle du poisson zèbre dans la pathogénèse mycobactérienne

Le poisson zèbre est naturellement susceptible à la tuberculose causée par M. marinum. Les bacilles de M. marinum phagocytés par les macrophages du poisson se répliquent dans ces cellules et induisent la formation de granulome d'une façon identique à la pathologie humaine. La mise en jeu des réponses immunitaires innée et adaptative du poisson lors de l'infection par M. marinum rapproche encore le modèle de la tuberculose humaine. A titre d'exemple, comme chez l'Homme infecté par M. tuberculosis, l'expression des TLRs du poisson est augmentée suite à l'infection par M. marinum (Meijer et al., 2004; Meijer et al., 2005; van der Sar et al., 2009). Dans le poisson zèbre adulte, M. marinum cause des infections aigües ou chroniques selon la souche mycobactérienne (van der Sar et al., 2004a). Les infections aigües se caractérisent par une dissémination précoce des mycobactéries dans le poisson zèbre entrainant rapidement sa mort. Ce type d'infection correspond en quelques sortes aux tuberculoses primaires observées chez les enfants ou les personnes immunodéprimées. Au cours de l'infection aïgue, le poisson est rapidement désorienté, perd l'appétit, gonfle de l'abdomen et a de sévères hémorragies au site d'infection (van der Sar et al., 2004a). L'infection chronique du poisson se caractérise par la formation de granulomes dans les organes et corrèle avec un taux de survie des animaux plus important dans le temps. Dans ce cas, le poisson zèbre perd ses écailles et ulcère au niveau du site d'infection. Comme énoncé précédemment, les granulomes du poisson nécrosent et caséifient au même titre que ceux observés chez l'Homme. Tous ces éléments ont été déterminants dans le choix du poisson zèbre comme modèle.

Cependant, l'avantage principal du poisson zèbre réside dans la possibilité d'infection durant les premiers stades de développement, lorsqu'il est optiquement transparent et que les macrophages représentent la principale barrière immunitaire. Ainsi, l'infection des embryons permet d'étudier les interactions primaires entre les mycobactéries et les macrophages de l'hôte, et par conséquent de disséquer les rôles respectifs de l'immunité innée et adaptative (Lesley et Ramakrishnan, 2008). L'injection 32-48 heures post-fécondation de mycobactéries fluorescentes dans les cavités fermées des ouïes ou des yeux, la veine caudale, et le ventricule rhombencéphalique d'embryons de poissons zèbres autorise la visualisation des événements précoces de la pathogénèse. Quelques heures après l'injection, les macrophages arrivent au site d'infection, phagocytent les bactéries, puis migrent vers les tissus profonds où ils forment des agrégats macrophagiques organisés appelés granulomes précoces ou immatures .

Aux vues des outils génétiques disponibles, le modèle pathogéne/hôte de *M. marinum*/embryons de poisson zèbre offre la possibilité unique de déterminer la contribution des antigènes mycobactériens et/ou des composantes du système immunitaire de l'hôte dans les premières étapes de la pathogénèse de l'infection.

# Chapitre II - Structure, biosynthèse et activités biologiques des glycoconjugués de l'enveloppe mycobactérienne

### Chapitre II- Structure, biosynthèse et activités biologiques des glycoconjugués de l'enveloppe mycobactérienne

### A. Structure et biosynthèse des glycoconjugués

#### 1. Ultrastructure de l'enveloppe

L'enveloppe mycobactérienne est exceptionnelle tant dans sa composition que dans son architecture. De par sa faible perméabilité, elle permet aux mycobactéries de résister aux traitements antibiotiques et aux agents chimio-thérapeutiques (Jarlier et Nikaido, 1990; Draper, 1998). L'enveloppe est caractérisée par une membrane plasmique entourée d'une paroi, elle-même encapsulée (Figure II-1).

Les observations les plus récentes de l'enveloppe mycobactérienne par cryomicroscopie électronique ont permis de clarifier son ultra-structure (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008; Sani *et al.*, 2010). Premièrement, la membrane plasmique, d'une épaisseur d'environ 7 nm, est d'apparence symétrique (Figure II-2). Elle est donc majoritairement constituée de phospholipides dans ses deux couches. Néanmoins, les glycolipides (PIMs) et lipoglycannes (LM, LAM) possédant une ancre lipidique de type phosphatidyl-*myo*-inositol sont également retrouvés dans la couche externe de cette membrane (Figure II-2B) (Ortalo-Magne *et al.*, 1996b; Pitarque *et al.*, 2008).

La paroi est représentée par quatre zones de densité électronique variable (Figure II-1). Les deux premières zones correspondent à l'espace périplasmique alors que les deux suivantes représentent la membrane externe. La première zone possédant la plus faible densité électronique est véritablement attribuable à un espace périplasmique (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008). Une étude a pu montrer que la partie de cette zone accolée à la membrane plasmique était d'apparence granulaire (Zuber *et al.*, 2008). Cette couche granulaire, déjà visualisée dans d'autres bactéries à GRAM-positif, pourrait s'expliquer par la présence de protéines insérées ou associées à la membrane plasmique (Zuber *et al.*, 2006; Zuber *et al.*, 2008). La seconde zone de densité électronique moyenne correspond à un espace périplasmique contenant le macro-complexe arabinogalactane-peptidoglycanne (Figures II-1) et II-2B). Le périplasme mesure 20 nm d'épaisseur. Cette épaisseur est suffisante pour contenir les lipoglycannes à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol d'une taille d'environ 15 nm (Figure II-2) (Riviere *et al.*, 2004; Pitarque *et al.*, 2008).



**Figure II-1 : Cryo-micrographe électronique de l'enveloppe des mycobactéries.** (A) Image de microscopie électronique de cryo-sections ultrafines de l'enveloppe de *Mycobacterium bovis* BCG. (Niederweis *et al.*, 2010)(B) Interprétation du micrographe montrant la présence d'une membrane externe à bicouche lipidique.

Les troisième et quatrième zones observées ont l'apparence d'une bicouche lipidique confirmant l'existence d'une membrane externe (Figure II-1). Dès 1982, Minnikin propose que les acides mycoliques (acides gras à longues chaînes) liés de manière covalente à l'arabinogalactane-peptidoglycanne servent de point d'ancrage aux lipides et glycolipides libres, l'ensemble formant une pseudo-bicouche lipidique clôturant la paroi (Minnikin, 1982). Sur la base de cette hypothèse, de nombreuses études structurales ont tenté de déterminer la localisation et l'organisation des lipides/glycolipides de cette membrane externe (Rastogi *et al.*, 1991; Brennan et Nikaido, 1995; Daffe et Draper, 1998; Fan *et al.*, 1998). La plupart de ces études ont conclu que cette membrane externe est asymétrique, comprenant un feuillet interne exclusivement pourvu d'acides mycoliques et un feuillet externe exclusivement composé de lipides et glycolipides libres. De façon inattendue, les observations de l'enveloppe par cryo-microscopie électronique montrent que les deux couches de la membrane sont d'apparence symétrique (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008). Cette symétrie témoigne d'une similarité dans la composition des deux couches. Le feuillet interne

de la membrane externe est donc composé d'acides mycoliques attachés à l'arabinogalactane dans lesquels sont intercalés des glycolipides libres (Figure II-2). Le feuillet externe est quant à lui composé de glycolipides libres et d'acides mycoliques liés ou non à des monosaccharides (Figure II-2). Ces études ont également permis de mesurer plus finement l'épaisseur de la membrane externe. Cette épaisseur d'environ 8-9 nm impose une conformation repliée des acides mycoliques (Figure II-2A). Le repliement des acides mycoliques est autorisé par la présence de certains groupes et fonctions chimiques (cyclopropane, éthylène, cétone, méthoxyle) qui les constituent (Villeneuve et al., 2005b; Villeneuve et al., 2007; Villeneuve et al., 2010). De plus, ces groupements chimiques interagissent certainement avec les lipides et glycolipides libres avoisinants (Zuber et al., 2008). Comme dans la membrane plasmique, les protéines présentes dans la membrane externe permettent les échanges avec le milieu extérieur (Niederweis et al., 2010). Le petit nombre de ces protéines, par comparaison au nombre identifié dans les bactéries à Gramnégatif (ex : Escherichia coli), semble en partie responsable de la faible perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne et plus spécifiquement de la faible sensibilité de ces bactéries aux agents toxiques (Jarlier et Nikaido, 1990; Draper, 1998; Niederweis, 2003; Niederweis et al., 2010).

Récemment, une autre étude par cryo-microcopie électronique a mis en évidence la présence d'une capsule dans plusieurs espèces de mycobactéries incluant *M. tuberculosis, M. marinum, M. smegmatis* (Sani *et al.*, 2010). Son épaisseur varie selon les espèces mais mesure en moyenne 35 nm. Ces travaux confirment l'existence d'une capsule mycobactérienne et son implication *in vitro* dans la réponse immunitaire pro-inflammatoire (Sani *et al.*, 2010).

Comme nous venons de le décrire, l'enveloppe des mycobactéries est composée dans ses différentes parties de nombreux glycoconjugués. Ces derniers incluent le mycolylarabinogalactane-peptidoglycanne, les glycolipides et lipoglycannes pariétaux ainsi que les polysaccharides et glycoprotéines capsulaires. Ces glycoconjugués sont ubiquitaires comme le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne ou spécifiques d'espèces. En plus de leurs fonctions structurales et physiologiques, les glycoconjugués sont impliqués dans les mécanismes de virulence. Dans la première partie de ce chapitre, nous décrirons de manière précise la structure et la biogénèse des glycoconjugués de l'enveloppe. Dans la seconde partie, nous exposerons le rôle indispensable des glycoconjugués dans la formation des granulomes et plus généralement dans la virulence des mycobactéries.



Figure II-2 : Nouveau modèle d'architecture et de composition de l'enveloppe de

*M. tuberculosis.* (A) Modèle de la membrane externe en fermeture éclair (Zuber *et al.*, 2008). Les acides mycoliques constituant certains glycolipides (ex : TDM) ou liés sur le domaine arabinane de l'arabinogalactane-peptidoglycanne sont en conformation repliée. Des glycolipides libres (SL, DAT, PAT) sont présents dans les deux couches de la membrane externe. (B) Schéma modifié de l'enveloppe des mycobactéries proposé par Minnikin et collaborateurs (Minnikin *et al.*, 2002). La membrane externe est organisée selon le modèle de Zuber *et al.*, 2008. Les glycolipides (PIM) et lipoglycannes (LM et LAM) à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol sont insérés dans la couche externe des membranes plasmique et externe. Les autres glycolipides se trouvent dans la membrane externe. SL : Sulfolipides ; DAT : Di-*O*-acyltréhaloses ; PAT : Poly-*O*-acyltréhaloses ; PIM : Phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides ; LM : Lipomannane ; LAM : Lipoarabinomannane ; mAG : mycolyl-arabinogalactane ; PG : Peptidoglycanne.

#### 2. Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne

Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne (mAGp) est à la base de l'architecture de la paroi qui est essentielle à la survie de la mycobactérie. Il est constitué de trois macromolécules liées de façon covalente : le peptidoglycanne, l'arabinogalactane et les acides mycoliques.

#### a. Le peptidoglycanne

Le squelette du peptidoglycanne est constitué d'un enchaînement de Nacétylglucosamines et d'acides muramiques modifiés, liés en  $\beta$ -1,4 (Figure II-3). Chez les mycobactéries, les acides muramiques sont majoritairement N-glycolylés (Figure II-3) (Mahapatra et al., 2005). Toutefois, chez Mycobacterium leprae, les acides muramiques sont exclusivement N-acétylés (Mahapatra et al., 2008). Ces polymères glycanniques sont substitués à hauteur de 70 à 80% par un tétra-peptide lié sur la fonction carboxylique des acides muramiques (Figure II-3). Dans toutes les mycobactéries examinées, à l'exception de M. leprae, le tétra-peptide présente une séquence L-alanyl-D-isoglutaminyl-mésodiaminopimélyl-D-alanine (L-Ala-D-Glu-A2pm-D-Ala) dont les résidus de Glu et A2pm peuvent être amidés (Figure II-3). Chez M. leprae, une glycine remplace la L-Ala (Draper, 1971; Draper, 1976; Mahapatra et al., 2008). Les tétra-peptides forment des ponts peptidiques qui relient les chaînes glucidiques entre elles, pour constituer un réseau tridimensionnel stable. Les différents types de ponts peptidiques sont à l'origine de la classification des peptidoglycannes bactériens de Schleifer et Kandler (Schleifer et Kandler, 1972). Selon cette classification, le peptidoglycanne des mycobactéries est du groupe A1y (Schleifer et Kandler, 1972). Environ deux tiers des ponts peptidiques se forment entre la fonction carboxylique de la D-Ala et la fonction amine de la chaîne latérale de l'A<sub>2</sub>pm (Figure II-3) (Wietzerbin *et al.*, 1974). Le tiers restant consiste en la liaison entre deux A<sub>2</sub>pm au niveau des fonctions carboxylique et amine de leurs chaînes latérales (Wietzerbin et al., 1974). Enfin, ce macrocomplexe est substitué par des chaînes d'arabinogalactane sur 10 à 12% d'acides muramiques modifiés (McNeil et al., 1990) (Figure II-3).



**Figure II-3 : Partie du peptidoglycanne de** *M. tuberculosis* (Crick *et al.*, 2001). Les chaînes glycanniques sont constituées d'une alternance de *N*-acétylglucosamines et d'acides muramiques *N*-glycolylés liés en  $\beta$ -1,4. Les flèches noires indiquent une fonction *N*-glycolyl et un site de fixation de l'arabinogalactane (AG). La flèche rouge et la flèche bleu indiquent respectivement une liaison peptidique entre un acide méso-diaminopimélique et une alanine (A<sub>2</sub>pm-Ala), et une liaison peptidique entre deux acides méso-diaminopiméliques (A<sub>2</sub>pm-A<sub>2</sub>pm). Les peptides substituent les chaînes glycanniques à hauteur de 70 à 80%. Les groupes carboxyles libres sur les peptides peuvent être amidés (non représenté). Pour plus de clarté, aucun des atomes d'hydrogène n'a été schématisé.

La voie de biosynthèse du peptidoglycanne mycobactérien est similaire à celle des peptidoglycannes des autres bactéries (Kaur *et al.*, 2009). Cependant, la synthèse du peptidoglycanne des mycobactéries est inhabituelle sous certains aspects. Comme décrit précédemment, les acides muramiques sont *N*-glycolylés. La conversion des acides muramiques *N*-acétylés en acides muramiques *N*-glycolylés est catalysée par la monooxygénase NamH (Raymond *et al.*, 2005). La présence des groupements *N*-glycolyls, ou tout du moins de la protéine NamH, est importante pour résister aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactame (ex : pénicilline) ainsi qu'aux enzymes hydrolytiques produites par l'hôte (ex : lysozyme) (Raymond *et al.*, 2005). Les enzymes impliquées dans les autres modifications du

peptitoglycanne, telles que l'amidation des résidus de Glu et A<sub>2</sub>pm ou la présence de glycines à la place d'alanines, n'ont pas encore été expliquées.

#### b. L'arabinogalactane

L'arabinogalactane a été identifié dès les années 1950 comme le polysaccharide majeur de la paroi des mycobactéries (Figure II-4). D'après les études les plus récentes, l'arabinogalactane est constitué de 125 monosaccharides distribués entre le disaccharide du point d'attache au peptidoglycanne, les 30 résidus de D-Galf du domaine galactane, et les 31 résidus de D-Araf de chacun des 3 domaines arabinanes substituant le galactane (Figure II-4) (Bhamidi *et al.*, 2008). La liaison au peptidoglycanne s'effectue *via* le disaccharide  $[\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -L-Rhap- $(1\rightarrow 3)$ -D-GlcNAc- $(1\rightarrow P]$  (McNeil *et al.*, 1990). Le C-1 de la GlcNAc va former une liaison phosphodiester avec l'hydroxyle en C-6 des acides muramiques modifiés. Le domaine galactane est constitué de l'unité de répétition disaccharidique  $[\rightarrow 6)$ - $\beta$ -D-Galf- $(1\rightarrow 5)$ - $\beta$ -D- $Galf-(1\rightarrow]_{15}$ . Le D-Galf en position terminale réductrice est lié sur le L-Rhap du point d'attache par la liaison  $\beta$ -1,4. Trois chaînes ramifiées de 31 résidus d'arabinose substituent en  $\alpha$ -1,5 le domaine galactane au niveau des résidus 8, 10 et 12 de D-Galf (Alderwick *et al.*, 2005). L'extrémité non réductrice de ces chaînes consiste en des motifs ([ $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf $_2$ -(1 $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ ) (Lee et al., 2006a; Bhamidi et al., 2008). Deux de ces motifs substituent en  $\alpha$ -3,5 le D-Araf en position terminale non réductrice de la chaîne linéaire de [ $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)]. Les résidus de 3,5-α-D-Araf des chaînes linéaires peuvent également être substitués en position C-2 par une galactosamine ou un succinate (Draper et al., 1997; Lee et al., 2006a; Bhamidi et al., 2008). Enfin, selon les espèces, un demi aux deux tiers des chaînes d'arabinose sont totalement estérifiés par des acides mycoliques en position C-5 des β-D-Araf terminaux et des 2-α-D-Araf pénultièmes (Figure II-4) (McNeil et al., 1991; Bhamidi et al., 2008).



Figure II-4 : Structure du mycolyl-arabinogalactane lié au peptidoglycanne (Bhamidi *et al.*, 2008). Le domaine arabinane est constitué de 3 chaînes de 31 unités d'arabinose. Une à deux des trois chaînes sont estérifiées par des acides mycoliques. Une des trois chaînes est substituée par une glucosamine. La chaîne d'arabinose non acylée par les acides mycoliques est succinylée.

La totalité de l'arabinogalactane est synthétisée sur un transporteur lipidique décaprényl-phosphate (Pol-P) avant son transfert sur le peptidoglycanne (Yagi et al., 2003). La biosynthèse des transporteurs lipidiques a fait l'objet de plusieurs publications et ne sera pas explicitée dans ce rapport (Crick et al., 2001; Wolucka, 2008). La biosynthèse de l'arabinogalactane débute par la synthèse du disaccharide de liaison, suivie de la synthèse simultanée des domaines galactane et arabinane (Figure II-5)(Mikusova et al., 2000; Yagi et al., 2003). La plupart des enzymes impliquées dans ce processus ont été identifiées. En premier lieu, l'uridyl diphosphate N-acétyl-galactosamine (UDP-GlcNAc) transférase Rfe (Rv1302, orthologue de WecA chez E. coli) transfère un résidu de GlcNAc-P sur le Pol-P (Mikusova et al., 1996). Ensuite, la rhamnosyltransférase WbbL (Rv3265c) lie le deuxième résidu monosaccharidique en utilisant le déoxythymidyl diphosphate-rhamnose (dTDP-Rha) comme donneur (Mills et al., 2004). La synthèse du dTDP-Rha nécessite les actions enzymatiques successives de l'a-D-glucose-1-phosphate thymidyltransférase RmlA (Rv0334), de la dTDP-D-glucose-4,6-déhydratase RmlB (Rv3464), de la dTDP-4-céto-6-déoxy-Dglucose-3,5-épimérase RmlC (Rv3465) et de la dTDP-rhamnose synthase RmlD (Rv3266c) (Ma et al., 1997; Hoang et al., 1999; Stern et al., 1999; Ma et al., 2001). Suite à la formation disaccharide de liaison, le domaine galactane est synthétisé du grâce aux galactofuranosyltransférases (GlfT) qui utilisent l'UDP-galactofuranose (UDP-Galf) comme donneur. L'UDP-galactopyranose épimérase (prédite pour être codée par Rv3634) et l'UDPgalactopyranose mutase (Rv3809c) catalysent la synthèse de l'UDP-Galf à partir de l'UDPglucopyranose (Mikusova et al., 2000; Umesiri et al., 2010). Le transfert des deux premiers Galf sur le L-Rhap- $(1\rightarrow 3)$ -D-GlcNAc- $(1\rightarrow P)$ -P-Pol est assuré par la première GlfT Rv3782 (Mikusova et al., 2006). La GlfT Rv3808c catalyse le transfert des 28 autres résidus de Galf en les liant alternativement en  $\alpha$ -1,5 et en  $\alpha$ -1,6 (Figure II-5) (Kremer *et al.*, 2001).



```
Peptidoglycan-P-GlcNAc-Rha-Galf-Galf-Galf_3-[Araf3-[Araf22]3-Mycolyl
```

**Figure II-5 : Voie de biosynthèse du mycolyl-arabinogalactane (Alderwick** *et al.***, 2007). Pol-P : Décaprényl-phosphate ; GlfT : Galactofuranosyltransférase ; UDP-Galf : Uridine diphosphate D-galactofuranose ; Aft : Arabinofuranosyltransférase ; dTDP-Rha : Déoxythymidine diphosphate rhamnose ; UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate** *N***-acétyl-galactosamine ; DPA : Décaprénylmonophosphoryl-D-arabinose ; TMM : Tréhaloses-6-monomycolate** 

Très peu d'informations sont disponibles sur les enzymes qui interviennent dans la biosynthèse du domaine arabinane (Berg et al., 2007). Les six arabinosyltransférases identifiées ne suffisent pas à expliquer la synthèse du domaine arabinane dans son intégralité. Ces arabinosyltranférases utilisent le seul donneur connu d'Araf chez les mycobactéries : le polyprénol-monophosphoryl-B-D-arabinose (DPA) (Wolucka et al., 1994). L'utilisation du DPA comme donneur implique que l'assemblage du domaine arabinane ait lieu du côté périplasmique de la membrane plasmique (Berg et al., 2007). Le DPA est synthétisé à partir du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate à la suite de quatre catalyses enzymatiques puis transloqué dans la couche externe de la membrane plasmique (Wolucka, 2008). La protéine AftA (Rv3792) est l'α-1,5-D-arabinosyltransférase qui catalyse le transfert du premier D-Araf sur le domaine galactane (Figure II-5) (Shi et al., 2008). Les α-1,5-D-arabinosyltransférases (Aft) qui interviennent dans la polymérisation du domaine arabinane n'ont pas encore été identifiées. Les protéines AftC (Rv2673) et AftD (Rv0236c) catalysent la formation des premiers points de branchement en  $\alpha$ -1,3 (Figure II-5) (Birch *et al.*, 2008; Skovierova *et al.*, 2009). La présence d'AftD semble importante pour contrôler l'élongation des chaînes d'arabinane. La β-1,2-D-arabinosyltransférase AftB (Rv3805c) transfère les résidus terminaux de β-D-Araf (Figure II-5) (Seidel et al., 2007). Enfin, les protéines EmbA (Rv3794) et EmbB (Rv3795) jouent un rôle fondamental dans le transfert du motif [ $\beta$ -D-Ara*f*-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Ara*f*] en  $\alpha$ -1,3 de la chaîne ramifiée d'arabinose (Escuyer *et al.*, 2001). EmbA et EmbB, ainsi que EmbC (Rv3796) intervenant dans la synthèse du LAM, sont essentielles à la survie de M. tuberculosis et sont les cibles de l'éthambutol, drogue antituberculeuse (Telenti et al., 1997; Amin et al., 2008; Goude et al., 2008; Goude et al., 2009).

#### c. Les acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des acides gras de 60 à 90 carbones  $\alpha$ -alkylés et  $\beta$ hydroxylés (Figure II-6). Au sein de la paroi, ces longues chaînes carbonées sont majoritairement attachées à l'arabinogalactane-peptidoglycanne, ainsi qu'à des glycolipides tels que les tréhaloses mono- et di-mycolates (TDM, TMM). Ils peuvent aussi être présents sous une forme non associée, suite à leur libération par l'action enzymatique d'estérases (Ojha *et al.*, 2010). Les acides mycoliques sont élaborés par toutes les espèces de mycobactéries. Des composés équivalents de plus faible masse moléculaire ont été identifiés dans les genres *Corynebacterium, Nocardia* et *Rhodococcus* (Brennan et Nikaido, 1995).



Figure II-6 : Structure générale des acides mycoliques et principales familles d'acides mycoliques retrouvées dans les différentes espèces de mycobactéries.

Les acides mycoliques sont constitués de deux chaînes alkylées, la branche  $\alpha$  (C19-C24) et le méromycolate (> C56) contenant le groupement hydroxyle (Figure II-6). La présence d'un groupement hydroxyle sur le C-3 rend les acides mycoliques susceptibles à la pyrolyse, ce qui a grandement facilité l'étude de leur structure (Brennan et Nikaido, 1995). A l'exception des faibles variations de longueur, la structure de la branche  $\alpha$  est constante chez toutes les mycobactéries. Les variations structurales se concentrent donc au niveau du méromycolate. Elles concernent la longueur de la chaîne ainsi que la présence d'insaturations, de cyclopropanes, de méthyles et de groupes chimiques oxygénés de type cétones, méthoxyles, époxydes et acides carboxyliques. Chaque acide mycolique contient un ou deux groupements chimiques localisés en positions dites proximale et distale sur le méromycolate (Figure II-6). Les insaturations, les cyclopropanes et les méthyles sont localisés en positions proximale et/ou distale alors que les autres groupements sont uniquement retrouvés en position distale. La présence de ces groupements fonctionnels a permis la classification des acides mycoliques en 6 familles : les  $\alpha$ -mycolates, les  $\alpha'$ -mycolates, les cétomycolates, les méthoxymycolates, les époxymycolates et les dicarboxymycolates (Figure II-6). Alors que la présence d' $\alpha$ -mycolates semble ubiquitaire chez les mycobactéries, les autres familles sont synthétisées par différentes espèces. A titre d'exemple, *M. tuberculosis* synthétise majoritairement des  $\alpha$ -mycolates ( $\alpha$ ), cétomycolates (k) et méthoxymycolates (Figure II-7A) (Daffe, 1991). Le positionnement précis des groupements chimiques (*cis*-cyclopropane, *cis*ou *trans*-ethylène, méthoxyle, cétone) au sein des acides mycoliques majeurs de *M. marinum* a été élucidé par spectrométrie de masse (Figure II-7B) (Watanabe *et al.*, 2002).

Comme décrit précédemment, les acides mycoliques estérifient les deux tiers des chaînes d'arabinose chez *M. tuberculosis* (Figure II-4) (McNeil *et al.*, 1991; Bhamidi *et al.*, 2008). L'acylation de l'arabinane est catalysée par les mycolyltransférases nommées Ag85A, Ag85B et Ag85C. Ces dernières utilisent le tréhalose mono-mycolate (TMM) comme donneur d'acides mycoliques. Comme le présente la Figure II-4, les chaînes d'arabinane estérifiées par des acides mycoliques sont non substituées ou substituées par une galactosamine (Gal*p*NH2). Les chaînes d'arabinane non acylées ne sont pas substituées par un succinate. La présence du succinyle pourrait inhiber la mycolylation des chaînes arabinanes (Bhamidi *et al.*, 2008).



**Figure II-7 : Structure des acides mycoliques de** *M. marinum*. (A) Résultats obtenus sur la souche CIPT 140120003 de *M. marinum* par résonance magnétique nucléaire et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Daffe *et al.*, 1991a). (B) Résultats obtenus sur la souche ATCC 927 de *M. marinum* par spectrométrie de masse (Watanabe *et al.*, 2002).  $\alpha$ = alpha- ; m= méthoxy- ; k=céto-.

Les acides mycoliques sont les composants structuraux majoritaires de la membrane externe. Ils sont directement impliqués dans la régulation de la fluidité et de la perméabilité de la paroi. En particulier, la réduction de la quantité d'acides mycoliques pariétaux entraine l'augmentation de la perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne (Jackson *et al.*, 1999). De plus, différents rôles ont été associés aux groupements chimiques contenus dans les acides mycoliques. A titre d'exemple, la suppression des cyclopropanes en position proximale des  $\alpha$ -mycolates ou la suppression des méthoxy- et cétomycolates de *M. tuberculosis* entraine une nette diminution de la virulence des souches mutantes dans un modèle murin (Dubnau *et al.*, 2000; Glickman *et al.*, 2000). De même, la suppression des cétomycolates entraine une diminution de la survie de *M. tuberculosis* dans les macrophages THP-1 (Yuan *et al.*, 1998). Plus récemment, deux études ont montré que la suppression de la synthèse des *trans*-cyclopropanes ou des méthoxyles des acides mycoliques conduit à l'augmentation de l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Rao *et al.*, 2006; Dao *et al.*, 2008). Ces travaux ont aussi clairement défini le rôle du tréhalose-6,6'-dimycolate (TDM) dans l'induction de cette réponse inflammatoire.

### 3. Les glycolipides et les lipoglycannes de la paroi

Les glycolipides et les lipoglycannes de la paroi peuvent être classés sur la base de leur structure en quatre familles : les glycolipides et les lipoglycannes à ancre phosphatidyl*myo*-inositol, les glycolipides constitués d'un noyau tréhalose, les glycolipides basés sur un noyau phénolique et les glycopeptidolipides. Certains de ces composés sont spécifiques d'espèce, tandis que d'autres sont ubiquitaires chez les mycobactéries. Ces quatre familles de glycolipides ont été identifiées à la surface des mycobactéries et jouent un rôle dans la virulence des pathogènes (Ortalo-Magne *et al.*, 1996b). En plus de ces familles, certaines espèces de mycobactéries synthétisent des glycolipides mineurs de fonctions inconnues.

## a. Structure et biosynthèse des glycolipides et les lipoglycannes à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol

(Pour une revue voir (Gilleron et al., 2008))

Les phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs) et leurs équivalents polyglycosylés (LM et LAM) sont des glycoconjugués ubiquitaires de l'enveloppe des mycobactéries. Au-

delà de leur rôle dans la virulence des mycobactéries, ces glycoconjugués sont impliqués dans la perméabilité de l'enveloppe, dans l'intégrité de la paroi, ainsi que dans la régulation de la division cellulaire (Gilleron *et al.*, 2008). Les PIMs ont été majoritairement retrouvés dans les membranes plasmique et externe, et dans une moindre mesure dans la capsule (Ortalo-Magne *et al.*, 1996b). La localisation du lipomannane (LM) et du lipoarabinomannane (LAM) a été plus difficile à déterminer en raison des protocoles d'extraction qui doivent être utilisés. Récemment, une étude conclue que ces lipoglycannes sont présents dans les feuillets externes de la membrane plasmique et de la membrane externe (Pitarque *et al.*, 2008).

#### i. Structure des phosphatidyl-myo-inositol mannosides

Les PIMs, LM et LAM ont en commun une ancre mannosyl-phosphatidyl-*myo*-inositol correspondant à un *sn*-glycéro-3-phospho-(1-D-*myo*-inositol) glycosylé par deux résidus d' $\alpha$ -D-Manp en positions 2 et 6 du *myo*-inositol (Ins) (Figure II-8). Un à quatre acides gras estérifient cette ancre sur les positions C-2 et C-3 du glycérol, C-6 du D-Manp lié en  $\alpha$ -1,2 sur le *myo*-inositol et C-3 du *myo*-inositol lui-même (Khoo *et al.*, 1995b; Gilleron *et al.*, 1999; Gilleron *et al.*, 2000; Gilleron *et al.*, 2003). Ces acides gras ont été majoritairement identifiés comme étant des acides palmitique (C16), tuberculostéarique (acide 10-méthyl-octadécanoïque) et dans une moindre mesure des acides stéariques (C18). Le type, le nombre et la position des acylations entrainent une grande hétérogénéité dans ces composés.

Les PIMs sont des phosphatidyl-*myo*-inositols di-, tri-, tétra,- penta-, et hexa-mannosylés (PIM<sub>2</sub> à PIM<sub>6</sub>) (Figure II-8) (Ballou *et al.*, 1963; Lee et Ballou, 1965). Le PIM<sub>2</sub> correspond donc au phosphatidyl-*myo*-inositol di-mannosylé en positions C-2 et C-6 de l'inositol. L'ajout des autres résidus d' $\alpha$ -D-Manp dans les PIM<sub>3</sub> à PIM<sub>6</sub> s'effectue à partir du mannose lié en C-6 sur le *myo*-inositol (Lee et Ballou, 1965). Le PIM<sub>4</sub> correspond à l'extension du PIM<sub>2</sub> par le disaccharide t- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 6) et le PIM<sub>6</sub> à l'extension du PIM<sub>4</sub> par l'unité disaccharidique t- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 2) (Figure II-8) (Chatterjee *et al.*, 1992; Gilleron *et al.*, 2003).



Figure II-8 : Structure du phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannoside tétra-acylé (Ac<sub>4</sub>PIM<sub>6</sub>) (Gilleron *et al.*, 2003).

#### *ii. Structure du lipomannane et du lipoarabinomannane*

Le lipomannane (LM) nait de l'allongement du PIM<sub>4</sub> par une chaîne linéaire d' $\alpha$ -1,6-D-Man*p*, partiellement substituée en  $\alpha$ -1,2 par d'autres résidus de D-Man*p* (Figure II-9) (Chatterjee *et al.*, 1992; Venisse *et al.*, 1995; Khoo *et al.*, 1996b). Les études comparatives sur le domaine mannane de plusieurs espèces de mycobactéries démontrent des variations dans le degré de substitution (Khoo *et al.*, 1995a; Rojas *et al.*, 2000). De plus, la liaison et la taille des branchements diffèrent chez *M. chelonae* et *M. kansasii*. Chez *M. chelonae*, les branchements sont en  $\alpha$ -1,3 et chez *M. kansasii*, ce sont des unités disaccharidiques *t*- $\alpha$ -D-Man*p*-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man*p* qui substituent le mannane (Guerardel *et al.*, 2002; Guerardel *et al.*, 2003). Le dénombrement des résidus de D-Man*p* du LM dans certaines espèces de mycobactéries indique aussi une certaine hétérogénéité. Chez *M. smegmatis*, le LM est constitué de 17 à 35 mannoses alors que chez *M. bovis* BCG le LM possède 15 à 45 mannoses (Khoo *et al.*, 1996b; Gilleron *et al.*, 2006). Néanmoins, dans ces deux espèces, la glycoforme majeure possède 26 mannoses (Khoo *et al.*, 1996b; Gilleron *et al.*, 2006).





Le lipoarabinomannane (LAM) est un LM substitué par un domaine arabinane (Figure II-9). Dans une même espèce, les domaines mannanes du LAM et du LM peuvent être de taille identique comme par exemple chez M. smegmatis, ou de taille différente comme chez *M. tuberculosis* Erdman (Khoo *et al.*, 1996b; Chatterjee et Khoo, 1998). La taille du domaine mannane du LAM varie également entre les espèces puisque 18 mannoses ont été retrouvés chez M. bovis BCG, 20 chez M. tuberculosis Erdman, et 26 chez M. smegmatis (Venisse et al., 1995; Khoo et al., 1996b; Chatterjee et Khoo, 1998). De plus, la structure et le degré de substitution du domaine mannane des LAMs diffèrent entre les espèces de mycobactéries (Khoo et al., 1995a; Nigou et al., 2000). Le domaine arabinane du LAM consiste en une chaîne linéaire de D-Araf liés en  $\alpha$ -1,5, ponctuellement substituée en  $\alpha$ -1,3 par des chaînes latérales courtes d'unités D-Araf. Ces dernières sont de deux types : des chaînes linéaires tétra-saccharidiques de séquence t- $\beta$ -D-Araf- $(1\rightarrow 2)$ - $\alpha$ -D-Araf- $(1\rightarrow 5)$ - $\alpha$ -D-Araf- $(1\rightarrow 5)$ - $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ , et des chaînes ramifiées hexa-saccharidiques de séquence ([ $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-]<sub>2</sub>-(1 $\rightarrow$ 3,5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$  (Figure II-9) (Chatterjee *et al.*, 1991). La liaison mise en jeu entre le domaine arabinane et le mannane reste à déterminer. Les analyses structurales de ces lipoglycannes démontrent que le LAM est plus polydisperse que le LM, ce qui suggère une hétérogénéité importante de la taille du domaine arabinane. En moyenne, ce domaine est constitué de 60 résidus de D-Araf chez M. bovis et M. smegmatis, et 70 chez M. tuberculosis (Hunter et Brennan, 1990; Venisse et al., 1993; Khoo et al., 1996b).

Les résidus terminaux de  $\beta$ -D-Araf du domaine arabinane peuvent à leur tour être substitués en C-5 par des motifs variés regroupés sous le terme de « coiffe » (Figure II-9). La découverte des coiffes a entrainé la classification du LAM en trois familles. Les LAMs d'espèces pathogènes comme *M. tuberculosis, M. leprae, M. bovis* ou ceux présents sur certaines espèces opportunistes comme *M. kansasii, M. avium, M. marinum,* sont modifiés par des coiffes dites à mannoses (Guerardel *et al.*, 2003; Pitarque *et al.*, 2005). Les coiffes à mannoses consistent en un résidu d' $\alpha$ -D-Man*p*-(1 $\rightarrow$ 5 seul, un disaccharide t- $\alpha$ -D-Man*p*-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man*p*-(1 $\rightarrow$ 5). Ces lipoglycannes constituent donc la famille des ManLAMs. Le nombre et le type de coiffes à mannoses (mono-, di- ou tri-mannosides) varient entre les espèces et quelques fois entre les souches d'une même espèce. Par exemple, le LAM de *M. tuberculosis* possède majoritairement une coiffe dimannosidique alors que le LAM de *M. marinum* possède une

coiffe majoritaire monomannosidique (Nigou *et al.*, 2000; Pitarque *et al.*, 2005). Le LAM de *M. avium* a été caractérisé avec des coiffes majoritairement monomannosidiques dans une souche et avec des coiffes majoritairement dimannosidiques dans une autre (Khoo *et al.*, 2001; Pitarque *et al.*, 2005). Le deuxième type de coiffe consiste en un motif phosphatidyl-*myo*-inositol (PI) qui a donné l'appellation PILAM à cette deuxième famille. Les PILAMs ont été uniquement identifiés dans des mycobactéries à croissance rapide telles que *M. smegmatis*, *M. fortuitum* et dans une espèce indéfinie (Khoo *et al.*, 1995a; Gilleron *et al.*, 1997; Gilleron *et al.*, 2008). Enfin, un troisième type de LAM, dépourvu de coiffes a été caractérisé dans *M. chelonae* et désigné sous le terme AraLAM (Guerardel *et al.*, 2002).

Enfin, le LM et le LAM peuvent aussi être substitués par des motifs plus rares comme des groupes succinyles et/ou des 5-méthyl-thiopentoses (MTP) (Figure II-9). Les succinyles ont été identifiés en position 2 des résidus de 3,5-D-Araf dans le ManLAM de *M. bovis* BCG et en position 3 des 5-D-Araf du ManLAM de *M. kansasii* (Hunter *et al.*, 1986; Delmas *et al.*, 1997; Guerardel *et al.*, 2003). Le MTP, caractérisé comme un 5-déoxy-5-méthylthio*xylo*furanose, a été identifié pour la première fois dans le ManLAM de *M. tuberculosis*, lié en  $\alpha$ -1,4 sur le mannose terminal de la coiffe (Treumann *et al.*, 2002; Turnbull *et al.*, 2004; Joe *et al.*, 2006). Ce sucre particulier substitue aussi le mannane du ManLAM et du LM de *Mycobacterium kansasii* (Guerardel *et al.*, 2003).

#### iii. Biosynthèse des phosphatidyl-myo-inositol mannosides

Dans la phase précoce de la biosynthèse des PIMs, LM et LAM, le phosphatidyl-*myo*inositol (PI) est synthétisé à partir de l'inositol et du CDP-diacylglycerol. Cette réaction est catalysée par une phospho-inositol synthase nommée PgsA1 (Rv2612c) (Jackson *et al.*, 2000). Le PI est ensuite glycosylé en position 2 par l' $\alpha$ -mannosyltransférase PimA (Rv2610c) qui utilise le GDP-Man*p* comme donneur (Figure II-10) (Kordulakova *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2005). La protéine PimA, essentielle à la vie des mycobactéries, constitue aujourd'hui une cible importante pour les futurs traitements antibiotiques (Gilleron *et al.*, 2008). Le monomannosyl-phosphatidyl-*myo*-inositol (PIM<sub>1</sub>) est de nouveau glycosylé en C-6 par la mannosyltransférase PimB' (Rv1288c) pour former le PIM<sub>2</sub> (Lea-Smith *et al.*, 2008; Guerin *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2009). Il semblerait que l'intervention de PimB' précède le plus souvent celle de Rv2611c qui acyle le  $\alpha$ -D-Man*p* en position 2 sur l'inositol pour former l'Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub> (Kordulakova et al., 2003; Guerin et al., 2009). L'appellation Ac<sub>1</sub>PIM<sub>X</sub> ne tient pas compte de la présence d'acides gras sur le glycérol de l'ancre phosphatidyl-myo-inositol. L'estérification du glycérol est d'ailleurs indispensable à l'activité de PimA (Schaeffer et al., 1999; Guerin et al., 2007). La glycosyltransférase PimB', tout comme PimB (Rv0557), est aussi capable de transférer un résidu de mannose après l'acylation du PIM<sub>1</sub> (Figure II-10). La mannosyltrasférase PimB n'est pas essentielle à la formation des PIMs (Kremer et al., 2002b; Tatituri et al., 2007; Torrelles et al., 2009). Néanmoins, l'interruption du gène pimB dans M. tuberculosis réduit la quantité de LM et de LAM dans l'enveloppe (Torrelles et al., 2009). L'étape suivante de la biosynthèse des PIMs correspond à la mannosylation de PIM<sub>2</sub>/Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub> pour former PIM<sub>3</sub>/Ac<sub>1</sub>PIM<sub>3</sub>. PimC de *M. tuberculosis* CDC1551, possède cette activité mannosyltransférasique in vitro (Kremer et al., 2002b). Cependant, cette enzyme est absente dans la plupart des isolats de *M. tuberculosis*. De plus, l'altération du gène correspondant dans M. bovis BCG n'affecte absolument pas la production des PIMs, suggérant la présence d'autres mannosyltransférases nécessaires pour la synthèse de la forme trimannosylée des PIMs (Kremer et al., 2002b). Les trois premières étapes de mannosylation des PIMs impliquent des glycosyltransférases (PimA, PimB, PimB', PimC) dépendantes du GDP-Man et classées dans la superfamille des GT-B. Les enzymes de cette superfamille sont des protéines associées à la membrane du coté cytosolique (Berg et al., 2007). Les étapes suivantes nécessaires à la biosynthèse des PIMs plus polaires, du LM et du LAM nécessitent des glycosyltransférases (de la superfamille GT-C) situées du coté périplasmique de la membrane plasmique (Berg et al., 2007). Ces glycosyltransférases utilisent comme donneur le polyprénol-monophosphomannose (DPM) pour les mannosyltransférases et le polyprénolmonophosphoarabinose (DPA) pour les arabinosyltransférases (Wolucka et al., 1994; Gurcha et al., 2002). La biosynthèse du DPM requiert des polyprénol-monophosphomannosyle synthases, produits des gènes Rv3779 et Rv2051c (Gurcha et al., 2002; Scherman et al., 2009). La protéine PimE (Rv1159) est l'α-1,2-mannosyltransférase impliquée dans la conversion du PIM<sub>4</sub> en PIM<sub>5</sub> (Morita *et al.*, 2006). Les  $\alpha$ -1,6- et  $\alpha$ -1,2-mannosyltransférases nécessaires à la biosynthèse des PIM<sub>4</sub> et PIM<sub>6</sub>, ainsi que l'acyltransférase intervenant dans la conversion des Ac<sub>1</sub>PIMs en Ac<sub>2</sub>PIMs n'ont pas encore été identifiées (Gilleron et al., 2008; Kaur et al., 2009).



**Figure II-10 : Schéma de biosynthèse des phosphatidyl-***myo***-inositol mannosides (PIM), du lipomannane (LM) et du lipoarabinomannane (LAM) de** *M. tuberculosis* (Alderwick *et al.*, 2007; Guerin *et al.*, 2009). DPM : décaprénol monophosphomannose; DPA : décaprénol monophosphoarabinose.

#### iv. Biosynthèse du lipomannane et du lipoarabinomannane

Le PIM<sub>4</sub> est à l'embranchement de la synthèse des PIM<sub>5</sub> et PIM<sub>6</sub> et de la synthèse du LM et du LAM (Figure II-10). A partir de ce point de ramification (PIM<sub>4</sub>), la lipoprotéine LpqW (Rv1166) aiguille le flux métabolique vers la formation du LM (Kovacevic et al., 2006; Crellin et al., 2008). Le mécanisme mis en jeu dans cette régulation est encore indéterminé. Néanmoins, il semblerait que la mannosyltransférase PimE agisse en opposition à LpqW et aiguille le flux métabolique vers la formation du PIM<sub>5</sub> (Crellin et al., 2008). La biosynthèse du mannane fait intervenir des  $\alpha$ -1,6-mannosyltransférases. La protéine MptA a récemment été identifiée comme l'α-1,6-mannosyltransférase responsable de l'élongation du LM de M. smegmatis et C. glutamicum (Kaur et al., 2007; Mishra et al., 2007). Une autre α-1,6-mannosyltransférase nommée MptB est nécessaire pour initier la formation du mannane du LM de C. glutamicum. La responsabilité des enzymes codées par Rv2174 et Rv1459c (orthologues à MptA et MptB), dans la formation du domaine mannane des LM et LAM de M. tuberculosis, n'a pas encore été confirmée. La substitution du mannane linéaire par des résidus de D-Manp liés en α-1,2 est catalysée par la mannosyltransférase Rv2181 (Kaur et al., 2006). Récemment, une étude a montré l'importance de cette enzyme de branchement pour l'élongation du mannane (Figure II-10) (Sena et al., 2010).

La glycosylation du LM par le domaine arabinane conduit à la formation du LAM. La biosynthèse de la chaîne principale d'arabinane nécessite l'intervention d' $\alpha$ -1,5arabinosyltransférases (Figure II-10). L'arabinosyltransférase EmbC (Rv3793) joue un rôle fondamental dans l'initiation et la polymérisation du domaine arabinane (Zhang *et al.*, 2003). Par conséquent, cette enzyme est essentielle pour la croissance de *M. tuberculosis*. En plus d'EmbC, d'autres mannosyltransférases, encore non identifiées, doivent assurer l'élongation de la chaîne d'arabinane. La mannosyltransférase récemment identifiée AftC (Rv2673) catalyse la formation des points de branchement en  $\alpha$ -1,3 (Birch *et al.*, 2008; Birch *et al.*, 2010). La formation des coiffes mannosidiques des ManLAMs nécessite les activités de deux mannosyltransférases. La mannosyltransférase Rv1635c transfère le premier D-Man*p* en  $\alpha$ -1,5 des résidus de  $\beta$ -Ara*f* en position terminale. La protéine Rv2181, qui intervient également dans la biosynthèse du mannane, permet d'ajouter les autres résidus de D-Manp en  $\alpha$ -1,2 (Appelmelk *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2008).

#### b. Structure des glycolipides à noyau phénolique

#### *i. Structure*

Les PGLs, localisés à la surface des mycobactéries, jouent un rôle très important dans la pathogénicité tuberculeuse. Ils ont été identifiés et caractérisés dans de nombreuses espèces de mycobactéries incluant M. leprae, M. kansasii, M. gastri, M. haemophylum, M. ulcerans et M. marinum, ainsi que dans quelques membres du complexe de M. tuberculosis (références dans le Tableau II-1). Les PGLs sont constitués d'un noyau lipidique phénolphtioglycol estérifié au niveau des groupements β-diol par deux chaînes d'acides gras polyméthylés et substitué sur l'hydroxyle du groupe phénol par une chaîne glycannique courte allant de un à quatre monosaccharides (Figure II-11A et Tableau II-1) (Onwueme et al., 2005a). Le phénolphtioglycol est majoritairement de type phénolphtiocérol mais des PGLs possédant des noyaux phénolphtiodiolone, phénolphtiotriol et phénolphtiotriol acylé ont été caractérisés. Les noyaux phénolphtiodiolone et phénolphtiotriol sont en fait des intermédiaires de biosynthèse du phénolphtiocérol (Figure II-11A) (Huet et al., 2009). En consèquence d'une déficience enzymatique, le PGL de M. tuberculosis Beijing est uniquement constitué de noyaux lipidiques phénolphtiodiolone et (acyl)phénolphtiotriol (Daffe et al., 1992; Huet et al., 2009). Dans pratiquement toutes les espèces de mycobactéries, les PGLs sont estérifiés par des acides gras polyméthylés de type mycocérosates (Figure II-11A). Chez M. ulcerans et M. marinum, les acides gras polyméthylés des PGLs sont des acides phtiocéraniques, énantiomères des acides mycocérosiques (Figure II-11B) (Daffe, 1991; Onwueme et al., 2005a). De plus, contrairement à la majorité des espèces de mycobactéries, les noyaux lipidiques des PGLs de M. ulcerans et M. marinum possèdent certaines spécificités incluant la configuration (R) du carbone 4 et la stéréochimie *ervthro* des groupements  $\beta$ -diol (Figure II-11B) (Daffe, 1991).


Figure II-11 : (A) Structure générale du PGL. (B) Structure du PGL majoritaire de *M. marinum*.

La partie glycannique des PGLs possède une grande hétérogénéité entre les espèces (Tableau II-1). Elle est constituée de un à quatre monosaccharides généralement méthylés et acétylés. En plus des différences inter-espèces, les glycannes des PGLs peuvent varier au sein d'une même espèce. Ainsi, *M. kansasii* possède huit PGLs qui différent par le nombre et le type de monosaccharides mais aussi par le nombre, le type et la position des substituants (Fournie *et al.*, 1987; Riviere *et al.*, 1987; Gilleron *et al.*, 1990b; Watanabe *et al.*, 1997). L'étude structurale des PGLs a également permis de mettre en évidence l'existence de monosaccharides particuliers de structure inconnue jusqu'alors, tels que le 2,6-didéoxy-4-*O*-Me- $\alpha$ -D-*arabino*-Hexp chez *M. kansasii* (Fournie *et al.*, 1987).

Le PGL de *M. marinum* est constitué majoritairement par un noyau lipidique de type phénolphtiocérol en C35, C37, C39 et C41 (Figure II-11B) (Dobson *et al.*, 1990). Le phénolphtiocérol est substitué par un unique 3-*O*-méthyl-α-L-rhamnopyranose et estérifié, selon les souches, par des acides 2,4-di-*O*-méthylphtiocéraniques en C26 et 2,4,6-tri-O-méthylphtiocéraniques en C27 et C29 (Villé et Gastambide-Odier, 1970; Dobson *et al.*, 1990).

Tableau II-1 : Structure du corps glycannique des glycolipides phénoliques (PGLs) caractérisés dans les différentes espèces de mycobactéries

Espèces	Structure des glycannes des PGL	références
<i>M. tuberculosis</i> (Beijing, isolats cliniques), <i>M. Canetti</i>	2,3,4-tri-O-Me-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-2-O-Me-α-L-Rhap-(1→ (PGL-tb)	(Daffe <i>et al.</i> , 1987; Daffe et Laneelle, 1988; Huet <i>et al.</i> , 2009)
M. bovis BCG, M.microtii	2-O-Me-α-L-Rhap-(1→ (Mycoside B)	(Daffe <i>et al.</i> , 1988b; Thurman <i>et al.</i> , 1993)
M. marinum, M.ulcerans	3-O-Me-α-L-Rhap-(1→ (Mycoside G)	(Villé et Gastambide-Odier, 1970; Dobson <i>et al.</i> , 1990)
M. kansasii, M.gastri.	2,6-didéoxy-4-O-Me-α-D- <i>arabino</i> -Hexp-(1→3)-2-O-Me-4-O-Ac-α-L-Fucp- (1→3)-2-O-Me-α-L-Rhap-(1→3)-2,4-di-O-Me-α-L-Rhap-(1→ PGL majoritaire	(Fournie <i>et al.</i> , 1987; Riviere <i>et al.</i> , 1987; Gilleron <i>et al.</i> , 1990a; Watanabe <i>et al.</i> , 1997)
M. Haemophylum	2,3-di-O-Me-α-L-Rhap-(1→2)-3-O-Me-α-L-Rhap-(1→4)-2,3-di-O-Me-α-L-Rhap-(1→)	(Besra <i>et al.</i> , 1991)
M. leprae	3,6-di-O-Me-β-D-Glcp-(1→4)-2,3-di-O-Me-α-L-Rhap-(1→2)-3-O-Me-α-L- Rhap-(1→	(Hunter <i>et al.</i> , 1982)

### ii. Biosynthèse

Chez M. tuberculosis, la plupart des gènes requis pour la biosynthèse des PGLs sont regroupés dans une région de 70Kb (Simeone et al., 2010). La synthèse du PGL nécessite l'intervention de protéines appelées polycétides synthases (PKS) (Gokhale et al., 2007a; Gokhale et al., 2007b). Les PKSs utilisent le malonyl-CoA ou le méthyl-CoA pour allonger les chaînes d'acides gras linéaires et former ainsi des acides gras polyméthylés. (Figure II-12). Les PKSs possèdent plusieurs domaines catalytiques (cétoacylsynthase, acyltranférase, déhydratase, énoylréductase, cétoréductase) qui permettent la synthèse de tous les types d'acides polyméthylés présents les glycolipides sulfatides, gras sur (ex : lipooligosaccharides). Ce sont aussi des protéines de la famille PKS qui sont responsables de la biosynthèse du phénolphtioglycol suite à l'allongement d'un acide para-hydroxy-benzoïque (Constant et al., 2002; Gokhale et al., 2007a; Gokhale et al., 2007b). Le transfert des acides gras linéaires (ou de l'acide p-hydroxy-benzoïque) sur les PKSs nécessite l'activité des protéines FadD (Trivedi et al., 2004). Ces protéines, de la famille des FAALs (long-chain fatty acyl-AMP ligases), convertissent les acides gras linéaires (ou le p-hydroxy-benzoate) en des formes activées par l'AMP puis catalysent leur transfert sur les PKSs. Enfin, une fois synthétisés, les acides gras polyméthylés sont transférés sur un substrat accepteur (glycanne, lipide) grâce aux acyltransférases de la famille PapA (Polycétide-associated protein acyltransferase) (Onwueme et al., 2004; Gokhale et al., 2007b).

La synthèse du PGL débute par la formation de l'acide *p*-hydroxy-benzoïque à partir du chorismate (Figure II-12). Cette réaction est catalysée par la chorismate pyruvate-lyase Rv2949c (Stadthagen *et al.*, 2005). L'acide *p*-hydroxy-benzoïque est ensuite transféré sur la PKS 15/1 par la protéine FadD22 (Rv2948c) (Constant *et al.*, 2002; Ferreras *et al.*, 2008). La PKS 15/1 synthétise le *p*-hydroxyphénylalkanoate qui est ensuite transféré par FadD29 sur la PKS nommée PpsA (Constant *et al.*, 2002). Des mutations dans le gène codant pour la PKS 15/1 sont responsables de l'absence de PGLs dans certaines souches de *M. tuberculosis* incluant H37Rv (Constant *et al.*, 2002). La protéine PpsA (Rv2931) ainsi que les PKS PpsB à PpsE (Rv2932 à Rv2935), l'énoylréductase Rv2953 et la thioestérase TesA (Rv2928), catalysent la formation du noyau lipidique phénolphtiodiolone (Azad *et al.*, 1997; Simeone *et al.*, 2007). La cétoréductase Rv2951c convertit le phénolphtiodiolone en phénolphtiotriol (Onwueme *et al.*, 2005b; Huet *et al.*, 2009). Ce dernier est ensuite méthylé par la protéine Rv2952 pour former le noyau phénolphtiocérol (Huet *et al.*, 2009). La polycétide synthase Mas synthétise la formation des acides mycocérosiques à partir d'un acide gras linéaire transféré par la protéine FadD28 (Sirakova *et al.*, 2002). Ensuite, la protéine PapA5 (Rv2939) catalyse l'estérification du phénolphtioglycol par deux acides mycocérosiques (Onwueme *et al.*, 2004). Les glycosyltransférases (Rv2957, Rv2958c et Rv2962c) et les autres enzymes impliquées dans la synthèse du PGL de *M. tuberculosis* ont aussi été identifiées (Perez *et al.*, 2004; Malaga *et al.*, 2008). La rhamnosyltransférase Rv2962c catalyse le transfert du premier monosaccharide sur le *p*-hydroxybenzoate et les glycosyltransférases Rv2958c puis Rv2957 transfèrent les résidus monosaccharidiques suivants (Perez *et al.*, 2004; Malaga *et al.*, 2008).



Figure II-12 : Voies de biosynthèse du PGL et du DIM de *M. tuberculosis* (Simeone *et al.*, **2010).** Les glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse du PGL-tb ne sont pas indiquées.  $R = C_2H_5$  ou CH<sub>3</sub>. KS : cétoacylsynthase; AT : acyltransférase; DH : déhydratase; ER : énoylréductase; KR : cétoréductase; ACP : protéine porteuse d'acyle.

En plus des PGLs, les mycobactéries synthétisent des phtiocérols dimycocérosates (DIM) indispensables à leurs virulences (Figure II-12) (Astarie-Dequeker *et al.*, 2009). Ces lipides ont été décrits dans toutes les espèces de mycobactéries qui synthétisent des PGLs mais aussi dans les souches de *M. tuberculosis* dépourvues de ce glycolipide (Camacho *et al.*, 2001; Minnikin *et al.*, 2002). Chez *M. marinum* et *M. ulcerans*, les DIMs possèdent les mêmes spécificités structurales que leurs homologues glycosylés (Daffe, 1991). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de DIMs sont les protéines FadD26, FadD28, PpsA-E, Rv2951c, Rv2952, Rv2953, TesA et PapA5 (Figure II-12) (Simeone *et al.*, 2010).

## c. Les glycolipides composés de tréhalose

Chez les mycobactéries, le tréhalose est présent sous une forme libre dans le cytosol ou sous une forme estérifiée dans la paroi et la capsule. Le tréhalose cytosolique a des fonctions de stockage des glucides et de protection contre le stress (Elbein *et al.*, 2003). Les tréhaloses estérifiés ont des fonctions dans la biosynthèse de la paroi, dans la protection contre certains stress environnementaux, mais aussi et surtout un rôle important dans la virulence des mycobactéries. Les tréhaloses estérifiés par des acides gras peuvent être classés en quatre familles de glycolipides pariétaux : les tréhaloses-6-monomycolates (TMM) et -6,6'-dimycolates (TDM), les sulfatides (SLs), les di-, tri et poly-acyltréhaloses (DATs, TATs, PATs), et les lipooligosaccharides (LOSs) (Figure II-13).

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur de glucoses liés en  $\alpha$ -1,1 ( $\alpha$ -D-Glc-(1 $\leftrightarrow$ 1')- $\alpha$ -D-Glc). Il est présent dans les bactéries, levures, champignons, plantes et invertébrés mais pas dans les cellules de mammifères. Les mycobactéries utilisent trois voies de biosynthèse pour former le tréhalose (Figure II-14) (De Smet *et al.*, 2000). La première correspond à la condensation du glucose-6-phosphate avec de l'UDP-glucose pour former du tréhalose-6-phosphate. Ce dernier est ensuite déphosphorylé pour donner du tréhalose libre. Cette voie est catalysée par la tréhalose-6-phosphate synthase (OtsA) et la tréhalose-6-phosphate phosphate (OtsB) (Pan *et al.*, 2002; Edavana *et al.*, 2004). La deuxième voie de biosynthèse génère du tréhalose à partir du glycogène suite à l'action d'une maltooligosaccharyltréhalose synthase (TreY) et d'une maltooligosyltréhalose hydrolase (TreZ). La troisième voie fait intervenir une tréhalose synthase (TreS) qui convertit le maltose en tréhalose. Récemment, la protéine TreS a aussi été caractérisée comme une amylase capable d'hydrolyser le glycogène pour donner du maltose (Pan *et al.*, 2008).



Figure II-13 : Structures du tréhalose-6,6'-dimycolate (TDM), du sulfolipide (SL1) et des di-, tri- et poly-*O*-acyltréhaloses (DATs, PATs et TATs) de *M. tuberculosis* (Minnikin *et al.*, 2002).

#### i. Les tréhaloses mono- et di-mycolates

Dans les TMM et TDM, le tréhalose est estérifié par des acides mycoliques en positions 6 et 6,6' (Figure II-13). Les acides mycoliques néosynthétisés sont transférés du mycolyl-mannosylphosphoheptaprénol sur le tréhalose-6-phosphate par une première mycolyltransférase encore non identifiée (Besra et al., 1994b; Shimakata et Minatogawa, 2000). Selon Takayama et al., cette réaction a lieu du côté cytosolique de la membrane plasmique (Takayama et al., 2005). Le TMM va donc servir au transport des acides mycoliques au travers de la membrane plasmique. Ainsi, le TMM-1-phosphate va être déphosphorylé puis transféré du côté externe de la membrane plasmique par un transporteur membranaire (Takayama et al., 2005). Une fois dans la paroi, le TMM va servir à la synthèse du TDM. Ce dernier est formé grâce au transfert de l'acide mycolique d'un premier TMM sur un second (Sathyamoorthy et Takayama, 1987; Belisle et al., 1997; Jackson et al., 1999). Cette réaction peut être catalysée par trois mycolyltransférases Ag85A, 85B et 85C (Belisle et al., 1997; Jackson et al., 1999; Puech et al., 2000). Ces mycolyltransférases catalysent aussi le transfert des acides mycoliques du TMM sur l'arabinogalactane-peptidoglycanne (Belisle et al., 1997; Jackson et al., 1999; Puech et al., 2000; Puech et al., 2002; Takayama et al., 2005). Alors que le TMM est nécessaire à la biogénèse de la paroi, le TDM est quant à lui associé à de nombreux rôles biologiques liés à la pathogénicité des mycobactéries (Cf. partie B de ce chapitre).



1-O-α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside (trehalose)

Figure II-14 : Les 3 voies de biosynthèse du tréhalose dans les mycobactéries (De Smet *et al.*, 2000).

### ii. Les sulfatides

Les sulfatides sont des tréhaloses tri- ou tétra-acylés, sulfatés en position 2. Cette famille comporte cinq types de glycolipides isolés initialement dans une souche virulente de *M. tuberculosis* (Middlebrook *et al.*, 1959; Gangadharam *et al.*, 1963; Goren, 1970a). Ces glycolipides sont estérifiés par deux ou trois acides gras polyméthylés de type phtiocéranates et hydroxyphtiocéranates, ainsi que par un acide stéarique ou palmitique (Figure II-13 et Tableau II-2). La position, le nombre et le type d'acides gras diffèrent entre les sulfatides (Tableau II-2). Ces derniers ont tout de même en commun la présence d'un acide gras non linéaire en position 2' de leur tréhalose. Le sulfatide le plus abondant dans la paroi de *M. tuberculosis* est nommé sulfolipide-1 (SL-1) et consiste en un 2',3',6,6'-tétra-O-acyl-tréhalose-2-sulfate (Figure II-13 et Tableau II-2). Les recherches infructueuses de sulfatides dans d'autres espèces de mycobactéries démontrent qu'ils sont hautement spécifiques de certaines souches de *M. tuberculosis* (Luquin *et al.*, 1992). Cette spécificité est en partie la conséquence de l'acquisition récente, suite à un transfert latéral de gènes (transposon bactérien, prophage..), de la région génomique codant pour les sulfatides (Stinear *et al.*, 2008).

Tableau	II-2 :	Différences	dans	les	profils	d'acylation	des	cinq	types	de	sulfatides
identifiés	chez /	Mycobacteriu	m tube	ercu	losis (G	oren, 1970b)	•				

		Nombre et nature de groupements					
	Position d'acylation	Palmitate /Stéarate	phtiocéranate	hydroxyphtiocéranate			
SL-I	2',4',6,6'	1	1	2			
SL-I'	2',3',6, 6'	1	2	1			
SL-II	2',3',6, 6'	1	0	3			
SL-II'	2',4',6, 6'	1	0	3			
SL-III	2',3',6'	1	0	2			

La voie de biosynthèse des sulfolipides est partiellement élucidée. Six protéines sont désormais connues pour être impliquées dans l'assemblage séquentiel de SL-1 (Figure II-15). La première est la sulfotransférase SftO qui initie la biosynthèse par la sulfatation du tréhalose en position 2 (Mougous et al., 2004). L'acyltransférase PapA2 reconnait spécifiquement le tréhalose-2-sulfate et l'estérifie en position 2' par un acide palmitique ou stéarique (Bhatt et al., 2007; Kumar et al., 2007b). Ensuite, l'acyltransférase PapA1 transfère le premier acide (hydroxy)phtiocéranique en position 3' du tréhalose (Bhatt et al., 2007; Kumar et al., 2007b). Les phtiocéranates et hydroxyphtiocéranates sont synthétisés par la polycétide synthase Pks2, aidée de la protéine FadD23 (Sirakova et al., 2001; Lynett et Stokes, 2007). Comme illustré dans la Figure II-15, ces deux premières acylations sont réalisées du côté cytoplasmique de la membrane plasmique et conduisent à la formation d'un intermédiaire de biosynthèse nommé SL<sub>1278</sub>. Deux hypothèses existent pour expliquer la suite de la biosynthèse de SL-1. La première propose que SL<sub>1278</sub> est transporté du côté pariétal par la protéine membranaire MmpL8 puis estérifié par deux nouveaux phtiocéranates en position 6 et 6' du tréhalose (Figure II-15) (Converse et al., 2003; Domenech et al., 2004; Kumar et al., 2007b). Cette hypothèse a été formulée suite à l'observation de l'accumulation de SL<sub>1278</sub> du côté cytosolique de la membrane plasmique, consécutivement à l'interruption du gène mmpL8 (Converse et al., 2003; Domenech et al., 2004). Cependant, ceci impliquerait la présence dans la paroi d'une seconde acyltransférase capable de transférer les acides (hydroxy)phtiocéraniques sur SL<sub>1278</sub>. De plus, sachant que les acides (hydroxy)phtiocéraniques sont synthétisés par Pks2, ces derniers devront aussi être transportés au travers de la membrane par un transporteur membranaire. La deuxième hypothèse suggère plus simplement que SL-1 est totalement synthétisé du côté cytosolique de la membrane puis transporté par MmpL8. Dans ce cas, les estérifications sont réalisées par l'acyltransférase PapA1 mais nécessitent la présence de MmpL8 pour présenter le glycolipide (Kumar et al., 2007b). L'implication des sulfatides dans la virulence de M. tuberculosis est controversée. En effet, une étude a démontré que l'abolition de la synthèse des sulfatides ne donne lieu à aucune différence phénotypique lors de l'infection de souris (Rousseau et al., 2003c). Pourtant, d'autres études ont clairement défini un rôle immunomodulateur de SL-1 in vitro et in vivo (Cf. Chapitre II partie B) (Zhang et al., 1994; Okamoto et al., 2006).



Figure II-15 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse du sulfolipide SL1 de *M. tuberculosis* (Kumar et al., 2007b). (A) Le tréhalose est d'abord sulfaté par Stf0 pour former T2S. PapA2 estérifie T2S en position 2' pour former SL659. Un acide (hydroxy) phtiocéranique est alors synthétisé par Pks2 et transféré directement par PapA1 sur SL659 pour générer SL1278. (B) Suite hypothétique de la biosynthèse de SL-1. Le SL1278 diacylé est ensuite transféré par MmpL8 à l'extérieur de la cellule où les estérifications finales doivent être effectuées (Kumar et al., 2007b).

### iii. Les tréhaloses polyacylés

Cette famille de glycolipides a été décrite pour la première fois dans *M. tuberculosis* (Minnikin *et al.*, 1985). Ils ont aussi été retrouvés dans d'autres espèces du complexe de *M. tuberculosis* incluant *M. africanum* et *M. bovis* (Lemassu *et al.*, 1992). Ces glycolipides sont constitués de tréhaloses estérifiés par des acides gras à chaînes linéaires et par un ou plusieurs acides gras di- ou tri-méthylés (Figure II-13). Le di-acyltréhalose (DAT) est estérifié en positions 2' et 3, le tri-acyltréhalose (TAT) en positions 2',3',6', et le poly-acyltréhalose (PAT) en positons 2, 2',3', 4, 6' du tréhalose (Figure II-13) (Daffe *et al.*, 1988a ; Besra *et al.*, 1992a ; Munoz *et al.*, 1997a). Les acides gras à chaînes linéaires sont en grande majorité saturés et constitués de 16 à 19 carbones (Daffe *et al.*, 1988a ; Besra *et al.*, 1997a). Ils substituent tous les glycolipides de cette famille en position 2' du tréhalose. Les acides gras polyméthylés de cette famille de glycolipides comprennent les acides mycosanoïques C24-C26 saturés, les acides mycolipanoliques C24-C28 hydroxylés et les acides mycolipéniques (ou phtiénoïques) C22-C29 insaturés (Figure II-13). En plus de l'acide

gras linéaire en position 2', les DATs de *M. tuberculosis* sont estérifiés en position 3' par les acides mycosanoïques dans les composés majoritaires ou par les acides mycolipanoliques dans les glycolipides mineurs (Figure II-13 et Tableau II-3) (Besra *et al.*, 1992a). Dans les TATs, les tréhaloses sont majoritairement estérifiés en position 2', 3' et 6' par trois acides gras : un acide stéarique (C18), un acide palmitique (C16) et un acide mycolipénique (Figure II-13 et Tableau II-3) (Munoz *et al.*, 1997a). Les TATs sont aussi substitués de façon mineure par des acides gras insaturés C18:1 et des acides phtiénoiques 2,4-diméthylés (Munoz *et al.*, 1997a). Les PATs majoritairement retrouvés dans *M. tuberculosis* sont substitués en position 2' par un acide stéarique ou palmitique et en positions 2, 3',4, 6' par des acides phtiénoïques en C25-C29 (Figure II-13 et Tableau II-3) (Daffe *et al.*, 1988a). Dans les fractions mineures de PAT, l'un des quatre acides phtiénoiques est remplacé par un acide gras linéaire saturé (acide palmitique ou stéarique) ou par un acide mycolipanoïque en C27 (Daffe *et al.*, 1988a).

Des 2,3-diacyltréhaloses et 2, 3, 4- ou 2, 3, 6-triacyltréhaloses ont également été isolés dans la paroi de *M. fortuitum*, une espèce à croissance rapide non pathogène (Gautier *et al.*, 1992; Ariza *et al.*, 1994). Cependant, les acides gras de ces glycolipides diffèrent considérablement de ceux retrouvés dans *M. tuberculosis*. Chez *M. fortuitum*, les acides gras des DAT et TAT consistent en des chaînes linéaires en C14-C18 et des chaînes insaturées monométhylées en C16-C20. Les acides gras insaturés monométhylés en C16-C20 ont aussi été identifiés comme constituants très minoritaires des PAT et DAT de *M. tuberculosis* (Dubey *et al.*, 2003).

Tableau	II-3 :	Différences	dans	les	profils	d'acylation	des	di-,	tri-	et	poly-0-
acyltréha	loses (I	DAT, TAT, P.	AT) id	entif	iés chez	Mycobacteriu	m tu	bercu	losis.		

	Position d'acylation	acides gras	acides mycosanoïques	acides mycolipanoliques	acides mycolipéniques
DAT	2',3'	C16, C18, C19	C24, C25, C26 2,4- di-méthyles	C24, C26, C28 3- hydroxy-2,4,6-tri- méthyles	
ТАТ	2',3',6'	C16, C18, C18:1			C27 2,4,6-tri-méthyles et C22, C25, C26 2,4-di- méthyles
ΡΑΤ	2,2',3',4,6'	C16, C18		C27 3-hydroxy-2,4,6-tri- méthyles	C28, C29 2,4,6-tri- méthyles et C25, C27 2,4- di-méthyles

Les acides mycosanoïques, mycolipéniques et mycolipanoïques des DATs, TATs et PATs sont synthétisés par la PKS 3/4 (Figure II-16) (Dubey *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2003a). La protéine PapA3 transfère successivement l'acide gras linéaire et le premier acide gras polyméthylé en positions 2 et 3 du tréhalose pour former les DATs (Hatzios *et al.*, 2009). Ainsi, le transfert de l'acide gras linéaire ne nécessite pas une acyltransférase supplémentaire comme pour la biosynthèse des sulfatides. Le rôle de PapA3 dans le transfert des acides gras polyméthylés suivants reste à confirmer. La biosynthèse des acides gras monométhylés insaturés est assurée par la PKS 8/17. Comme pour les autres glycolipides, les gènes de biosynthèse des polyacyltréhaloses sont regroupés dans une même région sur le chromosome. La protéine codée par le gène *fadD23* est impliquée dans le transfert des acides gras linéaires sur la PKS 3/4 et la protéine issue du gène *mmpL10* est nécessaire au transport des acyltréhaloses au travers de la membrane plasmique (Figure II-16).



**Figure II-16 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des poly-***O***-acyltréhaloses (PATs) de** *M. tuberculosis* (Hatzios *et al.*, 2009). (A) Le tréhalose est d'abord estérifié en position 2' par un palmitate. Un acide mycolipénique est alors synthétisé par Pks3/4 et transféré directement par PapA3 sur le tréhalose 2-palmitoylé pour générer un tréhalose di-*O*-acylé. Le reste de la voie de biosynthèse est encore indéterminé mais il est possible que PapA3 soit responsable des 3 acylations suivantes. (B) Comparaison de régions génomiques impliquées dans la synthèse du sulfolipide-1 (SL-1) et dans la synthèse des PATs. La protéine MmpL10 et fadD21 interviennent certainement dans la synthèse des PATs.

Comme pour les sulfolipides, le rôle des polyacyltréhaloses dans la virulence des mycobactéries fait aujourd'hui débat. En effet, l'abolition de la synthèse des polyacylatréhaloses affecte les propriétés de surface de *M. tuberculosis* sans pour autant lui conférer un avantage dans l'infection de souris (Rousseau *et al.*, 2003a). Cependant, l'étude des DATs purifiés a permis de démontrer leurs propriétés immunomodulatrices qui seront exposées dans le sous-chapitre B (Saavedra *et al.*, 2006).

## iv. Les lipooligosaccharides

Les lipooligosaccharides (LOSs) sont des tréhaloses polyacylés et multiglycosylés (Figure II-17 et Tableau II-4). Ils ont été identifiés dans douze espèces des mycobactéries incluant des espèces saprophytes, comme *M. smegmatis*, des espèces opportunistes comme *M. kansasii*, *M. gastri* ou *M. marinum* et la souche virulente *M. canettii* (Hunter *et al.*, 1983; Hunter *et al.*, 1984; Daffe *et al.*, 1991a; Gilleron *et al.*, 1993; Besra *et al.*, 1994a; Burguiere *et al.*, 2005). Cette famille de glycolipides présente une très grande diversité structurale et ne possède en commun que le corps tréhalose. Ainsi, le nombre, la position et la nature des acides gras et des monosaccharides qui composent les LOSs varient entre les espèces de mycobactéries, quelques fois même entre les souches d'une même espèce (Tableau II-4). De plus, une seule espèce de mycobactéries peut posséder plusieurs LOSs, qui différent majoritairement par la longueur de leurs parties oligosaccharidiques (Tableau II-4). A titre d'exemple, les LOSs sont présents sous deux formes chez *Mycobacterium canettii*, quatre chez *Mycobacterium marinum* et jusqu'à huit chez *Mycobacterium kansasii* (McNeil *et al.*, 1989; Daffe *et al.*, 1991b; Burguiere *et al.*, 2005).

D'une manière générale, le tréhalose des LOSs est estérifié sur des positions variables par 3 à 4 acides gras linéaires et/ou polyméthylés (Tableau II-4). Le glucose du tréhalose qui n'est pas substitué par l'oligosaccharide est toujours plus acylé que son voisin (Tableau II-4). Il peut même être estérifié par les quatre acides gras à la fois (ex : *M. gordonae*). Sauf exception, l'acylation du second glucose du tréhalose n'a lieu qu'en position 2. De plus, les carbones 2 et 6' du tréhalose portent éventuellement des groupements méthoxyles. (ex : chez *M. szulgai* et *M. gordonae*). Le premier monosaccharide substituant le tréhalose est soit du D-Glc*p* lié en  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6 soit du L-Rha*p* lié  $\alpha$ -1,3. Comme pour les glycopeptidolipides, ces monosaccharides pourraient servir à classer les LOSs en 3 groupes : le groupe 1 des LOSs possède un noyau  $\beta$ -D-Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 4)-tréhalose, le groupe 2, un noyau  $\beta$ -D-Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 6)tréhalose et le groupe 3 un noyau  $\alpha$ -L-Rha*p*-(1 $\rightarrow$ 3)-tréhalose (Tableau II-4). Les monosaccharides suivants sont très variables et plusieurs d'entre-eux sont uniques et complexes comme le 4,6-didéoxy-2-O-Me-3-C-Me-4-(2'-méthoxypropionamido)-L-mannohexopyranose (N-acylkansosamine) de M. kansasii et le 3,6-didéoxy-4-C-(1,3-diméthoxy-4,5,6,7-tétrahydro-heptyl)- $\alpha$ -xylo-hexopyranose chez M. gastri (Hunter et al., 1984; Gilleron et Puzo, 1995). De plus, d'autres monosaccharides et/ou la nature de leurs substituants doivent encore être caractérisés. Ainsi, les LOSs de M. gordonae et M. tuberculosis possèdent des monosaccharides terminaux N-acylés par des substituants encore inconnus (Tableau II-4) (Daffe et al., 1991b; Besra et al., 1993a). Les LOSs de M. marinum n'ont été que partiellement décrits et la nature des monosaccharides terminaux du LOS-IV n'a pas pu être définie (Figure II-17) (Burguiere et al., 2005). Une grande partie de mes travaux de thèse a consisté en la détermination structurale de ces monosaccharides terminaux.



Figure II-17 : Structure des quatre lipooligosaccharides (LOSs) de *M. marinum* proposée par (Burguiere *et al.*, 2005). Les monosaccharides X et YZ n'ont pas été caractérisés.

Tableau II-4 : Structure des lipooligosaccharides identifiés dans les différentes espèces de mycobactéries.

 références		(McNeil <i>et al.</i> , 1987)	(Besra <i>et al.</i> , 1993a)	(Daffe <i>et al.</i> , 1991b)	(Camphausen <i>et al.</i> , 1987)	(Munoz <i>et al.</i> , 1998)
Structure des LOSs (suite)	Groupe 3: α-L-Rhap-(1→3)-tréhalose	$\alpha$ -D-Man <i>p</i> -(1→3)-α-D-Man <i>p</i> -(1→2)-α-L-Rha <i>p</i> -(1→2)-[3-O-Me-α-L-Rha <i>p</i> -(1→2)] <sub>2</sub> α-L-Rha <i>p</i> -(1→3)α-L-Rha <i>p</i> -(1→3)-α-D-Glc <i>p</i> -(1→3)-(1→3)-α-D-Glc <i>p</i> -(1→3)-(1-3)-(1→3)-(1→3)-(1→3)-(1-3)-	$\begin{aligned} & N-acyl-4-amino-4, 6-didéoxy-2, 3-di-O-Me-$\alpha$-Galp-(1$3)-2-O-Me-$\alpha$-L-Fucp-(1$3)-$\beta$-D-Glcp-(1$3)-$2-O-Me-$\alpha$-(1$3)-$\beta$-D-acyl-$\alpha$-D-Glcp-(1$3)-$\beta$-D-Acyl-$\alpha$-D-Glcp-(1$3)-$\beta$-D-Acyl-$\alpha$-D-Acyl-$\alpha$-D-Glcp-(1$3)-$\beta$-D-Acyl-$\alpha$-D-Acyl-$\alpha$-D-Glcp-(1$3)-$\beta$-D-Acyl-$\alpha$-D-Acyl-$$	$N-acyl-4-amino-4,6-didéoxy-\alpha-Galp-(1\rightarrow3)-2-O-Me-\alpha-L-Fucp-(1\rightarrow3)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow3)-2-O-Me-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow3)-2-O-Me-\alpha-L-Rhap-(1\rightarrow3)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow3)-\beta-D$	β-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Glcp-(1↔1)-3,4,6-tri-O-acyl-α-D-Glcp Acyl: 2,4-diméthyltétradécanoate	Trisaccharide-α-D-Glcp-(1↔1)-α-D-Glcp Acyl: 4 acylations par les dodéca-, tétradeca-, hexadécanoate et hexadécanoate, 2,4-diméthyleicosanoate, 2,4- diméthyleicosénoate
Espèces et LOSs		M. malmoense LOS-II	<i>M. gordonae</i> LOS-II	<i>M. canettii</i> LOS-II	M. linda (M. paratuberculo sis)	M. mucogenicum LOS-I

De par leur structure, les LOSs sont des glycolipides hautement antigéniques. Néanmoins, leur rôle dans la virulence des mycobactéries et /ou dans leur morphologie n'est pas bien défini. Des études ont montré que les souches de M. kansasii de morphologie rugueuse étaient dénuées de LOSs mais induisaient des infections chroniques chez la souris. Au contraire, les souches de M. kansasii de morphologie lisse et possédant des LOSs, étaient rapidement éliminées des organes de l'animal (Collins et Cunningham, 1981; Belisle et Brennan, 1989). Ces auteurs en ont conclu que les LOSs pouvaient masquer les composants de l'enveloppe impliqués dans la virulence des mycobactéries (Belisle et Brennan, 1989). Bien que le lien entre ces glycolipides et la morphologie des mycobactéries ait été rapidement contredit, le rôle des LOSs dans la pathogénicité des mycobactéries n'a pas été étudié plus longuement (Lemassu et al., 1992). Par ailleurs, la plupart des souches de M. tuberculosis ne synthétisent pas ou très peu de LOSs (Lemassu et al., 1992; Munoz et al., 1997b). Les LOSs ont donc été essentiellement étudiés pour leurs structures antigéniques, permettant le sérotypage des espèces (Daffe et al., 1991b; Munoz et al., 1997b). Une étude plus récente a démontré que les LOSs de M. marinum avaient un rôle dans la motilité, la formation du biofilm et l'entrée des mycobactéries dans les macrophages (Burguiere et al., 2005). Ces constatations ont relancé l'intérêt porté à ces glycolipides et aux gènes impliqués dans leur biosynthèse. Les gènes nécessaires à la biosynthèse de la partie glycannique des LOSs de M. marinum ont été particulièrement étudiés (Burguiere et al., 2005; Ren et al., 2007). Une autre étude réalisée chez *M. smegmatis* a permis d'établir l'implication de la PKS 5 dans la biosynthèse des acides gras polyméthylés des LOSs.



**Figure II-18 : Structure de 3 types de glycopeptidolipides (GPLs) (Schorey et Sweet, 2008).** (A) Structure des GPLs apolaires ou non spécifiques (<sub>a</sub>GPLs) des MACs et de *M. smegmatis.* (B) Structure des GPLs polaires (<sub>p</sub>GPLs) des sérotypes 1 et 2 des MACs. (C) Structure des GPLs polaires (pGPLs) de *M. smegmatis.* 

# d. Les glycopeptidolipides

(Pour revues, voir (Chatterjee et Khoo, 2001) et (Schorey et Sweet, 2008))

Les glycopeptidolipides (GPLs) sont présents dans de nombreuses espèces de mycobactéries dites non tuberculeuses. Cette famille de glycolipides a été principalement caractérisée dans *M. avium* et *M. intracellulare*, qui font partie du complexe des mycobactéries de *M. avium* (ou MAC) (Chatterjee et Khoo, 2001). Les GPLs sont aussi présents dans des mycobactéries opportunistes telles que dans *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. habana* et *M. simiae* (Riviere *et al.*, 1993; Khoo *et al.*, 1996a; Ripoll *et al.*, 2007). Enfin, ils ont aussi été retrouvés dans certaines bactéries saprophytes comme *M. smegmatis* et *M. butyricum* ou pathogènes des animaux incluant *M. porcinum*, *M. senegalense* (Lopez Marin *et al.*, 1993; Villeneuve *et al.*, 2003).

Les GPLs sont constitués d'un corps lipopeptidique substitué par des motifs glycanniques (Figure II-18) (Chatterjee et Khoo, 2001; Schorey et Sweet, 2008). La partie lipidique est un acide gras en C26-33 hydroxylé ou méthoxylé en position 3. Le lipide estérifie la fonction amine de la D-phénylalanine du corps peptidique. Ce dernier, réduit en position C-terminale, possède une séquence de type D-phénylalanine-D-allo-thréonine-Dalanine-L-alaninol (D-Phe-D-allo-Thr-D-Ala-L-alaninol) (Figure II-18). Dans le cas très spécifique de M. xenopi, le lipopeptide est constitué d'un corps tétrapeptidique L-sérine-(O-Me)-L-sérine-D-phénylalanine-O-Me-D-allo-thréonine N-acylé sur la sérine par d'un acide laurique (Riviere et Puzo, 1992; Besra et al., 1993b; Riviere et al., 1993). La glycosylation du lipopeptide a conduit à subdiviser les GPLs en deux familles, apolaire et polaire (Figure II-18). De par leur faible niveau de glycosylation, les GPLs apolaires (aGPLs) sont non spécifiques des souches (ou sérotypes) dans une même espèce de mycobactéries. Les aGPLs sont à la base de la synthèse des GPLs polaires (pGPLs). Ces derniers possèdent des motifs glycanniques qui varient entre les nombreux sérotypes d'une même espèce. D'ailleurs, les pGPLs pourraient permettre d'établir une classification des nombreux sérotypes des MAC (Chatterjee et Khoo, 2001).

avium-intracellulare (Chatterjee et Khoo, 2001). Les GPLs des sérotypes 7 et 16 ont été ajoutés d'après les études de (Fujiwara *et al.*, 2007; Fujiwara *et al.*, 2008). Tableau II-5 : Structure des GPLs polaires caractérisés dans les différents sérotypes des mycobactéries du complexe de Mycobacterium

Sérotypes	Structures
	core: $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)-L-dTal
1	Core non substitué
	Groupe 1: R-α-L-Fuc <i>p</i> -(1→3)-core
2	4-O-Ac-2,3-di-O-Me- $\alpha$ -L-Fuc $p$ -(1→3)-core
4	4-O-Me- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 4)-2-O-Me- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-core
14	4-formamido-4,6-didéoxy-2-O-Me-3-C-Me- $\alpha$ -L- <i>manno</i> -hex <i>p</i> -(1→3)-2-O-Me- $\alpha$ -D-Rha <i>p</i> -(1→3)- 2-O-Me- $\alpha$ -L-Fuc <i>p</i> -(1→3)-core
20	2-O-Me-α-L-Rhap-(1→3)-2-O-Me-α-L-Fucp-(1→3)-core
3	2,3-di-O-Me- $lpha$ -L-Fuc $p$ -(1 $ ightarrow$ 4)- $eta$ -D-Glc $p$ A-(1 $ ightarrow$ 4)-2,3-di-O-Me- $lpha$ -Fuc $p$ -(1 $ ightarrow$ 3)-core
6	$4$ -O-Ac-2,3-di-O-Me- $lpha$ -L-Fuc $p$ -(1 $\rightarrow$ 4)- $eta$ -D-Glc $p$ A-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-Me- $lpha$ -Fuc $p$ -(1 $\rightarrow$ 3)-core
25	2-O-Me- <i>α</i> -L-FucpNAc-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-2-O-Me- <i>α</i> -L-Fuc <i>p</i> -(1→3)-core
26	2,4-di-O-Me- $lpha$ -L-Fuc $p$ -(1 $ ightarrow$ 4)- $eta$ -D-Glc $p$ A-(1 $ ightarrow$ 4)-2-O-Me- $lpha$ -L-Fuc $p$ -(1 $ ightarrow$ 3)-core
	Groupe 2: R-α-L-Rha <i>p</i> -(1→3)-core
7	4-(2'-hydroxy)propanamido-4,6-didéoxy-2-O-methyl-β-Hexp- $(1  ightarrow 3)$ - $a$ -L-Rha $p$ - $(1  ightarrow 3)$ - $a$ -L-Rha $p$ - $(1  ightarrow 3)$ -core
12	$4-(2'-hdyroxy)$ propanamido-4,6-didéoxy-3-O-Me- $eta$ -D-Glc $p-(1 \rightarrow 3)$ -4-O-Me- $lpha$ -L-Rha $p-(1 \rightarrow 3)$ - $lpha$ -( $1 \rightarrow 3$ )-core
16	$3-(2-Me-3'-hydroxy-4'-O-Me)$ pentanamido- $3,6-didéoxy-\beta-Hexp-(1 \rightarrow 3)-4-O-Me-a-L-Rhap-(1 \rightarrow 3)-a-L-Rhap-(1 \rightarrow 3)-core$
17	$4-(2'-OH-3'-O-Me)$ butanamido-3,6-didéoxy-3-O-Me- $\beta$ -D-Glc $p-(1 \rightarrow 3)$ -4-O-Me- $\alpha$ -L-Rha $p-(1 \rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Rha $p-(1 \rightarrow 3)$ -core
19	3,4-di-O-Me- $eta$ -D-Glc $p$ A- $(1  ightarrow 3)$ -3-C-Me- $2,4$ -di-O-Me- $lpha$ -L-Rha $p$ - $(1  ightarrow 3)$ -core
	Groupe 3: R-β-D-Glc <i>p</i> -(1→3)-core
8	4,6-(1-carboxyethylidene)-3-O-Me-β- D-Glc <i>p</i> -(1→3)-core
21	4,6-(1-carboxyethylidene)- $\beta$ - D-Glc $p$ -(1 $\rightarrow$ 3)-core

Le lipopetide des GPLs est généralement glycosylé par un  $\alpha$ -L-rhamnose sur l'alaninol et par un 6-déoxy- $\alpha$ -L-talose (6-déoxytalose) sur l'*allo*-thréonine (Figure II-18A). Dans les aGPLs des MACs, le 6-déoxytalose est non méthylé ou 3-*O*-méthylé et le rhamnose est 3-*O*méthylé ou 3,4-di-*O*-méthylé. De plus, en fonction des sérotypes, ces deux monosaccharides peuvent être *O*-acétylés en différentes positions (Chatterjee et Khoo, 2001). En comparaison, chez *M. smegmatis*, *M. chelonae* et *M. abscessus*, le rhamnose est 3,4-di-*O*-méthylé ou 2,3,4tri-*O*-méthylé et le 6-déoxytalose est 3,4-di-*O*-acétylé (Figure II-18A) (Patterson *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2003; Ripoll *et al.*, 2007). La présence d'un succinate substituant le rhamnose en position 2 a aussi été démontrée dans les <sub>p</sub>GPLs de *M. smegmatis* (Villeneuve *et al.*, 2003). Les <sub>a</sub>GPLs de *M. senegalense*, *M. porcinum* et *M. peregrinum*, se caractérisent quant à eux par le remplacement du 6-déoxytalose lié sur l'*allo*-thréonine par un 3-*O*-Me- $\alpha$ -Lrhamnose (Lopez Marin *et al.*, 1991; Lopez Marin *et al.*, 1993). Encore une fois, dans le cas spécifique de *M. xenopi*, le lipopeptide est substitué sur la serine acylée par un 3-*O*-Me-6déoxytalose et sur l'allo-thréonine par un 2-lauryl-3-*O*-méthyl-rhamnose (Riviere et Puzo, 1992; Besra *et al.*, 1993b; Riviere *et al.*, 1993).

En plus des <sub>a</sub>GPLs, les sérotypes de *M. avium* et *M. intracellulare* synthétisent de très nombreux <sub>p</sub>GPLs qui diffèrent par le nombre et la nature des monosaccharides (Figure II-18B). Ces derniers, au nombre maximum de quatre, substituent uniquement le résidu de 6-déoxytalose. Le résidu de rhamnose lié sur l'alaninol est quant à lui toujours 3,4-di-*O*-méthylé. De même, le premier monosaccharide substituant le 6-déoxytalose est uniquement un  $\alpha$ -L-rhamnose lié en  $\alpha$ -1,2. La glycosylation supplémentaire varie selon le sérotype de MAC (Figure II-18B et Tableau II-5). En se basant sur la nature et liaison du troisième monosaccharide, des auteurs ont établi une classification des <sub>p</sub>GPLs identifiés dans les différents sérotypes (Tableau II-5) (Chatterjee et Khoo, 2001). Les monosaccharides rares ou uniques tels que les monosaccharides *N*-acylés terminaux qui composent les <sub>p</sub>GPLs des MACs rendent ces glycolipides hautement antigéniques (Tableau II-5).

Les <sub>p</sub>GPLs synthétisés par certaines espèces de mycobactéries à croissance rapide (*M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. chelonae*) possèdent des structures sensiblement différentes des <sub>p</sub>GPLs des *M. avium-intracellulare* (Figure II-18C). Les <sub>p</sub>GPLs de *M. habana* sont une exception puisqu'ils pourraient intégrer le groupe 2 des <sub>p</sub>GPLs des MACs (Chatterjee et Khoo, 2001). Les <sub>p</sub>GPLs de *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. chelonae* sont produits par l'addition d'un second résidu de 3,4-di-*O*-méthyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranose-(1 $\rightarrow$ 3) sur le premier 3,4-di-*O*-méthyl-rhamnopyranose lié à l'alaninol (Figure II-18C) (Villeneuve *et al.*, 2003;

Ripoll *et al.*, 2007). Le 6-déoxytalose est di-*O*-acétylé mais jamais glycosylé. De plus, dans les <sub>p</sub>GPLs de *M. peregrinum*, le second 3,4-di-*O*-méthyl-rhamnopyranose peut être sulfaté en C-2 (Chatterjee et Khoo, 2001). Chez *M. xenopi*, le 2-lauryl-3-*O*-méthyl-rhamnose liant l'alaninol est majoritairement substitué en  $\alpha$ -1,3 par un 4-octanoyl/décanoyl- $\alpha$ -L-méthyl-rhamnose (Besra *et al.*, 1993b; Chatterjee et Khoo, 2001).

Les voies de biosynthèse des GPLs ont été étudiées dans les mycobactéries du complexe de M. avium et dans M. smegmatis, M abscessus et M. chelonae (Figure II-19). Le tripeptide-amino-alcool est assemblé par les produits des gènes mps1 et mps2 (Sonden et al., 2005). La synthèse et le transfert du lipide sur le peptide sont assurés par une polycétide synthase et une acyltransférase (Sonden et al., 2005). Le 6-déoxytalose et le rhamnose sont transférés sur le lipopeptide par les glycosyltranférases GtfA et GtfB chez les MACs (ou Gtf1 et Gtf2 pour M. smegmatis) (Figure II-19) (Eckstein et al., 2003; Miyamoto et al., 2006). La rhamnosyltransférase codée par rftA catalyse ensuite l'ajout d'un résidu de rhamnopyranose sur le 6-déoxytalose et permet ainsi la formation des <sub>p</sub>GPLs du sérotype 1 des MACs (Tableau II-5 et Figure II-19) (Eckstein et al., 1998). De nombreuses autres protéines impliquées dans la synthèse des <sub>p</sub>GPLs spécifiques des sérotypes ont ainsi été identifiées. Par exemple, la fucosyltransférase GtfD et la glucosyltransférase gtfTB sont impliquées dans la formation des pGPLs du groupe 1 et 3 (Tableau II-5) (Miyamoto et al., 2007; Miyamoto et al., 2008). Les rhamnosyltransférases nécessaires à la synthèse des pGPLs du groupe 2 sont sur le point d'être identifiées (Tableau II-5) (Fujiwara et al., 2007; Fujiwara et al., 2008). Dans M. smegmatis, M. abscessus et M. chelonae, la glycosyltransférase Gtf3 catalyse l'addition en  $\alpha$ -1,3 du second résidu de 3,4-di-O-méthyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranose (Figure II-19). En plus des glycosyltransférases, de nombreux gènes codant pour des méthyltransférases (rmt2, rmt3, rmt4 chez M. smegmatis ou mtfA, mtfB, mtfC, mtfD chez M. avium) et un gène codant pour une acétyltransférase (Aft chez M. smegmatis) ont été identifiés (Schorey et Sweet, 2008) (Figure II-19).

Comme pour les LOSs, le rôle des GPLs dans les mycobactéries n'est pas encore bien compris. Les GPLs joueraient un rôle dans la résistance aux antibiotiques, seraient responsables des différences morphologiques des colonies et participeraient à la motilité et à la formation des biofilms mycobactériens (Schorey et Sweet, 2008). De façon certaine, les GPLs exposés à la surface des mycobactéries participent grandement à l'immunomodulation de la réponse immunitaire (Schorey et Sweet, 2008).



Figure II-19 : Voies de biosynthèse des GPLs apolaires et polaires des mycobactéries du complexe de *M. avium* (MAC) et de *M. smegmatis* (Schorey et Sweet, 2008). Les gènes impliqués dans la synthèse des GPLs des MACs sont soulignés.

# e. Les autres glycolipides

L'enveloppe des mycobactéries est constituée de nombreux autres glycolipides parfois mineurs qui semblent restreints à certaines espèces. Les mannosyl-\beta-1très phosphomycokétides (MPIs) ont été trouvés dans des espèces pathogènes pour l'homme incluant *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG et *M. avium* mais pas pour des espèces saprophytes telles que M. smegmatis, M. phlei ou M. falax (Moody et al., 2000b; Moody, 2001; Matsunaga et al., 2004). Les MPIs sont constitués par un mannosyl-β-1-phosphate, identique à celui du mannosyl-\beta-1-phosphodolichols des cellules de mammifères, et d'un acide gras saturé en C30-C34 pentaméthylé en positions 4, 8, 12, 16 et 20. La biosynthèse du lipide requiert l'activité de la Pks12 (Matsunaga et al., 2004; Chopra et al., 2008). Le reste de la voie de biosynthèse de ce glycolipide est encore indéterminé. Au même titre que les polyprénol-monophosphomannoses (DPM), les MPIs pourraient avoir un rôle dans la biosynthèse des LAM et LM (Moody et al., 2000b; Moody, 2001). Mais ces glycolipides ont surtout été décrits comme des activateurs de la prolifération lymphocytaire suite à leur présentation sur les récepteurs CD1c des cellules présentatrices d'antigènes (Moody et al., 2000b; Moody, 2001; Matsunaga et al., 2004).

Des glycolipides mycolylés autres que les TMM et TDM ont aussi été retrouvés dans l'enveloppe mycobactérienne. Ceux-ci incluent mycolylnotamment le mannosylphosphoheptaprénol, impliqué dans la synthèse des TMM et TDM (Besra et al., 1994b; Takayama et al., 2005). Des glycérol-monomycolate (MMG), glucose-6monomycolate (GMM) et arabinose-5-monomycolate ont aussi été caractérisés chez les mycobactéries du complexe de M. tuberculosis (Moody et al., 2000a). Cependant, leur présence lors d'une infection mycobactérienne reste discutable car leur biosynthèse est fortement dépendante du milieu de culture (Moody et al., 1997; Moody et al., 2000a; Matsunaga et al., 2008). Par exemple, si l'on supplémente le milieu de culture des mycobactéries avec du glucose, le GMM sera fortement synthétisé par le micro-organisme, parfois-même en quantité plus importante que le TDM (Matsunaga et al., 2008). Au détriment de la formation du TDM, la mycolyltransférase Ag85 catalyse la synthèse du GMM en utilisant le TMM comme donneur d'acides mycoliques et le glucose comme accepteur (Matsunaga et al., 2008). L'acide mycolique du GMM et du MMG permet leur apprêtement sur les récepteurs CD1b et leur présentation aux lymphocytes T (Moody et al., 1997; Moody et Besra, 2001; Layre *et al.*, 2009). Le MMG est considéré aujourd'hui comme un adjuvent pour de futurs vaccins (Andersen *et al.*, 2009).

Une autre famille de glycolipides mycolylés est présente dans les mycobactéries du complexe de *M. avium-intracellulare* (MAC) et *M. kansasii* mais semble absente dans *M.* bovis BCG (Watanabe et al., 1992; Watanabe et al., 1997; Watanabe et al., 1999). Cette famille comporte deux membres de structure apparentée : le 5-O-mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl-α-D-Ara*f*-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol le 5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol et (Watanabe et al., 1992; Watanabe et al., 1999). On notera que le disaccharide mycolylé est identique à celui présent en position terminale de l'arabinogalactane. Du fait de la spécificité de ces glycolipides aux souches de M. avium-intracellulare, ils ont été étudiés pour la mise au point de tests diagnostics discriminant les patients infectés par les MACs de ceux atteints de la tuberculose (Honda et al., 1993). Une grande partie des sérums des patients infectés par les MACs possèdent des IgMs dirigés contre le 5-O-mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol. Néanmoins, un petit nombre de sérums de patients infectés par M. tuberculosis possèdent également des IgMs dirigés contre le glycolipide (Honda et al., 1993).

Enfin, *M. phlei* synthétise un polyphléoyl tréhalose qui correspond à un tréhalose acylé par huit acides gras poly-insaturés : les acides phléiques (Asselineau *et al.*, 1972).

# 4. Les polysaccharides capsulaires

La capsule est composée en grande majorité (97%) de protéines et polysaccharides, et d'une petite quantité de (glyco)lipides. Trois types de polysaccharides ont été trouvés dans la capsule de *M. tuberculosis* : un  $\alpha$ -D-glucane d'une masse moléculaire supérieure à 100000 Da, un D-arabino-D-mannane, et un D-mannane (Ortalo-Magne *et al.*, 1995; Lemassu *et al.*, 1996; Daffe et Etienne, 1999). Le D-mannane et le D-arabino-D-mannane ont des structures similaires aux domaines mannane et arabino-mannane du LM et du LAM. Ces similitudes incluent aussi les coiffes et les substitutions rares telles que les succinates et les 5-méthyl-thiopentoses (Lemassu *et al.*, 1996; Ortalo-Magne *et al.*, 1996a; Maes *et al.*, 2007). Il est donc tout à fait envisageable que ces deux polysaccharides proviennent d'une hydrolyse enzymatique des LM et LAM. En accord avec cette hypothèse, des D-mannanes et D-arabino-D-mannanes mineurs, possédant encore une ancre phosphatidyl-*myo*-inositol non acylée, ont été identifiés dans la capsule de *M. kansasii* (Maes *et al.*, 2007). La déacylation puis la libération de l'ancre phosphatidyl-*myo*-inositol par hydrolyse des LM et LAM peuvent

conduire à la formation des deux polysaccharides correspondants. Une seconde possibilité serait une synthèse *de novo* d'un mannane puis de l'arabinomannane. Dans ce cas, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des LM et LAM pourraient aussi intervenir dans la synthèse des mannanes et arabinomannanes. Néanmoins, une synthèse *de novo* implique que les deux polysaccharides mannosylés soient assemblés sur une ancre lipidique dans la membrane plasmique. En accord avec cette hypothèse, un « pseudo » LM a récemment été caractérisé dans une bactérie de même sous-ordre que les mycobactéries : *Corynebacterium glutamicum* (Tatituri *et al.*, 2007). En plus de synthétiser un LM similaire à celui des mycobactéries, *C. glutamicum* polymérise un second LM sur la base d'une ancre  $\alpha$ -D-Manp-(1→4)-( $\alpha$ -D-GlcAp)-(1→3)-1,2-di-*O*-acyl-glycérol. Ce nouveau LM n'a pas encore été identifié dans les mycobactéries mais pourrait correspondre à un intermédiaire de biosynthèse du mannane et de l'arabinomannane.

L' $\alpha$ -D-glucane est le polymère majoritaire de la capsule, représentant 80% (m/m) des polysaccharides extra-cellulaires (Ortalo-Magne *et al.*, 1995; Lemassu *et al.*, 1996). Il est constitué d'une chaîne d'unités glucose liées en  $\alpha$ -1,4 et ramifiées en  $\alpha$ -1,6 tous les 5 à 6 résidus. Du fait de sa similitude structurale avec le glycogène intra-cellulaire, sa biosynthèse est analogue et implique les mêmes enzymes: les  $\alpha$ -glucosyltransférases Rv3032, et GlgA (Rv1212c), l'ADP-glucose pyrophosphorylase GlgC (Rv1213) et l'enzyme de branchement GlgB (Rv1326c). Différentes fonctions biologiques ont été associées aux polysaccharides capsulaires, suggérant leur rôle dans l'immuno-pathogénicité (Cf. partie B de ce chapitre). En plus des polysaccharides, la capsule est composée de glycolipides incluant les PIMs, les PGLs, les LOSs et les GPLs (Daffe et Etienne, 1999). D'après une étude récente, la composition en polysaccharide de la capsule de *M. marinum* est similaire à celle de *M. tuberculosis*. Par contre, une plus petite quantité de PIMs a été retrouvée dans la capsule de *M. marinum* (Sani *et al.*, 2010).

# 5. Les glycoprotéines

A ce jour, six glycoprotéines sécrétées ont été identifiées dans les mycobactéries dont trois ont fait l'objet d'une caractérisation biochimique ciblée sur leur domaine glycannique: MPB83 chez *M. bovis*, Apa (Rv1860, 45-47 kDa) et SodC (Rv3873) chez *M. tuberculosis* (Dobos *et al.*, 1996; Michell *et al.*, 2003; Sartain et Belisle, 2009). Celles-ci sont modifiées par une à trois unités de D-Manp au niveau de résidus thréonine (Thr) ou sérine (Ser),

rappelant les profils de glycosylation à courte chaîne des eucaryotes. Dans MPB83, deux résidus adjacents de Thr sont modifiés par au plus trois D-Manp liés en  $\alpha$ -1,3 (Michell *et al.*, 2003). La protéine Apa possède quatre Thr non adjacentes O-glycosylées par du mannose, du mannobiose ou du mannotriose liés en  $\alpha$ -1,2 (Dobos et al., 1996). Pour SodC, six sites de glycosylation, constitués par 3 Ser et 3 Thr, ont été caractérisés (Sartain et Belisle, 2009). Comme pour Apa, les Ser et Thr sont glycosylées par du mannose, du mannobiose ou du mannotriose. Les motifs de glycosylation d'Apa ont été impliqués dans différentes activités biologiques incluant la capacité de cette protéine à induire une réponse différée d'hypersensibilité chez le cochon d'Inde, la stimulation de lymphocytes T in vitro et la liaison à certaines lectines de type C (SP-A et DC-SIGN). Les trois autres glycoprotéines sont les lipoprotéines LpqH (Rv, 3763, 19 kDa) et PstS-1 (Rv0934, 38 kDa), et la protéine Rv3873 (de la famille des PPE) (Espitia et Mancilla, 1989; Herrmann et al., 1996; Daugelat et al., 2003). LpqH est glycosylée sur une paire et un triplet de résidus Thr (Herrmann et al., 1996). La glycosylation de cette protéine la protège de la dégradation et lui confère des activités immunomodulatrices sur les cellules monocytaires (Herrmann et al., 1996; Wilkinson et al., 2009). Plusieurs autres protéines de M. tuberculosis sont également suspectées d'être glycosylées, mais leurs motifs de glycosylation n'ont pas encore été caractérisés (Herrmann et al., 2000). Chez M. marinum, la lipoprotéine LpqH est prédite tronquée et non glycosylée (Wilkinson et al., 2009). De plus, la protéine Apa de M. marinum possède des résidus de Ser à la place des résidus de Thr, sites de glycosylation dans la protéine Apa de M. tuberculosis. Cette différence pourrait conduire à la non-glycosylation de Apa chez M. marinum (Pitarque et al., 2005). Cependant des études en cours dans notre laboratoire ont permis de démontrer qu'Apa de M. marinum était bien glycosylée (résultats non publiés). Les glycosyltransférases impliquées dans la glycosylation des protéines de M. tuberculosis sont encore méconnues. Des approches bioinformatiques ont permis d'identifier une seule protéine, Rv1002c, présentant une similarité de séquence protéique et de profil d'hydrophobicité avec les Omannosyltransférases de Saccharomyces cerevisiae (VanderVen et al., 2005). Il s'agit d'une protéine membranaire intégrale, appartenant à la superfamille GT-C des glycosyltransférases, qui catalyse l'étape initiale de la mannosylation d'Apa. De plus, il a aussi été montré que la mannosylation chez M. tuberculosis nécessite, comme chez les eucaryotes, une translocation Sec-dépendante (VanderVen et al., 2005). Les glycosyltransférases impliquées dans la poursuite de l'élongation en  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3 n'ont à ce jour pas été identifiées.

# B. Activités biologiques des glycoconjugués lors de l'infection mycobactérienne

Comme nous venons de l'apprécier, les glycoconjugués sont des constituants essentiels et majoritaires de l'enveloppe des mycobactéries. Certains d'entres eux sont spécifiques à une espèce alors que d'autres sont ubiquitaires. De très nombreuses études ont mis en évidence l'implication des glycoconjugués mycobactériens au cours de l'immunopathogénèse des mycobactéries. Dans ce sous-chapitre, nous détaillerons les relations entre la structure et les activités biologiques des glycoconjugués au cours de l'infection tuberculeuse.

# 1. Les récepteurs

Les glycoconjugués mycobactériens sont reconnus par plusieurs opsonines solubles et récepteurs membranaires des macrophages et des cellules dendritiques (Tableau II-6). Ces interactions entrainent l'activation et/ou l'inhibition de nombreux phénomènes biologiques tels que la phagocytose, la production de cytokines et chimiokines, ou l'initiation de la réponse immunitaire innée. Les glycolipides des mycobactéries étant les glycoconjugués pariétaux majoritaires, de nombreux travaux ont porté sur l'identification des récepteurs qui leurs sont associés. Les récepteurs et opsonines peuvent être classés en trois familles selon les motifs bactériens reconnus. La première famille regroupe les lectines qui lient la partie glycosidique des glycoconjugués. Parmi les lectines, on peut citer les protéines du surfactant pulmonaire (SP-A et SP-D), le récepteur à mannose (MR) et DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin). La deuxième famille regroupe les récepteurs « scavengers » qui reconnaissent principalement des motifs lipidiques. Les récepteurs MARCO (MAcrophage Receptor with COllagenous structure) et SR-A (Scavenger Recptor A) font partie de cette famille. Enfin, la troisième famille comprend les récepteurs TLR (Toll-like receptor) et NLR (NOD-like receptor) qui reconnaissent des motifs variés.

Les récepteurs de surface sont tous regroupés dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique nommés radeaux lipidiques. Pour une meilleure efficacité, les récepteurs peuvent s'associer entre eux (Tableau II-7) et/ou avec des protéines coprésentatrices d'antigènes telles que les protéines CD14, MD1, MD2, la LBP (LPS-binding protein) ou encore MBL (Mannose Binding Lectin).

# Tableau II-6 : Les glycoconjugués des mycobactéries se lient spécifiquement à de nombreux récepteurs solubles et membranaires.

mAGp : mycolyl-arabinogalactane peptidoglycanne ; PIMs : phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides ; LM : lipomannane ; LAM : lipoarabinomannane ; PGL : glycolipide phénolique ; TDM : tréhalose di-mycolates GPLs : glycopeptidolipides ; NOD : nucleotide-binding oligomerization domain protein ; MBL : mannose binding lectin ; CR : complement receptor ; MR : mannose receptor ; DC-SIGN : dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin ; TLR : tolllike receptor ; SP: surfactant protein ; LBP : LPS-binding protein ; MARCO : macrophage receptor with collagenous structure ; SR : scavenger receptor.

Glycoconjugués	Structures	Récepteurs	Espèces	Références
mAGp	muramyl-dipeptide (MDP)	NOD2	M. tuberculosis	(Yang et al., 2007)
PIM	PIM <sub>2</sub> à PIM <sub>6</sub>	MBL	M. tuberculosis, M. avium	(Hoppe <i>et al.</i> , 1997; Polotsky <i>et al.</i> , 1997)
	Ac <sub>x</sub> PIM2	CR3	M. smegmatis	(Villeneuve et al., 2005a)
	Ac <sub>3</sub> PIM5,6 Préférentiellement	MR M. tuberculosis		(Torrelles et al., 2006)
	Ac <sub>x</sub> PIM-6 Préférentiellement	DC-SIGN	M. bovis BCG	(Driessen et al., 2009)
	Ac <sub>x</sub> PIM2 and Ac <sub>x</sub> PIM6	TLR2/TLR1/CD14	M. tuberculosis, M.bovis BCG	(Gilleron <i>et al.</i> , 2003)
	PIM <sub>1</sub> /PIM <sub>2</sub>	Galectine-3	M. bovis BCG	(Beatty et al., 2002)
LM	LM	MBL	M. avium	(Polotsky et al., 1997)
	Ac <sub>3</sub> LM	TLR2/TLR1/(LBP)/CD14	M. tuberculosis; M. bovis BCG; M. Kansasii; M. chelonae	(Gilleron <i>et al.</i> , 2006; Elass <i>et al.</i> , 2007);
	Ac <sub>4</sub> LM	TLR4	M. tuberculosis; M. bovis BCG	(Doz et al., 2007)
LAM	ManLAM	SP-A	M. tuberculosis, M. bovis BCG	(Sidobre <i>et al.</i> , 2002)
	ManLAM	SP-D	M. tuberculosis	(Ferguson et al., 1999)
	ManLAM	DC-SIGN	M.tuberculosis	(Maeda et al., 2003)
	ManLAM	MR		(Nigou et al., 2001)
	ManLAM	MBL	M. avium	(Polotsky et al., 1997)
	ManLAM	TLR2/TLR1/LBP/CD14	M. Kansasii	(Elass et al., 2007)
	PILAM	TLR2	M. smegmatis, M.fortuitum	(Wieland et al., 2004)
PGL	Trisaccharidique	C3/CR3	M. leprae	(Schlesinger et Horwitz, 1991)
Glycolipides à noyau tréhalose	TDM	Mincle/FcRy	M. tuberculosis, M. bovis BCG, M. smegmatis	(Ishikawa <i>et al.</i> , 2009; Schoenen <i>et al.</i> , 2010)
	TDM	MARCO/TLR2/CD14	M. tuberculosis	(Bowdish et al., 2009)
	TDM	SR-A /TLR2/TLR4/CD14/MD2	M. tuberculosis	(Ozeki et al., 2006)
GPL	GPLs polaires	MR	M. avium, M. smegmatis	(Shimada et al., 2006)
	GPLs apolaires et polaires	TLR2	M. avium	(Sweet et al., 2008)
	GPLs polaires	CR3/CR4	M. smegmatis	(Villeneuve et al., 2005a)
Polysaccharides	Tous	CR3	M. tuberculosis	(Cywes <i>et al.</i> , 1997; Stokes <i>et al.</i> , 2004)
	α-glucanne	DC-SIGN	M. tuberculosis	(Geurtsen et al., 2009)
	Man- Arabinomannane	DC-SIGN	M. tuberculosis	(Pitarque et al., 2005)

Tableau II-6 (suite) : Les glycoconjugués des mycobactéries se lient spécifiquement à de nombreux récepteurs solubles et membranaires.

Suite									
Glycoconjugués	Structures	Récepteurs	Espèces	Références					
Glycoprotéines	LpqH (19KDa)	DC-SIGN	Expression dans M. smegmatis	(Pitarque <i>et al.</i> , 2005)					
	LpqH	MR	M. tuberculosis	(Diaz-Silvestre et al., 2005)					
	LpqH	TLR2/MD1/RP105	M. tuberculosis	(Blumenthal et al., 2009)					
	LpqH	TLR2/TLR1/CD14	M. tuberculosis,	(Drage et al., 2009)					
	Apa (45-47KDa)	DC-SIGN	Expression dans M. smegmatis	(Pitarque <i>et al.</i> , 2005)					
	Ара	SP-A	M. bovis BCG	(Ragas et al., 2007)					
	PstS-1 (38kDa)	TLR2 ou TLR2/TLR4	M. tuberculosis	(Jung et al., 2006; Sanchez et al., 2009)					
	MPB83	TLR2/TLR1	M. bovis	(Chambers et al., 2010)					

De façon intéressante, les motifs de glycosylation des glycoconjugués peuvent influencer la fixation aux récepteurs non lectiniques. Par exemple, la longueur de la chaine du LM influence grandement son interaction avec TLR2 (associé à CD14 et TLR1), récepteur qui reconnait surtout l'acylation des glycolipides, lipoglycannes et lipoprotéines. De même, les groupements méthyles et acétyles portés par le rhamnose et le 6-déoxytalose des GPLs apolaires de *M. avium* sont nécessaires à l'interaction de ce composé avec TLR2 (Sweet *et al.*, 2008).

La reconnaissance des glycoconjugués par les lectines est aussi dépendante de l'acylation. Le ManLAM de *M. tuberculosis* interagit avec SP-A grâce au mannose de la coiffe (Sidobre *et al.*, 2000). Bien que les lipides ne soient pas directement reconnus par SP-A, l'acylation du ManLAM est nécessaire pour son interaction avec la lectine (Sidobre *et al.*, 2000). L'acylation permet une organisation supra-moléculaire du lipoglycanne en solution qui favorise sa liaison avec la lectine (Riviere *et al.*, 2004). L'association des PIMs avec le récepteur à mannose dépend également du nombre d'acylations en plus de la longueur de la chaine mannosidique (Torrelles *et al.*, 2006).

Les avancées récentes dans le domaine de la caractérisation structurale des glycoconjugués permettent d'attribuer plus précisément la reconnaissance d'un motif de glycosylation et/ou d'acylation restreint et spécifique à un récepteur donné. Le meilleur exemple est celui du lipomannane qui se lie au complexe TLR2/TLR1 dans sa forme triacylée et au récepteur TLR4 dans sa forme tétra-acylée (Doz *et al.*, 2007). Cependant, il est à noter que pour de nombreux glycoconjugués mycobactériens impliqués dans la pathogénicité, aucun récepteur n'a été identifié à ce jour. En particulier, les récepteurs des glycolipides constitués d'acides gras poly-méthylés (PGL, DAT, PAT, SL), possédant un rôle anti-inflammatoire et fortement exprimés dans le granulome, sont encore inconnus. De plus, nous sommes loin de comprendre la totalité des interactions permettant la reconnaissance d'un ligand particulier par un récepteur particulier. A titre d'exemple, le ManLAM (ou l'AraLAM), contrairement au LM, ne sont pas capables de se lier au complexe CD14/TLR2/TLR1. En effet, le domaine arabinane du ManLAM masque la chaine linéaire de mannane et empêche son interaction avec le complexe de récepteurs, ce qui démontre encore l'influence de la glycosylation sur la liaison à des récepteurs non lectiniques (Vignal *et al.*, 2003). Par contre, lorsque le ManLAM est complexé à la lectine soluble LBP (exprimée entre autre dans les poumons), ce lipoglycanne peut interagir avec CD14/TLR2/TLR1 (Elass, 2007 #2324}. De même, une étude récente propose que l'interaction du ManLAM avec la lipoprotéine LpqH également synthétisée par la mycobactérie permet la reconnaissance du lipoglycanne au récepteur TLR2 (Drage, 2010 #2341).

# 2. Les glycoconjugués modulent la réponse immunitaire innée

# a. Internalisation des mycobactéries

La phagocytose des mycobactéries a lieu dans des domaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et met en jeu de nombreux récepteurs cellulaires de surface et et opsonines. Le récepteur DC-SIGN a été identifié comme le récepteur majoritairement impliqué dans la phagocytose de *M. tuberculosis* par les cellules dendritiques et macrophages alvéolaires chez l'Homme (Tailleux *et al.*, 2003b; Tailleux *et al.*, 2005). En complément de DC-SIGN, le domaine lectinique du CR3, le MR et les récepteurs scavenger de classe A participent également à la phagocytose des mycobactéries notamment dans les macrophages dérivés de monocytes (Schlesinger, 1993; Zimmerli *et al.*, 1996; Astarie-Dequeker *et al.*, 1999).

Comme le présente le Tableau II-6, les glycoconjugués sont de nombreux ligands des récepteurs impliqués dans la phagocytose des mycobactéries.

# b. Inhibition de la fusion phagolysosomale

Après internalisation dans les cellules phagocytaires, les mycobactéries inhibent la fusion entre le phagosome et le lysosome afin d'échapper à leur destruction. Ce processus est considéré comme une étape critique pour l'installation de la maladie. De nombreuses protéines mycobactériennes intéragissent avec les protéines de l'hôte ou leurs substrats pour prévenir la maturation des vésicules phagosomales (Philips, 2008). Cinq glycolipides et un lipoglycanne (PIMs, PGLs, DATs, TDM, GPLs et ManLAM) sont directement impliqués dans l'inhibition de la fusion phagolysosomale. Cette dernière requiert l'accolement de la paroi des mycobactéries avec la membrane du phagosome par l'intermédiaire du cholesterol (de Chastellier et Thilo, 2006; de Chastellier et al., 2009). Par ce rapprochement des membranes, les (glyco)lipides de la paroi des mycobactéries s'intercalent dans la membrane du phagosome puis dans les vésicules endocytaires et exocytaires (Beatty et al., 2000; Beatty et al., 2001). Les PIMs de M. tuberclosis stimulent le trafic vésiculaire entre les endosomes précoces et le phagosome immature contenant les bacilles (Vergne et al., 2004b). Dans les vésicules endocytaires ou dans la membrane plasmique, les lipides et glycolipides mycobactériens peuvent interagir avec les récepteurs cellulaires (TLRs, lectines, ...) afin de moduler les voies de signalisation intracellulaires et d'inhiber de manière continue la fusion phagolysosomale. A titre d'exemple, les PIMs et ManLAM de M. tuberculosis et les GPLs polaires de *M. avium* inhibent la fusion phagolysosomale suite à leur interaction avec le récepteur à mannose (MR) (Kang et al., 2005; Shimada et al., 2006; Torrelles et al., 2006; Sweet et al., 2010). Des études plus poussées sur le ManLAM démontrent que ce lipoglycanne empêche l'influx de Ca<sup>2+</sup> cytosolique, nécessaire à la maturation du phagosome (Fratti et al., 2003; Vergne et al., 2003). Pour ce faire, le ManLAM inhiberait une sphingosine-kinase qui permet la libération du calcium réticulaire dans le cytosol (Malik et al., 2003).

A ce jour, aucun lien direct n'a été établi entre le calcium et le récepteur à mannose. Cependant, une étude récente a montré que les antigènes phagocytés par l'intermédiaire du récepteur à mannose restent piégés dans des phagosomes immatures (Burgdorf *et al.*, 2007). On peut supposer que la liaison de certains glycoconjugués au récepteur à mannose inhiberait l'influx calcique nécessaire à la fusion phagolysosomale (Nunes et Demaurex, 2010). En accord avec cette hypothèse, la stimulation par l'INF- $\gamma$  de macrophages infectés par *M. tuberculosis* entraine la reprise de la maturation du phagosome suite à une forte inhibition transcriptionelle du récepteur à mannose (Ehrt *et al.*, 2001). D'autres glycolipides n'interagissant pas avec le MR (TDM et PGL, DAT) sont également capables d'inhiber la phagocytose, démontrant l'existence d'autres voies inhibitrices, dont les mécanismes sont encore inconnus (Indrigo *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2007; Axelrod *et al.*, 2008; Brodin *et al.*, 2010).

# c. Régulation des fonctions microbicides de la cellule hôte

En plus d'inhiber la maturation du phagosome, les glycoconjugués permettent aux mycobactéries de lutter contre les mécanismes de défense de l'hôte incluant la production d'intermédiaires réactifs oxygénés et azoté (ROI, RNI) et l'apoptose. L'un des premiers processus identifiés est une altération de la membrane des phagosomes. Certains glycolipides (PATs, GPLs, TDM et PGLs) s'insèrent dans la membrane du phagosome et modifient la fluidité et la perméabilité membranaire (Sut et al., 1990; Vergne et al., 1995; Beatty et al., 2000). Ces modifications influent sur le recrutement et l'activité enzymatique de protéines dans les phagosomes, impliquées notamment dans la défense contre le pathogène, telles que iNOS (synthèse des RNI) ou les cathepsines D (protéases). L'altération de la membrane du phagosome perturbe la maturation de ce compartiment vacuolaire. De plus, de par leur structure peptidique, les PGLs sont une barrière de protection efficace contre les enzymes lysosomales et en particulier contre les protéases (Schorey et Sweet, 2008). De même, le phénol des PGLs, leur confère la propriété de capter les radicaux hydroxylés et les ions superoxides (Neill et Klebanoff, 1988; Chan et al., 1989). Enfin, la glycoprotéine SodC possède une activité superoxide dismutase qui contribue à la diminution des ROI dans le phagosome (Piddington et al., 2001).

Les lipoglycannes (ManLAM, LM) régulent également l'apoptose des cellules infectées. L'inhibition de l'apoptose permet à la mycobactérie de croitre dans la cellule infectée. Le ManLAM de *M. tuberculosis* a été identifié comme un puissant inhibiteur de l'apoptose par des processus non élucidés. L'un des mécanismes pourrait mettre en jeu la fixation du lipoglycanne au récepteur à mannose (Gilleron *et al.*, 2008). L'inhibition de la signalisation calcique en résultant empêcherait l'induction de l'apoptose par l'INF- $\gamma$ , la perméabilisation de la membrane mitochondriale, et l'activation des caspases (Rojas *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2002; Briken *et al.*, 2004). En plus de ce processus, le ManLAM inhibe l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose en activant la voie de signalisation intracellulaire Akt/Bad, et interfère avec la voie extrinsèque, en modulant la sécrétion de cytokines par les cellules phagocytaires (Maiti *et al.*, 2001). En particulier, le ManLAM

inhibe la sécrétion de la cytokine pro-apoptotique TNF- $\alpha$  par les macrophages humains dérivés de monocytes, probablement au travers du MR, et augmente la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les cellules dendritiques (Nigou *et al.*, 2002; Chieppa *et al.*, 2003; Geijtenbeek *et al.*, 2003; Pathak *et al.*, 2005).

Bien que le cas du ManLAM démontre le rôle anti-apototique de certains antigènes mycobactériens, de nombreux autres glycoconjugués activent au contraire l'apoptose au travers de l'induction de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'autres molécules pro-apototiques. Ainsi, les LMs de plusieurs espèces de mycobactéries incluant *M. tuberculosis* induisent l'apoptose sur des macrophages THP-1 en se liant à TLR2 (Guerardel *et al.*, 2003; Dao *et al.*, 2004). De même, la glycolipoprotéine PstS-1 (38kDa) de *M. tuberculosis* se lie à TLR2 pour activer la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose en augmentant l'expression du TNF- $\alpha$  et de son récepteur et l'activation des caspases 3,8 et 9 (Sanchez *et al.*, 2009).

# d. Modulation de la sécrétion de cytokines

Les glycoconjugués modulent la sécrétion des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Certains ont uniquement été identifiés comme des inducteurs de la réponse pro-inflammatoire. Tel est le cas des glycolipoprotéines PstS-1 (38kDa) de *M. tuberculosis* et MPB83 de *M. bovis*, qui activent la sécrétion macrophagique de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) et de métalloprotéinases matricielles (MMP-9), suite à leur liaison au récepteur TLR2/TLR1, (Jung *et al.*, 2006; Chambers *et al.*, 2010). Le cas de MPB-83 témoigne encore de la complexité du système de reconnaissance puisque ni la glycosylation, ni l'acylation ne sont nécessaires à l'induction des cytokines (Chambers *et al.*, 2010). Enfin, parmi les glycolipides, le TDM a été identifié comme un puissant inducteur de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) *in vitro*, mais également *in vivo* dans un modèle murin (Geisel *et al.*, 2005).

Pour d'autres glycoconjugués, seul un effet anti-inflammatoire a été mis en évidence. Ainsi, les PGLs de *M. tuberculosis* inhibent les sécrétions de TNF- $\alpha$ , d'IL-6, d'IL-12 et de MCP-1 préalablement induites par des fractions totales de (glyco)lipides mycobactériens apolaires par des macrophages murins (Reed *et al.*, 2004). L'effet inhibiteur est non spécifique du type de glycosylation puisque les PGLs de *M. marinum* inhibent également la sécrétion macrophagique de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 préalablement stimulée par des bacilles de *M. bovis* BCG inactivés par la chaleur (Robinson *et al.*, 2008). Comme le suggère les études sur les glycosyl-para-hydroxybenzoates (précurseurs des PGLs), le groupement glycosyl-phénol serait responsable de l'activité inhibitrice de la réponse pro-inflammatoire (Stadthagen *et al.*, 2006). En plus du PGL, les SLs inhibent la sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par le TDM, *in vivo* et *in vitro* et les DATs de *M. tuberculosis* inhibent la sécrétion de cytokines de types Th-1 (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-2) et Th-2 (IL-10) par des cellules mononucléaires de sang périphérique de patients tuberculeux (Okamoto *et al.*, 2006; Saavedra *et al.*, 2006). Enfin, en se liant à DC-SIGN, le ManLAM et l' $\alpha$ -glucane capsulaire induisent la sécrétion d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire qui réprime la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Geurtsen *et al.*, 2009).

Enfin, certains glycolipides peuvent présenter, *in vitro*, un effet pro- et antiinflammatoire, selon leur structure fine, et/ou le récepteur impliqué dans leur reconnaissance. A titre d'exemple, une fraction totale de PIM6 provoque la sécrétion macrophagique de TNF $\alpha$ , alors que les formes purifiées di-, tri- et tétra-acylées de ce glycolipide, inhibent cette sécrétion après induction à l'aide de LPS (Gilleron *et al.*, 2003; Doz *et al.*, 2009). De la même façon, alors qu'une fraction totale de LM est inductrice de la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-12) et de chimiokine (IL-8), les formes purifiées possèdent différentes activités et sont reconnues par plusieurs récepteurs (Vignal *et al.*, 2003; Gilleron *et al.*, 2006; Doz *et al.*, 2007). Ainsi, les LM tri- et tétra-acylé (Ac<sub>3</sub>LM et Ac<sub>4</sub>LM) induisent la production de TNF- $\alpha$ et d'IL-12 par des macrophages murins alors que le di-acylé est inhibiteur (Doz *et al.*, 2007). De plus, l'activité inductrice de Ac<sub>3</sub>LM est dépendante de l'hétérodimère TLR2/TLR1 alors que celle de Ac<sub>4</sub>LM passe par le récepteur TLR4. Ces exemples démontrent qu'une régulation fine de l'acylation et de la glycosylation des PIMs et du LM par les mycobactéries confère des propriétés immunomodulatrices opposées.

# e. Les glycoconjugués et les autres cellules de l'immunité innée

Très peu d'informations sont disponibles quant à l'activité des glycoconjugués en contact avec les cellules de l'immunité innée autres que les phagocytes spécialisés : les neutrophiles, les cellules NK et les cellules iNKT. Les neutrophiles sont les cellules qui ont été le plus étudiées. Les PGLs de *M. canettii* et *M. kansasii* induisent la production de ROI par les neutrophiles (Faldt *et al.*, 1999). Ce phénomène est lié à la partie tri- et tétra-saccharidique des deux glycolipides car les PGLs de *M. marinum* et *M. bovis* n'ont aucune activité inductrice (Faldt *et al.*, 1999). Les LAMs (ManLAM et PILAM) possèdent également la capacité d'activer les neutrophiles. L'interaction du LAM avec les neutrophiles entraine
l'expression en surface des récepteurs du complément CR1 et CR3 et la libération de la métalloproteinase matricielle MMP-9, indispensable à la formation des granulomes (Fäldt *et al.*, 2001; Volkman *et al.*, 2010). Enfin, le TDM, indispensable au recrutement des neutrophiles, induit l'apoptose de ces cellules et provoque la libération de granules (contenant des protéases, nucléases, élastas...) et de NET (Neutrophil extracellular traps) (Brinkmann et Zychlinsky, 2007; Sakamoto *et al.*, 2010).

# 3. Les glycoconjugués modulent la réponse immunitaire adaptative

#### a. Modulation de la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et de la présentation des antigènes aux lymphocytes

La présentation des glycoconjugués mycobatériens aux lymphocytes nécessite la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), principalement les cellules dendritiques et les macrophages. Les glycoprotéines et les glycolipides sont respectivement présentés aux lymphocytes par les complexes majeurs d'histocompatibilités I et II (CMH-I et –II) et par les protéines CD1. Les protéines CD1 sont au nombre de 5 isoformes (CD1a à CD1e) qui lient différents lipides bactériens libres ou attachés à des peptides et/ou des glycannes (Young et Moody, 2006). Alors que les CD1a, CD1b et CD1c permettent de présenter les antigènes lipidiques aux lymphocytes T  $\alpha\beta$ , le CD1d est restreint aux cellules NKT. Il faut noter qu'une seule protéine CD1, homologue au CD1d humain, est présente chez la souris. La protéine CD1e est très spécifique puisqu'elle est uniquement localisée dans le lysosome où elle est nécessaire pour l'apprêtement de certains lipoglycannes et glycolipides tels que les PIMs (de la Salle *et al.*, 2005).

CD1b présente aux lymphocytes plusieurs glycolipides de la paroi incluant le LAM, les PIMs, le glucose monomycolate (GMM) et les sulfolipides. Les protéines CD1a et CD1c présentent respectivement des lipopetides mycobactériens et des mannophosphoprénoides bactériens (Young et Moody, 2006). Fisher *et al.*, ont identifié les PIMs comme agonistes de CD1d bien que ces résultats soient contreversés (Fischer *et al.*, 2004; Gilleron *et al.*, 2008). La liaison des glycolipides au CD1 et la présentation aux lymphocytes dépend de la nature du lipide, mais aussi de la structure du peptide ou du glycanne portant les lipides. Ainsi, les branches méthyles des acides gras, la configuration des centres chiraux, et la localisation respective des différentes chaînes d'acides gras sur le tréhalose influencent l'interaction des sulfolipides avec CD1b et/ou l'interaction avec le TCR des lymphocytes T.

Les glycoconjugués régulent positivement ou négativement la maturation des cellules présentatrices d'antigènes. Encore une fois, ces activités opposées sont certainement mises en jeu à différents stades de l'infection. Pendant la phase chronique de l'infection, les mycobactéries inhibent la maturation des CPAs afin de retarder le recrutement et l'activation de l'immunité innée. Une des premières modalités de l'inhibition des CPAs est d'induire la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, ou de réprimer la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12. Comme décrit précédemment, les glycoconjugués sont de puissants modulateurs de la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les macrophages et cellules dendritiques. Le second processus pour empêcher la maturation des CPAs est d'inhiber la production de protéines de surface, impliquées dans la présentation des antigènes bactériens (CD1, CMH) et dans la co-stimulation des lymphocytes (ex : CD80, CD86,..). A titre d'exemple, l'α-glucane capsulaire de M. tuberculosis induit la différenciation des monocytes humains en cellules dendritiques immatures, incapables d'activer les lymphocytes (Gagliardi et al., 2007). Ces cellules dendritiques n'expriment ni les protéines CD1a et CD1c, ni la protéine de co-stimulation CD80. L'activité inhibitrice de l'αglucane pourrait avoir lieu après sa fixation au récepteur CR3 (Gagliardi et al., 2009). De même, au travers de sa liaison à TLR2, la lipoprotéine LpqH (19 kDa) inhibe fortement l'expression des CMH-II sur des macrophages murins (Noss et al., 2001). A l'opposé, d'autres glycoconjugués mycobactériens induisent l'expression macrophagique de protéines co-stimulatrices et présentatrices d'antigènes. La fixation des PIMs de M. tuberculosis et du PILAM de M. smegmatis à TLR2 entraine l'expression des CD1a, CD1b et CD1c, CD80 et CD86 à la surface de monocytes humains (Roura-Mir et al., 2005). Aussi, le TDM injecté dans la souris entraine l'augmentation de CMH-II et de CD1d à la surface des macrophages (Ryll *et al.*, 2001).

#### b. Interactions directes avec les lymphocytes

Plusieurs glycolipides peuvent potentialiser la sécrétion de cytokines par les lymphocytes, en interagissant directement avec ces cellules. Alors que les PGLs polaires de *M. avium* stimulent la prolifération des lymphocytes T en augmentant la sécrétion de cytokines d'IL-6 et d'IL-12, le ManLAM, PIMs et DATs de *M. tuberculosis* et le ManLAM

de *M. leprae* inhibent la prolifération et l'activation des lymphocytes T humains stimulés par des antigènes microbiens (Kaplan et al., 1987; Pourshafie et al., 1999; Shabaana et al., 2005; Saavedra et al., 2006; Mahon et al., 2009). Le ManLAM de M. tuberculosis incubé avec des lymphocytes T jurkat diminue la synthèse cellulaire des ARNm de l'IL-2, l'IL-3, du GM-CSF et du récepteur à l'IL-2. De manière surprenante, le LAM s'insère dans la membrane des lymphocytes au niveau de micro-domaines spécifiques (radeaux lipidiques ou « rafts ») et activent les voies de signalisation intracellulaire sans interaction préalable avec un récepteur. De même, le PILAM régule la sécrétion des cytokines lymphocytaires en diminuant la production de cytokines de type Th-1 (IL-2 et INF- $\gamma$ ) et augmentant celle de type Th-2 (IL-4 et IL-5) (Shabaana et al., 2005). Les DATs de M. tuberculosis inhibent également la production lymphocytaire de cytokines de type Th-1 (IL-2, et TNF- $\alpha$ ) mais aussi la sécrétion d'IL-10, médiateur principal de la réponse de Th-2 (Saavedra et al., 2006). L'activité des DATs est fortement liée à la nature de l'acylation puisque les DATs de M. fortuitum, constitués d'acides gras saturés et monométhylés à chaines courtes (C14-C20), sont incapables d'inhiber la prolifération, l'activation ou la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T (Saavedra et al., 2006). En plus de ces glycoconjugués, les lymphocytes NKT activés par les mycobactéries répondent au TDM, indépendamment du récepteurs CD1 (Otsuka et al., 2008). Récemment, la lectine Mincle a été identifiée comme un des récepteurs du TDM sur les macrophages (Ishikawa et al., 2009). D'après cette étude, la protéine Mincle serait aussi exprimée à la surface des lymphocytes T activés, suggérant un rôle modulateur du TDM dans l'expression de cytokines lymphocytaires (Ishikawa et al., 2009). Néanmoins, l'interaction entre le TDM et les lymphocytes T entraine le plus souvent la mort des cellules par apoptose. Ainsi, le TDM injecté dans une souris induit l'atrophie thymique en conséquence de l'apoptose des lymphocytes corticaux (Fujita et al., 2007).

Le rôle inhibiteur direct ou indirect des glycolipides de *M. tuberculosis* sur l'activation et la prolifération des lymphocytes T explique en partie la lenteur du recrutement et de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative dans les ganglions lymphatiques et les poumons.

#### 4. Les glycoconjugués et la maturation du granulome

A la suite de sa formation, le granulome évolue vers une forme plus structurée par un processus de néo-vascularisation et de production fibroblastique d'une chape fibreuse. Les

macrophages au centre du granulome se différencient en cellules épithéloides et en cellules spumeuses (gorgées de lipides), ou fusionnent pour donner naissance à des cellules géantes multinuclées.

Le TDM des mycobactéries est capable d'induire la formation de granulome chez la souris, le cochon d'Inde et le lapin (Hamasaki et al., 2000; Sugawara et al., 2002; Fujita et al., 2007). De plus, un centre nécrotique est observé dans le modèle de cochon d'Inde et du lapin. Comme énoncé précédemment, le TDM est un puissant inducteur de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, entrainant le recrutement des cellules de l'immunité innée et adaptative (Geisel et al., 2005; Hunter et al., 2006; Welsh et al., 2008). Une fois le granulome formé, le TDM induit la sécrétion de VEGF (vascular endothélail growth factor) par les macrophages et les neutrophiles, permettant la mise en place des vaisseaux sanguins (Saita et al., 2000; Sakaguchi et al., 2000). La différenciation des macrophages est également induite par le TDM, en plus d'autres glycoconjugués. In vitro, le PIMs, le LM et le TDM induisent la fusion des macrophages et la formation de cellules géantes de Langherans (Puissegur et al., 2007). La différenciation des macrophages induite par le LM dépend de sa fixation au récepteur TLR2. Récemment, une étude démontre que le TDM est également impliqué dans la transformation des macrophages infectés et non infectés en cellules spumeuses (Kim et al., 2010). Le TDM libéré dans le granulome augmente la synthèse et/ou la séquestration de lipides par les macrophages qui accumulent alors des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme. Lors de la réactivation mycobactérienne, les cellules macrophagiques deviennent apoptotiques et les gouttelettes lipidiques sont libérées au centre du granulome, donnant naissance au phénomène de caséification. En plus du TDM, deux études rapportent que les PIMs sont capables d'induire la formation de granulomes chez la souris (Gilleron et al., 2001; Takimoto et al., 2006).

#### 5. Conclusion

En interagissant avec les cellules de l'hôte, les glycoconjugués mycobactériens régulent de nombreux phénomènes biologiques allant de la phagocytose à la caséification des granulomes. Les glycoconjugués conditionnent donc le développement de l'infection et leur présence ou leur absence doit certainement influencer la gravité de la pathologie. Comme montré tout au long de ce chapitre, les glycoconjugués présentent étonnamment des effets pro- et/ou anti-inflammatoires. Ces effets pouvant paraître contradictoires, sont probablement le reflet d'une évolution de la composition de la paroi au cours de la pathologie. Ainsi, Une

réponse inflammatoire rapide est d'abord établie, en réponse à des composés pariétaux immunostimulants. Puis progressivement, les mycobactéries synthétiseraient des molécules capables d'inhiber la réponse immunitaire innée, leur permettant de se multiplier dans l'hôte. Dans un troisième temps, la mise en œuvre du système adaptatif entraîne l'arrêt de la croissance bactérienne et la formation de granulomes. A ce stade, les effets antiinflammatoires doivent être prédominants. Enfin, si l'on considère la phase chronique de l'infection comme un état dynamique de réactivation, alors les mycobactéries doivent être capables de stimuler à nouveau la réponse pro-inflammatoire afin d'induire la formation de nouveaux granulomes (Cardona, 2009). Dans ce cas, les glycoconjugués et autres antigènes à activité pro-inflammatoire sont requis.

De par la composition de l'enveloppe des mycobactéries, les glycolipides et lipoglycannes sont les principaux médiateurs de la virulence. Comme énoncé dans ce chapitre, l'interaction de ces composés avec les cellules de l'hôte est strictement dépendante de leur structure. Des modifications structurales discrètes peuvent avoir des conséquences importantes sur la pathogénicité des mycobactéries.

Aujourd'hui, *M. marinum* est un modèle largement utilisé pour comprendre la formation des granulomes tuberculeux. Toutefois, aucune étude n'a clairement défini la totalité des glycoconjugués qui composent la paroi de cette mycobactérie modèle. Aux vues de l'importance des glycolipides et des lipoglycannes dans la virulence des mycobactéries, nos recherches ont porté sur l'analyse structurale de ces composés isolés de *M. marinum* et l'étude de leurs propriétés biologiques.

## **Présentation des travaux**

Les glycoconjugués de l'enveloppe des mycobactéries, en particulier les glycolipides et lipoglycannes, jouent de nombreux rôles dans les différentes étapes de la réponse granulomateuse. Des variations infimes dans la structure de ces composés peuvent influencer de manière conséquente la physiopathologie tuberculeuse. Ainsi, la compréhension de la maladie requiert une caractérisation structurale fine des composants spécifiques de la paroi des mycobactéries qui interagissent avec le système immunitaire.

Notre équipe de recherche est impliquée depuis de nombreuses années dans l'étude de la diversité structurale des glycoconjugués dans les règnes animal, végétal, et bactérien. Les compétences et les technologies (résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse,...) acquises depuis la création de l'UMR 8576, nous permettent de procéder à l'analyse structurale précise de toutes les formes de glycosylation: glycoprotéines, glycolipides, oligosaccharides libres ou encore polysaccharides. Sous l'impulsion du Dr Yann Guérardel, notre laboratoire collabore depuis plusieurs années avec l'équipe du Dr. Laurent Kremer (Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, UMR 5235 CNRS, Montpellier) sur l'étude de la glycosylation pariétale des espèces de mycobactéries responsables de mycobactérioses chez l'homme.

Le travail de cette thèse fait partie intégrante d'un projet plus large concernant l'étude du rôle et de la biosynthèse des glycolipides impliqués dans la pathogénicité de *M. marinum*. Le projet a été financé durant 3 années (2005-2008) par l'Agence Nationale de la Recherche et impliquait trois équipes de recherche aux compétences complémentaires : l'équipe du Dr Laurent Kremer, l'équipe du Dr Yann Guérardel et l'équipe du Dr Philippe Herbomel (Unité Macrophages et Développement de l'Immunité, URA 2578, Institut Pasteur, Paris).

L'approche du projet consistait à comparer la composition de la paroi de six souches de *M*.*marinum* qui induisent chez le poisson zèbre adulte soit une infection chronique caractérisée par la formation de granulomes, soit une maladie aigüe caractérisée par une hémorragie et une inflammation au site d'infection (Figure 1)(van der Sar *et al.*, 2004a). L'objectif était de corréler la présence de composés (glyco)lipidiques particuliers avec le degré de pathogénicité de ces souches. Après identification, ces composés seraient purifiés de manière à premièrement analyser leurs structures fines (équipe du Dr Y.Guérardel) et deuxièmement, les coupler à des billes fluorescentes de polystyrène-sulfate (équipe du Dr Y.Guérardel). Ces billes chargées en lipides et/ou glycolipides spécifiques seraient alors injectées dans des embryons de poisson zèbre. La participation de ces molécules dans divers

phénomènes tels que la phagocytose, le recrutement cellulaire, la formation de granulomes, et l'incidence des réponses immunitaires innée et adaptive serait alors directement visualisée et évaluée *in vivo* dans les embryons du poisson (équipe du Dr P.Herbomel). Parallèlement, la nature des gènes responsables de la biosynthèse des (glyco)lipides caractérisés serait déterminée par comparaison génomique des souches de *M. marinum* qui différent dans la biosynthèse des composés (équipe du Dr. L. Kremer). Dans un second temps, les gènes orthologues seraient identifiés et inactivés chez *M. tuberculosis*, afin d'évaluer leurs rôles respectifs dans le modèle murin.



Figure 1 : Courbes de survie des poissons zèbres infectés par voie intra-péritonéale avec 10<sup>4</sup> CFU des souches 7, 11, 20, 21, 42 et 98 de *Mycobacterium marinum* (Mma). Les souches ont été isolées chez l'homme (Mma20, Mma21 et Mma98), des poissons (Mma7 et Mma11) et un serpent (Mma42) (van der Sar *et al.*, 2004a).

Comme prélude à ces études, l'équipe du Dr L. Kremer avait déjà comparé les compositions de la paroi des six souches de *M. marinum* à la composition de la paroi de la souche témoin M d'origine humaine dont le génome a été séquencé (MmaM). L'extraction des (glyco)lipides et acides mycoliques et leur détection par chromatographie sur couche mince ont été effectuées systématiquement et en parallèle dans les souches étudiées. Le résultat le plus marquant concernait la souche 7 de *M. marinum* (Mma7) dont le profil de glycolipides polaires était très différent de MmaM (Figure 2). Le profil chromatographique obtenu pour la souche MmaM permet d'observer la présence de quatre lipooligosaccharides (LOS-I à -IV), comme défini dans la littérature (Burguiere *et al.*, 2005). Au contraire, celui de Mma7 se caractérise par la disparition du LOS-IV et par l'accumulation d'un lipide polaire présentant un comportement chromatographique similaire à celui du LOS-III de MmaM. Ces

résultats préliminaires indiquaient un probable défaut de biosynthèse du LOS-IV dans Mma7 et suggéraient pour la première fois un rôle des LOSs dans la pathogénicité des mycobactéries.

#### M. marinum



Figure 2: Comparaison par chromatographie sur couche mince en deux dimensions du profil des glycolipides polaires extraits de l'enveloppe des souches M et 7 de *M. marinum*. Quatre lipooligosaccharides (LOSs) sont identifiés dans MmaM. Seuls les LOS-I et -II peuvent être visualisés Mma7. Le composé qui s'accumule dans Mma7 migre comme le LOS-III de MmaM. Les solvants de migration utilisés sont le chloroforme/méthanol/eau (60:30:6) pour la première direction et le chloroforme/acide acétique/méthanol/eau (40:25:3:6) pour la seconde dimension. Les glycolipides ont été révélés par l'orcinol sulfurique.

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes tout d'abord focalisé sur cette famille de glycolipides spécifique d'espèces que sont les lipooligosaccharides. Ainsi, une grande partie de cette thèse porte sur la purification et l'élucidation de la structure fine des LOSs de *M. marinum*. De plus, nous avons étendu nos travaux aux autres glycolipides de la souche de référence MmaM afin de préciser la nature de la paroi de cette mycobactérie modèle dans l'étude de la tuberculose. La structure de l'ensemble de ces composés a été déterminée par l'utilisation coordonnée de la résonance magnétique nucléaire, de la spectrométrie de masse, de la chromatographie en phase gazeuse et de dégradations chimiques. Des travaux préliminaires concernant les propriétés immunomodulatrices de ces glycolipides purifiés ont été entrepris au sein de notre équipe, en collaboration avec le Prof. Elisabeth Elass.

La première partie de mes résultats exposera la purification des glycolipides pariétaux de *M. marinum*. Ces composés ont été subdivisés en deux groupes: les glycolipides polaires, incluant également les lipoglycannes, et les glycolipides apolaires. Le second chapitre de mes travaux portera sur la caractérisation structurale des glycolipides polaires regroupant les LOSs

ainsi que les glycolipides et lipoglycannes à ancres phosphatidyl-*myo*-inositol. Dans une troisième et dernière partie, seront rapportées l'analyse structurale de glycolipides apolaires déjà connus tels que le tréhalose-6,6'-di-mycolates et les glycolipides phénoliques ainsi que l'identification et la caractérisation d'une famille de glycolipides pariétaux jamais étudiés chez *M. marinum* et chez *M. bovis BCG*.

# Résultats

## **Chapitre III - Extraction et purification des**

## glycolipides et lipoglycannes

## Chapitre III- Extraction et purification des glycolipides et lipoglycannes

L'extraction et la purification des glycolipides pariétaux de *M. marinum* ont été entreprise sur une grande échelle. Les protocoles utilisés devaient répondre à la fois aux exigences des analyses structurales détaillées et à celles de l'étude des fonctions biologiques de ces composés. De fait, une attention toute particulière a été apportée à éliminer toute trace d'impureté pouvant compromettre la validité des résultats obtenus. Ainsi, sur la base des protocoles déjà publiés, nous avons optimisé les différentes étapes de purification en termes de solvants, de supports chromatographiques et de taille de colonnes selon le schéma général présenté en Figure III-1.



**Figure III-1 : Méthodologie de purification des glycolipides apolaires, glycolipides polaires et lipoglycannes.** LOSs : lipooligosaccharides ; PIMs : phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides ; PGLs : glycolipides phénoliques ; TDM : tréhalose-6,6'-di-mycolates ; LM : lipomannane ; LAM : lipoarabinomannane.

L'accès à un large panel de techniques analytiques au sein du laboratoire nous a permis de suivre au plus près l'efficacité de nos mises au point. Ainsi, à partir des différentes souches de *M. marinum*, nous avons purifié un grand nombre de glycolipides polaires et apolaires connus dans d'autres espèces incluant lipoarabinomannane (LAM), lipomannanes (LM), phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs), lipooligosaccharides (LOSs), tréhalose di-mycolates (TDM) et glycolipides phénoliques (PGLs).

#### **A. Extraction**

#### 1. Extraction des glycolipides

L'extraction des glycolipides et des lipoglycannes est une étape délicate qui conditionne la suite de la préparation des composés. Les glycolipides polaires et apolaires sont extraits à partir d'un même échantillon de mycobactéries. Nous avons opté pour des extractions biphasiques permettant de séparer les deux groupes de glycolipides avant même l'étape de purification (Besra, 1998; Walker *et al.*, 2001). Dans un premier temps, les mycobactéries sont homogénéisées dans une solution non miscible d'éther de pétrole et de méthanol salin. Après centrifugation, les glycolipides apolaires contenus dans la phase d'éther de pétrole sont retirés et le solvant évaporé. Nos études ont révélé qu'un deuxième cycle d'extraction à l'éther de pétrole est indispensable pour enlever la grande majorité des glycolipides apolaires. Chez *M. marinum*, l'extraction des composés apolaires peut être suivie de manière colorimétrique puisqu'un chromophore de couleur jaune co-extrait colore la phase d'éther de pétrole.

Dans un deuxième temps, l'addition de chloroforme à la phase méthanolique, qui contient les cellules partiellement délipidées, permet l'extraction des glycolipides polaires. Après filtration des débris cellulaires, des quantités équivalentes de chloroforme et d'eau sont ajoutées à la fraction chloroforme/méthanol salin, ce qui entraine une démixtion de phase. Si la quantité de cellules dépasse les 10 g en poids sec, les débris cellulaires sont récupérés et les glycolipides polaires à nouveau extraits dans du chloroforme/méthanol salin. L'étape de démixtion est critique et peut conduire à la perte d'une grande partie des glycolipides polaires. Elle permet dans la plupart des cas de séparer les glycolipides polaires solubles dans la phase chloroformique, des sels, des glycannes et potentiellement des lipoglycannes solubles dans la phase aqueuse. Néanmoins, comme pour l'extraction de Folch, le méthanol est inégalement partitionné entre la phase aqueuse (85% de méthanol) et la phase chloroformique (15% de méthanol) (Folch *et al.*, 1957). Par conséquent, une proportion estimée à 30% des

glycolipides les plus polaires, en particulier ceux possédant une charge et un corps glucidique important, ont tendance à se solubiliser dans la phase méthanol/eau plutôt que dans la phase chloroforme/méthanol. Pour parer à ce problème, nous avons procédé à deux cycles de mixtion/démixtion de la phase méthanol/eau avec du chloroforme pur. Ainsi, la diminution de la quantité de méthanol dans la phase aqueuse a réduit la solubilité des glycolipides les plus polaires dans cette fraction et augmenté leur répartition vers la phase chloroforme/méthanol.

#### 2. Extraction des lipoglycannes

L'extraction des lipoglycannes (LM et LAM) est réalisée indépendamment de celle des glycolipides, sur un nouvel extrait de mycobactéries lysées. Le protocole classiquement utilisé est basé sur une partition de phase dans le Triton X-114 (Nigou *et al.*, 1997). Les lipoglycannes, acides nucléiques et protéines extraits dans le détergent ont été précipités par de l'éthanol à froid. Après resolubilisation des échantillons dans l'eau, les acides nucléiques et protéines ont été respectivement éliminés par l'ajout de nucléases et par une extraction au phénol comme précédemment publié par notre laboratoire (Guerardel *et al.*, 2002).

#### **B.** Purification

#### 1. Suivi de la purification des glycolipides et lipoglycannes

Afin de suivre le processus de purification des glycolipides, nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM). Les solvants de migration ont été directement adaptés de la littérature et permettent de séparer, en une ou deux dimensions, les différents types de glycolipides polaires et apolaires de *M. marinum* (Tableau III-1) (Besra, 1998; Walker *et al.*, 2001). La révélation des glycolipides a été effectuée par l'orcinol sulfurique en raison de la reproductibilité, de la faible variation de réponse vis-à-vis de divers glucides et de la sensibilité de détection ( $\geq 0.5\mu g$  de sucre réducteur) de ce procédé. De plus, suite à leur révélation par l'orcinol sulfurique, les glycolipides prennent différentes couleurs en fonction de leurs parties glycanniques et/ou lipidiques (Exemple en Figure III-5). Ces variations de coloration nous ont été très utiles pour différencier les glycolipides d'intérêt lors du processus de purification.

Le suivi de la purification du LM et du LAM a été effectué par réfractométrie différentielle et par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (Guerardel *et al.*, 2002; Guerardel *et al.*, 2003). Pour visualiser les

lipoglycannes, les gels d'électrophorèse ont été traités par l'acide périodique et révélés par le nitrate d'argent (Tsai et Frasch, 1982).

**Tableau III-1 : Solvants de migration pour chromatographie sur couche mince utilisés dans l'analyse des glycolipides de** *M. marinum.* LOSs : lipooligosaccharides ; PIMs : phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides ; PGLs : glycolipides phénoliques ; TDM : tréhalose-6,6'-di-mycolates ; TMM : tréhalose-6-mono-mycolate.

Solvant	composition	glycolipides résolus	
Α	Chloroforme/méthanol (96:4; v/v)	PGLs	
В	Chloroforme/méthanol (90:10; v/v)	TDM	
С	chloroforme/méthanol/eau (75:25:4. v/v/v)	TMM	
D dimension 1 (D1)	chloroforme/méthanol/eau (60:30:6. v/v/v)		
dimension 2 ( <b>D2</b> )	chloroforme/acide acétique/méthanol/eau (40:25:3:6. v/v/v/v)	LOSS, FINIS	

#### 2. Purification des glycolipides polaires

Après extraction, nous avons effectué un contrôle de la fraction extraite de glycolipides polaires par CCM dans le système de solvant D (Tableau III-1). Comme le présente la Figure III-2, les taches de glycolipides polaires observés sur CCM ont été attribués à deux familles majoritaires : les lipooligosaccharides (LOSs) et les phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs). Pour rappel, quatre LOSs (I à IV) qui diffèrent par la longueur de la partie glycannique, ont été identifiés et partiellement caractérisés chez *M. marinum* (Burguiere *et al.*, 2005). Les PIMs sont des composés ubiquitaires chez les mycobactéries dont les structures varient peu entre les espèces. La variation principale est liée à la position, au type et au nombre d'acylation (quatre au maximum).

La purification des glycolipides polaires nécessite plusieurs étapes chromatographiques qui induisent un faible rendement de purification, estimé entre 20 et 40% en fonction du glycolipide étudié (Figure III-3). De fait, il est impératif de débuter le processus de purification avec une grande quantité de matériel. A titre d'exemple, en partant de 50g de bactéries en poids sec, nous avons purifié environ 10 mg de LOS-II.

La première étape de purification consiste en une chromatographie sur résine échangeuse d'anions de diéthylaminoéthyl (DEAE) cellulose. Cette étape permet de séparer les LOS-I, -II et -III neutres et donc non retenus sur la DEAE, des PIMs possédant une charge négative sur le phosphate et retenus sur la colonne (Figure III-3). La rétention du LOS-IV sur

la DEAE et sa co-élution avec les PIMs démontrent que ce glycolipide possède lui aussi une charge négative, probablement sur le monosaccharide qui lui est spécifique. En plus des quatre LOSs majoritaires, nous avons purifié et étudié le LOS-I\*, intermédiaire de biosynthèse des LOS-I et -II, ainsi qu'un glycolipide que nous avons nommé LOS-IV neutre, migrant sur CCM comme le LOS-IV mais élué de la DEAE dans la fraction neutre. Les trois bandes correspondant au LOS-III, observables sur CCM (Figure III-3), s'expliquent par des variations structurales subtiles de la partie oligosaccharidique comme expliqué dans le chapitre IV.



# Figure III-2 : Analyse des glycolipides polaires extraits de *M. marinum* par chromatographie couche mince en deux dimensions.

Les migrations chromatographiques ont été effectuées dans le solvant D1 pour la première dimension et le solvant D2 pour la seconde dimension (Tableau III-1). La révélation des glycolipides a été réalisée par pulvérisation d'orcinol sulfurique suivi du séchage de la couche mince cinq minutes à 120°C. LOSs : lipooligosaccharides ; PIMs : phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides.

Les glycolipides non chargés sont regroupés et séparés par chromatographie d'absorption sur gel de silice. L'élution des composés par des concentrations croissantes de méthanol dans le chloroforme permet d'obtenir des fractions enrichies en un glycolipide majoritaire. L'excès de sels contenu dans les fractions des glycolipides chargés est éliminé par une extraction de Folch (Folch *et al.*, 1957). Comme lors de l'étape d'extraction, une partie des glycolipides polaires se solubilisent dans la phase aqueuse saline. Là encore, après avoir récupéré la phase chloroforme/méthanol, nous avons procédé à plusieurs cycles de mixtion/démixtion de la phase méthanol/eau avec du chloroforme pur, afin d'extraire la totalité des glycolipides. Les glycolipides enrichis dans les différentes fractions ont été finalement purifiés par chromatographie préparative sur couche mince.



Chromatographie d'échange d'anions DEAE-cellulose

# Figure III-3 : Purification des glycolipides polaires extraits de Mycobacterium marinum.

de la colonne d'échange d'anions par de l'acétate de sodium, sont dessalées par une extraction de Folch. Chaque glycolipide enrichi dans une fraction est (2:1; v/v), sont à nouveaux séparés par chromatographie d'absorption sur gel de silice. Les fractions contenant les glycolipides possédant une charge et élués finalement préparé par chromatographie sur couche mince. Les migrations chromatographiques permettant de suivre le processus de purification sont Dans un premier temps, les glycolipides polaires sont séparés par chromatographie d'échange d'anions. Les glycolipides neutres, élués par le CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH effectuées dans le solvant D2 (Tableau III-1). Les glycolipides ont été révélés par l'orcinol sulfurique. LOS : lipooligosaccharide; PIM : phosphatidyl-myoinositol mannoside.

#### 3. Purification des lipoglycannes

La purification et la séparation du LM et du LAM ont été réalisées par chromatographie d'exclusion stérique (séphacryl S-200). Les lipoglycannes, élués par un tampon Tris-déoxycholate, ont été repérés par réfractométrie différentielle. Les fractions d'intérêt ont ensuite été analysées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Figure III-4). Les fractions 35-37 et 39-42 contenant respectivement le LAM et le LM ont été regroupées et comparées à des lipoglycannes témoins par électrophorèse (Figure III-4). La fraction 38 possédant à la fois du LM et du LAM a été mise à l'écart.





Les LM et LAM extraits ont été purifiés par chromatographie gel filtration. Les lipoglycannes ont été élués dans un tampon Tris-déoxycholate. L'élution des composés a été suivie par réfractométrie. Les fractions contenant les lipoglycannes ont été analysées par gel d'électrophorèse 13% SDS-PAGE. Les fractions contenant le LM ou le LAM ont été regroupées et de nouveau analysées par électrophorèse, en utilisant le LM et le LAM de *Mycobactérium bovis* BCG comme témoins. Les lipoglycannes ont été révélés par les traitements successifs des gels d'électrophorèse à l'acide périodique et au nitrate d'argent. LM : lipomannane ; LAM : lipoarabinomannane.

#### 4. Purification des glycolipides apolaires

Suite à leur extraction, les glycolipides apolaires de *M. marinum* ont été rapidement séparés par chromatographie d'absorption sur colonne de silice à basse pression (0,6 à 1 bar), aussi appelée chromatographie flash. L'élution de la colonne par du chloroforme puis par des concentrations croissantes en méthanol dans le chloroforme a permis d'obtenir successivement les lipides et les glycolipides. La Figure III-5 présente l'analyse chromatographie flash. Quatre glycolipides majeurs ont été séparés sur la colonne de silice. D'après leurs caractéristiques chromatographiques, trois d'entre eux correspondent aux PGLs, TDM et TMM (Figure III-5). A notre connaissance, le profil de migration chromatographique du quatrième glycolipide nommé X1 n'a pas d'équivalent connu dans la littérature. Ce

glycolipide se colore spécifiquement en bleu à l'orcinol sulfurique (Figure III-5). Cette coloration est en général caractéristique de certains monosaccharides tels que les pentoses et des acides sialiques (Bruckner, 1955). En plus de ces quatre composés, des glycolipides mineurs peuvent être observés dans les fractions d'élution contenant respectivement 5, 7, 15 et 30% de méthanol. Comme pour X1, les glycolipides appelés X2 et X3, élués par 5-7% de méthanol, sont également colorés en bleu par l'orcinol sulfurique, ce qui suggère leur appartenance à une même famille. Les glycolipides élués de la silice par 15 et 30% de méthanol, ont été identifiés comme appartenant aux glycolipides polaires.

Par la suite, les fractions enrichies en PGL, TDM et glycolipides inconnus X1, X2, X3 ont été recyclées par chromatographie d'adsorption sur Florisil® (silicate de magnésium activé). La Florisil®, plus adsorbante que la silice, permet une meilleure séparation des composés en utilisant des débits d'élution plus rapide (Carroll, 1961). De façon à éliminer toute trace d'impureté ou de contamination croisée, la purification des glycolipides apolaires a été finalisée si nécessaire par chromatographie préparative sur couche mince. On notera que le TMM n'a pas été purifié de manière plus approfondie et donc ne fera pas partie des études structurales présentées dans les chapitres suivants.

#### 5. Conclusion

L'extraction et la séparation des glycolipides polaires a permis de purifier six lipooligosaccharides (LOS-I, -I\*, -II, -III, -IV neutre, -IV acide), ainsi que trois espèces de PIMs : les phosphatidyl-myo-inositols dimannosides tri et tétra-acylés (Ac<sub>3</sub>PIM<sub>2</sub> et Ac<sub>4</sub>PIM<sub>2</sub>) et le phosphatidyl-myo-inositol hexamannosides tétra-acylé (Ac<sub>4</sub>PIM<sub>6</sub>) (Figure III-3). Indépendamment des glycolipides, l'extraction et la séparation des lipoglycannes a conduit à l'obtention de deux fractions fortement enrichies en lipomannane et lipoarabinomannane (Figure III-4). Enfin, la séparation des glycolipides apolaires a donné lieu à la purification de deux glycolipides (PGL-I et -II), du tréhalose-6,6'-di-mycolates (TDM) et de trois glycolipides X inconnus (Figure III-5). Les chapitres IV et V présentent les études structurales concernant d'une part les glycolipides polaires et les lipoglycannes, et d'autre part les glycolipides apolaires. Les analyses structurales ont nécessité l'utilisation de diverses techniques de résonance magnétique homo- (<sup>1</sup>H) et hétéronucléaires (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C), de spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS, ESI-MS, FTICR-MS) et de chromatographie en phase gazeuse (GC et GC-MS). Cette étude systématique a permis de définir très précisément

la structure des glycolipides de la souche témoin de *Mycobacterium marinum* (souche ATCC BAA-535 / M).



Chromatographie préparative sur couche mince si nécessaire

**Figure III-5 : Purification des glycolipides apolaires extraits de** *Mycobacterium marinum*. Dans un premier temps, les glycolipides apolaires sont séparés par chromatographie d'absorption flash sur colonne de silice à basse pression. Les glycolipides sont élués de la colonne par des concentrations croissantes de méthanol dans le chloroforme. Les glycolipides enrichis dans différentes fractions sont à nouveau purifiés par chromatographie d'adsortion sur Florisil® (silicate de magnésium activé) puis si nécessaire par chromatographie préparative sur couche mince. La purification des glycolipides est suivie par chromatographie sur couche mince. La purification des glycolipides est suivie par chromatographie sur couche mince. La purification des composés, plusieurs solvants de migration ont été utilisés comme décrit dans le Tableau III-1. Les glycolipides ont été révélés par l'orcinol sulfurique. PGL : glycolipide phénolique ; TDM : tréhaloses-6,6'-di-mycolates ; TMM : tréhaloses-6-mono-mycolate ; X1, X2 et X3 : glycolipides inconnus.

## **Chapitre IV - Analyse structurale des glycolipides et lipoglycannes polaires**

# Chapitre IV- Analyse structurale des glycolipides et lipoglycannes polaires

La paroi de M. marinum contient deux familles de glycolipides polaires, les lipooligosaccharides (LOSs) et les lipoglycannes à ancre phosphatidyl-myo-inositol mannosides. La première partie de ce chapitre expose l'analyse structurale des LOSs et la découverte de propriétés immunomodulatrices qui leurs sont associées. Les résultats sont présentés sous la forme d'une publication et d'un manuscrit accepté pour publication. Ces travaux seront complétés par des études biochimiques et bioinformatiques portant sur l'acylation des LOSs. Dans une seconde partie, nous décrirons l'analyse structurale préliminaire de la seconde famille de glycolipides polaires incluant trois formes de phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIMs), le lipomannane (LM)et le lipoarabinomannane (LAM).

#### A. Les lipooligosaccharides (LOSs)

#### 1. Introduction

Les lipooligosaccharides sont des glycolipides hautement antigéniques décrits dans de nombreuses espèces de mycobactéries dont *M. canettii*, *M. kansasii* et plus récemment *M. marinum*. Alors que leurs structures ont été finement caractérisées, le rôle des LOSs dans la virulence des mycobactéries n'a toujours pas été élucidé. Récemment, un mutant de *M. marinum* déficient pour la synthèse d'un des quatre LOSs (LOS-IV) a été identifié comme étant moins phagocyté par les macrophages que la souche sauvage (Burguiere *et al.*, 2005). Pour la première fois, ces travaux reliaient les LOSs à la virulence de la mycobactérie qui les synthétise.

Dans le cadre de notre projet financé par l'ANR, les profils glycolipidiques de sept souches naturelles de *M. marinum* présentant des virulences divergentes dans le poisson zèbre ont été comparés par chromatographie couche mince (van der Sar *et al.*, 2004a). La souche 7 de *M. marinum*, avirulente dans le poisson zèbre, s'est révélée être déficiente dans la synthèse du LOS-IV de *M. marinum*. Ce résultat suggérait une seconde fois que le LOS-IV jouait un rôle dans la pathogénicité de *M. marinum*.

Dans le but d'étudier les relations entre structures et activités biologiques des LOSs dans l'infection mycobactérienne, nous avons purifié les LOSs de *M. marinum* et déterminé leur structure primaire par l'utilisation combinée de la RMN, de la spectrométrie de masse, de la modélisation moléculaire et de la chromatographie en phase gazeuse. Les propriétés immunomodulatrices des LOSs ont été explorées au travers de divers tests d'activité biologique *in vitro* sur des macrophages dérivés de la lignée leucémique pro-monocytaire humaine THP-1. En particulier, nous avons analysé le pouvoir inducteur et/ou inhibiteur de cette famille de glycolipides sur la sécrétion macrophagique d'une cytokine pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ ) et d'une chimiokine (IL-8) ainsi que sur l'expression d'antigènes de surfaces tels que ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1 antigen) et CD40.

#### 2. Résultats

#### a. Analyse structurale et fonctionnelle

Les travaux, portant à la fois sur l'analyse structurale des LOSs et sur leur propriétés immunomodulatrices sont résumés sous la forme de deux manuscrits intitulés : « *Mycobacterium marinum* lipooligosaccharides are unique caryophyllose-containing cell wall glycolipids that inhibit tumor necrosis factor-alpha secretion in macrophages » publié dans *The journal of Biological Chemistry* et « Structural analysis of an unusual bioactive *N*-acylated lipooligosaccharide LOS-IV in *Mycobacterium marinum* » accepté pour publication dans *Journal of American Chemical Society*.

#### i. Résumé du premier article

**Title:** *Mycobacterium marinum* lipooligosaccharides are unique caryophyllose-containing cell wall glycolipids that inhibit tumor necrosis factor-alpha secretion in macrophages.

**Titre:** Les lipooligosaccharides de *Mycobacterium marinum* sont des glycolipides constitués d'un monosaccharide rare, le caryophyllose, qui inhibent la sécrétion macrophagique de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ .

Auteurs : Yoann Rombouts et Adeline Burguière, Emmanuel Maes, Bernadette Coddeville, Elisabeth Elass, Yann Guérardel, et Laurent Kremer.

**Résumé :** Les lipooligosaccharides (LOSs) sont des constituants importants de la paroi de nombreuses espèces de mycobactéries. Cependant, l'implication de ces glycolipides dans les interactions hôte-pathogène a faiblement été documentée. *M. marinum* synthétise quatre lipooligosaccharides (LOS-I à -IV) qui semblent jouer un rôle dans la pathogénicité (Burguiere *et al.*, 2005). Dans ce contexte, l'accès à plusieurs souches de *M. marinum* a permis de purifier une quantité de glycolipides assez importante pour établir la structure complète des LOS-I à -III et pour effectuer des tests d'activités biologiques *in vitro*. Dans un premier temps, les analyses structurales par RMN et spectrométrie de masse ont permis de caractériser un dodécaoside rare nommé caryophyllose dans les LOS-II à -IV. Dans un deuxième temps, les tests d'activités biologiques ont démontré pour la première fois que les lipooligosaccharides de *M. marinum* possédaient des propriétés immunomodulatrices. Ces glycolipides ont été identifiés comme des inhibiteurs de la sécrétion macrophagique de TNF- $\alpha$  induite par le LPS ou par un lipopeptide. Cette découverte inattendue suggère que ces glycolipides pariétaux représentent des effecteurs capables d'interférer avec la mise en place de la réponse pro-inflammatoire lors de l'infection mycobactérienne.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 31, pp. 20975–20988, July 31, 2009 © 2009 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

#### *Mycobacterium marinum* Lipooligosaccharides Are Unique Caryophyllose-containing Cell Wall Glycolipids That Inhibit Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Secretion in Macrophages<sup>\*S</sup>

Received for publication, April 22, 2009, and in revised form, May 22, 2009 Published, JBC Papers in Press, June 2, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.011429

Yoann Rombouts<sup>‡1</sup>, Adeline Burguière<sup>§1</sup>, Emmanuel Maes<sup>‡</sup>, Bernadette Coddeville<sup>‡</sup>, Elisabeth Elass<sup>‡</sup>, Yann Guérardel<sup>‡2</sup>, and Laurent Kremer<sup>§¶</sup>

From the <sup>‡</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, the <sup>§</sup>Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier II et I, CNRS UMR 5235, Case 107, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, and <sup>¶</sup>INSERM, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Earlier studies have reported a role for lipooligosaccharides (LOSs) in sliding motility, biofilm formation, and infection of host macrophages in Mycobacterium marinum. Although a LOS biosynthetic gene cluster has recently been identified in this species, many structural features of the different LOSs (LOS-I-IV) are still unknown. This clearly hampers assessing the contribution of each LOS in mycobacterial virulence as well as structure-function-based studies of these important cell wallassociated glycolipids. In this study, we have identified an M. marinum isolate, M. marinum 7 (Mma7), which failed to produce LOS-IV but instead accumulated large amounts of LOS-III. Local genomic comparison of the LOS biosynthetic cluster established the presence of a highly disorganized region in Mma7 compared with the standard M strain, characterized by multiple genetic lesions that are likely to be responsible for the defect in LOS-IV production in Mma7. Our results indicate that the glycosyltransferase LosA alone is not sufficient to ensure LOS-IV biosynthesis. The availability of different M. marinum strains allowed us to determine the precise structure of individual LOSs through the combination of mass spectrometric and NMR techniques. In particular, we established the presence of two related 4-C-branched monosaccharides within LOS-II to IV sequences, of which one was never identified before. In addition, we provided evidence that LOSs are capable of inhibiting the secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in lipopolysaccharidestimulated human macrophages. This unexpected finding suggests that these cell wall-associated glycolipids represent key effectors capable of interfering with the establishment of a proinflammatory response.

A key feature of all members of the genus *Mycobacterium* is a cell wall of unique and complex structure, which plays an



important role in antibiotic resistance and pathogenesis of mycobacteria by modulating the host immune system and phagocytic cell functions (1). The mycobacterial cell wall includes essentially two types of lipids, the mycolic acids, which are very long chain fatty acids covalently bound to the arabinogalactan polysaccharide attached to a peptidoglycan backbone (2), and a vast array of extractable lipids/glycolipids (3). The latter include the ubiquitous trehalose dimycolate (TDM)<sup>3</sup> and phosphatidyl mannosides (PIM) (4) as well as a vast array of species-specific lipids such as phenol glycolipids (5), phthiocerol dimycocerosates (5), sulfolipids (4), glycopeptidolipids, and lipooligosaccharides (LOSs).

LOSs were found and described in *Mycobacterium kansasii* (6-8), *Mycobacterium gastri* (8, 9), *Mycobacterium szulgai* (10), *Mycobacterium malmoense* (11), *Mycobacterium gordonae* (12), *Mycobacterium butyricum* (13), *Mycobacterium mucogenicum* (14), the Canetti variant of *Mycobacterium mainougenicum* (15) and, more recently in *Mycobacterium marinum* (Mma) (16). However, they remain among the less studied mycobacterial glycolipids at a biosynthetic, structural, and functional point of view. To date, only three genes have been experimentally demonstrated to be involved in the late steps of LOS biosynthesis in *M. marinum* (16, 17), and one gene encodes a polyketide synthase responsible for the synthesis of the polymethyl-branched fatty acid in the *Mycobacterium smegmatis* LOS (18).

LOSs represent highly antigenic glycoconjugates exposed to the cell surface and useful target molecules for serotyping in a given mycobacterial species. Their precise role in mycobacteria virulence as well as in the colony morphology remains unclear (19, 20). Early studies demonstrated that rough variants of

<sup>\*</sup> This work was supported by Grant ANR-05-MIIM-025 from the French National Research Agency (to Y. G. and L. K.), the Ministère de l'Enseignement Supérieur (to Y. R.), Université des Sciences et Technologies de Lille, and Institut Fédératif de Recherche Grant (IFR 147).

The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Figs. S1–S6 and Table S1.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-20-33-63-47; Fax: 33-3-20-43-65-55; E-mail: yann.guerardel@univ-lille1.fr.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> The abbreviations used are: TDM, trehalose dimycolate; COSY, correlation spectroscopy; FCS, fetal calf serum; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; HMBC, heteronuclear multiple-bound correlation; LM, lipomannan; LOS, lipooligosaccharide; MALDI-MS, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry; Mma, *Mycobacterium marinum*; PIM, phosphatidylinositol mannoside; TNF, tumor necrosis factor; TOCSY, total correlation spectroscopy; NOE, nuclear Overhauser effect; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; DIG, digoxigenin; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; α-Car, α-caryophyllose; PGL, phenolic glycolipid; LPS, lipopolysaccharide; ES-MS, electrospray-mass spectrometry; *rt*, retention time.

Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2009/06/02/M109.011429.DC1.html

#### M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

M. kansasii, devoid of all LOSs, induce chronic systemic infections in mice, whereas smooth variants containing LOSs are rapidly cleared from the organs of infected animals (19, 21). It was therefore proposed that LOSs may act as avirulence factors by masking other cell wall-associated virulence factors. Accordingly, LOSs are absent in most clinical isolates of M. tuberculosis as well as in the laboratory strain H37Rv. A recent genetically based comparison of the LOS biosynthetic cluster in M. marinum and M. tuberculosis revealed that only about onethird of the genes are conserved between the two species, with the genetic locus of M. tuberculosis H37Rv containing fewer genes (17). Although recent studies suggested a possible role of LOSs in sliding motility, biofilm formation, and infection of macrophages by M. marinum (17), the precise contribution of LOSs to M. marinum pathogenesis or virulence is seriously hampered by the restricted number of isogenic strains deficient in their production and the lack of precise structural data of LOS variants. LOSs from different mycobacterial species exhibit considerable variations in the glycan core. A previous work identified the presence of four major LOS variants in M. marinum, designated LOS-I to LOS-IV (16). Through partial characterization, the structure of LOS-I was previously established as 3-O-Me-Rhap-(1-3)-Glcp-(1-3)-Glcp-(1-4)-Glcp-(1-1)-Glcp. Although all LOSs were shown to contain this common oligosaccharidic core substituted by an additional Xylp unit, LOS-II, -III, and -IV are further substituted by other unidentified monosaccharides, designated X and YZ, which leave their exact sequence largely unknown (16).

In this study, we report the identification of a natural mutant of *M. marinum*, devoid of LOS-IV production, which allowed the production of large amounts of LOS-III and the determination of the fine structure of all LOSs. In addition, the availability of all LOS variants with defined structures has opened the possibility to undertake structure-function relationship studies. These molecules were therefore used in *in vitro* assays to uncover their potent biological roles.

#### **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

*M. marinum Strains and Growth Culture Conditions—M. marinum* isolates, originating from infected fish or humans, used in this study were described previously (22). The reference strain M, a human isolate (23), was also included in this work. Bacteria were grown at 30 °C on plates containing Middlebrook 7H10 supplemented with oleic acid/albumin/dextrose/catalase enrichment or in Sauton's broth medium.

DNA Manipulation—Restriction enzymes, T4 DNA ligase, and Vent DNA polymerase were purchased from New England Biolabs. *M. marinum* genomic DNA was prepared as described previously (24). Probes were labeled with digoxigenin (DIGdUTP-5') using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Science), and Southern blot hybridization was performed as described earlier (24). Detection was performed using the DIG luminescence detection kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommendations.

*Cloning of Rv1500 (losA) from M. tuberculosis*—PCR amplification of *Rv1500*, the gene homologous to *losA* in *M. tuberculosis*, was performed using H37Rv genomic DNA along with the upstream primer 5'-TGC GCC TCT CAA TCG TAA CGA

CTA T-3' and downstream primer 5'-AAA G<u>GA ATT C</u>TG CAG ATG TAA GAT GG-3', which contains an EcoRI site (underlined). The 1360-bp product was then digested with EcoRI and cloned into the MscI/EcoRI-restricted pMV261, a mycobacterial shuttle vector containing the *hsp60* promoter (25), thus giving rise to pMV261-*Rv1500*. Mma7 was transformed with this plasmid or pMV261, and polar lipids were extracted.

Lipid Extraction and Analysis—Polar and apolar lipids were extracted according to established procedures (16). Polar lipid extracts were examined by two-dimensional TLC on plates of Silica Gel 60 (Merck), using chloroform/methanol/water (60: 30:6, v/v) in the first direction and chloroform/acetic acid/ methanol/water (40:25:3:6, v/v) in the second direction. Glycolipids were visualized by spraying plates with orcinol/sulfuric acid reagent (0.2%, w/v, orcinol in  $H_2SO_4$ /water, 1:4, v/v) followed by charring. Lipids were also visualized by spraying with 5% ethanolic molybdophosphoric acid and charring. Phosphate-containing lipids were stained and visualized using the Dittmer and Lester reagent.

Purification of Glycolipids—To purify LOSs, the crude polar extract was dissolved in chloroform/methanol (2:1, v/v) and applied in a DEAE-cellulose column (2  $\times$  30 cm) for purification. The column was eluted with chloroform/methanol (500 ml; 2:1, v/v) and increasing concentrations of ammonium acetate (5-500 mM) in chloroform/methanol (2:1, v/v). The purification process was monitored by one-dimensional TLC using chloroform/acetic acid/methanol/water (40:25:3:6, v/v). Glycolipids were visualized by spraying plates with orcinol/sulfuric acid reagent followed by charring. LOS-I, -II, and -III were coeluted from the DEAE column using chloroform/methanol (2:1, v/v), whereas LOS-IV was eluted from DEAE in the presence of 40-60 mM ammonium acetate in chloroform/methanol (2:1, v/v). DEAE fractions containing LOS-I to LOS-III were concentrated and applied on a silicate gel column for a second purification step. The column was eluted with chloroform (500 ml) and chloroform/methanol with increasing volumes of methanol (1-80%). LOS-I was eluted in a fraction containing 15% methanol, and LOS-II and LOS-III were co-eluted in the presence of 20% methanol. LOS-I to LOS-IV were further purified into individual species by preparative TLC on 20  $\times$  20-cm high performance TLC plates of Silica Gel 60 (Merck) and run in chloroform/acetic acid/methanol/water (40:25:3:6, v/v). Glycolipids and lipids were revealed by iodine vapors. Spots corresponding to the glycolipids were scraped from the plates, and the glycolipids were extracted using chloroform/methanol (2:1, v/v) and finally purified on Sep-pack  $C_{18}$  cartridge (Waters, Milford, CT).

Purification of TDM was realized from extracted apolar glycolipids. Briefly, apolar glycolipids were dissolved in chloroform and applied on Florisil<sup>®</sup> column chromatography (Acros Organics). The column was eluted with chloroform (500 ml) and chloroform/methanol with increasing volumes of methanol (1–50%). The purification process was monitored by onedimensional high performance TLC using chloroform/methanol (90:10, v/v). TDM was visualized by spraying plates with orcinol/sulfuric acid reagent followed by heating the plates at 120 °C. TDM was eluted in fraction containing 10% of metha-



#### M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

nol. TDM-containing fractions were pooled and applied on a second Florisil<sup>®</sup> column chromatography eluted with chloroform (500 ml) and chloroform/methanol with increasing volumes of methanol (1–20%). Purity of TDM was checked by MALDI-MS and NMR.

Lipooligosaccharide De-O-acylation—LOSs were de-O-acylated in chloroform/methanol (2:1, v/v) containing 0.1 mM NaOH at 37 °C for 2 h. Solvents were evaporated, and the resulting oligosaccharides were dissolved in water and further purified on a carbograph column (Alltech carbograph SPE column).

Permethylation and Linkage Analysis-Permethylation (or perdeuteromethylation) was performed according to the procedure of Ciucanu and Kerek (26). Briefly, compounds were incubated overnight in a suspension of 200 mg/ml NaOH in dry DMSO (300 ml) and iodomethane (200 ml) (or iododeuteromethane). The methylated (or deuteromethylated) products were extracted in chloroform and washed with water. The reagents were evaporated, and the sample was dissolved in methanol prior to mass spectrometry analysis. Permethylated samples were hydrolyzed with 4 M trifluoroacetic acid for 2 h at 100 °C and reduced with 10 mg/ml sodium NaBH<sub>4</sub> in 0.5  $\,\mathrm{M}$ aqueous ammonium hydroxide solution at room temperature for 4 h, and the reaction was terminated by adding a few drops of acetic acid. Samples were dried and acetylated with acetic anhydride at 100 °C for 4 h. The reagent was removed under nitrogen stream and sample dissolved in chloroform. The chloroform phase was then washed several times with water before gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis using a Carlo Erba GC 8000 gas chromatograph equipped with a 25-m  $\times$  0.32-mm CP-Sil5 CB low bleed/MS capillary column, 0.25-µm film phase (Chrompack). Temperature of the Ross injector was 280 °C, and samples were analyzed using a temperature program starting at 100 °C for 1 min, followed by a temperature ramp of 5 °C min<sup>-1</sup> to 300 °C. Electron ionization-mass spectra were obtained using a Finnigan Automass II mass spectrometer.

*Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry (MALDI-MS) Analyses*—The molecular masses of polysaccharides were measured by MALDI-TOF on a Voyager Elite reflectron mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA), equipped with a 337 nm UV laser. Native and permethylated samples were prepared by mixing directly on the target 1 ml of the methanol (native and permethylated)-diluted oligosaccharide solution and 1 ml of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/ml dissolved in acetonitrile/H<sub>2</sub>O).

*Electrospray Ionization-MS Analysis*—Nano-electrospray mass spectrometric analyses were performed using a QSTAR Pulsar quadrupole time-of-flight mass spectrometer (AB/MDS Sciex, Toronto, Canada) equipped with a nanoelectrospray ion source (Protana, Odense, Denmark). Samples were dissolved at a concentration of 10 pmol/ $\mu$ l in methanol/water (50:50, v/v), 0.1% formic acid and sprayed from gold-coated "medium length" borosilicate capillaries (Protana, Odense, Denmark). A potential of 800 V was applied to the capillary tip, and the declustering potential and the focusing potential were set at 120 and 180 V, respectively. For the recording of conventional mass spectra, TOF data were acquired by accumulation of 10 multi-

ple channel acquisition scans over the m/z range 400–2000. In the collision-induced dissociation (MS/MS) analyses, multiple charged ions were fragmented using nitrogen as collision gas  $(5.3 \times 10^{-3} \text{ torr})$ , and the collision energy varied between 40 and 80 eV to obtain maximal fragmentation. The collision-induced dissociation spectra were recorded on the orthogonal TOF analyzer over a range of m/z 100–1400. Signal detection was performed with a multichannel plate detector and time to digital conversion. Resolution was measured as the full width at half-maximum and was 7000 in the measured mass ranges. External calibration was performed prior to each measure using a 1 pmol/µl solution of glufibrinopeptide in methanol/water (50:50, v/v).

NMR Analysis-NMR experiments were performed on a Bruker NMR spectrometer 9.4 teslas (where <sup>1</sup>H resonated at 400.33 MHz and <sup>13</sup>C at 100.66 MHz) and on a Bruker NMR spectrometer 14.1 teslas (where <sup>1</sup>H resonated at 600.13 MHz and <sup>13</sup>C at 150.91 MHz) equipped with a cryo-probe head. Prior to NMR spectroscopic analyses, LOS-I-IV were repeatedly exchanged in CD<sub>3</sub>OD (99.97% purity, Euriso-top<sup>®</sup>, CEA Saclay, France) with intermediate drying and then dissolved in CDCl<sub>3</sub>/  $CD_3OD$  (2:1, v/v) (Euriso-top<sup>®</sup>). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts are given in parts/million downfield from internal tetramethylsilane at 0 ppm. OS-II and OS-IV were repeatedly exchanged in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.97% <sup>2</sup>H, Euriso-top<sup>®</sup>) with intermediate freeze-drying and finally dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (Euriso-top<sup>®</sup>) in Shigemi<sup>®</sup> tubes (Allison Park). Chemical shifts (parts/million) were calibrated taking methyl groups from internal acetone at  $\delta^1$ H 2.225 and <sup>13</sup>C at 31.55 ppm. All experiments were recorded at 300 K without sample spinning. The Bruker pulse programs were used and optimized (pulse lengths and delays) for each one- or two-dimensional experiments.

Cell Culture Conditions and Quantification of TNF- $\alpha$  Secretion by ELISA—RPMI 1640 medium, L-glutamine were purchased from Invitrogen, and fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). The 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> was provided by Calbiochem. The human TNF- $\alpha$  protein detection kit was from ABCys. By LPS from Salmonella typhimurium was purchased from Alexis Corp. Lipomannan (LM) was purified from MmaM using procedures reported previously (27, 28). The model bacterial lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys-SKKKK (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>) was purchased from EMC microcollections GmbH (Germany).

The human promonocytic leukemia THP-1 cell line was grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and  $2 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol in a 5% CO<sub>2</sub> air-humidified atmosphere at 37 °C. THP-1 cells were differentiated by treatment for 72 h with 50 nM 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (29). Viability of cells was over 96% as determined by trypan blue dye exclusion. To investigate the effect of LOSs on TNF- $\alpha$  secretion, differentiated THP-1 cells were seeded in 96-well plastic culture plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well, in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS and L-glutamine. Purified LOSs as well as TDM were resuspended in ethanol and hexane, respectively, and sonicated for 3 min. These glycolipids were coated on plates at the indicated concentrations, which were subsequently dried at 37 °C to ensure complete solvent evaporation. Control wells were layered with sol-



#### M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

vent without glycolipids. Additionally, purified LM (used as positive control) was dissolved in apyrogen water and sonicated before addition to the cells. After 6 h of incubation, culture supernatants of triplicates were then collected and centrifuged prior to quantitation of cytokines by ELISA, according to the manufacturers' instructions. Cytokines concentrations present in the supernatants were obtained in comparison with a standard curve generated with recombinant human TNF- $\alpha$ .

To investigate the TNF- $\alpha$ -inhibitory properties of LOS-II and LOS-IV on stimulated macrophages, THP-1 cells were pretreated with LOSs for 20 h prior to the addition of either LPS (20 ng/ml) or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (20 ng/ml) and incubated for a further 6 h. Supernatants were processed for cytokine quantification as mentioned above. Viability of the cells was checked by flow cytometry (FACSCalibur flow cytometer) by using propidium iodide.

Statistical significance was analyzed with a Student's t test for unpaired data. Values of p < 0.05 were considered to be significant.

#### RESULTS

Identification of an M. marinum Isolate Defective in LOS-IV *Production*—LOSs are highly antigenic glycoconjugates exposed at the cell surface of several mycobacterial species, but their precise role in virulence and colony morphology is still a matter of debate (19, 20). Nevertheless, recent studies on M. marinum mutants carrying transposon insertions in the LOS biosynthetic cluster indicated that LOSs participate in sliding motility, biofilm formation and infection of host macrophages (17). Deciphering the biological properties of LOSs requires fine structural determination and to date, only a partial structure of M. marinum LOSs is available (16). Structure-function relationship studies are also hampered by the lack of detailed structural information, which can be attributed to the failure of obtaining high yields of the purified LOS variants, and particularly of the more polar ones (16). We reasoned that screening a set of *M. marinum* isolates from various origins would allow us to select "natural" mutants affected in their quantitative and/or qualitative LOS content, representing interesting sources for subsequent LOS production and purification. Therefore, we included in our study unrelated M. marinum strains isolated either from humans with fish tank granuloma (Mma20, Mma21, and Mma98) or from different poikilothermic species (Mma7, Mma11), which, when injected into adult zebrafish, developed an acute or a chronic disease (22).

Polar lipids were extracted from all *M. marinum* strains and compared with the glycolipid content of the reference M strain (MmaM) (23). Glycolipid profiles were recorded on two-dimensional TLC stained by orcinol/sulfuric acid or ethanolic molybdophosphoric acid. Lipid phosphates were stained and visualized using the Dittmer and Lester reagent. The polar glycolipid pattern from MmaM (Fig. 1*A*) was similar to the one recorded previously for the *M. marinum* ATCC 927 strain (16), characterized by the presence of PIMs and different LOS-type species (LOS-I, -II, -III, and -IV). Comparison of polar glycolipids established that, among all six strains, five exhibited a very similar profile (data not shown). However, one isolate, Mma7, displayed a profoundly altered polar lipid pattern, character-



FIGURE 1. **Two-dimensional TLC patterns of** *M. marinum* **polar glycolipids.** Following extraction from MmaM (*A*) or Mma7 (*B*), polar glycolipids were separated on two-dimensional TLC using the solvent system chloroform/ methanol/water (60:30:6, v/v) in the first direction and chloroform/acetic acid/methanol/water (40:25:3:6, v/v) in the second direction. Glycolipids were detected with orcinol/sulfuric acid stain.

ized by the absence of a compound exhibiting low chromatographic mobility in both directions and the concomitant accumulation of a higher mobility compound (Fig. 1*B*). Based on the literature and the standard molecule chromatographic behaviors, these two compounds were tentatively assigned as members of the LOS family. Mma7 appeared to accumulate large amounts of LOS-III but failed to produce LOS-IV (Fig. 1*B*).

Comparative Analyses of LOS-I, -II, -III in MmaM and Mma7-To confirm LOS-III accumulation in Mma7, LOSs were extracted and purified individually from both the MmaM and Mma7 strains and their structures compared. The final step of purification was performed by one-dimensional preparative TLC that allowed us to generate four compounds tentatively assigned to LOS-I to -IV and that appeared essentially pure by TLC analysis (Fig. 2A). Individual LOSs were then permethylated and analyzed by MALDI-MS (Fig. 2B). Permethylated LOS-I, LOS-II, and LOS-III from Mma7 gave prominent signals at *m*/*z* 1059.6 [M + Na]<sup>+</sup>, 1567.8 [M + Na]<sup>+</sup>, and 1915.8 [M + Na]<sup>+</sup>, respectively, in agreement with m/z values previously established (16). Identical values were obtained for permethylated LOS-I to LOS-III purified from MmaM (data not shown), which indicates that both strains synthesize LOSs with identical structures. In particular, these results demonstrate that Mma7 accumulates LOS-III in large quantities. Accordingly, LOS-IV could only be purified from MmaM, supporting the fact that this compound was not produced in Mma7. Consistently with a previous report (16), MALDI-MS analysis of permethylated LOS-IV gave a signal at m/z 2332.7 [M + Na]<sup>+</sup> (Fig. 2*B*).

Local Genome Comparison Reveals Multiple Lesions with the LOS Biosynthetic Cluster in Mma7—The altered LOS profile in Mma7 (Fig. 1B) is reminiscent of the one observed by Alexander *et al.* (30) in an *M. marinum* mutant carrying a transposon in a gene homologous to Rv1500, originally assigned to participate in PIM<sub>7</sub> synthesis. This gene was subsequently renamed *losA* after it was established that it participates in LOS-IV rather than PIM<sub>7</sub> synthesis based on both biochemical studies (16) and genetic studies in which inactivation of Rv1500 did not alter expression of the PIM pattern in *M. tuberculosis* (31). This prompted us to investigate whether the presence of mutations within *losA* in Mma7 could explain the observed



#### M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

LOS alteration. Therefore, *losA* was amplified by PCR, and as shown in Fig. 3*A*, a band of the expected size was amplified using MmaM, but not Mma7, genomic DNA. Southern blotting



FIGURE 2. **TLC and mass spectrometric analyses of LOSs from** *M. marinum* **7 strains.** Intact purified LOSs fractions were separated by one-dimensional TLC with chloroform/methanol/water solvent (60:30:6, v/v) (*A*) and then analyzed by MALDI-MS as permethylated derivatives (*B*).



using losA as a probe generated a positive signal in Mma7, although with a different pattern compared with MmaM, suggesting the possibility of mutations within this gene (data not shown). Indeed, sequence analysis clearly indicated the presence of multiple lesions in the losA gene of Mma7, including substitutions and an important deletion and the 3'-end of the gene. The derived amino acid sequence of LosA shows that it carries 18 amino acid substitutions and a truncation of the last 41 residues (Fig. 3B). To test whether these mutations, presumably responsible for a nonfunctional protein, would account for the lack of LOS-IV production, Mma7 was transformed with a functional copy of LosA, as described under "Experimental Procedures." However, no complementation of LOS-IV production was observed, because the LOS profile of this strain remained identical to the one of Mma7 (data not shown). This raised the possibility of additional mutations (presumably in other LOS biosynthetic genes) preventing LOS-III to LOS-IV conversion. We thus undertook the local comparison of the genes surrounding losA in Mma7 and compared it with MmaM. Amplification of the four genes MM2314 to MM2317 adjacent to *losA* failed to produce a signal of the expected size in Mma7 as compared with MmaM (Fig. 3A). Primers were therefore designed to amplify short gene segments, which were then sequenced and subsequently used as probes for a comparative genomic walk. Using this approach, major changes in the organization of the LOS cluster were identified, culminating with an important deletion spanning from the 3'-end of losA to MM2318 (Fig. 3A). In addition, sequences of the genes lying downstream of this deleted region (starting from MM2318) contained, like losA, multiple mutations (data not shown). Taken collectively, our genetic studies clearly indicated that the LOS biosynthetic cluster organization/sequence is severely impeded in Mma7, very likely explaining the failure to produce LOS-IV. Our data also highlighted the fact that *losA*, although required (16), is not sufficient to ensure LOS-IV biosynthesis.

В					
	MmaM	MIPGKDALQRWIGLAMRLSIVTTLYMSEPYVLEFYRRVRAAADKITSDVEMIFVDDGSPD	60		
	Mma7	MIPGKDALQRWIGLAMRLSIVTTLYMSEPYVLEFYRRVRAAADKITSDVEMIFVDDGSPD	60		
	MmaM	${\tt GSLDQAVSLLGKDPSVRVIQLSRNFGHHK {\tt AMMTGLAHATGDLVFLIDSDLEEDPALLEQF}$	120		
	Mma7	${\tt GSLDQAVSLLGKDPSVRVIQLSRNFGHHK {\tt AMMTGLAHATGDLVFLIDSDLEEDPALLEQF}$	120		
	MmaM	YEKLIATDADVVFGCQAQRPGSWWKNFGPKMHYRASAMLCNPPLHENVLTVRLMRADYVR	180		
	Mma7	$\texttt{YEKLIATDADVVFGC} \underline{QEQ} \texttt{RPG} \underline{GWWKNL} \texttt{GPK} \underline{VA} \underline{YRASAMLC} \underline{D} \texttt{PPLHENVLTVRLMRAD} \underline{YVH}$	180		
	MmaM	CLVQHQERELSIAGLWQITGFNQIPMSVHKASKGTTTYTFAHKVKALVDNVTSFSNKPLV	240		
	Mma7	$\underline{S} LVQHQERELSIAGLWQITGFNQVPIAVMKASKGTSTYTFAHRVKALVDNVTSFSNKPLV$	240		
	MmaM	FIFYLGAVIFMISSLAAGYLIIDRLFFRVLLGGWPSLIVSIWMLGGLTIFCLGLIGIYIS	300		
	Mma7	FIFYLGA <u>A</u> IF <u>I</u> ISSLAAGYLIIDRLFFR <u>T</u> LLGGWPSLIVSIWMLGGLTIFCLGLIGIYIS	300		
	MmaM	KIFTETKQRPYTIIRRIYGPNFTSQGPASLEAAFRAMPPASWERFGADPVRSPRGDRGL	359		
	Mma7	KIFAETKQRPYTIIRRIY	318		

FIGURE 3. Genomic analysis of the losA region in MmaM and Mma7. A, illustration of the LOS biosynthetic cluster surrounding losA in MmaM and Mma7 (upper panel). Agarose gel showing the different amplicons (MM2312 to MM2317) obtained using either MmaM or Mma7 genomic DNA. Expected sizes of the PCR products in MmaM are indicated on the right (lower panel). B, comparison of LosA amino acid sequences in MmaM and Mma7. Point mutations found in Mma7 are underscored.


Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2009/06/02/M109.011429.DC1.html

#### M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

However, although our results clearly established that Mma7 is deficient in LOS-IV biosynthesis and suggested that structures of the remaining LOS-I to LOS-III in Mma7 are identical to those present in the reference M strain, the fine structure of LOSs remains largely unknown. In particular, no data are currently available on the nature and substitution patterns of terminal monosaccharide X of LOS-II and -III and monosaccharide YZ in LOS-IV (16). Therefore, an exhaustive analysis of LOS-II that contains a single copy of the X monosaccharide was undertaken to identify X. We also analyzed the substitution pattern of the X-X terminal disaccharide in LOS-III and partially characterized the YZ monosaccharide in LOS-IV. Structures of LOS-II and -IV were derived from the MmaM strain. However, because LOS-III is a minor component in MmaM, we took advantage of Mma7 as a source of LOS-III, as this molecule strongly accumulates in this strain.

Analysis of LOS-II Sugar Moiety-Initially, the oligosaccharide moiety of LOS-II was analyzed from both intact and deacylated LOS-II. However, given the higher quality of analyses performed on the deacylated molecule, only these results will be presented in detail. LOS-II was deacylated by alkaline hydrolysis to generate an oligosaccharide (OS-II). Analysis of native OS-II by MALDI-MS generated a major signal at m/z1259.6  $[M + Na]^+$  (supplemental Fig. S1), consistent with a monosaccharide composition of  $X_1$ Pent<sub>1</sub>deHex<sub>1</sub>Hex<sub>4</sub>Me<sub>1</sub>, where X is an unidentified monosaccharide with an average molecular mass of 296 mass units in native form and Pent is pentose. Composition was confirmed by ES-MS/MS analysis of the corresponding doubly charged ion at  $m/z 641 [M + 2Na]^{2+}$ (Fig. 4A). In particular,  $[M + Na]^+$  B/Y couple fragmentation ions, according to standard nomenclature (49), at m/z 301/981 confirmed the molecular mass of the unknown X residue present in the nonreducing position of OS-II. Furthermore, it established the position of a methyl group on the deHex residue as well as the sequence of OS-II as X-Pent-MedeHex-Hex<sub>4</sub>, in agreement with the literature (16). Then MALDI-MS analysis of the permethylated derivative of OS-II generated a signal at m/z 1567.8 [M + Na]<sup>+</sup> (supplemental Fig. S1A). It is noteworthy that permethylated derivatives of OS-II and LOS-II exhibited similar m/z values, indicating that permethylation of LOS-II in alkaline solution completely removed fatty acids. Furthermore, comparison of native and permethylated OS-II m/zvalues at m/z 1259.6 and 1567.8 respectively, as well as permethylated and per-deuteromethylated OS-II values at m/z1567.8 and 1634.2, respectively, unambiguously indicated the presence of 22 potentially methylated functional groups in OS-II (supplemental Fig. S1A). This permitted us to calculate that the free monosaccharide X in the permethylated form has an average molecular mass of 394, and to propose that X possesses seven functional groups in free form and six when linked to LOS-II.

The nature of monosaccharides and linkage patterns of OS-II were further established by <sup>1</sup>H homonuclear and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C heteronuclear NMR experiments. Entire spin systems of all constituting monosaccharides were established by two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY (supplemental Fig. S2) and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR (Fig. 5) experiments. Glycosyl residues were identified on



FIGURE 4. Mass spectrometry fragmentation patterns of native OS-II and OS-II'. ES-MS/MS analyses of doubly charged ion at m/z 641 corresponding to OS-II (A) and doubly charged ion at m/z 649 corresponding to OS-II' (B) are shown.

the basis of spin systems, chemical shift values, and their relevant vicinal coupling constants patterns. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C parameters of the individual monosaccharides are summarized in Table 1. NMR parameters of intact LOS-II sugar moiety were very similar to OS-II and mainly differ from the trehalose unit, considering it bears the lipid moiety (data not shown). The anomeric region of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSOC NMR spectrum of OS-II permitted the identification of eight signals associated with distinct monosaccharides labeled I to VII' (Fig. 6A). According to their  ${}^{1}\text{H}/{}^{13}\text{C}$  chemical shifts and  ${}^{3}J_{1,2}$  coupling constant values, the I, II, V, VII, and VII'-H1 signals were all associated with monosaccharides in  $\alpha$ -anomeric configurations (I-H1  $\delta$  5.18  $({}^{3}J_{1,2} = 3.5 \text{ Hz})$ ; II-H1  $\delta$  5.19  $({}^{3}J_{1,2} = 3.6 \text{ Hz})$ ; V-H1  $\delta$  5.18  $({}^{3}J_{1,2} = 1.0 \text{ Hz})$ ; VII-H1  $\delta$  4.91  $({}^{3}J_{1,2} = 4.0 \text{ Hz})$ ; and VII'-H1  $\delta$ 4.97 ( ${}^{3}J_{1,2} = 4.0$  Hz)), whereas III, IV, and VI-H1 were associated with monosaccharides in  $\beta$ -anomeric configurations (III-H1  $\delta 4.55 ({}^{3}J_{1,2} = 7.7 \text{ Hz})$ , IV-H1  $\delta 4.76 ({}^{3}J_{1,2} = 7.3 \text{ Hz})$ , and VI-H1  $\delta$  4.52 (<sup>3</sup> $J_{1,2}$  = 8.0 Hz)) (Table 1). Spin systems associated with I- and II-H1/C1 signals at 5.18/94.7 and 5.19/94.5 ppm typified  $\alpha$ -glucopyranosyl units (Table 1). Upfield resonance of carbons I-C1 and II-C1 around 94.6 ppm (Fig. 6A) as well as clear  ${}^{3}J_{H-C}$  inter-correlations I-C1/II-H1 and II-C1/I-H1 on the HMBC spectrum (Fig. 6B) demonstrated that both  $\alpha$ -Glc residues are part of a trehalose unit. Large  ${}^{3}J_{1,2}$ ,  ${}^{3}J_{2,3}$ , and  ${}^{3}J_{3,4}$ values (Table 1) for spin systems associated with the  $\beta$ -anomeric signals III-1 (δ 4.55/103.6) and IV-1 (δ 4.76/104.0) typified III and IV as  $\beta$ -glucopyranosyl units. Identification of a spin system ( ${}^{3}J_{1,2}$ , 1.0 Hz;  ${}^{3}J_{2,3}$ , 4.6 Hz;  ${}^{3}J_{3,4}$ ; 9.5 Hz;  ${}^{3}J_{4,5}$ , 9.6 Hz) from V-H1 representative of a manno configuration and of a methyl group at  $\delta$  1.34 indicative of a 6-deoxyhex-



IV = 0.98; II = 1.00; VI = 1.02) established that X and X'

were present in less than a single residue per glycolipid,

whereas all others were present as a single copy. Further-

more, the sum of VII and VII'-H1 signal integrations (VII +

VII' = 1.1) strongly suggests that X and X' are part of two

similar molecules called LOS-II (substituted by X) and LOS-

II' (substituted by X') that only differ by the nature of their

respective nonreducing terminal monosaccharide. Accord-

ingly, subsequent NMR and MS analyses permitted us to

establish that the LOS-II fraction consisted in fact of the

mixture of two glycolipids, LOS-II and LOS-II', that were

individualized based on their differential fragmentation pat-

opyranosyl unit permitted the identification of V as an  $\alpha$ -rhamnopyranosyl unit (Table 1). From the HMBC experiment, the  ${}^{3}J_{H-C}$  vicinal connectivity between the V-H3 at 3.56 ppm and O-methyl carbon at 57.3 ppm established that residue V is an  $\alpha$ -3-O-Me-Rhap unit (data not shown). Then, the anomeric signal resonance at 4.52/104.9 ppm of residue VI was attributed to a  $\beta$ -xylopyranosyl unit because of H5ax and H5eq assignment and large vicinal coupling constant values  $({}^{3}J_{1,2} = 8.0, {}^{3}J_{2,3} = 8.9, {}^{3}J_{3,4} = 9.6$ , and  ${}^{3}J_{4,5ax} = 11.7$ ) (Table 1). The remaining anomeric signals VII-1 and VII'-1 at 4.91/  $\,$ 96.9 and 4.97/97.5 ppm were then assigned to two yet unidentified monosaccharides. Further analyses (see below) permitted us to assign the VII signal to the unidentified monosaccharide X that was observed by mass spectrometry analysis in a terminal nonreducing position of LOS-II (Fig. 4A). Similarly, VII' signal was associated with X', a close relative of X present in a terminal nonreducing position of a minor equivalent of LOS-II, LOS-II'. Differential relative integrations of H1 signals (I + II + V = 3.10; VII' = 0.35; VII = 0.75;



FIGURE 5. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR analysis of OS-II fraction. Details of the anomer and bulk regions of the <sup>1</sup>H NMR spectrum (*A*) and the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectrum of OS-II (*C*) are shown. Details of the methyl and methylene resonances containing regions of the <sup>1</sup>H NMR spectrum (*B*) and of <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectrum of OS-II (*D*) are shown.

terns and NMR parameters. We subsequently initiated the structural determination of the unknown monosaccharide X, and we demonstrated the existence of the minor but structurally related glycolipid LOS-II' and established its exact glycosidic sequence. The glycosidic sequence of OS-II was established from the HMBC experiment by observing scalar coupling correlations (<sup>3</sup>*J*<sub>H-C</sub>) between <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C implicated in glycosidic linkages (Fig. 6B). Trehalose linkage pattern was first confirmed by crossed correlations I-C1/II-H1 and II-C1/I-H1. Then substitutions of II-VI residues in C3 or C4 positions were established by a continuous series of III-C1/II-H4, IV-C1/III-H3, V-C1/IV-H3, VI-C1/V-H4, and VII-C1/ VI-H4 <sup>3</sup>J<sub>H-C</sub> correlations. Positions of glycosidic linkages were supported by specific downfield <sup>13</sup>C resonance shifts by a value of 4-10ppm on carbon involved in glycosidic linkages (Table 1). Altogether, in accordance with ES-MS/MS fragmentation pattern of native OS-II (Fig. 4A), NMR data clearly indicated that OS-II presents the following linear monosaccharide

#### TABLE 1

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts (in ppm) and coupling constant values (in Hz) of OS-II monosaccharides (measured at 300 K in D<sub>2</sub>O using acetone as internal reference)

Values in parentheses are coupling constants; values in	bold correspond to substituted carbons. ND indicates not determined.
---	--

and s in parciniteses are coupling constants, values in bold correspond to substituted carbons. ND indicates not determined.							
Sugar units	H1/C1 ( ${}^{3}J_{H1-H2}$ )	$H2/C2 ({}^{3}J_{H2-H3})$	H3/C3 ( <sup>3</sup> J <sub>H3-H4</sub> )	H4/C4 ( ${}^{3}J_{H4-H5}$ )	H5/C5	H6,6′/C6	Others
(I) $\alpha$ -Glcp	5.18/ <b>94.</b> 7 (3.5)	3.63/72.3 (10.0)	3.84/73.9 (9.4)	3.44/71.1 (9.4)	3.82/73.7	3.85, 3.76/61.9	
(II) $\alpha$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 1	5.19/ <b>94.5</b> (3.6)	3.69/72.1 (10.0)	3.96/72.3 (9.4)	3.69/80.1 (8.9)	3.95/72.3	3.91, 3.85/61.2	
(III) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 4	4.55/103.6 (7.7)	3.52/74.5 (8.7)	3.77/85.3 (9.3)	3.53/69.4 ND	3.52/76.9	3.93, 3.76/62.0	
(IV) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 3	4.76/104.0 (7.3)	3.47/75.5 (8.4)	3.64/83.3 (9.4)	3.48/69.4 ND	3.49/77.2	3.92, 3.73/62.0	
(V) 3-O-Me- $\alpha$ -Rhap 1 $\rightarrow$ 3	5.18/102.0 (1.0)	4.32/67.5 (4.6)	3.56/79.6 (9.5)	3.64/ <b>80.9</b> (9.6)	4.13/69.4	1.34/18.0	3.40/57.3 (O-Me)
(VI) $\beta$ -Xylp 1 $\rightarrow$ 4	4.52/104.9 (8.0)	3.32/74.9 (8.9)	3.62/75.2 (9.6)	3.68/75.2 (11.7)	3.33, 4.10/63.9		
4-C-branched sugars							
(VII) α-3,6-Dideoxy-4-C-(D-	H1/C1 ( <sup>3</sup> J <sub>H1-H2</sub> )	$H_{2}/C_{2}({}^{3}J_{H_{2}-H_{3}})$	$H3,3'/C3({}^{3}J_{H3-H3'})$	H4/C4	H5/C5	H6/C6	
altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-	4.91/96.9 (4)	4.00/65.7 (4/9)	1.94, 1.77/31.7 (11)	-/75.8	4.47/68.6	1.15/13.6	
D-xylo-hexopyranose 1→4	Ha/Ca	Hb,b'/Cb	Hc/Cc	Hd/Cd	He/Ce	Hf/Cf	
	3.78/71.1	1.73, 1.68/33.5	3.84/69.4	3.52/79.2	3.93/68.8	1.21/18.2	
(VII') $\alpha$ -6-dideoxy-4-C-(D-	$H1/C1 ({}^{3}J_{H1-H2})$	$H2/C2 ({}^{3}J_{H2-H3})$	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6	
altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-	4.97/97.5 (3.5)	3.78/69.6 (10.1)	3.84/72.5	-/77.7	4.40/68.4	1.22/14.9	
<i>galacto</i> -hexopyranose 1→4	Ha/Ca	Hb,b′/Cb	Hc/Cc	Hd/Cd	He/Ce	Hf/Cf	
	4.12/69.4	1.82, 1.75/34.8	3.83/69.4	3.50/79.2	3.93/68.8	1.21/18.2	





FIGURE 6. Sequence analysis of OS-II by NMR. Expanded areas of two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectrum (A) and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC spectrum of OS-II fraction (B) are shown.

sequence:  $X-(1\rightarrow 4)-\beta-Xylp-(1\rightarrow 4)-\alpha-3-O-Me-Rhap-(1\rightarrow 3)-\beta Glcp-(1\rightarrow 3)-\beta-Glcp-(1\rightarrow 4)-\alpha-Glcp-(1\rightarrow 1)-\alpha-Glcp.$ 

Further determination of the nature of monosaccharide X was exclusively based on NMR experiments. The entire spin system of the ring protons was deduced from the COSY and TOCSY spectra of OS-II (supplemental Figs. S2 and S3). The observation of VII-H2 signal with an octuplet shape at  $\delta$  4.00 and the identification of two shielded VII-H3 signals (VII-H3 at  $\delta$  1.94 and VII-H3' at  $\delta$  1.77) clearly typified the VII unit as a 3-deoxysugar. The presence of a methylene group in C3 position was further confirmed by the observation of two  ${}^{1}J_{H-C}$  correlations from C3 carbons ( $\delta$  31.7) with its corresponding protons at  $\delta$  1.94 and at  $\delta$  1.77, respectively (Fig. 5D). Triplet and quadruplet shapes of H3 and H3', induced by vicinal coupling constants  ${}^{3}J_{3,2} = 9$  Hz,  ${}^{3}J_{3',2} = 4$  Hz and geminal coupling constant  ${}^{2}J_{3,3'} = 11$  Hz, allowed us to assign H3 as axial and H3' as equatorial protons (Table 1). Analysis of relayed COSY showed that H3 and H3' were only coupled to H2, indicating that C4 is a quaternary carbon (data not shown). The VII-C4 resonance was determined on the HMBC spectrum by observing the internal <sup>2</sup>/<sub>H-C</sub> correlations between VII-C4 and VII-H3', VII-H5 and <sup>3</sup>J<sub>H-C</sub> correlation between VII-C4 and VII-H6 signal (supplemental Fig. S4). Similarly, C5 resonance was established because of intra-residue  ${}^{3}\!J_{\text{H-C}}$  connectivities of VII-C5 with H1 and H3'. Finally, VII-H6 was identified at 1.15 ppm on COSY spectrum through a correlation with VII-H5 (supplemental Fig. S3B). Parameters of H6/C6 at 1.15/13.6 established from an HSQC experiment (Fig. 5D and Table 1) typified a methyl group. The ring configuration was defined as xylo based on data from a nuclear Overhauser effect spectroscopy experiment (data not shown) and vicinal coupling constants pattern previously defined. Indeed, NOE effect from VII-H3 to VII-H5 indicated the axial orientation of VII-H5 (data not shown). Furthermore, Ha-VII NOE contacts with VII-H6 and VII-H5 suggesting a spatial proximity of this proton and an equatorial orientation of the side chain (data not shown). Thus, NMR data permitted us to identify the X monosaccharide as a 3,6dideoxyhexopyranose in xylo configuration further substituted by a side chain in the C4 position.

Accordingly, linkage of side chain to the quaternary ring carbon was directly observed on HMBC spectrum because of clear  ${}^{3}J_{H-C}$  and  ${}^{2}J_{H-C}$  connectivities of C3 and C4 with an extra ring proton Ha at 3.78 ppm (supplemental Fig. S4). This interpretation is further supported by strong NOE effects from Ha to H5 and H6 on rotating frame Overhauser enhancement spectrum (data not shown). The proton resonance VII-Ha was used as starting point to define the spin system of the side chain. From COSY 90 spectrum analysis, VII-Ha was correlated with two methylene protons VII-Hb at  $\delta$  1.73 and VII-Hb' at  $\delta 1.68 ({}^{3}J_{\text{Ha,Hb}} = 3.8 \text{ Hz and}$  ${}^{3}J_{\mathrm{Ha,Hb'}} = 9.8$  Hz) (supplemental Fig. S3B). Then Hb protons permitted us to successively identify Hc,

Hd, and He protons at  $\delta$  3.84, 3.52, and 3.93, respectively, all associated with CHOD groups. Finally, He correlates with a final Hf proton at 1.21 ppm associated with a methyl group

 $r_{\rm soci}$ ...ent, Cb and ...assignments as .rig. 5D and Table 1). ...nical shifts values between ...eement with carbons of CHOD ...k data identified the side chain of X ...anched in the C4 position as a 1,3,4,5-tetra-...chain. A complete set of NOE contacts between ...of the tetrahydroxyhexyl chain (data not shown) .ongly suggested that the configuration of the side chain is *altro*, which finally established the structure of previously unknown monosaccharide X as a 3,6-dideoxy-4-C-(p-*altro*-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-*p*-*xylo*-hexoperand The nature of the monosaccharide X was further confirmed by analyzing its fragmentation pattern in MS. LOS-II was per-tethylated, hydrolyzed, reduced by BD<sub>4</sub>Na, and per-acety-ted. Derived monosaccharides were analyzed by GC-MS in ctronic impact mode. Chromatographic mobility and frag-ntation patterns of individual partially methylated alditol ate derivatives showed the presence of terminal glucv 19.56 min), 4-substituted glucose (rt = 22.07 min) ed glucose (rt = 21.51 min), 3,4-substituter' fied as 4-substituted 3-O-methyl-rham and 4-substituted xylose ( $rt = 1^{-1}$ ; in accordance with NMR ar al monosaccharide der n that exhibits a fr a terminal copyrar t<sup>+</sup> hexyl)-hexopyranose derivative (supplemental Fig. S5A). In particular, the presence of a partially hydroxylated six-carbon side chain was evidenced by the fragment ion couple 262/205 between C4 and Ca positions. Also, positions of hydroxyl groups were evidenced because of prominent cleavage ions between O-methylated Cc and Cd and between O-methylated Cd and Ce. Finally, structure information determined by GC-MS techniques is in total agreement with mass spectrometry and NMR data, which confirmed the previous assignment of the X monosaccharide.



#### Α OH OH H<sub>2</sub>C<sub>6</sub> 5 OH OH OH 3 ÔΗ ĊН B OH OH 5 OH OH $\cap H$ OH

FIGURE 7. Structures of  $\alpha$ -3,6-dideoxy-4-C-(D-*altro*-1,3,4,5-tetrahydroxy-hexyl)-D-xylo-hexopyranose (A) and  $\alpha$ -6-deoxy-4-C-(D-*altro*-1,3,4,5-tet-rahydroxyhexyl)-D-galactopyranose (B).

A polysaccharide chain composed of a 4-*C*-branched monosaccharide that presents a structure identical to X residue was previously reported in *Pseudomonas caryophylli* (32). Conformational studies permitted its identification as a 3,6-dideoxy-4-*C*-(D-*altro*-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-*xylo*-hexopyranose that was named caryophyllose (33). The fact that X presented strictly identical NMR parameters than  $\alpha$ -caryophyllose ( $\alpha$ -Car) (34) confirmed the configuration of the side chain as *altro* configuration, as we established by nuclear Overhauser effect spectroscopy experiment and demonstrated its  $\alpha$ -anomery (Fig. 7*A*).

Structural Heterogeneity of the LOS-II Sugar Moiety-As stated above, preliminary observation of NMR data indicated that the so-called LOS-II fraction consisted in fact of a mixture of two closely related molecules, LOS-II and LOS-II', differing by the nature of their terminal nonreducing monosaccharide residue. LOS-II is capped by the residue VII (VII-H1/C1 at 4.91/ 96.9 ppm), identified as a  $\alpha$ -caryophyllose, whereas LOS-II' is characterized by the VII' residue (VII'-H1/C1 at 4.97/97.5 ppm). Spin system of VII' residue was totally resolved by <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, and HMBC experiments on OS-II fraction (Table 1). It exhibited a general pattern similar to VII, demonstrating it is also a 4-C-branched hexopyranose (Table 1). In particular on COSY spectrum, correlation of VII'-H5 with methyl protons at  $\delta$  1.22 clearly established it is a  $\alpha$ -6-deoxyhexose (supplemental Fig. S3B). Furthermore, absence of the H4 signal permitted us to detect the presence of a quaternary carbon on the C4 position, which chemical shift was established at 77.7 ppm because of  ${}^{2}J_{H-C}$  correlation between VII'-H5 and VII'-C4 on <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC spectrum. As for residue VII, the Ca/Ha linked to C4 was identified from  $^1\text{H-}{^{13}\text{C}}$  HMBC spectrum by  $^2\!J_{\text{H-C}}$  scalar coupling connectivity between VII'-Ha and VII'-C4 (supplemental Fig. S4) and from rotating frame Overhauser enhancement spectrum because of a NOE effect between VII'-H5 and VII'-Ha (data not shown).

#### M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

Then the spin system of side chain was identified on relayed COSY experiment starting from the proton VII'-Ha, which demonstrated that it has the same structure than the one substituting VII (Table 1). Considering the closeness of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR parameters from the chains associated with VII', with the exception of VII'-Ha, with the one associated with VII residues, it is most likely that it also exhibits an altro configuration. However, despite these similarities, VII' differs from the VII residue by the presence of a hydroxyl group on the C3 position, as demonstrated by the large downfield shift of VII'-H3 from 1.94 to 3.84 ppm and upfield shift of VII'-H2 from 4.00 to 3.78 ppm (Table 1 and supplemental Fig. S2). It is also obvious from the loss of vicinal coupling constants between H2 and H3eq and the geminal constant between two H3. Moderate downfield shift of VII'-Ha ( $\delta$  4.12) compared with VII-Ha ( $\delta$  3.78) may also result from the closeness of the modified C3 position. On the TOCSY analysis, the  ${}^{3}J_{2,3}$ value of 10.1 Hz indicated that H3 is in axial position. Altogether, NMR data identified the X' residue as a novel 4-Cbranched sugar corresponding to a  $\alpha$ -6-deoxy-4-C-(D-altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-galactopyranose (Fig. 7B).

A closer examination of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC spectrum revealed a clear correlation between VII'-C1 and a <sup>1</sup>H signal at  $\delta$  3.64, tentatively attributed to the H4 of a  $\beta$ -Xylp residue labeled VI' (Fig. 6B). This residue exhibits identical parameters to the VI residue, only differing by the minute upfield shift of its H4 from 3.68 to 3.64 ppm. This indicated that 3-C-hydroxylation of  $\alpha$ -caryophyllose induces a slight modification of the VI-H4 parameter. Altogether, NMR data established the presence of two highly related molecules in the LOS-II fraction as follows: LOS-II terminally substituted by a  $\alpha$ -3,6-dideoxy-4-C-(D-altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-xylo-hexopyranose and LOS-II' substituted by a  $\alpha$ -6-deoxy-4-C-(D-altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-galactopyranose. Both molecules were directly observed from the native and permethylated OS-II fraction by MALDI-MS. Indeed, MALDI-MS of the native OS-II fraction shows two major signals at m/z 1259 and 1275 attributed to  $[M + Na]^+$  adducts of OS-II and OS-II' (supplemental Fig. S1A). To rule out the possibility that the signal at m/z 1275 may originate from the  $[M + K]^+$  adduct of OS-II, we also analyzed permethylated and per-deuteromethylated derivatives of the OS-II fraction. After derivatization, OS-II and OS-II' could still be differentiated according to the m/z values of their respective derivatives as  $[M + Na]^+$  adducts (supplemental Fig. S1A). Indeed, the 30-mass unit increment between permethylated oligosaccharides and the 33-mass unit increment between per-deuteromethylated oligosaccharides established that OS-II and OS-II' differed by the presence of a single hydroxyl group. MS-MS fragmentation patterns of [M + 2Na<sup>2+</sup> adducts of native OS-II and OS-II' confirmed that the supplementary hydroxyl group was located on the X' monosaccharide at the nonreducing end of OS-II', in perfect accordance with the NMR data (Fig. 4B).

Analysis of LOS-III—MALDI-MS analysis of the permethylated derivative of LOS-III already established that it differed from LOS-II by an additional caryophyllose ( $\Delta$ 348 mass units) (Fig. 2*B*). Comparative NMR analyses demonstrated that LOS-II and LOS-III exhibited essentially identical NMR





Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2009/06/02/M109.011429.DC1.html

## M. marinum LOSs Inhibit Secretion in Macrophages

parameters (data not shown), and as a consequence both share a very similar glycan sequence. Indeed, comparison of LOS-II and LOS-III <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC anomeric region spectra showed that all I- to VII-C1/H1 signals had identical NMR parameters, and that LOS-III differed exclusively from LOS-II by the presence of an additional VIII-H1/C1 signal at  $\delta$  4.87/99.9, tentatively assigned as the anomer of a second  $\alpha$ -caryophyllose residue (Fig. 8, *A* and *B*). As shown in Table 2, the spin system of VII from LOS-II and LOS-III essentially differ for their respective tetrahydroxyhexyl chains. In particular, a large downfield shift of LOS-III VII-Cc compared with LOS-II VII-Cc from 71.1 to 78.0 ppm, as well as a moderate downfield shift of LOS-III

B С A ppm -1-1 -1-1 92 -11-1 A-11-1 G-11-1 94 96 VII-1 VII-1 VIII-1 VIII-1 98 100 102 104 106 5.4 4.4 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 5.2 5.0 4.8 4.6 44 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 ppm the substituted monosaccharide,  $\beta$ -Xyl for LOS-II and  $\alpha$ -Car for LOS-III. The linkage pattern of the  $\alpha$ -caryophylloses in LOS-III was further confirmed by methylation analysis in GC-MS. Two relevant peaks at rt = 30.55 and 32.23 min were associated with caryophyllose based on their electron ionization-MS fragmentations patterns. Peaks at rt = 30.55 min presented an identical fragmentation pattern than in LOS-II and was identified as terminal caryophyllose (data

VII-Hc ( $\Delta \delta$  +0.26), strongly suggested that LOS-III VII is sub-

stituted in the Cc position by VIII. Accordingly, neighboring

proton and carbon parameters are also moderately affected

(Table 2). The LOS-III VIII spin system then confirmed its

assignment as an additional 3,6-dideoxy-4-*C*-(1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-hexopyranose residue. Furthermore, perfect

matching between the <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C chemical shifts of LOS-II VII and

LOS-III VIII residues established that VIII is a  $\alpha$ -3,6-dideoxy-

4-C-(D-altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-xylo-hexopyranose

in a terminal nonreducing position. Moderate downfield shifts

of LOS-VIII H1/C1 parameters ( $\Delta \delta$  +0.05/3.1) compared with

LOS-II VII can easily be rationalized by the different nature of

FIGURE 8. **Comparison of anomeric signals from LOS-II, -II, and -IV.** Anomeric area of the two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectra from LOS-II (*A*), LOS-III (*B*), and LOS-IV (*C*) is shown.

#### TABLE 2

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts (in parts/million) of 4-C-branched monosaccharides from LOS-II and LOS-III (measured at 300 K in D<sub>2</sub>O using acetone as internal reference) ND indicates not determined.

### **LOS-II**

	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
(VII) $\alpha$ -3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -(D- <i>altro</i> -	4.82/96.8	3.96/65.2	1.89-1.73/ 32.0	_/74.2	4.33/67.5	1.16/13.2
1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-						
<i>xylo</i> -hexopyranose 1, 4	Ha/Ca	Hb/Cb	Hc/Cc	Hd/Cd	He/Ce	Hf/Cf
-	3.70/71.4	1.79-1.73/ 33.9	3.79/71.1	3.33/77.7	3.84/69.5	1.25/18.7
LOS-III						
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
(VII) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -(D-	4.82/97.1	3.97/65.2	1.90-1.73/ 31.9	_/n.d.	4.33/67.7	1.13/13.2
<i>altro</i> -1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-						
D-rula-hevopyranose 1 4	Ha/Ca	Hb/Cb	Hc/Cc	Hd/Cd	He/Ce	Hf/Cf
	3.83/70.4	1.61-2.03/ 30.0	4.05/78.0	3.64/78.2	3.70/68.1	1.28/19.7
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
(VIII) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -(D-	4.87/99.9	3.94/65.8	1.90-1.73/ 31.9	_/n.d.	4.21/67.8	1.16/13.2
altro 1345 tetrahydrovyhevyl)						
<i>uuro-1,5,4,5-tettanydroxynexy1)</i>	Ha/Ca	Hb/Cb	Hc/Cc	Hd/Cd	He/Ce	Hf/Cf
<i>D-xylo</i> -hexopyranose 1, c	3.73/71.5	1.80-1.76/33.9	3.80/71.2	3.34/77.8	3.85/69.7	1.25/18.8



not shown). Peak at rt = 32.23 min showed the presence of an additional *O*-acetyl group at position c indicating that this position is involved in interglycosidic linkage (supplemental Fig. S5*B*). Thus, the OS-III monosaccharide sequence was identified as  $\alpha$ -Car-(1 $\rightarrow$ c)- $\alpha$ -Car-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Xyl*p*-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3-*O*-Me-Rha*p*-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Glc*p*.

Analysis of LOS-IV-Contrary to the other LOSs, LOS-IV was retained on a DEAE column during chloroform/methanol elution (2:1, v/v) and required ammonium acetate salt to be eluted, suggesting the presence of an acidic function, very likely to be localized on the terminal YZ unidentified sugar residue. To delineate its oligosaccharide sequence, the glycan moiety was released by de-O-acetylation to generate OS-IV. Native OS-IV analyzed by MALDI-MS produced a major signal at m/z1867.5  $[M + Na]^+$  (supplemental Fig. S1B), suggesting that it exhibits an apparent m/z value of 1844 mass units. Surprisingly, ES-MS analysis permitted us to calculate for the same molecule an apparent m/z value of 1889 through the observation of a doubly charged signal at m/z 967.47  $[M + 2Na]^{2+}$  (data not shown). Discrepancy of 45 m.u. between the two analyses suggested that native OS-IV undergoes partial degradation upon laser desorption, probably from the YZ residue. This hypothesis was confirmed by deducing OS-IV native molecular mass from MALDI-MS analyses of permethylated and per-deuteromethylated OS-IV derivatives (supplemental Fig. S1). Comparison of  $[M + Na]^+$  signals at m/z 2332 and 2422 established that OS-IV possesses 30 methylatable functional groups of which 4 would be localized on the terminal YZ residue, allowing us to deduce that the molecular mass of native OS-IV is indeed 1889 mass units. Altogether, mass spectrometry analyses permitted us to estimate the molecular mass of the free YZ residue to 393 Da, which is way above the molecular mass of all known monosaccharides, including caryophyllose (296 Da).

Comparison of LOS-III and LOS-IV <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSOC spectra showed a single additional anomeric signal at 4.94/101.5 ppm assigned to the monosaccharide residue IX (Fig. 8, B and C). This unique supplementary anomeric signal demonstrated that the unknown YZ consists of a single monosaccharide unit despite its high molecular mass (Fig. 8C). Complete spin systems of constituting monosaccharides were established from OS-IV in identical condition than for OS-II (supplemental Table S1). Comparison of NMR parameters of OS-IV with OS-II demonstrated that OS-IV exhibited an oligosaccharidic moiety similar to other LOSs with a  $\alpha$ -Car-(1 $\rightarrow$ c)- $\alpha$ -Car- $(1\rightarrow 4)$ - $\beta$ -Xylp- $(1\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -3-O-Me-Rhap- $(1\rightarrow 3)$ - $\beta$ -Glcp- $(1\rightarrow 3)$ - $\beta$ -Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -Glc*p*-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Glc*p* sequence further substituted by an additional monosaccharide residue labeled IX in Cc position of terminal  $\alpha$ -Car residue (VIII residue). Position of substitution was assigned because of large downfield shift of OS-IV VIII-Cc to 79.1 ppm, compared with unsubstituted OS-II VII-Cc at 69.4 ppm (Table 1 and supplemental Table S1). The substitution pattern of Car residues was then confirmed by methylation analysis in GC-MS (data not shown) that showed a unique partially methylated and acetylated derivative of Car residue with a methyl group in the Cc position. NMR parameters of IX residue ring protons and <sup>3</sup>J connectivities established through <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC and <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H COSY experiments permit-



FIGURE 9. Inhibitory effect of LOS-IV on TNF- $\alpha$  secretion in differentiated THP-1 cells. Cells were preincubated for 20 h with increasing concentrations of LOS-IV isolated from MmaM and then stimulated with LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (20 ng/ml). Culture supernatants were collected after 6 h of induction and assayed by ELISA for TNF- $\alpha$  secretion. The results presented are from one representative experiment of three independent experiments with similar results. Comparable results were obtained using different batches of THP-1 cells and different LOS-IV preparations. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. of triplicate plates. Statistical analyses were performed by using Student's t test to compare LOS-IV-pretreated cells with nontreated cells. The *p* values were <0.0023 and <0.0003 in comparison with LPS- or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-stimulated cells, respectively.

ted us to assign it as a 4,6-dideoxy-galactopyranose in  $\alpha$ -anomery (supplemental Table S1). Distinctive chemical shift of IX-H4/C4 at 4.28/56.3 strongly suggests that IX-C4 is linked to a nitrogen atom (supplemental Table S1). Furthermore, observation of a  ${}^{3}J_{H,C}$  correlation on  ${}^{1}H/{}^{13}C$  HMBC spectrum (data not shown) between IX-H4 and a carbon at 170.2 ppm clearly typified the presence of a -CO-NH- group substituting IX in the C4 position. Altogether, the data established that LOS-IV is capped by  $\alpha$ -4,6-dideoxy-Galp substituted in the C4 position by an aglycone group through an amide linkage.

Role of LOSs in Modulating the Macrophage TNF- $\alpha$  Response— The mycobacterial cell envelope is important in directing hostpathogen interactions (3, 4). Several cell envelope-associated lipids, glycolipids, or lipoglycans have recently been significantly studied because they are considered to be important virulence factors and because of their immunomodulatory properties (1). Paradoxically, little attention has been paid regarding the potential immunomodulatory functions of LOSs. We therefore took advantage of the availability of purified LOS-I to LOS-IV with defined structural variations to examine their propensity to modulate the TNF- $\alpha$  response in the human monocytic cell line THP-1. First, the capacity of the different LOS subtypes to trigger TNF- $\alpha$  secretion was investigated, but none of these glycolipids were able to induce a TNF- $\alpha$  response (supplemental Fig. S6), in contrast to LM and TDM, both known as potent proinflammatory-inducing factors (35-37). We next examined whether increasing concentrations of LOS-IV may inhibit TNF- $\alpha$  secretion in macrophages stimulated with either LPS or Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (20 ng/ml), known to activate macrophage through TLR4- and TLR2-dependent signaling pathways, respectively. As presented in Fig. 9, LOS-IV strongly inhibited the release of TNF- $\alpha$  when the glycolipid was added 20 h before LPS or  $\text{Pam}_3\text{CSK}_4$  stimulation. LPS-induced release of TNF- $\alpha$ was inhibited by LOS-IV in a dose-dependent manner by 55–93%. The release of TNF- $\alpha$  induced by Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> was inhibited by 90% from 20  $\mu$ g/ml of LOS-IV. Taken together,



these results suggest that LOSs represent potent glycolipids interfering with the macrophage TNF- $\alpha$  response.

#### DISCUSSION

M. marinum causes a systemic tuberculosis-like disease in a large number of poikilothermic animals and is often used as a model to study mycobacterial pathogenesis (38-41). M. marinum isolates can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence, developing either an acute or a chronic disease in fish (22). In this study, we analyzed the apolar and by polar lipid profiles in various strains inducing either an acute or a chronic disease. The major difference was found in Mma7, a strain originally isolated from the butterfly fish (22), which exhibited an altered LOS profile, characterized by a defect of LOS-IV synthesis and a concomitant accumulation of LOS-III. Interestingly, although most zebrafish inoculated with Mma7 or Mma11 (isolated from butterfly fish and sea bass, respectively) survived 56 days postinfection, those inoculated with Mma7 showed no signs of infection for 8 weeks, whereas those infected with Mma11 showed skin lesions (ulceration) after 45 days (22). Because Mma11 produces a standard LOS profile, similarly to the reference M strain (data not shown), our results suggest that the differences between strains inducing chronic and acute diseases are unlikely to be caused by differences observed in the LOS profiles. These results tend to indicate that the marked differences in pathogenicity of the M. marinum strains are not because of direct activities of LOSs. Ren et al. (17) demonstrated that M. marinum strains carrying transposon in MM2309 and MM2332 are defective in LOS-II and accumulate an intermediate between LOS-I and -II respectively, and are affected in sliding motility, biofilm formation, and infection of host macrophages. However, whether LOSs participate directly to the pathogenicity of M. marinum requires to be investigated in more detail by derivating isogenic strains that are completely deficient in LOS synthesis.

We subsequently established that the failure of Mma7 to synthesize LOS-IV was associated with the presence of multiples genetic lesions present in the LOS biosynthetic gene cluster (17). First, LosA, which was reported as a key glycosyltransferase involved in transferring sugars to LOS-III to form LOS-IV (16), contains several point mutations and is lacking its C terminus in Mma7. Second, a comparative genomic analysis indicated that this LOS cluster contains important mutations, including a 3.8-kb deletion downstream of the truncated losA gene. Thus, it can be inferred that the LOS biosynthetic cluster organization/sequence is severely compromised in Mma7 and is very likely responsible for the loss of LOS-IV production. In addition, the failure to restore LOS-IV biosynthesis in Mma7 following introduction of a functional *losA* gene indicates that losA, although necessary (16), is not sufficient to ensure LOS-IV biosynthesis. Our partial characterization of the YZ substituent in LOS-IV indicates that it consists of a single high molecular mass N-acylamino-monosaccharide substituted by a very large side chain, rather than a disaccharide as proposed earlier (16). Interestingly, another acylamino sugar presented a much simpler side chain has already been identified in M. kansasii as a 4,6-dideoxy-2-O-methyl-3-C-methyl-4-(2'-methoxypropionamido)hexopyranose (42). Therefore, the structural complexity of this sugar unit probably results from the action of an important number of enzymes. Thus, it appears conceivable that, in addition to LosA, multiple enzymes are operating to ensure both the synthesis and transfer of YZ to LOS-III, and that the deletion and/or mutations in these genes in Mma7 compromises LOS-IV production in this strain. Work is currently in progress to establish the exact structure of the remaining YZ monosaccharide.

One surprising finding of this study is the characterization of a polysaccharide chain composed of a 4-C-branched monosaccharide structurally identical to the one described in *P*. caryophylli (32) identified as a 3,6-dideoxy-4-C-(D-altro-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-xylo-hexopyranose and subsequently designated caryophyllose (33). Caryophyllose is part of a family of unusual 4-C-branched monosaccharides of which members have been identified from various Gram-negative bacteria, including Yersinia species (43, 44) and Burkholderia brasiliensis (45). All 4-C-branched monosaccharides described so far are surprisingly based on a 3,6-dideoxyhexose core, which strongly suggests a conserved origin for this family of molecules. To our knowledge,  $\alpha$ -caryophyllose has only been described so far in P. caryophylli. A related monosaccharide differing in the nature of the side chain has been previously identified at the nonreducing position of an LOS of M. gastri (9). The presence of this very rare and unusual monosaccharide in two totally unrelated bacteria suggests the presence of a common biosynthetic pathway that ultimately leads to  $\alpha$ -caryophyllose biosynthesis. Furthermore, we identified a novel monosaccharide that derives from the caryophyllose but differs by the presence of an additional hydroxyl group in C3 position. To our knowledge, hydroxylated caryophyllose has never been observed before. This study describes a novel family of 4-Cbranched 6-deoxyhexoses. In addition, this study reveals an additional level of complexity within the LOS structures of M. marinum. Indeed, its presence first permitted us to define another LOS subtype, designated LOS-II', in which the terminal  $\alpha$ -caryophyllose is replaced by its 3-C-hydroxylated equivalent (OH-Car) that co-exists with LOS-II. Differential integration of the NMR signals revealed that within the LOS-II mixture, LOS-II' represents a quantitatively minor compound compared with LOS-II. Although it was initially identified at the terminal nonreductive position of LOS-II', OH-Car was also observed within the glycan sequences of both LOS-III and LOS-IV, defining again multiple subtypes of LOS-III and LOS-IV. Indeed, both NMR and mass spectrometry analyses (data not shown) provided conclusive evidence that LOS-III and -IV fractions were in fact constituted by mixtures of subtypes in which OH-Car could replace Car residues in both positions, thus presumably generating four isoforms for each molecule. However, the OH-Car residue containing LOS-III and -IV isoforms appeared as minor molecules (<10%).

Our study also unraveled a role of LOS in the inhibition of the TNF- $\alpha$  response in LPS-stimulated human macrophages. This unexpected finding is somehow reminiscent to the observation that phenolic glycolipids (PGL), produced by a subset of *M. tuberculosis* isolates of the Beijing family, are responsible for the "hyperlethality" phenotype of these strains in mice (46). Indeed, loss of PGL was found to correlate with an increase in the



release of the pro-inflammatory cytokines in vitro, including TNF- $\alpha$ . Moreover, the addition of purified PGL to macrophages inhibited the secretion of TNF- $\alpha$  in a dose-dependent manner but did not induce the release of this cytokine (46). This anti-inflammatory effect has recently been confirmed using PGL purified from *M. marinum* (47). Our data suggest that, in addition to PGL, LOS can also confer the ability to inhibit the release of key inflammatory effector molecules by the innate immune system of the host. Whether this inhibition manifests itself in the hyperlethal phenotype of virulence M. marinum strains in infected fish remains, however, to be further demonstrated. Recent work demonstrated that loss of TNF signaling was responsible for an increase of M. marinum-infected zebrafish mortality and M. marinum intracellular growth and an acceleration in granuloma formation, followed by necrotic death of overladen macrophages and granuloma breakdown (48). It is therefore tempting to speculate that LOSs, by inhibiting TNF signaling, directly influence these physiopathological processes.

Our results point out an important immunomodulatory role of LOS, which may also be of high biological significance in the context of infection with other pathogenic species. In particular, LOSs are found in the Canetti strain, a smooth variant of *M. tuberculosis* (15). Further work is now required to address whether LOSs participate and contribute in the Canetti strain to pathogenesis or virulence by inhibiting the pro-inflammatory response in the Canetti strain.

Acknowledgments—We are grateful to Marlène Mortuaire for technical advice in cell culture and to Wilbert Bitter for kindly providing the M. marinum strains.

#### REFERENCES

- Karakousis, P. C., Bishai, W. R., and Dorman, S. E. (2004) *Cell. Microbiol.* 6, 105–116
- Kremer, L., Baulard, A. R., and Besra, G. S. (2000) in *Molecular Genetics of Mycobacteria* (Hatfull, G. F., and Jacobs, W. R., Jr., eds) pp. 173–190, American Society for Microbiology, Washington, DC
- 3. Brennan, P. J., and Nikaido, H. (1995) Annu. Rev. Biochem. 64, 29-63
- 4. Daffé, M., and Draper, P. (1998) Adv. Microb. Physiol. 39, 131-203
- Minnikin, D. E., Kremer, L., Dover, L. G., and Besra, G. S. (2002) *Chem. Biol.* 9, 545–553
- Hunter, S. W., Murphy, R. C., Clay, K., Goren, M. B., and Brennan, P. J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 10481–10487
- Hunter, S. W., Jardine, I., Yanagihara, D. L., and Brennan, P. J. (1985) Biochemistry 24, 2798–2805
- 8. Gilleron, M., and Puzo, G. (1995) Glycoconj. J. 12, 298-308
- 9. Gilleron, M., Vercauteren, J., and Puzo, G. (1993) J. Biol. Chem. 268, 3168-3179
- Hunter, S. W., Barr, V. L., McNeil, M., Jardine, I., and Brennan, P. J. (1988) Biochemistry 27, 1549–1556
- McNeil, M., Tsang, A. Y., McClatchy, J. K., Stewart, C., Jardine, I., and Brennan, P. J. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 3312–3320
- Besra, G. S., McNeil, M. R., Khoo, K. H., Dell, A., Morris, H. R., and Brennan, P. J. (1993) *Biochemistry* 32, 12705–12714
- Khoo, K. H., Suzuki, R., Morris, H. R., Dell, A., Brennan, P. J., and Besra, G. S. (1995) *Carbohydr. Res.* 276, 449 – 455
- Muñoz, M., Raynaud, C., Lanéelle, M. A., Julián, E., López Marín, L. M., Silve, G., Ausina, V., Daffé, M., and Luquin, M. (1998) *Microbiology* 144, 137–148
- 15. Daffe, M., McNeil, M., and Brennan, P. J. (1991) Biochemistry 30, 378-388



- Burguière, A., Hitchen, P. G., Dover, L. G., Kremer, L., Ridell, M., Alexander, D. C., Liu, J., Morris, H. R., Minnikin, D. E., Dell, A., and Besra, G. S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 42124–42133
- Ren, H., Dover, L. G., Islam, S. T., Alexander, D. C., Chen, J. M., Besra, G. S., and Liu, J. (2007) *Mol. Microbiol.* **63**, 1345–1359
- 18. Etienne, G., Malaga, W., Laval, F., Lemassu, A., Guilhot, C., and Daffé, M. (2009) *J. Bacteriol.* **191**, 2613–2621
- 19. Belisle, J. T., and Brennan, P. J. (1989) J. Bacteriol. 171, 3465–3470
- Lemassu, A., Lévy-Frébault, V. V., Lanéelle, M. A., and Daffé, M. (1992) J. Gen. Microbiol. 138, 1535–1541
- 21. Collins, F. M., and Cunningham, D. S. (1981) Infect. Immun. 32, 614-624
- van der Sar, A. M., Abdallah, A. M., Sparrius, M., Reinders, E., Vandenbroucke-Grauls, C. M., and Bitter, W. (2004) *Infect. Immun.* 72, 6306–6312
- Stinear, T. P., Seemann, T., Harrison, P. F., Jenkin, G. A., Davies, J. K., Johnson, P. D., Abdellah, Z., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Goodhead, I., Holroyd, N., Jagels, K., Lord, A., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Walker, D., White, B., Whitehead, S., Small, P. L., Brosch, R., Ramakrishnan, L., Fischbach, M. A., Parkhill, J., and Cole, S. T. (2008) *Genome Res.* 18, 729–741
- Kremer, L., Gurcha, S. S., Bifani, P., Hitchen, P. G., Baulard, A., Morris, H. R., Dell, A., Brennan, P. J., and Besra, G. S. (2002) *Biochem. J.* 363, 437–447
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., and Hatfull, G. F. (1991) *Nature* **351**, 456–460
- 26. Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) Carbohydr. Res. 131, 209-217
- Guerardel, Y., Maes, E., Elass, E., Leroy, Y., Timmerman, P., Besra, G. S., Locht, C., Strecker, G., and Kremer, L. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 30635–30648
- Guérardel, Y., Maes, E., Briken, V., Chirat, F., Leroy, Y., Locht, C., Strecker, G., and Kremer, L. (2003) J. Biol. Chem. 278, 36637–36651
- 29. Vey, E., Zhang, J. H., and Dayer, J. M. (1992) J. Immunol. 149, 2040-2046
- Alexander, D. C., Jones, J. R., Tan, T., Chen, J. M., and Liu, J. (2004) J. Biol. Chem. 279, 18824–18833
- Malm, S., Walter, K., Engel, R., Maass, S., Pfau, S., Hübner, G., Lindner, B., Holst, O., Ehlers, S., and Bange, F. C. (2008) *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 645–655
- Adinolfi, M., Corsaro, M. M., De Castro, C., Lanzetta, R., Parrilli, M., Evidente, A., and Lavermicocca, P. (1995) *Carbohydr. Res.* 267, 307–311
- Adinolfi, M., Corsaro, M. M., De Castro, C., Evidente, A., Lanzetta, R., Mangoni, L., and Parrilli, M. (1995) *Carbohydr. Res.* 274, 223–232
- Molinaro, A., De Castro, C., Lanzetta, R., Manzo, E., and Parrilli, M. (2001) J. Am. Chem. Soc. 123, 12605–12610
- Vignal, C., Guérardel, Y., Kremer, L., Masson, M., Legrand, D., Mazurier, J., and Elass, E. (2003) J. Immunol. 171, 2014–2023
- Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S., and Kremer, L. (2004) *Mol. Microbiol.* 53, 391–403
- Ryll, R., Kumazawa, Y., and Yano, I. (2001) Microbiol. Immunol. 45, 801–811
- Clay, H., Davis, J. M., Beery, D., Huttenlocher, A., Lyons, S. E., and Ramakrishnan, L. (2007) Cell Host Microbe 2, 29–39
- Cosma, C. L., Humbert, O., and Ramakrishnan, L. (2004) Nat. Immunol. 5, 828 – 835
- Davis, J. M., Clay, H., Lewis, J. L., Ghori, N., Herbomel, P., and Ramakrishnan, L. (2002) *Immunity* 17, 693–702
- Appelmelk, B. J., den Dunnen, J., Driessen, N. N., Ummels, R., Pak, M., Nigou, J., Larrouy-Maumus, G., Gurcha, S. S., Movahedzadeh, F., Geurtsen, J., Brown, E. J., Eysink, Smeets, M. M., Besra, G. S., Willemsen, P. T., Lowary, T. L., van Kooyk, Y., Maaskant, J. J., Stoker, N. G., van der Ley, P., Puzo, G., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Wieland, C. W., van der Poll, T., Geijtenbeek, T. B., van der Sar, A. M., and Bitter, W. (2008) *Cell. Microbiol.* 10, 930–944
- 42. Hunter, S. W., Fujiwara, T., Murphy, R. C., and Brennan, P. J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 9729–9734
- 43. Gorshkova, R. P., Zubkov, V. A., Isakov, V. V., and Ovodov, Y. S. (1984)



Carbohydr. Res. **126,** 308–312

- Gorshkova, R. P., Zubkov, V. A., Isakov, V. V., and Ovodov, IuS. (1987) *Bioorg. Khim.* 13, 1146–1147
- Mattos, K. A., Todeschini, A. R., Heise, N., Jones, C., Previato, J. O., and Mendonça-Previato, L. (2005) *Glycobiology* 15, 313–321
- 46. Reed, M. B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A. K., Kreiswirth,

B. N., Kaplan, G., and Barry, C. E., 3rd (2004) *Nature* **431**, 84–87

- Robinson, N., Kolter, T., Wolke, M., Rybniker, J., Hartmann, P., and Plum, G. (2008) *Traffic* 9, 1936–1947
- 48. Clay, H., Volkman, H. E., and Ramakrishnan, L. (2008) *Immunity* 29, 283–294
- 49. Domon, B., and Costello, C. E. (1988) Biochemistry 27, 1534-1543



## Supplemental data

**Fig. S1 : Mass spectrometric analyses of deacylated LOS-II and LOS-IV**. LOS-II and LOS-IV purified from MmaM were deacylated by alkaline hydrolysis to generate OS-II and OS-IV. (A) OS-II and (B) OS-IV were analysed by MALDI-MS in native form and as, permethylated (per-CH<sub>3</sub>) and perdeuteromethylated (per-CD<sub>3</sub>) derivatives.







Fig. S3: Identification of side chains associated to caryophyllose (VII) and hydroxylated caryophyllose (VII') by 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY analysis of OS-II fraction. A, anomeric region of <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum containing ring proton signals and **B**, region containing methyl and methylen signals; VII sugar unit corresponds to the  $\alpha$ -3,6-dideoxy-4-*C*-(D-*altro*-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-*xylo*-hexopyranose and VII' to the  $\alpha$ -6-deoxy-4-*C*-(D-*altro*-1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-D-galactopyranose.



**Fig. S4 : Linkage analysis of side chains to caryophyllose (VII) and hydroxylated caryophyllose (VII') by** <sup>1</sup>**H**-<sup>13</sup>**C HMBC NMR**. Expanded areas of 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC spectrum (A, B and D) and 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum (C and E) of OS-II fraction.



Fig. S5: Structural analysis of partially methylated and acetylated derivatives of reduced external and internal caryophyllose residues by GC/MS. EI/MS fragmentation pattern of 3,6-dideoxy-4-C-(1,3,4,5-tetrahydroxyhexyl)-*xylo*-hexopyranose residues (A) in terminal position of LOS-II and (B), in penultimate position of LOS-III. Carbon positions were labelled according to NMR description where 1-6 are ring carbons and a-f side chain carbons. Both residues exclusively differ by the presence of a methyl or an acetyl group in c position, establishing its substitution position when in penultimate position.



Fig. S6 : Effect of LOSs on TNF- $\alpha$  secretion in differentiated THP-1 cells. Cells were incubated with increasing concentrations of glycolipids isolated from MmaM including LOS-I to -IV, TDM and LM, compared with medium (M). Culture supernatants were collected after 6 h of induction and assayed by ELISA for TNF- $\alpha$  secretion. The results presented are from one representative experiment of three independent experiments with similar results. Data are expressed as means ±SD of triplicate plates. The levels of statistical significance of differences in comparison with unstimulated cells were calculated by using Student *t* test (one asterisk indicates a P value of < 0.05 that is considered to be significant).



**Sup. Table 1:** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts (in ppm) and coupling constant values (in Hz) of OS-IV monosaccharides (measured at 300 K in D<sub>2</sub>O using acetone as internal reference). Values in brackets are coupling constants; values in bold correspond to substituted carbons.

Sugar unit	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6,6'/C-6	Others
	$({}^{3}J_{\text{H1-H2}})$	$({}^{3}J_{\text{H2-H3}})$	$({}^{3}J_{H3-H4})$	$({}^{3}J_{H4-H5})$			
( <b>I</b> ) α-Glc <i>p</i>	5.18/ <b>94.6</b>	3.64/72.3	3.84/73.5	3.44/70.9	3.83/73.5	3.85, 3.75	
	(3.5)	(10.2)	(9.5)	(9.6)		/61.6	
(II) $\alpha$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 1	5.19/ <b>94.2</b>	3.69/71.9	3.96/72.1	3.70/ <b>79.8</b>	3.96/72.2	3.91, 3.87	
	(3.6)	(10.4)	(9.5)	(10)		/60.9	
(III) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 4	4.56/103.5	3.53/74.3	3.77/ <b>85.2</b>	3.53/69.2	3.53/76.8	3.93, 3.77	
	(7.7)	(~ 9)	(8.4)	(n.d.)		/61.75	
(IV) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 3	4.76/103.7	3.48/75.3	3.64/ <b>83.1</b>	3.49/69.2	3.49/77.0	3.93, 3.73	
	(7.4)	(~ 9)	(8)	(n.d.)		/61.75	
(V) 3-O- <i>Me</i> - $\alpha$ -Rhap 1 $\rightarrow$ 3	5.19/101.92	4.33/67.4	3.56/79.4	3.64/ <b>80.8</b>	4.14/69.2	1.34/17.9	3.41/57.0
	(1.0)	(4.6)	(9.4)	(11)			(O-Me)
<b>(VI)</b> β-Xyl <i>p</i> 1→4	4.52/104.7	3.32/74.7	3.61/75.1	3.69/ <b>75.3</b>	3.34, 4.11		
	(8.3)	(8.9)	(n.d.)	(11.5)	/63.8		
(IX) 4-amino-4,6-dideoxy-	5.10/102.7	3.56/70.2	4.08/69.9	4.28/56.3	4.38/66.7	1.24/17.2	
a-Gal $p \rightarrow c$	(4)	(11)	(4.7)	(~ 1)			

## 4-C-branched sugars

	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3,3'/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
(VII) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -	$({}^{3}J_{\text{H1-H2}})$	$({}^{3}J_{\text{H2-H3}})$	$({}^{3}J_{\text{H3-H3'}})$			
(D-altro-1,3,4,5-	4.91/96.8	3.99/65.6	1.97, 1.79	/76.1	4.48/68.43	1.12/13.4
tetrahydroxyhaxyl) D	(4.3)	(~4/9)	/31.1 (11)			
tetranyoroxynexyr)-D-	H-a/C-a	H-b,b'/C-b	H-c/C-c	H-d/C-d	H-e/C-e	H-f/C-f
<i>xylo</i> -hexopyranose $1 \rightarrow 4$	3.99/70.1	1.96, 1.62	4.15/ <b>79.1</b>	3.72/79.1	3.72/68.55	1.28/20.4
		/29.5				
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
( <b>VIII</b> ) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -	$({}^{3}J_{\text{H1-H2}})$	$({}^{3}J_{H2-H3})$	$({}^{3}J_{H3-H3'})$			
(D-altro-1,3,4,5-	4.94/101.5	3.96/66.2	2.0, 1.78	/76.2	4.33/68.4	1.13/13.4
tetrahydroxyhexyl)-D-	(4.1)	(~4/9)	/31.2 (11)			
<i>xylo</i> -hexopyranose $1 \rightarrow c$	H-a/C-a	H-b,b'/C-b	H-c/C-c	H-d/C-d	Н-е/С-е	H-f/C-f
	3.94/70.3	1.96, 1.62	4.14/ <b>79.1</b>	3.72/79.1	3.72/68.5	1.28/20.4
		/29.5				

#### ii. Résumé du second article

# Title: Structural analysis of an unusual bioactive *N*-acylated lipooligosaccharide LOS-IV in *Mycobacterium marinum*.

Titre: Etude structurale du lipooligosaccharide IV (LOS-IV) de *Mycobacterium marinum*, un glycolipide constitué d'un monosaccharide *N*-acylé qui confère des propriétés immunomodulatrices.

Auteurs : Yoann Rombouts, Elisabeth Elass, Christophe Biot, Emmanuel Maes, Bernadette Coddeville, Adeline Burguière, Caroline Tokarski, Eric Buisine, Xavier Trivelli, Laurent Kremer et Yann Guérardel.

Résumé : Après avoir analysé en détail la structure des LOS-I à -III, nous devions caractériser le monosaccharide terminal spécifique au LOS-IV. L'utilisation complémentaire de la modélisation moléculaire et de méthodes d'analyses physicochimiques incluant la RMN et la spectrométrie de masse a permis d'élucider la structure unique de ce monosaccharide *N*-acylé. En particulier, nos études ont caractérisé deux diastéréoisomères du monosaccharide majeur naturellement présent dans le LOS-IV. Les souches de *M. marinum* déficientes dans la synthèse du LOS-IV étant moins pathogènes *in vitro* et *in vivo*, le monosaccharide terminal était suspecté de conférer des aptitudes originales au pathogène. Nous avons en effet démontré que le monosaccharide terminal conférait au LOS IV d'importantes propriétés immunomodulatrices qui participent à l'activation des macrophages et à la formation des granulomes.



Published on Web 10/21/2010

## Structural Analysis of an Unusual Bioactive *N*-Acylated Lipo-Oligosaccharide LOS-IV in *Mycobacterium marinum*

Yoann Rombouts,<sup>†,‡</sup> Elisabeth Elass,<sup>†,‡</sup> Christophe Biot,<sup>†,‡</sup> Emmanuel Maes,<sup>†,‡</sup> Bernadette Coddeville,<sup>†,‡</sup> Adeline Burguière,<sup>§</sup> Caroline Tokarski,<sup>⊥</sup> Eric Buisine,<sup>#</sup> Xavier Trivelli,<sup>†,‡</sup> Laurent Kremer,<sup>§,II</sup> and Yann Guérardel<sup>\*,†,‡</sup>

Université de Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France, CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France, Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier II et I, CNRS UMR 5235, case 107, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France, INSERM, DIMNP, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France, Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique (MSAP), USR CNRS 3290, IFR 147, Université de Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, Bâtiment C7, Avenue Mendeleïev - B.P. 90108, 59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received July 1, 2010; E-mail: yann.guerardel@univ-lille1.fr

**Abstract:** Although lipo-oligosaccharides (LOSs) are recognized as major parietal components in many mycobacterial species, their involvement in the host–pathogen interactions have been scarcely documented. In particular, the biological implications arising from the high degree of structural species-specificity of these glycolipids remain largely unknown. Growing recognition of the *Mycobacterium marinum–Danio rerio* as a specific host–pathogen model devoted to the study of the physiopathology of mycobacterial infections prompted us to elucidate the structure-to-function relationships of the elusive end-product, LOS-IV, of the LOS biosynthetic pathway in *M. marinum*. Combination of physicochemical and molecular modeling methods established that LOS-IV resulted from the differential transfer on the caryophyllose-containing LOS-III of a family of very unusual *N*-acylated monosaccharides, naturally present as different diastereoisomers. In agreement with the partial loss of pathogenecity previously reported in a LOS-IV-deficient *M. marinum* mutant, we demonstrated that this terminal monosaccharide conferred to LOS-IV important biological functions, including macrophage activating properties.

#### Introduction

Nontuberculous mycobacteria, including *Mycobacterium marinum*, are responsible for opportunistic infections primarily in immune-deficient patients such as AIDS patients.<sup>1</sup> The incapacity to eradicate these diseases can, at least partly, be attributed to the presence of the specific and unusual mycobacterial cell envelope known to play an important role in the pathogenesis of mycobacterial infections and to confer resistance to many antibiotics and bactericidal treatments.<sup>2,3</sup> The mycobacterial cell wall "core" structure consists of long-chain mycolic acids attached to the arabinogalactan/peptidoglycan backbone.<sup>4,5</sup> This mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan structure serves as an anchor for numerous free lipids/glycolipids that are ubiquitous

- <sup>II</sup> CNRS, UMR 5235, Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques.
- <sup>1</sup> Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique.
   <sup>#</sup> Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille.
- (1) Adle-Biassette, H.; Huerre, M.; Breton, G.; Ruimy, R.; Carbonnelle,
- A.; Trophilme, D.; Yacoub, M.; Regnier, B.; Yeni, P.; Vilde, J. L.; Henin, D. Am. Pathol. 2003, 23, 216–35.
- (2) Jarlier, V.; Nikaido, H. J. Bacteriol. 1990, 172, 1418-23.
- (3) Daffe, M.; Draper, P. Adv. Microbiol. Physiol. 1998, 39, 131-203.

10.1021/ja105807s © 2010 American Chemical Society

or species-specific,<sup>6</sup> which are important in directing host– pathogen interactions and contributing to modulation of the host immune system.<sup>7</sup> The latter include phthiocerol dimycocerosates,<sup>8</sup> phenolic glycolipids (PGL),<sup>8</sup> phosphatidylinositol mannosides,<sup>3</sup> glycopeptidolipids,<sup>9,10</sup> and trehalose-containing glycolipids such as trehalose dimycolate,<sup>11</sup> sulfolipids,<sup>12,13</sup> multiacylated trehalose,<sup>14</sup> and lipo-oligosaccharides (LOSs).<sup>15</sup>

LOSs are cell surface glycolipids described in at least 10 mycobacterial species including *Mycobacterium kansasii*, the strain Canetti of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium marinum*.<sup>16–18</sup> Although LOSs are commonly described as highly antigenic glycoconjugates exposed to the cell surface, very little is known with respect to their general functions during the mycobacterial infection.<sup>17,19</sup> All LOSs contain an  $\alpha$ , $\alpha'$ -

- (4) Kremer, L., Baulard, A. R., Besra, G. S. Genetics of mycolic acid biosynthesis. In *Molecular Genetics of Mycobacteria*; Hatfull, G. F., Jacobs, W. R., Jr., Eds.; ASM Press: Washington DC, 2000; pp 173– 190
- (5) Bhowruth, V.; Alderwick, L. J.; Brown, A. K.; Bhatt, A.; Besra, G. S. Biochem. Soc. Trans. 2008, 36, 555–65.
- (6) Brennan, P. J.; Nikaido, H. Annu. Rev. Biochem. 1995, 64, 29-63.
- (7) Karakousis, P. C.; Bishai, W. R.; Dorman, S. E. Cell. Microbiol. 2004, 6, 105–16.
- (8) Minnikin, D. E.; Kremer, L.; Dover, L. G.; Besra, G. S. Chem. Biol. 2002, 9, 545–53.
- (9) Chatterjee, D.; Khoo, K. H. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 2018–42.
- (10) Schorey, J. S.; Sweet, L. Glycobiology 2008, 18, 832-41.

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup> Université de Lille 1.

<sup>&</sup>lt;sup>+</sup> CNRS, UMR 8576.

<sup>&</sup>lt;sup>§</sup> Université de Montpellier II et I.



**Figure 1.** Structure of LOSs from *M. marinum.* (a) All LOS are constituted by a polyacylated  $\beta$ Glcp-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ Glcp-1 $\rightarrow$ 4- $\alpha$ Glcp-1 $\rightarrow$ 1- $\alpha$ Glcp core differentially substituted by 3-O-Me-Rha and Car derivative residues. R1 stands for 2,4-dimethyl-branched fatty acid chains and R2 for either -H or -OH groups. LOS-III is substituted by a so far undescribed substituent on its nonreducing terminal Car residue, as indicated by the arrow. Full structure of each molecule is described in Table S1 of the Supporting Information. (b) Novel family of *N*-acetylated dideoxy-galactoses substituting LOS-III, which structures are described in the present report. R3 stands for either -H or -OCH<sub>3</sub> and R4 for either -H or -COOH.

trehalose moiety that is substituted by different species-specific glycan sequences. In M. marinum, four major lipooligosaccharides, named LOS-I to LOS-IV (Figure 1 and Table S1 of the Supporting Information), have been previously identified.<sup>20</sup> A fifth molecule, LOS-II\*, has been subsequently described as a biosynthetic intermediate between LOS-I and LOS-II.<sup>21</sup> Fine structural determination of their oligosaccharide structures not only allowed to confirm the common core sequence of these molecules but also to unravel two rare monosaccharides belonging to the caryophyllose (Car) family in LOS-II, LOS-III, and LOS-IV (Table S1 of the Supporting Information).<sup>18</sup> However, the exact nature of the unusual nonreducing terminal monosaccharide that typifies the LOS-IV end-product remained uncharacterized. Although this compound was tentatively identified as N-acylated  $\alpha$ -amino-hexopyranose, the fine structure of its substituent group remained elusive.<sup>18</sup>

In our previous work, we have demonstrated that one particular *M. marinum* isolate, named Mma7, produced an

- (11) Hunter, R. L.; Olsen, M. R.; Jagannath, C.; Actor, J. K. Ann. Clin. Lab. Sci. 2006, 36, 371–86.
- (12) Mougous, J. D.; Petzold, C. J.; Senaratne, R. H.; Lee, D. H.; Akey, D. L.; Lin, F. L.; Munchel, S. E.; Pratt, M. R.; Riley, L. W.; Leary, J. A.; Berger, J. M.; Bertozzi, C. R. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 721–9.
- (13) Kumar, P.; Schelle, M. W.; Jain, M.; Lin, F. L.; Petzold, C. J.; Leavell, M. D.; Leary, J. A.; Cox, J. S.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 11221–6.

altered LOS profile.<sup>18</sup> Mma7 failed to produce the more polar LOS-IV but instead accumulated large amounts of the LOS-III precursor. Local genomic comparison of the LOS biosynthetic cluster indicated the presence of a highly disorganized region in Mma7 compared to the standard M strain that are likely to be responsible for the defect LOS-IV production in Mma7. In particular, a deletion of the 5'-end of the *losA* gene was identified. Earlier studies emphasized the role of LosA in the synthesis of LOS-IV, since inactivation of LosA was associated with impairment of LOS-IV production and the concomitant

- (14) Hatzios, S. K.; Schelle, M. W.; Holsclaw, C. M.; Behrens, C. R.; Botyanszki, Z.; Lin, F. L.; Carlson, B. L.; Kumar, P.; Leary, J. A.; Bertozzi, C. R. J. Biol. Chem. 2009, 284, 12745–51.
- (15) McNeil, M.; Chatterjee, D.; Hunter, S. W.; Brennan, P. J. Methods Enzymol. 1989, 179, 215–42.
- (16) Hunter, S. W.; Murphy, R. C.; Clay, K.; Goren, M. B.; Brennan, P. J. J. Biol. Chem. 1983, 258, 10481–7.
- (17) Daffe, M.; McNeil, M.; Brennan, P. J. Biochemistry 1991, 30, 378-88.
- (18) Rombouts, Y.; Burguiere, A.; Maes, E.; Coddeville, B.; Elass, E.; Guerardel, Y.; Kremer, L. J. Biol. Chem. 2009, 284, 20975–88.
- (19) Ortalo-Magne, A.; Lemassu, A.; Laneelle, M. A.; Bardou, F.; Silve, G.; Gounon, P.; Marchal, G.; Daffe, M. J. Bacteriol. **1996**, *178*, 456– 61.
- (20) Burguiere, A.; Hitchen, P. G.; Dover, L. G.; Kremer, L.; Ridell, M.; Alexander, D. C.; Liu, J.; Morris, H. R.; Minnikin, D. E.; Dell, A.; Besra, G. S. J. Biol. Chem. 2005, 280, 42124–33.
- (21) Ren, H.; Dover, L. G.; Islam, S. T.; Alexander, D. C.; Chen, J. M.; Besra, G. S.; Liu, J. Mol. Microbiol. 2007, 63, 1345–59.

accumulation of the biosynthetic precursor LOS-III.<sup>20</sup> Interestingly, a M. marinum losA deficient mutant strain was also found to be less efficient to enter macrophages in vitro.<sup>22</sup> Despite the fact that the losA product was attributed to the glycosyltransferase responsible for the transfer of terminal monosaccharide on LOS-III, complementation of Mma7 with a functional losA failed to restore LOS-IV production.<sup>18</sup> Therefore, to apprehend to which extent LOS-IV participates in the pathogenesis of M. marinum and to delineate LOS-IV structure-function relationship activities, it appeared crucial to establish the fine structure of the yet uncharacterized LOS-IV molecule. From a functional point of view, purified LOSs from M. marinum were found to inhibit the release of TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated macrophages.<sup>18</sup> This unexpected finding suggested that LOSs may represent key effectors capable to interfere with the host immune proinflammatory response, which is central to the physiopathological events that culminate with granuloma formation.<sup>23</sup> However, this process is not only mediated by proinflammatory cytokines secretion but relies also on macrophage cell surface antigen expression. In this context, both the intercellular adhesion molecule-1 antigen (ICAM-1) and the marker of activation CD40 have been reported to promote cell-cell or cell-matrix interactions and T-cell recruitment/activation into granuloma.24-32

As a first step toward the elucidation of the biological functions of LOSs in mycobacterial pathogenicity, not only in M. marinum but also in other LOS-producing mycobacterial species such as the Canetti strain, we have undertaken a thorough structural description of LOS-IV from M. marinum. Thanks to the combination of a vast panel of methods including mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, and molecular modeling, we clearly established that LOS-IV was capped by a family of very unusual N-acylated 4-amino-galactopyranose residues. These residues were found to bear three different N-acyl groups, collectively called "Z" that generate a structural microheterogeneity of LOS-IV (Figure 1, Table S1 of the Supporting Information). We then investigated the role of LOSs in the inflammatory response, by assessing the effect of LOS-IV on the induction of the macrophage cell surface markers and cytokine secretion.

#### **Materials and Methods**

*M. marinum* Strains and Growth Culture Conditions. *M. marinum* strain M, used in this study, was first isolated from a

- (22) Alexander, D. C.; Jones, J. R.; Tan, T.; Chen, J. M.; Liu, J. J. Biol. Chem. 2004, 279, 18824–33.
- (23) Clay, H.; Volkman, H. E.; Ramakrishnan, L. *Immunity* **2008**, *29*, 283–94.
- (24) Ma, J.; Chen, T.; Mandelin, J.; Ceponis, A.; Miller, N. E.; Hukkanen, M.; Ma, G. F.; Konttinen, Y. T. Cell. Mol. Life Sci. 2003, 60, 2334– 46.
- (25) Lukacs, N. W.; Chensue, S. W.; Strieter, R. M.; Warmington, K.; Kunkel, S. L. J. Immunol. 1994, 152, 5883–9.
- (26) Lebedeva, T.; Dustin, M. L.; Sykulev, Y. Curr. Opin. Immunol. 2005, 17, 251–8.
- (27) Lopez Ramirez, G. M.; Rom, W. N.; Ciotoli, C.; Talbot, A.; Martiniuk, F.; Cronstein, B.; Reibman, J. Infect. Immun. 1994, 62, 2515–20.
- (28) DesJardin, L. E.; Kaufman, T. M.; Potts, B.; Kutzbach, B.; Yi, H.; Schlesinger, L. S. *Microbiology* **2002**, *148*, 3161–71.
- (29) Lazarevic, V.; Myers, A. J.; Scanga, C. A.; Flynn, J. L. Immunity 2003, 19, 823–35.
- (30) Ordway, D.; Henao-Tamayo, M.; Orme, I. M.; Gonzalez-Juarrero, M. J. Immunol. 2005, 175, 3873–81.
- (31) Ordway, D.; Harton, M.; Henao-Tamayo, M.; Montoya, R.; Orme, I. M.; Gonzalez-Juarrero, M. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 4931–9.
- (32) Hogan, L. H.; Markofski, W.; Bock, A.; Barger, B.; Morrissey, J. D.; Sandor, M. Infect. Immun. 2001, 69, 2596–603.

human patient as described previously.<sup>33</sup> Bacteria were grown at 30 °C on plates containing Middlebrook 7H10 supplemented with oleic acid/albumin/dextrose/catalase enrichment or in Sauton's broth medium.

Purification of Neutral and Acidic LOS-IV. Extraction and purification of LOSs were performed as previously described.<sup>18</sup> Briefly, extracted polar lipids were dissolved in chloroform/ methanol (2:1, v/v) and applied on a DEAE cellulose column for purification. LOS-I to LOS-III and neutral LOS-IV were eluted by chloroform/methanol (2:1, v/v) from the DEAE column. Acidic LOS-IV was eluted from DEAE by 40-60 mM ammonium acetate in chloroform/methanol (2:1, v/v). Presence of LOS in the eluted fractions was monitored by 1D-HP thin layer chromatography (TLC) on a silica gel 60 glass back TLC plate ( $20 \times 20$  cm; Merck) run in chloroform/acetic acid/methanol/water (40:25:3:6, v/v/v/v). LOSs were visualized by spraying the plates with orcinol/sulphuric acid reagent followed by heating. The neutral and acidic LOS-IV were further purified into individual species by preparative TLC on HPTLC plates of silica Gel 60 (Merck) using chloroform/acetic acid/methanol/water (40:25:3:6, v/v/v/v) as the running solvent. The glycolipids and lipids were revealed by iodine vapors. Following detection, plates were dried overnight, and the corresponding glycolipid were scraped from the plates. Glycolipids were extracted from the silica gel using chloroform/methanol (2:1, v/v) and purified on Sep-pack C18 cartridge (Waters, Milford, CT, USA).

**Chemical Procedures.** Glycolipids were de-*O*-acylated in chloroform/methanol (2:1, v/v) and 0.1 mM NaOH at 37 °C for 2 h. The reagents were evaporated, and the resulting oligosaccharides dissolved in water were purified on a carbograph column (Alltech carbograph SPE column). Oligosaccharides were de-*N*-acylated in 4 M KOH at 100 °C for 16 h, followed by neutralization with HCl. De-*N*-acylated oligosaccharides were further purified on a carbograph column. Carboxylic acid groups of oligosaccharides were converted into methyl esters by incubation in dry dimethyl-sulfoxide (100  $\mu$ L) and iodomethane (100  $\mu$ L) for 2 h at room temperature. After lyophylization, compounds were dissolved in water and purified on a carbograph column.

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) Analysis. The molecular masses of oligosaccharides were measured by MALDI-TOF on a Voyager DE STR reflectron mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA), equipped with a 337 nm UV laser. Samples were prepared by mixing directly on the target 1  $\mu$ L of water diluted oligosaccharide solution and 1  $\mu$ L of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in methanol-water).

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FTICR-MS) Analysis. The sample fractions were diluted with water/methanol (v/v), acidified with 0.1% formic acid to obtain 500 fmol/ $\mu$ L final concentrations. The samples were analyzed with an Apex Qe 9.4 T fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The FT-ICR mass spectrometer is equipped with a nanoelectrospray source. Detection was carried out in positive mode. A potential of 1.1 kV was applied on the needle (PicoTip Emitter, New Objective, Woburn, MA, USA). The detection parameters were as follows: broadband detection, 512 K acquisition size, start mass at m/z 500. Ions were accumulated in the storage hexapole during 1 s and in the second hexapole during 0.01 s. Spectra were calibrated using external calibration based on prior analysis of Angiotensin I (sequence DRVYIHPFHL,  $MH^+ = 648.846$  amu) via DataAnalysis software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

**Purification of the Terminal Monosaccharide of Acidic OS-IV.** Oligosaccharides were hydrolyzed in 4 M trifluoroacetic acid solution at 100 °C for 4 h. Prior to purification, trifluoroacetic acid was removed by successive coevaporation with methanol under nitrogen flow. Then, the terminal monosaccharide of acidic OS-IV was purified by high performance liquid chromatography (HPLC)

<sup>(33)</sup> Stinear, T. P.; et al. Genome Res. 2008, 18, 729-41.

on a AMINEX ion exclusion HPX-87H column (7.8  $\times$  300 mm, BIO-RAD, Richmond, VA, USA) using H<sub>2</sub>O with a flow rate of 1 mL/min. Monosaccharide was detected by UV spectroscopy at 206 nm.

NMR Analysis. NMR experiments have been performed at 300 K on Bruker Avance 400, Avance 600, AvanceII 800, and AvanceIII 900 spectrometers equipped with a 5 mm broad-band inverse probe, a 5 mm triple resonance cryoprobe, a 3 mm broadband inverse probe, and a 5 mm triple-resonance cryoprobe, respectively. Prior to NMR spectroscopic analyses into deuterium oxide, mono- and oligosaccharides were repeatedly exchanged in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99.97% <sup>2</sup>H, Euriso-top, Saint-Aubin, France) with intermediate freeze-drying and finally dissolved in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O and transferred in standard or Shigemi (Allison Park, USA) tubes. Samples used in light water contained 10% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Chemical shifts (ppm) were calibrated taking methyl group from internal acetone at  $\delta^{1}$ H 2.225 and  $\delta^{13}$ C 31.55. Nitrogen-15 was referenced indirectly as described by Wishart et al.<sup>34</sup> All experiments were recorded without sample spinning. The COSY, ROESY, NOESY, 13C-HSQC, 13C-HMBC, <sup>15</sup>N-HSQC, and <sup>15</sup>N-HMBC experiments were performed using the Bruker standard sequences.

**Molecular Modeling.** Model structures suitable for computational studies of the aglycon and the first sugar were considered to mimic the enantiomers (2*S*, 3*S*, 4*R*) and (2*R*, 3*S*, 4*R*) of the major aglycon molecule Zc. The conformational space for Zc (2*S*, 3*S*, 4*R*) and Zc (2*R*, 3*S*, 4*R*) was systematically explored using the HF/ 3-21 g(d) ab initio method as implemented in Gaussian03.<sup>35</sup> The effect of water was evaluated using the integral equation formalism (polarizable continuum) model (IEF-PCM).<sup>36</sup> Finally, geometry optimizations were then performed using density functional theory (DFT) at the B3LYP level<sup>37</sup> with the 6-31 g(d) basis set.

Cell Culture and Flow Cytometry Analysis. Human promonocytic leukemia THP-1 cells (ECACC no. 88081201) were differentiated into macrophages in the presence of 50 nM 1,25dihydroxy-vitamin D3 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 72 h. To investigate the effect of LOSs on ICAM-1 expression, differentiated THP-1 cells were seeded at a density of  $3.5 \times 10^5$  cells/ well, in RPMI 1640 supplemented with 2% FCS and L-glutamine, together with the glycolipids. Purified LOSs (LOS-I, LOS-II, and LOS-IV) were resuspended in ethanol, coated on plates and dried at 37 °C, as previously described.<sup>18</sup> Control wells were layered with solvent without glycolipids. The LOS-IV oligosaccharidic moiety (OS-IV) and LPS from Salmonella typhimurium (Alexis Corporation), used as positive control were dissolved in apyrogen water and sonicated prior to addition to the cells. Eventual endotoxin contamination of LOS samples was evaluated with the Limulus amoebocyte lysate assay kit (QCL1000; BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). After 20 h of incubation, expression on THP-1 cells of human ICAM-1 (CD54) and CD40 was analyzed by flow cytometry. Briefly, 250 000 cells were incubated 20 min at 4 °C with 20  $\mu$ g/mL human IgG (Sigma), washed three times, and incubated for 40 min with 10 µL of PE-conjugated anti-ICAM-1 (CD54) or FITC-conjugated anti-CD40 mouse monoclonal IgG<sub>1k</sub> antibodies (BD Biosciences) in PBS containing 0.04% NaN<sub>3</sub> and 0.05% BSA. Both PE- and FITC-conjugated mouse isotype control IgG (BD Biosciences) were used as negative controls. Cells were washed and analyzed using a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer and gated for forward- and side-angle light scatters. Approximately 8 000 particles of the gated population were analyzed. The fluorescence channels were set on a logarithmic scale, and the mean fluorescence intensity was determined.

#### Results

Structural Analyses. Identification of Two LOS-IV Isoforms. *M. marinum* possesses four major LOS subtypes (LOS-I to -IV) that can be distinguished in one-dimensional thin-layer chromatography (TLC).<sup>18</sup> During the purification process, LOS-IV was purified from the other LOS subtypes by anion-exchange chromatography. Indeed, whereas LOS-I to -III were rapidly eluted from the DEAE-cellulose column in the equilibrating solvent, LOS-IV was retained on the column and eluted in the presence of ammonium acetate. Surprisingly, TLC analysis revealed that, in addition to LOS-I, LOS-II, and LOS-III, the nonretained fractions contained an additional unidentified glycolipid exhibiting a chromatographic behavior similar to LOS-IV (Figure S1 of the Supporting Information). This glycolipid was originally assigned to as LOS-IV, presuming that LOS-IV was incompletely retained by anion-exchange chromatography. However, successive recycling of this product on DEAE gel chromatography demonstrated that it had no affinity for anionexchange gel chromatography, thus suggesting that this compound differed from the LOS-IV retained on the DEAE column. Both fractions, referred to as neutral LOS-IV and acidic LOS-IV, were further purified by preparative HPTLC and studied separately in their intact (LOS) and deacylated forms generated by alkaline hydrolysis (OS). Relative quantification of both fractions established that acidic LOS-IV represented about 95%of total LOS-IV. Then, the fine structures of these compounds were solved by a combination of mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR), and molecular modeling. As described below, our structural analysis led to the identification of three different glycolipids structurally related to LOS-IV: neutral LOS-IV consisting of LOS-IVa and LOS-IVb and acidic LOS-IV consisting of a single molecule, LOS-IVc. Although proven to be different, LOS-IVa and LOS-IVb could not be individually separated and therefore were further studied as a mixture.

Comparison of Oligosaccharide Sequences. First, major structural features of neutral and acidic OSs were compared. In a previous study, we established the nature of the monosaccharides and linkage patterns of the oligosaccharide core common to all LOSs from M. marinum.<sup>18</sup> Two dimensional <sup>1</sup>H/ <sup>1</sup>H-TOCSY and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HSQC spectra permitted to identify both <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spin systems of all glycosyl residues. The homonuclear vicinal coupling constant  $({}^{3}J_{H-H})$  observed by COSY experiments established the configuration of the monosaccharides. Finally, the heteronuclear scalar coupling correlation  $({}^{3}J_{H-C})$  observed in the  ${}^{1}H/{}^{13}C$ -HMBC spectrum established the glycosidic sequence of all LOSs. In particular, the neutral OS-IV glycosidic sequence was identified as a  $\alpha$ -4-amino-4,6dideoxy-Galp-(1 $\rightarrow$ c)- $\alpha$ -Car-(1 $\rightarrow$ c)- $\alpha$ -Car-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3-O-Me-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Glcp- $(1 \rightarrow 1)$ - $\alpha$ -Glcp (Table S2 of the Supporting Information). Comparison of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR parameters of neutral and acidic OS-IV showed that they exhibited very similar chemical shifts values and spin systems, which established that both fractions contained identical oligosaccharidic cores, characterized by the presence of nine monosaccharides (Table S3 of the Supporting Information). Furthermore, distinctive chemical shifts of IX-H4/C4 at  $\delta$  4.38/55.6 and 4.40/55.6 for neutral LOS-IV and  $\delta$  4.28/56.3 for acidic LOS-IV demonstrated that aminodideoxy-Gal residues (IX) were further substituted in their C-4

<sup>(34)</sup> Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E.; Markley, J. L.; Sykes, B. D. J. Biomol. NMR 1995, 6, 135–40.

<sup>(35)</sup> Frisch, M. J.; et al. GAUSSIAN 03, Revision A; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2003.

<sup>(36)</sup> Cammi, R.; Mennucci, B.; Tomasi, J. J. Phys. Chem. A 2000, 104, 5631–5637.

<sup>(37)</sup> Becke, A. D. Phys. Rev. A 1988, 38, 3098-3100.



*Figure 2.* Mass spectrometry analysis of neutral and acidic OS-IV. Left panel: NanoESI-Qh-FT-ICR analysis of (a) neutral and (b) acidic OS-IV generated by *O*-deacylation of LOS-IV fractions. The doubly charged ions  $[M + 2Na]^{2+}$  at  $m_{exp} = 945.364$  ( $m_{th} = 945.366$ ,  $\Delta m = 2,11$  ppm) and  $m_{exp} = 930.361$  ( $m_{th} = 930.359$ ,  $\Delta m = 2,15$  ppm) established that neutral OS-IV had  $C_{74}O_{50}H_{128}N_2$  and  $C_{73}O_{49}H_{126}N_2$  compositions. The doubly charged ion at  $m_{exp} = 967.359$  ( $m_{th} = 967.361$ ,  $\Delta m = 2,06$  ppm) demonstrated that neutral OS-IV had  $C_{75}O_{52}H_{128}N_2$  composition. Right panel, MALDI-MS analysis of  $[M + Na]^+$  adducts of (c) neutral OS-IV and (d) acidic OS-IV showing in the inset, carboxymethylated acidic OS-IV (m/z 1925.9).

positions via an amide bond by yet unidentified *N*-acyl groups (Z). Considering that both LOS-IV fractions exhibited different chromatographic behaviors on an anion-exchange column, we postulated that neutral OS-IV differed from acidic OS-IV solely by the nature of their respective *N*-acyl substituents Z.

The exact atomic compositions of the two OS-IV fractions were then established by high resolution mass spectrometry using a nanoelectrospray-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (nanoESI-FTICR MS). NanoESI-Qh-FT-ICR MS analysis of the neutral OS-IV fraction generated two doubly charged signals at m/z 945.364  $[M + 2Na]^{2+}$  and m/z 930.359 [M + 2Na]<sup>2+</sup> (Figure 2a), thus supporting the existence of two different compounds OS-IVa and OS-IVb with calculated exact compositions of C74O50H128N2 and C<sub>73</sub>O<sub>49</sub>H<sub>126</sub>N<sub>2</sub>, respectively. Consistently, MALDI-MS analysis of the same preparation generated two distinct signals at m/z $1867.7 [M + Na]^+$  and  $1837.7 [M + Na]^+$ , confirming the presence of two distinct molecules (Figure 2c). The fact that a single oligosaccharide core (C66O46H116N1) was observed by NMR in the neutral OS-IV fraction strongly suggested that OS-IVa and OS-IVb only differed in their respective N-acyl substituents Za and Zb. On this basis, the compositions of the Za and Zb were established as  $C_8O_4H_{12}N_1$  and  $C_7O_3H_{10}N_1$ , respectively. In comparison, nanoESI-Qh-FT-ICR MS analysis of acidic OS-IV showed a single doubly charged signal at m/z967.359  $[M + 2Na]^{2+}$ , which permitted to establish OS-IVc molecular composition as C75O52H128N2 (Figure 2b). Based on the known core structure, the molecular composition of Zc was calculated as C<sub>9</sub>O<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>1</sub>. Surprisingly, MALDI-MS analysis of native acidic OS-IV generated an additional  $[M + Na]^+$  signal at m/z 1867.5 suggesting a molecular mass of 1844 that differed by 44 amu from the intact molecule observed as a  $[M + Na]^+$ adduct at m/z 1911.1 (Figure 2d). This apparent loss of 44 amu was tentatively attributed to a partial decarboxylation of the N-acyl group Zc upon laser desorption. Stabilization of the carboxyl group of Zc by methyl esterification prior to MALDI-MS analysis allowed to generate a single  $[M + Na]^+$  signal at m/z 1925.9, consistent with the presence of a -COOH group on the native molecule (Figure 2d).

Altogether, comparison of both neutral and acidic LOS-IV fractions conclusively revealed the presence of three structurally related molecules sharing identical oligosaccharidic sequences but substituted in the C4 position at the terminal nonreducing amino-dideoxy-Gal residue (IX) by three distinct *N*-acylated groups Za, Zb, and Zc. Retrospectively, the presence of two different substituents Za and Zb in neutral LOS-IV fraction is in agreement with the observation on NMR spectra of a slight heterogeneity of IX H2/C2 and H4/C4 NMR parameters (Table S2 of the Supporting Information). This prompted us to (i) inquire about the structure of neutral LOS-IV Za and Zb and (ii) establish the structure of the more complex Zc substituent characterizing acidic LOS-IV.

NMR Identification of the N-Acyl Groups Za and Zb. Structure of Za and Zb were established by NMR from the neutral OS-IV fraction. Their respective NMR signals were easily distinguished from each other owing to their different quantities, Za accounting for about 80% of total molecules. Based on <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSOC (Figure 3) and HMBC (Figure S2 of the Supporting Information) NMR experiments, Za atoms were assigned to the following:  $-CH_3$  ( $\delta$  1.42/21.6), N-CH<sub>3</sub> ( $\delta$  2.79/ 30.0), O-CH<sub>3</sub> (\$\delta\$ 3.61/60.8), CH-N (\$\delta\$ 4.14/72.4), CH-O (\$\delta\$ 4.30/84.7), C=O ( $\delta$  173.8) and C-OH ( $\delta$  77.7). The sequence assignment -CH(OCH<sub>3</sub>)-C(CH<sub>3</sub>)(OH)-CHR-N(CH3)-COwas deduced from the numerous heteronuclear multiple bond correlations  $({}^{x}J_{H-C})$  observed on the HMBC spectrum, as depicted on Figure S2 of the Supporting Information. In particular, the observation of  ${}^{3}J_{H-C}$  correlations between N-CH<sub>3</sub> ( $\delta$  2.79) and C=O ( $\delta$  173.8)/CH-R ( $\delta$  72.4) clearly established the sequence CH-N(CH<sub>3</sub>)-CO. Then,  ${}^{3}J_{H-C}$  correlation between CH(OCH<sub>3</sub>) ( $\delta$  4.30) and C=O ( $\delta$  173.8) demonstrated that Za exhibits a cyclic structure. Accordingly, on the COSY spectrum, the total absence of  ${}^{3}J_{H-H}$  correlation originating from  $CH_3$  ( $\delta$  1.42) confirmed that this group is carried by the oxygenated quaternary carbon (C-OH) at 77.7 ppm. Finally,



*Figure 3.*  ${}^{1}H^{-13}C$  HSQC NMR analysis of neutral OS-IV fraction. Details of the anomer and bulk regions (left panel) and the methyl and methylene resonances containing regions (right panel) of the  ${}^{1}H^{-13}C$  HSQC NMR spectrum of the neutral OS-IV. I to IX correspond to the nine monosaccharides of the neutral OS-IV. The two aglycon groups substituting the monosaccharide IX are named Za and Zb.  ${}^{1}H$  and  ${}^{13}C$  chemical shift values are indicated in Table S2 of the Supporting Information.

based on this sequence, the linkage position of the N-acyl group on Za was assigned to the remaining cycle carbon CH–N at  $\delta$ 72.4. It was however not possible to unambiguously observe on the HMBC spectrum a clear correlation between IX-H4 and the remaining C=O group associated to the N-acyl group linking Za to the  $\alpha$ -4-amino-4,6-dideoxy-Galp residue although this correlation could be observed in the major compound derived from the acidic LOS-IV fraction. Surprisingly, the only correlation observed on the COSY experiment is a rare  ${}^{5}J_{H-H}$  long distance correlation between the protons of N-CH<sub>3</sub> and the proton of CH(OMe). The veracity of such unusually long distance correlation was however confirmed by performing the NMR analysis of a product comparable to Za, the N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) (Figure S3 of the Supporting Information). Altogether, NMR and MS analyses permitted the identification of the N-acyl substituent Za as a 3-hydroxy-4-methoxy-1,3dimethyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (also named N-methyl-3-hydroxy-3-methyl-4-methoxy-5-oxoproline). Consequently, a  $\alpha$ -4-(2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine)-4,6-dideoxy-galactopyranose sequence could be inferred as the terminal monosaccharide of OS-IVa.

The relative configurations of the asymmetric carbons from *N*-methyl-3-hydroxy-3-methyl-4-methoxy-5-oxoproline Za were established by the observation of the nuclear Overhauser effect (NOE) on the <sup>1</sup>H<sup>-1</sup>H NOESY NMR spectrum. On this basis, the three asymmetric carbons labeled 2\*, 3\*, and 4\* could be assigned as (2*S*, 3*S*, 4*R*) (Figure 4a). Starting from 2\*, the small NOE connectivities from protons H-2 and H-6 of the  $\alpha$ -4-amino-4,6-dideoxy-galactopyranose residue to the protons CH<sub>3</sub>–N and CH–O groups of Za, respectively, supported the conformation (2*S*). Then, observation of an intense NOE correlation between CH<sub>3</sub> ( $\delta$  1.42) and CH–N ( $\delta$  4.14) indicated that the carbon 3\* had also a (*S*) configuration. Finally, correlation between –CH<sub>3</sub> and O–CH<sub>3</sub> ( $\delta$  3.61) established that 4\* has a (*R*) configuration. Lack of NOE correlation between CH–N and CH–O also strongly supported the (4*R*) configuration. Altogether, NMR data

established that 3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyr-rolidine-2-carboxylic is in the (2S, 3S, 4R) configuration (Figure 4a).

In addition to signals assigned to Za, a set of minor signals associated to another N-acylated substituent Zb was observed on <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (Figure 3) and HMBC (Figure S2 of the Supporting Information) NMR spectra. According to their <sup>1</sup>H/  $^{13}$ C chemical shifts, these signals were assigned to  $-CH_3$  ( $\delta$ 1.54/28.4), N-CH<sub>3</sub> ( $\delta$  2.79/29.9), -CH<sub>2</sub>- ( $\delta$  2.71, 2.50/45.4) CH-N group ( $\delta$  4.23/74.8), C=O ( $\delta$  177.3) and an hydroxylated quaternary carbon ( $\delta$  73.1). Similarly to Za, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC-NMR correlations established that Zb was a 3-hydroxy-1,3dimethyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid (also named N-methyl-3-hydroxy-3-methyl-5-oxoproline), only differing to Za by the absence of a  $O-CH_3$  group. Then, intense <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H NOE correlations between -CH3 and CH-N, established that Zb exhibited either (R, R) or (S, S) configurations (NOE) (Figure 4b). However, lack of obvious NOE contacts between the Zb and 4,6-dideoxy galactopyranose, as observed for Za, prevented to unambigously distinguish the two configurations. Altogether, NMR experiments allowed the establishment of the nature of the terminal monosaccharide of the minor OS-IVb as an  $\alpha$ -4-(2-carbamoyl-3-hydroxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine)-4,6dideoxy-galactopyranose (Figure 4b).

**NMR Identification of the** *N***-Acyl Group Zc.** Mass spectrometry analysis of acidic OS-IV fraction established the presence of a single Zc (C<sub>9</sub>O<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>1</sub>) substituting the 4,6-dideoxygalactopyranose residue. However, subsequent NMR analyses demonstrated that this compound occurred as two distinct diastereoisomers (2*S*, 3*S*, 4*R*) and (2*R*, 3*S*, 4*R*) that exhibited slightly different <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts (Table S3 of the Supporting Information). As for Za and Zb, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (Figure S4 of the Supporting Information) and HMBC (Figure S5 of the Supporting Information) experiments permitted the identification of CH<sub>3</sub> ( $\delta$  1.32/19.6 and 1.63/23.5), N-CH<sub>3</sub> ( $\delta$ 2.80/31.0 and 2.81/31.0), O-CH<sub>3</sub> ( $\delta$  3.60/61.1 and 3.65/61.9), CH-O ( $\delta$  4.20/85.3 and 3.96/84.2), two C=O ( $\delta$  170.3-175.4



*Figure 4.* Structures and conformations of aglycon structure Za and Zb or Zc substituting the terminal 4-amino-4,6-dideoxyGal*p* residue of neutral or acidic LOS-IV, respectively. (a) (2*S*, 3*S*, 4*R*)  $\alpha$ -4-(2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine)-4,6-dideoxy-Gal*p*, (b)  $\alpha$ -4-(2-carbamoyl-3-hydroxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine)-4,6-dideoxy-Gal*p*, (c)  $\alpha$ -4-((2*S*, 3*S*, 4*R*) 2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine)-2-carboxylic acid)-4,6-dideoxy-Gal*p*, and (d)  $\alpha$ -4-((2*R*, 3*S*, 4*R*) 2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)-4,6-dideoxy-Gal*p*. Configurations of asymmetric carbons of aglycon groups were deduced from nuclear Overhauser effect (full arrow) NMR experiments.

and 170.6–176.4), as well as two distinct quaternary carbons ( $\delta$  80.5–81.9 and 77.3–83.4). In agreement with the atomic composition of Zc, an additional –COOH group was identified in both diastereoisomers at 173.2 and 172.3 ppm, from the <sup>13</sup>C NMR spectrum (Figure S6 of the Supporting Information). Finally, NMR analysis of OS-IV in H<sub>2</sub>O permitted the identification of protons of two CO–NH groups at 10.23 and 10.27 ppm in agreement with the presence of two diastereoisomers substituting the terminal monosaccharide (Table S3 of the Supporting Information). The surprisingly strong upfield resonance of these protons compared to a typical CO–NH group was tentatively attributed to the strong effect of the neighboring the –COOH group.

As for Za and Zb, multiple  ${}^{x}J_{H-C}$  observed on the HMBC spectrum (Figure S5 of the Supporting Information) permitted the unambiguous establishment of the structure of Zc as a cyclic compound -CH(OCH<sub>3</sub>)-C(CH<sub>3</sub>)(OH)-C-N(CH<sub>3</sub>)-CO- presenting an overall identical sequence as Za. However, Zc differed from Za by the replacement of the -CH-N- group by a quaternary carbon further substituted by the additional carboxyl group, as demonstrated by the large downfield chemical shift of this carbon from  $\delta$  72.4 to  $\delta$  81.9 and 83.4 in both diastereoisomers. Failure to observe any  ${}^{x}J_{H-C}$  correlations in the HMBC experiment due to absence of neighboring protons strongly supported the proposed location of the carboxyl group. Finally, the  ${}^{3}J_{H-C}$  correlation from the H4 of the  $\alpha$ -4-amino-4,6-dideoxy-Galp to carbonyl groups at 170.3 ppm unambiguously demonstrated that -NH-CO was linking IX-C4 to the quaternary carbon C-N of Zc. Thus, these experiments firmly established the structure of Zc as 3-hydroxy-4-methoxy-1,3dimethyl-5-oxopyrrolidine-2,2-dicarboxylic acid. The nature of Zc and its linkage to LOS-IV were also confirmed by studying the structures of intact isolated *N*-acylated  $\alpha$ -4-amino-4,6dideoxy-Gal*p* and de-*N*-acylated acidic OS-IV moiety (Figure S7 and S8 of the Supporting Information).

Analysis of intraresidual NOE correlations on the ROESY spectrum permitted the identification of two diastereoisomers of Zc, (2S, 3S, 4R) and (2R, 3S, 4R), easily distinguished owing to different signal integrations (70% for the former and 30% for the last). NOE correlation between -CH<sub>3</sub> and O-CH<sub>3</sub> demonstrated that carbons 3 and 4 were always in opposite configurations, as established for Za. However, the extra-residual NOE connectivities from IX-H2 to N-CH3 and from IX-H6 to CH-OCH<sub>3</sub> established that the major form of Zc exhibited a (2S, 3S, 4R) configuration (Figure 4c). This was further confirmed by NOE correlations from CO-NH ( $\delta$  10.23) to  $-OH (\delta 6.70)$  and to N $-CH_3 (\delta 2.80)$ . The minor form of Zc was characterized by a very different pattern of extra-residual correlations including strong NOE correlations from Zc-CH<sub>3</sub> to CO-NH and IX-H6 that permitted to characterize its configuration as (2R, 3S, 4R) (Figure 4d).

Taken collectively, these results indicate that the terminal monosaccharide of acidic OS-IV consisted of a mixture of two diastereoisomers  $\alpha$ -4-((2*S*, 3*S*, 4*R*) 2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)-4,6-dideoxy-galactopyranose and  $\alpha$ -4-((2*R*, 3*S*, 4*R*) 2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)-4,6-dideoxy-galactopyranose.

Molecular Modeling of *N*-Acylated Dideoxy-Galactose. Based on the deduced configuration of individual carbons of Zc, we have modeled the spatial conformation of the very unusual terminal  $\alpha$ -4-(2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-



*Figure 5.* Spatial conformations of the two diastereoisomers of  $\alpha$ -4-(2-carbamoyl-3-hydroxy-4-methoxy-1,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)-4,6-dideoxy-Gal*p* from major acidic LOS-IV. Lowest B3LYP/6-31 g(d) IEF-PCM energy conformations of (a) (2*S*, 3*S*, 4*R*) and (b) (2*R*, 3*S*, 4*R*) diastereoisomers. Atoms are colored green (carbon), white (hydrogen), red (oxygen), and blue (nitrogen).

5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)-4,6-dideoxy-galactopyranose residue of LOS-IV. This allowed us to compare the electronic and geometrical details of the two Zc (2*S*, 3*S*, 4*R*) and (2*R*, 3*S*, 4*R*) diastereoisomers substituted monosaccharides (Figure 5). Under the investigated experimental conditions (pH = 6.51), compound Zc is mainly protonated, so only the carboxylic form was considered in the calculations. Proposed structural models are in agreement with the experimental data based on the NOE connectivity patterns, thus allowing direct structure comparisons by spectroscopic method and threedimensional reconstruction. These results indicated that compound (2*S*, 3*S*, 4*R*) Zc can thus adopt a folded conformation whereas compound (2*R*, 3*S*, 4*R*) Zc can adopt an extended conformation (Figure S9 of the Supporting Information).

Induction of Macrophage Cell Surface Antigens. Previous studies have reported that microbial infection modulates the macrophage cell activation process by interfering with the expression of cell surface antigens.<sup>7,24</sup> In the case of mycobacterial infections, cell surface antigens such as the adhesion molecule ICAM-1 and the CD40 activation marker are necessary for granuloma formation and bacterial containment burden.<sup>29,32,38–40</sup> The ability of purified LOSs to trigger the expression of these molecules in human differentiated THP-1 macrophages was therefore investigated. To this aim, LOS-I, LOS-II, and LOS-IV were used to evaluate the influence of the terminal  $\alpha$ -3-O-Met-Rha,  $\alpha$ -Car, and *N*-acylated  $\alpha$ -4-amino-4,6-dideoxy-Gal*p* residues on the activity of the intact and de-*O*-acylated glycolipids.

Flow cytometry analysis using either anti-ICAM-1 or anti-CD40 antibodies revealed that these cell surface antigens were expressed at low levels on the surface of unstimulated THP-1 cells (Figure 6). In contrast, LOS-IV, along with LPS, a known ICAM-1 stimulator, strongly induced ICAM-1 expression after 20 h incubation (Figure 6a). Considering the high prevalence of acidic LOS-IV in the mycobacteria cell wall compared to neutral LOS-IV (20 times more), only acidic LOS-IV was used as stimulating factors. Similarly, stimulation of the cells with acidic LOS-IV also caused CD40 expression (Figure 6b). Interestingly, in contrast to LOS-IV, LOS-I and LOS-II failed to induce ICAM-1 or CD40 significant expression on the macrophage cell surface. Because these glycolipids only differ from LOS-IV molecules by the nonreducing terminus of their glycan moieties, the loss of activity of LOS-I and LOS-II can be associated with the absence of the unusual terminal nonreducing monosaccharide. In order to define the relative contribution of the lipidic or carbohydrate domains of LOS-IV in the cell surface antigen-inducing activity, the ability of LOS-IV devoid of fatty acids to modulate ICAM-1 and CD40 expression was assessed. As shown in Figure 6c and d, the oligosaccharide moiety of LOS-IV alone failed to stimulate ICAM-1 and CD40 expressions. Together, these results support the view that both the lipidic aglycone anchor and the specific carbohydrate domains of LOS-IV are necessary to trigger ICAM-1 and CD-40 inductions.

#### Discussion

The mycobacterial cell envelope contains a vast array of glycolipids characterized by an extraordinary species-specific structural diversity. The structure of individual glycolipids varies from one species to the other in terms of sequence, monosaccharide composition, and/or acylation status. In particular, the structures of many complex and rare, sometimes unique, monosaccharides found in mycobacterial glycolipids have been

<sup>(38)</sup> Johnson, C. M.; Cooper, A. M.; Frank, A. A.; Orme, I. M. Infect. Immun. 1998, 66, 1666–70.

<sup>(39)</sup> Sullivan, L.; Sano, S.; Pirmez, C.; Salgame, P.; Mueller, C.; Hofman, F.; Uyemura, K.; Rea, T. H.; Bloom, B. R.; Modlin, R. L. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 4154–60.

<sup>(40)</sup> Okamoto Yoshida, Y.; Umemura, M.; Yahagi, A.; O'Brien, R. L.; Ikuta, K.; Kishihara, K.; Hara, H.; Nakae, S.; Iwakura, Y.; Matsuzaki, G. J. Immunol. 2010, 184, 4414–22.



*Figure 6.* Modulation of cell surface antigen expression on macrophages by LOSs and oligosaccharide generated from Los-IV. Differentiated THP-1 cells were incubated with  $20 \ \mu g/mL$  of various LOSs (LOS-I, LOS-IV),  $50 \ ng/mL$  of LPS (a, b) or  $20 \ \mu g/mL$  of oligosaccharide generated from deacylated LOS-IV (c, d). After 20 h incubation, analysis of ICAM-1 (CD54) and CD40 expression on unstimulated (medium) and activated cells was performed by flow cytometry, using PE-conjugated anti-CD54 or FITC-conjugated anti-CD40, respectively. Cells were exposed also with irrelevant antibodies (PE- or FITC-conjugated mouse isotype controls). Results are shown as linear-log scale fluorescence histograms. The mean fluorescence intensity is shown in parentheses. The data are representative of three independent experiments.

determined, for instance, polymethylated and acetylated monosaccharides in *M. kansasii* phenolic glycolipids,<sup>41,42</sup> branched monosaccharides in M. gastri<sup>43</sup> and M. marinum LOSs,<sup>18</sup> as well as *N*-acylated monosaccharides in *M. kansasii* LOSs<sup>44</sup> and *M. intracellulare* glycopeptidolipids.<sup>45,46</sup> Although cell wall associated glycolipids exhibit immunomodulatory properties and participate in the pathogenic processes by manipulating host-pathogen interactions,<sup>3,7</sup> only little information is available regarding the biological functions of individual molecules and the relevance of their structural diversity. Herein, we have isolated and characterized three members of a new family of dicyclic N-acylated monosaccharides. They all share a 4,6dideoxy-Galp substituted by a 3-hydroxy-3-methylated-pyrrolidone cycle. Although absolute configuration of this monosaccharide was not definitively established by total synthesis, it was tentatively assigned as D-configuration based on comparison with other bacterial strains and biosynthetic data. Indeed, every 4-acetamido-4,6-dideoxy-Galp residue so far observed in bacterial polysaccharides were shown to exhibit a D-configuration,

irrespective of the bacterial species they originate from.<sup>47–49</sup> Exhaustive analysis of the nucleotide sugar pathways involved in the biosynthesis of enterobacterial common antigens (ECA) further confirmed that dTDP-4-acetamido-4,6-dideoxy-D-Galp originated from dTDP-D-Glc through a dTDP-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose.<sup>50</sup> A similar pathway seems to be conserved in *M. marinum* (Figure 7).

Although dicyclic N-acylated monosaccharides isolated from LOSs share a common structural core, they differ by the substitutions of their respective cycle by either methoxy and/or carboxy groups. This heterogeneity generated two neutral and one acidic glycolipids referred to as LOS-IVa, LOS-IVb, and LOS-IVc, respectively. The complete form of LOS-IVc substituted by both carboxy and methoxy groups, presumably corresponding to the end-product of the LOS biosynthetic pathway, represents around 95% of the total LOS-IV content. Interestingly, the molecular constraints that originate from the additional pyrrolidone cycle stabilized the glycolipids into distinct conformations, providing an unique opportunity to establish spatial conformations of natural carbohydrate structures in solution both by analysis the NOE connectivity pattern and by modeling their minimum energy conformers. This demonstrated that, whereas the (2S, 3S, 4R) diastereoisomer presented a folded structure with the two cycles facing each others, the

<sup>(41)</sup> Gilleron, M.; Venisse, A.; Riviere, M.; Servin, P.; Puzo, G. Eur. J. Biochem. **1990**, 193, 449–57.

<sup>(42)</sup> Watanabe, M.; Aoyagi, Y.; Ohta, A.; Minnikin, D. E. Eur. J. Biochem. 1997, 248, 93–8.

<sup>(43)</sup> Gilleron, M.; Vercauteren, J.; Puzo, G. Biochemistry 1994, 33, 1930-7.

<sup>(44)</sup> Hunter, S. W.; Fujiwara, T.; Murphy, R. C.; Brennan, P. J. J. Biol. Chem. 1984, 259, 9729–34.

<sup>(45)</sup> Fujiwara, N.; Nakata, N.; Maeda, S.; Naka, T.; Doe, M.; Yano, I.; Kobayashi, K. J. Bacteriol. 2007, 189, 1099–108.

<sup>(46)</sup> Fujiwara, N.; Nakata, N.; Naka, T.; Yano, I.; Doe, M.; Chatterjee, D.; McNeil, M.; Brennan, P. J.; Kobayashi, K.; Makino, M.; Matsumoto, S.; Ogura, H.; Maeda, S. J. Bacteriol. 2008, 190, 3613– 21.

<sup>(47)</sup> Lugowski, C.; Kulakowska, M.; Romanowska, E. Infect. Immun. 1983, 42, 1086–91.

<sup>(48)</sup> Vinogradov, E. V.; Knirel, Y. A.; Thomas-Oates, J. E.; Shashkov, A. S.; L'Vov V, L. Carbohydr. Res. 1994, 258, 223–32.

<sup>(49)</sup> Kilcoyne, M.; Shashkov, A. S.; Perepelov, A. V.; Nazarenko, E. L.; Gorshkova, R. P.; Ivanova, E. P.; Widmalm, G.; Savage, A. V. *Carbohydr. Res.* 2005, 340, 1557–61.

<sup>(50)</sup> Samuel, G.; Reeves, P. Carbohydr. Res. 2003, 338, 2503-19.



Figure 7. Proposed partial biosynthetic pathway of the N-acylated 4-amino-4,6-dideoxy-Galp identified in LOS-IV of M. marinum.

(2R, 3S, 4R) diastereoisomer exhibits an extended shape. The almost orthogonal positioning of the pyrrolidone cycle compared with the hexopyranoside cycle observed in last isomer is greatly stabilized by the COO-H···OH-C3' H bond between the two cycles.

Importantly, structural delineation of LOSs offers the possibility to assign potential biological functions to various enzymes encoded within the LOS biosynthetic gene cluster. Several genes involved in the LOS-II biosynthesis pathway have been previously described.<sup>21</sup> In particular, MMAR\_2309 was found to encode a UDP-glucose dehydrogenase (UdgL) involved in the first step of D-xylose synthesis, while at least three other genes (MMAR\_2310, MMAR\_2311, and MMAR\_2312), cotranscribed with MMAR\_2309, were proposed to be involved in the last step of D-xylose synthesis and transfer to LOS-I. Transposon insertion within MMAR\_2332 gene resulted in the accumulation of LOS-II\*, a LOS-II biosynthetic precursor possessing the  $\beta$ -xylose but lacking the terminal caryophyllose residue capping LOS-II.<sup>21</sup> Moreover, although a gene coding for a potential glycosyltransferase implicated in the transfer of the LOS-IV terminal monosaccharide was identified as LosA (MMAR\_ 2313),<sup>20</sup> lack of structural information prevented further identification of biosynthetic genes. Despite the fact that the proposed first steps of biosynthesis of 4-amino-4,6-dideoxy-galactose residue are likely to be similar to those of the rhamnose biosynthetic pathway, requiring an  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate thimidylyltransferase and a dTDP-D-Glc 4,6-dehydratase to catalyze the formation of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc (Figure 7),  $^{51,52}$  no genes encoding these enzymes were found within the LOS biosynthetic gene cluster. However, both an  $\alpha$ -D-Glc-1-phosphate thimidylyltransferase and a dTDP-D-Glu-4,6-dehydratase have previously been identified in mycobacteria, as RmlA and RmlB participating in the biogenesis of the dissacharide linker unit that connects together arabinogalactan and peptidoglycan.<sup>53</sup> It is therefore tempting to speculate that *rmlA*  and *rmlB* may also participate to the early steps of 4,6-dideoxy-Gal synthesis. In the next step, dTDP-4-keto-6-deoxy-D-Glc is converted into dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-Gal by a TDP-4-oxo-6-deoxy-D-Glc transaminase enzyme,<sup>54</sup> an enzyme predicted to be encoded by *MMAR\_2320* present in the LOS cluster. This is supported by the high degree of conservation between MMAR\_2320 and the TDP-4-oxo-6-deoxy-D-Glc transaminase WecE from *Escherichia coli* (Table S4 of the Supporting Information).<sup>54</sup>

With respect to the biosynthesis/transfer of the aglycone moiety, we identified a putative acyltransferase encoded by MMAR\_2321 that is probably cotranscribed with MMAR\_2320. Thus, MMAR\_2321 may represent a potent candidate for the transfer of the pyrrolidone cycle onto the dideoxy-sugar through an amide bond. Such an acyl-transferase involved into the transfer of N-acylated aglycon moiety of glycopeptidolipids have been previously identified in M. avium/M. intracellulare, although no significant homology was found with MMAR\_2321.45,46 BLAST analysis revealed that MMAR\_2321 shares 44% identity with a putative transferase (GenBank: GU576498.1) from the O-antigen biosynthesis gene cluster of Vibrio cholerae O:5, that catalyzes the transfer of a pyrrolidone derivative onto the polysaccharide moiety of LPS.<sup>55</sup> This cross-species conservation strongly suggests that this N-acyltransferases family shows a high degree of specificity for pyroglutamate substituents. Overall, based on the studies conducted by McNeil and collaborators,<sup>56,57</sup> we propose that the early biosynthesis steps of LOS-IV terminal N-acylated monosaccharide are common to those of rhamnose biosynthesis in mycobacteria whereas the specific enzymes required for its full synthesis are coded by the genes contained within the LOS gene cluster (Figure 7).

A 4-amino-4,6-dideoxy-Gal substituted by a yet undescribed *N*-acylated group was previously also observed in terminal

- (56) Ma, Y.; Mills, J. A.; Belisle, J. T.; Vissa, V.; Howell, M.; Bowlin, K.; Scherman, M. S.; McNeil, M. *Microbiology* **1997**, *143*, 937–45.
- (57) Stern, R. J.; Lee, T. Y.; Lee, T. J.; Yan, W.; Scherman, M. S.; Vissa, V. D.; Kim, S. K.; Wanner, B. L.; McNeil, M. R. *Microbiology* **1999**, *145*, 663–71.

<sup>(51)</sup> Trefzer, A.; Salas, J. A.; Bechthold, A. Nat. Prod. Rep. 1999, 16, 283–99.

<sup>(52)</sup> Erbel, P. J.; Barr, K.; Gao, N.; Gerwig, G. J.; Rick, P. D.; Gardner, K. H. J. Bacteriol. 2003, 185, 1995–2004.

<sup>(53)</sup> Li, W.; Xin, Y.; McNeil, M. R.; Ma, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 342, 170–8.

<sup>(54)</sup> Hwang, B. Y.; Lee, H. J.; Yang, Y. H.; Joo, H. S.; Kim, B. G. Chem. Biol. 2004, 11, 915–25.

<sup>(55)</sup> Hermansson, K.; Jansson, P. E.; Holme, T.; Gustavsson, B. *Carbohydr. Res.* **1993**, *248*, 199–211.

position of LOS-II from the strain Canetti of M. tuberculosis.<sup>17</sup> Interestingly, the unknown aglycon structure of N-acylated 4-amino-4,6-dideoxy-Gal terminal monosaccharide of LOS-II from the Canetti strain possesses the same mass as Za from neutral LOS-IV of *M. marinum*,<sup>17</sup> suggesting the presence of a similar/conserved structure in this species. Previously, the gene Rv1500 of M. tuberculosis H37Rv (conserved in the Canetti strain) was identified as an homologue of MMAR\_2313/LosA (Table S4 of the Supporting Information).<sup>20</sup> BLAST analysis also revealed that the putative MMAR\_2321/acyltransferase displayed 90% of identity with the Rv1505c-encoded protein of M. tuberculosis H37Rv, also found in the Canetti strain. In contrast, although MMAR\_2320/aminotransferase appears fully conserved in the Canetti genome, its orthologue in M. tuberculosis H37Rv is separated in two genes (Rv1503c and Rv1504c) by a stop codon. Whether this interruption leads to unproductive enzymes unable to synthesize LOS-IV remains however to be addressed. Altogether, structural and genomic data suggest that the aglycone group terminally substituting the LOS-II from the Canetti strain is also a pyroglutamate derivative, as identified in M. marinum.

In our previous study, we demonstrated that LOSs purified from *M. marinum* not only failed to induce significant TNF- $\alpha$ secretion in human macrophage-like differentiated THP-1 cells but also inhibited its secretion.<sup>18</sup> The molecular mechanisms by which LOS-IV exerts this inhibitory effect are not clearly understood. Since it is well documented that IL-10 negatively regulates TNF- $\alpha$  synthesis, we investigated the production of IL-10 in LOS-IV stimulated THP-1 cells. However, no IL-10 secretion was detected in response to LOS-IV (data not shown). Recent studies demonstrated that lack or inhibition of TNF- $\alpha$ production during mycobacterial infection lead to accelerated intracellular bacterial growth and dissemination through increasing formation of granulomas.<sup>23,58</sup> In this context, LOSs, along with other glycolipids such as PGL that are known to inhibit TNF- $\alpha$  secretion, may play an important role in granulomas formation and bacterial dissemination.<sup>59–61</sup> Expression of cell surface antigens on activated monocytes/macrophages and dendritic cells represents also a critical step in the immune system activation process and in the control of tuberculosis dissemination. Indeed, through cell-cell and cell-matrix interactions, cell surface markers mediate both the recruitment of cells during granuloma formation and the presentation of antigens to the T-cell receptor.<sup>24,26</sup> Previous studies have reported that whole M. tuberculosis cells as well as purified mycobacterial antigens increased the expression of both the adhesion molecules ICAM-1 and the activation marker CD40 in primary macrophages or THP-1 cell line.<sup>27,28,62-65</sup> Not only ICAM-1 and CD40 are expressed in macrophages and dendritic

- (58) Lin, P. L.; Myers, A.; Smith, L.; Bigbee, C.; Bigbee, M.; Fuhrman, C.; Grieser, H.; Chiosea, I.; Voitenek, N. N.; Capuano, S. V.; Klein, E.; Flynn, J. L. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 340–50.
- (59) Reed, M. B.; Domenech, P.; Manca, C.; Su, H.; Barczak, A. K.; Kreiswirth, B. N.; Kaplan, G.; Barry, C. E., III *Nature* **2004**, *431*, 84-7.
- (60) Okamoto, Y.; Fujita, Y.; Naka, T.; Hirai, M.; Tomiyasu, I.; Yano, I. Microb. Pathog. 2006, 40, 245-53.
- (61) Lee, K. S.; Dubey, V. S.; Kolattukudy, P. E.; Song, C. H.; Shin, A. R.; Jung, S. B.; Yang, C. S.; Kim, S. Y.; Jo, E. K.; Park, J. K.; Kim, H. J. FEMS Microbiol. Lett. 2007, 267, 121-8.
- (62) Ghosh, S.; Saxena, R. K. *Exp. Mol. Med.* 2004, *36*, 387–95.
  (63) Giacomini, E.; Iona, E.; Ferroni, L.; Miettinen, M.; Fattorini, L.; Orefici, G.; Julkunen, I.; Coccia, E. M. J. Immunol. 2001, 166, 7033-
- (64) Xu, Y.; Liu, W.; Shen, H.; Yan, J.; Yang, E.; Wang, H. Microbes Infect. 2010, 12, 683-689.

cells within lung granuloma of mice infected by M. tuberculosis or *M. bovis* BCG, <sup>30,31,40,66,67</sup> but expression of both markers are also required for the formation of mature granulomas and control of the bacterial burden.<sup>29,32,38-40</sup>

The present work indicates that LOS-IV, but none of other LOSs tested, induced expression of both ICAM-1 and CD40 on the surface of THP-1 macrophages. In line with this result, we have also observed that only LOS-IV stimulates IL-8 secretion from THP-1 cells (data not shown), a chemokine that plays a central role in leukocyte recruitment during granuloma formation. These differential responses between the LOS subtypes are very likely to result from structural variations in their glycan moiety. In particular, presence of the terminal *N*-acylated dideoxygalactose, that is unique to LOS-IV, appears essential to the inducing activity of the LOS family whereas the substitution by a Car derivative does not confer modulating activity. Moreover, the fact that deacylation of LOS-IV completely abrogated the cell surface antigen-inducing activity clearly indicated that the sole oligosaccharidic sequence was not sufficient to trigger the biological response of LOS-IV as both the specific oligosaccharidic core and the lipid anchor are required. This is reminiscent with other studies demonstrating that the fatty acid chains of the mannosyl-phosphatidyl inositol anchor of lipomannan and lipoarabinomannan are required for ligation to either CD14 or LPS binding protein.<sup>68</sup> These results are also consistent with the fact that the immunomodulatory functions of mycobacterial glycolipids/lipoglycans required the integrity of their acyl chains to mediate the formation of micelles and facilitate the multivalency/presentation to their ligands.<sup>69</sup> Therefore, by analogy with other glycolipids, we propose that biological activity of LOS-IV is dependent on its specific carbohydrate domain whereas its lipid moiety plays a crucial role for an efficient presentation to cellular receptors.

Macrophages isolated from ICAM-1-knockout mice exhibit decreased phagocytic activity, indicating an additional role of this molecule in phagocytosis.<sup>70</sup> Therefore, the enhanced regulation of ICAM-1 may impact the early phases of mycobacterial infection. In this context, it is noteworthy that M. marinum LOS-IV mutant carrying a transposon in losA was less efficient in entering/invading macrophages relative to the parental strain,<sup>22</sup> although it cannot be inferred whether this defect was directly linked to an altered phagocytic activity due to down-regulation of ICAM-1 expression or whether LOS-IV acts directly a ligand to a yet unidentified macrophage receptor that facilitates invasion.

In conclusion, this work represents a pioneering study devoted to the immunomodulatory role of M. marinum LOSs, so far the less studied mycobacterial glycolipids from biosynthetic and functional points of view. Further studies are now required to investigate whether this family of glycolipids, especially LOS-IV, plays a role in the physiopathological features such as granuloma formation during the course of infection. The

- (65) Scandurra, G. M.; Williams, R. B.; Triccas, J. A.; Pinto, R.; Gicquel, B.; Slobedman, B.; Cunningham, A.; Britton, W. J. Microbes Infect. 2007. 9. 87-95.
- (66) Gonzalez-Juarrero, M.; Orme, I. M. Infect. Immun. 2001, 69, 1127-33.
- (67) Mogga, S. J.; Mustafa, T.; Sviland, L.; Nilsen, R. Scand. J. Immunol. 2003, 58, 327-34.
- Elass, E.; Coddeville, B.; Guerardel, Y.; Kremer, L.; Maes, E.; (68) Mazurier, J.; Legrand, D. FEBS Lett. 2007, 581, 1383-90.
- (69) Sidobre, S.; Puzo, G.; Riviere, M. Biochem. J. 2002, 365, 89-97.
- (70) Paine, R., III; Morris, S. B.; Jin, H.; Baleeiro, C. E.; Wilcoxen, S. E. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2002, 283, L180-7.

expected results may be of high biological significance to understand the pathogenesis of other LOS-producing mycobacterial species, such as the Canetti strain, a smooth variant of *M. tuberculosis*.

Acknowledgment. This study was funded by a grant from the french National Research Agency (ANR-05-MIIM-025) to Y.G. and L.K. and a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur to Y.R. The 800 and 900 MHz spectrometers were funded by Région Nord-Pas de Calais, European Union (FEDER), Ministère Français de la Recherche, Université Lille1-Sciences et Technologies, and CNRS. The 600 MHz facility used in this study was funded by the European Union, Région Nord-Pas de Calais, CNRS, and Institut Pasteur de Lille. Financial support from the

TGE RMN THC Fr3050 for conducting the research on the 800 and 900 MHz spectrometers is gratefully acknowledged. The 400 MHz facility was funded by the Centre Commun de Mesure RMN.

**Supporting Information Available:** Figure S1, purification and TLC analysis of polar glycolipids; Figures S2–S8, supporting structural data; Table S1, summary of known LOSs sequences; Tables S2 and S3, NMR parameters of neutral and acidic OS-IV; Table S4, ORF and predicted proteins of *M. marinum* LOS cluster; and complete refs 33 and 35. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

JA105807S

## Structural analysis of an unusual bioactive *N*acylated lipooligosaccharide LOS-IV in *Mycobacterium marinum*

Yoann Rombouts, Elisabeth Elass, Christophe Biot, Emmanuel Maes, Bernadette Coddeville, Adeline Burguière, Caroline Tokarski, Eric Buisine, Xavier Trivelli, Laurent Kremer and Yann Guérardel

## **Supporting information**

- Pages S2-S11: Figures S1 to S8
- Pages S12-S15: Tables S1 to S4
- Pages S16: References
- Pages S17:Complete references 33 and 35

#### **Supporting figures**

Figure S1. Separation of polar *M. marinum* glycolipid fractions and TLC analysis. The total polar glycolipid fraction was first extracted and its major components were tentatively identified based on their chromatographic mobilities on 2D-HPTLC (a). Of particular interest, LOS-I, -II and -IV appear as major components among polar glycolipids, whereas LOS-III is expressed in low quantity compared to other LOSs. Then it was fractionated according to the charge of their individual components on DEAE ion-exchange column. The neutral fraction was eluted by chloroform/methanol (2:1, v/v whereas the acidic fraction was eluted by 40-60 mM of ammonium acetate in chloroform/methanol (2:1, v/v). Eluting solvents were collected as 2 mL fractions out of which 10 µL aliquots were run on glass-backed silica thin layer chromatography plates using chloroform/acetic acid/methanol/water (40:25:3:6, v/v/v/v) as running solvant. Carbohydrate containing molecules were then visualized by spraying the plates with orcinol/sulphuric acid reagent. In neutral glycolipid fraction (b), most polar glycolipids, including LOS-I, -II and -III, were rapidly eluted in tubes 2-6. However, a molecule present in low quantity was specifically retained on the column and eluted in tubes 12-15. Further analyses revealed that it contained the so called 'neutral LOS-IV' fraction, a mixture of two intermediate LOS-IV molecules differentially substituted by the aglycons Za and Zb. Then, the acidic glycolipid fraction (c) contained almost exclusively the 'acidic LOS-IV' that differed from the neutral LOS-IV by the nature of its terminal aglycon substituent Zc. Neutral and acidic LOS-IV fractions were then further purified by preparative HPTLC and reverse phase chromatography



Figure S2. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR analysis of neutral OS-IV fraction and deduced aglycon structures. (a) In the top panel, the region of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR spectrum between 40 and 90 ppm shows the correlations between most carbons and protons of the ring, whereas in the low panel the spectrum region of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR spectrum between 170 and 180 ppm specifically shows the correlations of ring protons with <u>C</u>=O group. (b) Za and Zc are easily distinguished by the network of <sup>2</sup>J<sub>H-C</sub> (dotted line arrow) and <sup>3</sup>J<sub>H-C</sub> (full arrow) correlations owing to the differential presence of the methoxy group in Za.



**Figure S3. NMR analysis of the** *N***-methyl-2-pyrrolidone (NMP). (a)** <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC and (b) <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY-90 NMR spectra of the NMP. The full arrow represents <sup>5</sup>J<sub>H-H</sub> correlation observed on COSY-90 experiment. From the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC spectrum, the <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C chemical shifts of the N-<u>CH<sub>3</sub></u> ( $\delta$  2.66/29.0), -<u>CH<sub>2</sub>-N ( $\delta$  3.32/49.8), -<u>CH<sub>2</sub>-CO ( $\delta$  2.23/30.5), and -<u>CH<sub>2</sub>-</u> ( $\delta$ 1.87/17.0) groups constituting the NMP were identified. On the COSY spectrum (b), a <sup>5</sup>J<sub>H-H</sub> correlation was then clearly observed between N-C<u>H<sub>3</sub></u> and the C<u>H<sub>2</sub>-CO</u> groups. However, no <sup>4</sup>J<sub>H-H</sub> long distance correlation was observed between protons of the N-C<u>H<sub>3</sub></u> and the C<u>H<sub>2</sub>-N</u> groups indicating the necessity of the tertiary amide group N-CO for the long distance correlation in COSY experiment.</u></u>



Figure S4. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR analysis of acidic OS-IV fraction. (a) Details of the anomer and bulk regions and (b) of the methyl and methylene resonances containing regions of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectrum of acidic OS-IV. Roman numbers (I to IX) correspond to the nine monosaccharides of neutral OS-IV. The two aglycon groups substituting the monosaccharide IX are named **Zc** for the diastereoisomer (*2S*, *3S*, *4R*) and **Zc\*** for the diastereoisomer (*2R*, *3S*, *4R*). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift values collected and identified are summarized in Supplementary Table 2.



Figure S5. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR analysis of acidic OS-IV fraction and deduced aglycon structure. (a) In the top panel, the region of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR spectrum between 60 and 90 ppm shows the correlations between most carbons and protons of the ring, whereas in the low panel the spectrum region of the <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR spectrum between 170 and 180 ppm specifically shows the correlations of ring protons with <u>C</u>=O group. (c) The <sup>2</sup>*J*<sub>H-C</sub> (dotted line arrow) and <sup>3</sup>*J*<sub>H-C</sub> (full arrow) correlations obtained by HMBC experiment permitted to identify a single aglycon structure **Zc**.


Figure S6. Expanded carbonyl area of the <sup>13</sup>C NMR experiment of acidic OS-IV. <sup>13</sup>C NMR experiment permitted to directly observe the supplementary -COOH group that is exclusively present in Zc aglycon moiety of acidic LOS-IV, and not on Za and Zb of neutral LOS-IV. This group could not be observed neither on <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSCQ, nor on <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR spectra because both substituted C2 and neighboring C3 are quaternary carbons. Two clear –COOH signals were observed and assigned to the two diastereoisomers of Zc contained in the acidic LOS-IV fraction. Differential configurations of C2 carbon exerted also a strong effect on the C=O groups of the ring and of the amide bond, resulting in the splitting of each signal in two. Differential integrations of each signal associated to the two distereosiomers permitted to assign each signal to either Zc or Zc\* corresponding to (*2S*, *3S*, *4R*) and (*2R*, *3S*, *4R*) diastereoisomers respectively.



Figure S7. Purification and structural analysis of the pruified terminal *N*-acylated monosaccharide of acidic LOS-IV. (a) After hydrolysis of the acidic OS-IV, the terminal *N*-acylated monosaccharide was purified by high performance liquid chromatography (HPLC) on an ion exclusion AMINEX® HPX-87H column. (b) MALDI-MS analysis of the *N*-acylated monosaccharide. The signal at m/z 437 [M+2Na-H]<sup>+</sup> indicated that the *N*-acylated monosaccharide possesses an acidic function identified as a carboxylic group. Difference of 44 uma between signals at m/z 415 [M+Na]<sup>+</sup> and m/z 371 [M+Na]<sup>+</sup> corresponds to the loss of carboxylic group during laser desorption. Signal with a star is characteristic of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix. (c) Details of the anomer, bulk, methyl and methylene resonances containing regions of the one dimensional <sup>1</sup>H and two dimensional <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectra of the *N*-acylated monosaccharide. Zc and Zc\* correspond to the (*2S*, *3S*, *4R*) and (*2R*, *3S*, *4R*) diastereoisomers of the aglycon structure. Differential integration of the anomer signals of monosaccharide on <sup>1</sup>H-NMR spectrum established that the dideoxy-Gal*p* residue was present in solution as a mixture of α- and β-anomers in a 20:80 ratio.



а

5.5 5.3 5.1 4.9 4.7 4.5 4.3 4.1 3.9 3.7 3.5 3.3 3.1 3.0 2.5 2.0 ppm

**Figure S8. Structural analysis of acidic OS-IV** *N***-deacylated. (a)** MALDI-MS analysis of *N*-deacylated OS-IV revealed a signal at m/z 1682 [M+Na]<sup>+</sup> indicating the loss of the aglycon structure **Zc. (b)** Details of the anomer, bulk, methyl and methylene resonances containing regions of the one dimensional <sup>1</sup>H and two dimensional <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectra of the *N*-deacylated OS-IV. Correlations corresponding to aglycon structure have completely disappeared and chemical shift of the H4 of the terminal monosaccharide (IX) indicated that this proton carries an amine group.

а



# Figure S9: Spatial conformations of the two diastereoisomers of α-4-(2-*carbamoyl*-3*hydroxy*-4-*methoxy*-1,3-*dimethyl*-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid)-4,6-*dideoxy*-Galp from major acidic LOS-IV.

(a) Spatial conformation of (2S, 3S, 4R) Zc

The global minimum energy conformer of this molecule showed the presence of the COO-H••••O=C-NH- hydrogen bond with a distance of 1.7 Å between the acidic hydrogen and the acceptor oxygen atom. The hydrogen atom of the amide group is equidistant from the endocyclic oxygen of the pyranose (with a distance of 2.5 Å) and the endocyclic nitrogen of the aglycon moiety (with a distance of 2.3 Å). Thus, the hydrogen atom of the amide group serves as a bifurcated donor to both N1 nitrogen and IX-O oxygen atoms (Figure 5a). The Z conformation of the amide linkage can be understood in terms of steric interactions due to the bulky sugar group. This preferential conformation allowed contacts between the H2' and the Zc-1-CH<sub>3</sub> (with a distance of 2.5 Å), the hydrogen atom of the amide group and the hydrogen at C6' position (with a distance of 2.6 Å), and finally with the C3-O-H of the aglycon moiety and the hydrogen at C6' position (with a distance of 2.8 Å).



### (b) Spatial conformation of (2R, 3S, 4R) Zc

The global minimum energy conformer of this molecule showed the presence of the COO-H•••OH-C3' hydrogen bond with a distance of 1.7 Å between the acidic hydrogen and the acceptor oxygen atom. The hydrogen atom of the amide group is equidistant from the endocyclic oxygen of the pyranose (with a distance of 2.7 Å) and the hydroxyl group of the aglycon moiety (with a distance of 2.3 Å). Here again, the hydrogen atom of the amide group serves as a bifurcated donor to both C3-Q-H and IX-Q oxygen atoms (Figure 5b). The amide linkage adopts also a Z conformation. Interestingly, contacts are established between the methyl group at C3 position of the aglycon moiety and the methyl group at C5' position of the pyranose with a distance of 2.5 Å. Thus, the hydrogen atom of the amide group is also in close contact with the methyl group at C3 position (with a distance of 2.7 Å) and the methyl group at C5' position (with a distance of 2.6 Å). Only small electronic ( $\Delta E$ ) and free ( $\Delta\Delta G$ ) energy differences (less than 1kcal/mol) were noticed between the two **Zc** (2*S*, 3*S*, 4*R*) and (2*R*, 3*S*, 4*R*) diastereoisomers substituted monosaccharides, suggesting thus similar stabilities.



# Supplementary tables

	Table S1: Summary	y of LOSs	oligosaccharide s	sequences from <i>M. marinum</i>
--	-------------------	-----------	-------------------	----------------------------------

	Oligosaccharides structures	Ref.
LOS-I	$\alpha$ -3-O-Me-Rhap-(1→3)-β-Glcp-(1→3)-β-Glcp-(1→4)-α-Glcp-(1↔1)-α-Glcp	1
LOS-II*	$\beta$ -Xylp-(1→4)-α-3-O-Me-Rhap-(1→3)- $\beta$ -Glcp-(1→3)- $\beta$ -Glcp-(1→4)-α-Glcp-(1→4)-α-Glcp-(1↔1)-α-Glcp	2
LOS-II	$\begin{array}{l} \alpha \text{-Carp-}(1 \rightarrow 4) - \beta \text{-Xylp-}(1 \rightarrow 4) - \alpha \text{-} 3 \text{-} O \text{-} Me \text{-} Rhap \text{-} (1 \rightarrow 3) - \beta \text{-} Glcp \text{-} (1 \rightarrow 3) - \beta \text{-} Glcp \text{-} (1 \rightarrow 4) - \alpha \text{-} 3 \text{-} O \text{-} Me \text{-} Rhap \text{-} (1 \rightarrow 3) - \beta \text{-} Glcp \text{-} (1 \rightarrow 3) - \beta \text{-} Glcp \text{-} (1 \rightarrow 4) - \alpha \text{-} Gl$	3
LOS-III	$\alpha$ -(3-OH)-Car <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ c)-α-(3-OH)-Car <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ 4)-β-Xyl <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ 4)-α-3-O-Me- Rha <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ 3)-β-Glc <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ 3)-β-Glc <i>p</i> -(1 $\rightarrow$ 4)-α-Glc <i>p</i> -(1 $\leftrightarrow$ 1)-α-Glc <i>p</i>	3
LOS-IV	<b>Z</b> - $\alpha$ -4 <i>N</i> -4,6-dieoxy-Galp-(1 $\rightarrow$ c)- $\alpha$ -(3-OH)-Carp-(1 $\rightarrow$ c)- $\alpha$ -(3-OH)-Carp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -3-O-Me-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glcp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -Glcp	3

**Table S2:** <sup>1</sup>**H and** <sup>13</sup>**C chemical shifts (in ppm) and coupling constant values (in Hz) of neutral OS-IV monosaccharides** (measured at 300 K in D<sub>2</sub>O using acetone as internal reference). Values in brackets are coupling constants; values in bold correspond to substituted carbons.

Sugar unit	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6,6'/C-	Others
						6	
(I) α-Glcp	5.18/ <b>94.4</b>	3.63/72.0	3.84/73.4	3.44/70.7	3.82/73.3	3.84, 3.75	
						/61.5	
(II) $\alpha$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 1	5.19/ <b>94.2</b>	3.69/71.8	3.94/71.9	3.70/ <b>79.6</b>	3.96/72.1	3.90, 3.86	
						/60.8	
(III) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 4	4.55/103.4	3.52/74.1	3.77/ <b>84.7</b>	3.51/69.0	3.52/76.6	3.92, 3.75	
						/61.6	
(IV) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 3	4.77/103.6	3.46/75.1	3.63/ <b>82.9</b>	3.48/69.0	3.48/76.9	3.92, 3.73	
						/61.6	
(V) 3-O- <i>Me</i> - $\alpha$ -Rhap 1 $\rightarrow$ 3	5.19/101.9	4.34/67.1	3.56/79.3	3.64/ <b>80.7</b>	4.13/69.0	1.33/17.7	(O-Me)
							3.40/56.9
<b>(VI)</b> β-Xyl <i>p</i> 1→4	4.52/104.6	3.31/74.5	3.60/75.0	3.69/ <b>74.9</b>	3.33, 4.10		
	(8.3)	(8.9)	(n.d.)	(11.5)	/63.6		
(VII) $\alpha$ -3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -	4.90/96.5	3.99/65.4	1.97, 1.78	/76.2	4.49/68.2	1.12/13.0	
(D-altro-1,3,4,5-			/30.7 (11)				
tetrahydroxyhexyl)-D-	H-a/C-a	H-b,b'/C-b	H-c/C-c	H-d/C-d	Н-е/С-е	H-f/C-f	
	3.98/69.7	1.95, 1.6	4.14/ <b>78.6</b>	3.68/79.0	3.73/68.3	1.27/20.4	
<i>xyto</i> -nexopyranose $1 \rightarrow 4$		/29.3					
(VIII) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -	4.93/101.5	3.96/66.1	1.99, 1.79	/76.4	4.33/68.2	1.13/13.2	
(D-altro-1.3.4.5-			/30.8 (11)				
tetrahydroxyhexyl) D	H-a/C-a	H-b,b'/C-b	H-c/C-c	H-d/C-d	Н-е/С-е	H-f/C-f	
	3.95/69.8	1.95, 1.61	4.12/ <b>79.2</b>	3.71/79.2	3.71/68.3	1.27/20.4	
<i>xylo</i> -hexopyranose $1 \rightarrow c$		/29.3					
<b>(IX)</b> α-4-amino-4,6-	5.06/102.7	3.71/69.9	4.11/69.2	4.38/55.7	4.33/66.3	1.18/16.7	(N <u>H</u> ) n.d*
dideoxy- $\beta$ -Gal $n \rightarrow c$		or		or			
and only p Sup 1 . C		3.73/69.9		4.40/55.6			
(Za) 3-hydroxy-4-	(N)	( <u>CH</u> -N)	( <u>C</u> -OH)	( <u>CH</u> -O)	( <u>C</u> =O)		(O- <u>CH<sub>3</sub></u> ) 3.61/60.8
methoxy-1,3-dimethyl-5-	n.d*	4.14/72.4	/77.7	4.30/84.7	/173.8		(N- <u>CH</u> <sub>3</sub> ) 2.79/30.0
oxopyrrolidine-2-							( <u>CH<sub>3</sub></u> ) 1.42/21.6
carboxylic acid							( <u>C</u> O-NH) n.d*
( <b>7</b> b) 2 budrovy 1 2	(N)	(CH-N)	(C-OH)	(CH <sub>2</sub> )	(C=0)		(N-CH <sub>2</sub> ) 2 79/29 9
(20) 5-iiyutoxy-1,5-	n.d*	4.23/74 8	/73 1	2.71. 2.50	<u></u> /177 3		(CH <sub>3</sub> ) 1.54/28 4
dimethyl-5-				/45.4			(CO-NH) n.d*
oxopyrrolidine-2-							
carboxylic acid							
* 1 ( 1 ( * 1							

\* n.d: not determined

Table S3: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts (in ppm) and coupling constant values (in Hz) of acidic OS-IV monosaccharides (measured at 300 K in D<sub>2</sub>O using acetone as internal reference). Values in brackets are coupling constants; values in bold correspond to substituted carbons.

Sugar unit	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-	Others
C	$({}^{3}J_{\text{H1-H2}})$	$({}^{3}J_{H2-H3})$	$({}^{3}J_{H3-H4})$	$({}^{3}J_{\rm H4-H5})$		6,6'/C-6	
(I) $\alpha$ -Glcp	5.18/ <b>94.6</b>	3.64/72.3	3.84/73.5	3.44/70.9	3.83/73.5	3.85, 3.75	
	(3.5)	(10.2)	(9.5)	(9.6)		/61.6	
(II) $\alpha$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 1	5.19/ <b>94.2</b>	3.69/71.9	3.96/72.1	3.70/ <b>79.8</b>	3.96/72.2	3.91, 3.87	
	(3.6)	(10.4)	(9.5)	(10)		/60.9	
(III) $\beta$ -Glcp 1 $\rightarrow$ 4	4.56/103.5	3.53/74.3	3.77/ <b>85.2</b>	3.53/69.2	3.53/76.8	3.93, 3.77	
	(7.7)	(~ 9)	(8.4)	(n.d.)		/61.7	
(IV) $\beta$ -Glcp $1 \rightarrow 3$	4.76/103.7	3.48/75.3	3.64/ <b>83.1</b>	3.49/69.2	3.49/77.0	3.93, 3.73	
	(7.4)	(~ 9)	(8)	(n.d.)		/61.7	
(V) 3-O- <i>Me</i> - $\alpha$ -Rhap 1 $\rightarrow$ 3	5.19/101.92	4.33/67.4	3.56/79.4	3.64/ <b>80.8</b>	4.14/69.2	1.34/17.9	(O-Me) 3.41/57.0
	(1.0)	(4.6)	(9.4)	(11)			
<b>(VI)</b> β-Xyl <i>p</i> 1→4	4.52/104.7	3.32/74.7	3.61/75.1	3.69/ <b>75.3</b>	3.34, 4.11		
	(8.3)	(8.9)	(n.d.)	(11.5)	/63.8		
(VII) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -	4.91/96.8	3.99/65.6	1.97, 1.79	/76.1	4.48/68.4	1.12/13.4	
(D altro 1345)	(4.3)	(~4/9)	/31.1 (11)				
(D-auro-1,5,4,5-	H-a/C-a	H-b,b'/C-b	H-c/C-c	H-d/C-d	H-e/C-e	H-f/C-f	
	3.99/70.1	1.96, 1.62	4.15/ <b>79.1</b>	3.72/79.1	3.72/68.5	1.28/20.4	
<i>xylo</i> -hexopyranose $1 \rightarrow 4$		/29.5					
(VIII) α-3,6-dideoxy-4- <i>C</i> -	4.94/101.5	3.96/66.2	2.0, 1.78	/76.2	4.33/68.4	1.13/13.4	
$(D_{-altro-1} 3 4 5_{-})$	(4.1)	(~4/9)	/31.2 (11)				
tetrahydroxyhexyl)-D-	H-a/C-a	H-b,b'/C-b	H-c/C-c	H-d/C-d	H-e/C-e	H-f/C-f	
wile hoversmonage 1 and	3.94/70.3	1.96, 1.62	4.14/ <b>79.1</b>	3.72/79.1	3.72/68.5	1.28/20.4	
<i>xyto</i> -nexopyranose $1 \rightarrow c$		/29.5					
<b>(IX)</b> α-4-amino-4,6-	5.10/102.7	3.56/70.2	4.08/69.9	4.28/56.3	4.38/66.7	1.24/17.2	N <u>H</u> **: 10.23
dideoxy- $\beta$ -Gal $n \rightarrow c$	(4)	(11)	(4.7)	(~ 1)			or 10.27
							<u>N</u> H <sup>‡</sup> 118.8 or 118.6
(Zc) (2S, 3S, 4R) 3-	(N)	( <u>C</u> -N)	( <u>C</u> -OH)	( <u>CH</u> -O)	( <u>C</u> =O)		(O- <u>CH<sub>3</sub></u> ) 3.60/61.1
hudrovy 1 mothovy 1 2	n.d*	/81.9	/80.5	4.20/85.3	/175.4		(N- <u>CH<sub>3</sub></u> ) 2.80/31.0
nydroxy-4-methoxy-1,5-							( <u>CH<sub>3</sub></u> ) 1.32/19.6
dimethyl-5-							( <u>C</u> OOH)/173.2
oxopyrrolidine-2-							(NH- <u>C</u> O)/170.3
carboxylic acid							
(Zc) $(2R, 3S, 4R)$ 3-	(N)	( <u>C</u> -N)	( <u>C</u> -OH)	( <u>CH</u> -O)	( <u>C</u> =O)		(O- <u>CH</u> <sub>3</sub> ) 3.65/61.9
hydroxy-4-methoxy-1 3-	n.d*	/83.4	/77.3	3.96/84.2	/176.4		(N- <u>CH</u> <sub>3</sub> ) 2.81/31.0
dimethed 5							( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) 1.63/23.5
annetnyi-5-							( <u>C</u> OOH)/172.3
oxopyrrolidine-2-							(NH- <u>C</u> O)/170.6
carboxylic acid							

\* n.d: not determined
 \*\* measured at 300 K in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O.
 <sup>‡</sup> Nitrogen chemical shift were identified by <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC experiment using indirect reference.

**Table S4: (a)** predicted proteins and **(b)** ORF organisation of *M. marinum* LOS cluster conserved in *Mycobacterium tuberculosis*. Grey arrows, ORF mentioned in the table.

(a)	2		<b>,</b>		
ORF	Gene name	Number of amino acids	Predicted protein (conserved family domain)	Sequence similarity	Identity/similarity (%)
	1	244	<b>Glycosyltransferase</b> (cd04187: Bacterial DPM1_like enzymes,	Rv1500, <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	78/87
IVIVIAK_2313	LOSA	344	PRK10714: undecaprenyl phosphate 4-deoxy- 4-formamido-L-arabinose transferase)	contig001063 (185154 to 184129), <i>M. tuberculosis</i> canetti	78/87
MMAD 2214		272	Hypothetical protein, unknown function	Rv1501, <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	80/90
IMMAR_2314		273	(cl02184: Phytanoyl-CoA dioxygenase)	contig001063 (184114 to 183296), <i>M. tuberculosis</i> canetti	80/90
MMAD 2219		202	Hunothotical protoin unknown function	Rv1502, M. tuberculosis H37Rv	71/83
MMAR_2518		302	Hypothetical protein, unknown function	contig001063 (183080 to 182184), <i>M. tuberculosis</i> canetti	71/83
				Rv1503c + Rv1504c, M. tuberculosis H37Rv	82/89 +82/85
MMAR_2320	WecE	382	TDP-4-oxo-6-deoxy-D-glucose transaminase (COG0399: Predicted pyridoxal phosphate- dependent enzyme, cd00616: 3-amino-5- hydroxybenzoic acid synthase family)	contig001063 (180860 to 182008), <i>M. tuberculosis</i> canetti	82/87
				sugar aminotransferase Wec, E.coli K12	58/72
				Rv1505c, M. tuberculosis H37Rv	90/94
MMAR_2321		221	Acyltransferase (cd03360: Putative Acyltransferase, TIGR03570: ugar O-acyltransferase and	contig001063 (180058 to 180720), <i>M. tuberculosis</i> canetti	90/94
			sialic acid O-acetyltransferase)	putative transferase in O-antigen biosynthesis gene locus , <i>Vibrio</i> cholera serogroup O:5 (agb ADF80977.1 )	44/64
MMAR 2322		211	Hypothetical protein, unknown function (COG2230: Cyclopropane fatty acid synthase	Rv1506c, <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	81/89
WIWAR_2322	211 and related methyltransferases, cl12011: S adenosylmethionine-dependent methyltransferases)		contig001063 (179426 to 180055), <i>M. tuberculosis</i> canetti	83/89	
		212	Hypothetical protein, unknown function	Rv1507c, M. tuberculosis H37Rv	85/92
MIMAR_2325		212	(pfam08889: WbqC-like protein family)	contig001063 (178635 to 179270), <i>M. tuberculosis</i> canetti	85/92
		E22	Hypothetical protein, unknown function	Rv1508c, M. tuberculosis H37Rv	47/59
IVIIVIAR_2327		522	(pfam08889: WbqC-like protein family)	contig001063 (176346 to 177758), <i>M. tuberculosis</i> canetti	47/59





## References

- Burguiere, A.; Hitchen, P. G.; Dover, L. G.; Kremer, L.; Ridell, M.; Alexander, D. C.; Liu, J.; Morris, H. R.; Minnikin, D. E.; Dell, A.; Besra, G. S. J. Biol. Chem. 2005, 280, 42124-33.
- (2) Ren, H.; Dover, L. G.; Islam, S. T.; Alexander, D. C.; Chen, J. M.; Besra, G. S.; Liu, J. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 1345-59.
- (3) Rombouts, Y.; Burguiere, A.; Maes, E.; Coddeville, B.; Elass, E.; Guerardel, Y.; Kremer, L. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 20975-88.

### **Complete references**

- (33) Stinear, T. P.; Seemann, T.; Harrison, P. F.; Jenkin, G. A.; Davies, J. K.; Johnson, P. D.; Abdellah, Z.; Arrowsmith, C.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Clarke, K.; Cronin, A.; Davis, P.; Goodhead, I.; Holroyd, N.; Jagels, K.; Lord, A.; Moule, S.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Quail, M. A.; Rabbinowitsch, E.; Walker, D.; White, B.; Whitehead, S.; Small, P. L.; Brosch, R.; Ramakrishnan, L.; Fischbach, M. A.; Parkhill, J.; Cole, S. T., Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis. Genome Res.* 2008, *18* (5), 729-41
- (35) Frisch M. J.; Trucks G. W.; Schlegel H. B.; Scuseria G. E.; Robb M. A.; Cheeseman J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; T. V.; Kudin K. N.; Burant J. C.; Millam J. M.; Iyengar S. S.; Tomasi J.; Barone V.; Mennucci B.; Cossi M.; Scalmani G.; Rega N.; Petersson G. A.; Nakatsuji H.; Hada, M.; Ehara M.; Toyota K.; Fukuda R.; Hasegawa J.; Ishida M.; Nakajima T.; Honda Y.; Kitao O.; Nakai H.; Klene M.; Li X.; Knox J. E.; Hratchian H. P.; Cross J. B.; Adamo C.; Jaramillo J.; Gomperts R.; Stratmann R. E.; Yazyev O.; Austin A. J.; Cammi R.; Pomelli C.; Ochterski J. W.; Ayala P. Y.; Morokuma K.; Voth G. A.; Salvador P.; Dannenberg J. J.; Zakrzewski V. G.; Dapprich S.; Daniels A. D.; Strain M. C.; Farkas O.; Malick D. K.; Rabuck A. D.; Raghavachari K.; Foresman J. B.; Ortiz J. V.; Cui Q.; Baboul A. G.; Clifford S.; Cioslowski J.; Stefanov B. B.; Liu G.; Liashenko A.; Piskorz P.; Komaromi I.; Martin R. L.; Fox D. J.; Keith T.; Al-Laham M. A.; Peng C. Y.; Nanayakkara A.; Challacombe M.; Gill P. M. W.; Johnson B.; Chen W.; Wong M. W.; Gonzalez C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision A.1, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **2003**.

## b. Etude de l'acylation des lipooligosaccharides

*i. Analyse des acides gras et des positions d'acylation.* 

Dans une étude précédente, l'analyse par GC-MS des esters méthyliques d'acides gras libérés a révélé un profil lipidique semblable pour tous les LOSs de *M. marinum*, avec la prédominance d'un acide gras à chaîne ramifiée, identifié comme étant le 2,4 diméthylhexadécanoate (C18: 0) (Burguiere *et al.*, 2005). Les autres acides gras présents en petites quantités ont été caractérisés comme des chaines linéaires composées de 15 à 20 carbones et deux autres acides gras 2,4-diméthylés de 17 et 19 carbones. Le positionnement des acides gras sur le tréhalose a été établi par l'analyse GC-MS des monosaccharides alditol-acétates partiellement méthylés et éthylés (procédure de Prehm), obtenus à partir du LOS-I (Prehm, 1980; Burguiere *et al.*, 2005). Cette analyse a démontré que le C-4 et C-6 de l' $\alpha$ -Glc*p* terminal (annoté **II**), ainsi que le C-2 du second résidu d' $\alpha$ -Glc*p* (annoté **I**) du tréhalose sont acylés.

Parce que la position des acylations et la nature des acides gras peuvent varier entre les LOSs d'une même espèce (Daffe *et al.*, 1991b), nous avons procédé à l'analyse de la partie lipidique des LOS-I à -IV de *M. marinum*. Les expériences RMN homonucléaires <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H et héteronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C confirment la localisation des acylations précédemment établie pour le LOS-I (Figure IV-1, Tableau IV-1). Comme le présente la Figure IV-1, les tréhaloses des LOS-II, -III et -IV sont également acylés en position C-2 du résidu d' $\alpha$ -Glcp I et en positions C-4 et C-6 du résidu d' $\alpha$ -Glcp II. Aucune autre position d'acylation n'a pu être mise en évidence dans les différents LOSs purifiés de *M. marinum* incluant le LOS-I\* (intermédiaire du LOS-I et -II) et le LOS-IV neutre.

L'analyse des spectres RMN des LOSs a permis d'identifier deux signaux <sup>1</sup>H particuliers à  $\delta$  5.34 et 6.80 appartenant aux acides gras (Figure IV-1). Les déplacements chimiques <sup>13</sup>C ( $\delta$  129.6 et 144.5) associés démontrent que les deux signaux correspondent à deux fonctions éthyléniques distinctes (Tableau IV-1). Alors que le signal le plus blindé est typique d'une fonction éthylénique en milieu de chaine carbonée, le signal à 6.8 ppm semble plutôt correspondre au proton méthine d'un groupe éthylénique substitué par un méthyl et proche d'une fonction carbonyle (Figure IV-1) (Etienne *et al.*, 2009). La nature de ce groupement a été confirmée par l'identification du méthyl ( $\delta$ <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 1.81-12.5) sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC et par les corrélations <sup>3</sup>*J*<sub>H-C</sub> des protons méthine et méthyl avec le carbone d'un

même groupe carbonyle à 168.1 ppm observés sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC (résultats non présentés) (Figure IV-1, Tableau IV-1).



Figure IV-1 : Région élargie des spectres RMN <sup>1</sup>H à une dimension des LOS-I à -IV de *M. marinum* (réalisés à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1; v/v) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne). Les déplacements chimiques sont regroupés dans le Tableau IV-1. Les signaux I à IX font référence aux protons anomères de l' $\alpha$ -D-Glc*p* (I) substitué par la chaine oligosaccharidique, du second  $\alpha$ -D-Glc*p* du tréhalose (II), des  $\beta$ -D-Glc*p* (III et IV), du 3-*O*-Me- $\alpha$ -L-Rha*p* (V), du  $\beta$ -D-Xyl*p* (VI), des caryophylloses (VII, VIII) et du 4-*N*-acyl-4,6-didéoxy- $\alpha$ -D-Gal*p*. I-2, II-4, II-6: protons H-2, H-4 et H-6 des monosaccharides correspondants; \* Positions d'acylation. R= C-2 de I, C-4 et C-6 de II. R'= CH<sub>2</sub>.

# Tableau IV-1 : Valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (en ppm) et des constantes de couplage (en Hz) des signaux anomères (I à IX) des monosaccharides du LOS-IV, des acides gras méthyl-branchés et des positions d'acylation sur l'oligosaccharide (I-2, II-4,

**II-6)** (Mesurées à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1 ; v/v) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne). Les valeurs en italique correspondent aux constantes de couplages vicinales ( ${}^{3}J_{H1-H2}$ ).

Déplacements chimiques <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C (ppm)	Caractéristiques du signal proton	Assignement
1.81/12.5	singulet	CH, CH,     0 R'-HC-HC=C-C OR
1.73, 1,17/41.7 (II- 4)	n.d	CH, CH,     0 R'-HC-CH,-CH-C OR
1.71, 1,17/41.7 (I- 2)	n.d	CH, CH,     0 R'-HC-CH,-CH-C OR
2.59/37.8 (I-2)	n.d	CH, CH,     0 R'-HC-CH <sub>2</sub> -CH-C OR
2,63/37,3 (II-4)	n.d	CH, CH,     0 R'-HC-CH,-CH-C OR
4.10, 4.01/62.0	n.d	H-6,6' α-D-Glcp II ( <b>II-6</b> )
4.43/103.5	doublet, 9.0	$\beta$ -D-Xyl $p$ (VI)
4.44/103.0	doublet, 7.0	$\beta$ -D-Glc $p$ (III)
4.54/104.2	doublet, 7.4	$\beta$ -D-Glc $p$ (IV)
4.84/72.0	doublet de doublet	H-2 α-D-Glc <i>p</i> I ( <b>I-4</b> )
4.83/96.7	n.d	Caryophyllose VII
4.90/99.8	n.d	Caryophyllose VIII
5.3/100.0	doublet, 3.8	4- <i>N</i> -acyl-4,6-didéoxy-α-d-Gal <i>p</i> ( <b>IX</b> )
4.92/70.23	triplet	H-4 α-D-Glcp II ( <b>II-4</b> )
5.15/100.5	Singulet, 1	3- <i>O</i> -Me-α-L-Rhap (V)
5.14/93.6	doublet, 3.6	$\alpha$ -D-Glcp (II)
5,24/91.6	doublet, 3.8	$\alpha$ -D-Glcp (I)
5.34/129.6	triplet	C=C
6.80/144.4	triplet	CH, CH, │ │ / Ø R'-HC- <mark>H</mark> C=C-C OR
168.1		CH, CH,     0 R'-HC-HC=C-C OR
176.2 (II-4)		CH, CH,     0 R'-HC-CH <sub>2</sub> -CH-C OR
176.4 (I-2)		CH, CH,     O R'-HC-CH,-CH-COR

La présence d'acides gras insaturés dans les LOSs de *M. marinum* n'ayant pas été identifiée dans les travaux précédents (Burguiere *et al.*, 2005), nous avons procédé à l'analyse par GC-MS des esters méthyliques des acides gras de manière à premièrement, déterminer la nature des acides gras majoritaires substituant les LOSs de *M. marinum* et deuxièmement, vérifier si les acides gras insaturés sont des lipides contaminants ou non.



**Figure IV-2 : Analyse par GC-MS des acides gras issus du LOS IV après méthanolyse de l'échantillon.** (Cf. matériel et méthode programme température 1) Le chromatogramme montre la présence de deux acides gras majoritaires. Les ions fragments obtenus par EI-MS ont permis d'identifier les deux acides gras comme le 2,4 diméthylhexadécanoate (C18:O) et le 2,4-diméthyl-2-pentadécenoate (C17:1). Des chromatogrammes similaires ont été obtenus pour les autres LOSs de *M. marinum*.

L'analyse par GC-MS des acides gras méthyl-estérifiés isolés à partir des LOSs purifiés a permis d'obtenir des profils chromatographiques identiques montrant la présence de deux pics majoritaires (Figure IV-2). Le pic du composé le plus volatile donne un ion pseudomoléculaire de m/z 298 et une fragmentation qui correspond à un acide 2,4 diméthylhexadécanoique (C18:0) (Figure IV-2). En particulier, les ions fragments majoritaires de m/z 88 (réarrangement de McLafferty), 101 et 129 sur le spectre EI-MS démontrent sans ambigüité la présence de deux groupes méthyles branchés sur les C-2 et C-4 de l'acide gras. La fragmentation du composé le moins volatile présente un ion pseudo-moléculaire de m/z282 caractéristique d'un acide gras insaturé en C17 (Figure IV-2). Les ions fragments de m/z88 (réarrangement de McLafferty), 101 et 127 sur le spectre EI-MS identifient l'acide gras comme un 2,4-diméthyl-2-pentadécenoate (C17:1) (Figure IV-2). La quantification relative entre le 2,4 diméthylhexadécanoate et le 2,4-diméthyl-2-pentadécenoate est d'environ 2 pour 1, ce qui suggère que l'acide gras insaturé n'est pas un contaminant. En plus de ces lipides, nous avons identifié la présence minoritaire d'acides gras linéaires saturés (C14 à C20) prédominés par le C16, d'acides gras linéaires insaturés (principalement C18:1) ainsi que de deux autres acides gras 2,4-diméthylés en C17 et C19.

Dans le but de confirmer que les LOSs sont majoritairement acylés par les 2,4 diméthylhexadécanoates (C18:0) et 2,4-diméthyl-2-pentadécenoates (C17:1), nous avons analysé les glycolipides par spectrométrie de masse MALDI-TOF après perméthylation des échantillons. Suite à celle-ci, les dérivés n'ont pas été purifiés sur colonne de phase inverse comme établi dans le protocole standard (Burguiere, 2005 #24). De cette manière, les spectres MALDI-TOF-MS des LOSs perméthylés permettent de visualiser la masse des produits sousméthylés et acylés par 1, 2 ou 3 acides gras (Figure IV-3A). Ces analyses de masse démontrent que les LOSs sont tri-acylés en grande majorité par deux acides gras en C18:1 et un acide gras en C17:1, comme le suggérait l'analyse GC-MS. De façon surprenante, la dé-Oacylation des LOSs durant la perméthylation s'est faite de manière séquentielle comme le montre la perte successive d'un C18:0, d'un C17:1 puis d'un second C18:0 sur les spectres MALDI-MS (Figure IV-3A). La libération séquentielle des acides gras par la soude suggère que chaque type d'acides gras des LOSs substitue une position spécifique sur le tréhalose. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de corréler par RMN un type d'acide gras avec une position d'acylation. Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC du LOS-IV, la corrélation  ${}^{3}J_{H-C}$  des protons H-2 (δ 4.84) du résidu d'α-Glcp I et H-4 (δ 4.92) de l'α-Glcp II avec deux groupements carbonyles (C=O) démontre que ces deux positions sont acylées (Figure IV-3B). De façon intéressante, les deux groupements carbonyles font partie de deux acides gras 2,4 diméthylés saturés en positon C-2. Ces résultats suggèrent que les positions **I-2** et **II-4** du tréhalose sont toutes deux substituées par des acides 2,4 diméthylhexadécanoiques (C18:O) que l'on peut discriminer par RMN (Figure VI-3B, Tableau VI-1). L'analyse du spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC a également permis d'identifier le carbonyle de l'acide 2,4-diméthyl-2pentadécenoique (C17:1) (Figure VI-3, Tableau VI-1). Malheureusement, aucune corrélation n'a pu être visualisée entre les protons **I-2**, **II-4** et **II-6** et le carbonyle de cet acide gras (Figure IV-3B). Nous émettons l'hypothèse que le groupe éthylénique substitué par un méthyle empêche le transfert de magnétisation entre les protons du tréhalose et le carbonyle de l'acide gras.



**Figure IV-3 : (A) Spectres MALDI-TOF-MS du LOS-I et du LOS-VI de** *M. marinum* **après per-***O***-méthylation des échantillons. (B) Spectre** <sup>1</sup>**H**-<sup>13</sup>**C HMBC (1 à 7 ppm) du LOS-IV.** (Spectres RMN réalisés à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1 ; v/v) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne). Des spectres similaires ont été obtenus pour les autres LOSs de *M. marinum*.

En conclusion, au travers des résultats obtenus par les différentes techniques d'analyse structurale, nous proposons que tous les LOSs de *M. marinum* sont majoritairement acylés en positions I-2 et II-4 par deux acides 2,4 diméthylhexadécanoiques et en position II-6 par un acide 2,4-diméthyl-2-pentadécenoique (Figure IV-4)



Figure IV-4 : Structure majeure du LOS I de M. marinum.

*ii. Analyse bioinformatique de la région génétique intervenant dans la synthèse des acides gras et dans l'acylation des LOSs.* 

Les acides gras polyméthylés sont synthétisés par des polycétides synthases (PKS) et transférés sur le substrat accepteur par des protéines Pap (Polyketide-associated protein). Récemment, une étude a démontré que le gène *MSMEG\_4727* de *M. smegmatis* (orthologue à *pks5* de *M. tuberculosis*) code pour la PKS-5 impliquée dans la synthèse de l'acide 2,4-dimethyl-2-eïcosénoïque (C22:1) acylant les LOSs de cette espèce (Etienne *et al.*, 2009). Dans la région génétique des LOSs de *M. marinum*, deux gènes (*pks5*/MMAR\_2341 et *pks5.1*/MMAR\_2344) ont été annotés comme codant deux PKS. La présence de ces deux gènes suggère que les PKS-5 et PKS-5.1 sont nécessaires à la synthèse des LOSs de *M. marinum*. En considérant la spécificité enzymatique des PKSs, nous avons émis l'hypothèse

que l'une des protéines interviendrait dans la synthèse de l'acide 2,4-diméthylhexadécanoique et l'autre permettrait la production l'acide 2,4-diméthyl-2-pentadécenoique qui substitue les LOSs de *M. marinum*. Nous avons donc tenté de conforter notre hypothèse grâce à plusieurs analyses bioinformatiques.

Les PKSs ont des modules enzymatiques spécifiques qui leur permettent de synthétiser une seule famille d'acides gras polyméthylés. L'analyse des séquences peptidiques issues de *pks5* et *pks5.1* de *M. marinum* (Figure IV-5) en utilisant le programme SBSPKS (<u>http://www.nii.ac.in/~pksdb/sbspks/master.html</u>) confirme que les protéines interviennent dans la synthèse d'acides gras polyméthylés (Anand *et al.*, 2010). PKS-5 et PKS-5.1 possèdent toutes les activités enzymatiques requises pour la synthèse d'acides gras polyméthylés saturés (Figure IV-5). Sachant que la synthèse d'acides gras insaturés est la résultante de l'absence d'activité énoylréductase (ER), il est probable que cette activité soit non fonctionnelle dans une des deux PKSs. De façon concordante, la PKS-5 de *M. smegmatis* possède également un module ER alors qu'elle synthétise un acide gras 2,4-di-méthylé insaturé en position 2 (Figure IV-5).



**Figure IV-5 : Prédiction des activités enzymatiques des PKS-5 impliquées dans la synthèse des LOSs de plusieurs espèces de mycobactéries** en utilisant le programme SBSPKS (<u>http://www.nii.ac.in/~pksdb/sbspks/master.html</u>). KS : Cétosynthase ; AT : Acyltransférase ; DH : Déhydratase ; ER : Enoylréductase; KR : Cétoréductase ; ACP : Acyl carrier protein.

Pour appuyer notre hypothèse selon laquelle les PKS-5 et PKS-5.1 de M. marinum interviendraient dans la synthèse de deux familles d'acides gras polyméthylés substituant les LOSs, nous avons étendu nos recherches bioinformatiques au génome d'autres souches et espèces de mycobactéries. Nous nous sommes intéressé plus particulièrement à Mycobacterium canettii dont le génome a été séquencé récemment. M. canettii est la seule espèce mycobactérienne du complexe de M. tuberculosis qui synthétise des LOSs (Daffe et al., 1991b). Qui plus est, les LOSs de M. canettii sont acylés par deux familles d'acides gras polyméthylés, hydroxylés et non hydroxylés. Comme le présente la publication décrivant la structure du LOS-IV de M. marinum, nous avons identifié le locus génétique de biosynthèse des LOSs de M. canettii par des comparaisons de séquences nucléotidiques avec les gènes impliqués dans la synthèse des LOSs de M. marinum. En employant la même méthodologie, nous avons identifié deux gènes (pks5 et pks5.1) pouvant coder pour des PKSs dans le locus génétique de biosynthèse des LOSs de M. canettii (Figure IV-6, Tableau IV-2). De plus, un gène (papA) pouvant coder pour une seconde acyltransférase (homologue à MMAR 2343 de M. marinum) a été localisé entre les deux Pks (Figure IV-5). La présence de pks5 et pks5.1 dans le génome de M. canettii a conforté notre hypothèse. De façon intéressante, ni pks5.1 ni papA ne sont présents dans le génome de M. tuberculosis H37Rv. Il faut également noter que l'acyltransférase prédite PapA4 de M. tuberculosis (Rv1528c) est tronquée. En effet, alors que les protéines PapA4 prédites de M. marinum et M. smegmatis sont composées d'environ 480 acides aminés, PApA4 de M. tuberculosis ne possède que 165 acides aminés.



**Figure IV-6 : Locus génétique de la biosynthèse des LOSs de** *M. marinum* **et les régions correspondantes chez** *M. tuberculosis* **H37Rv et** *M. canettii. pks* : polyketide synthase ; *papA* : Polyketide associated protein acyltransferase ; *mmpL12* : Mycobacterial membrane protein large family transport ; *fadD25*: Fatty acyl coenzyme-A ligase ; wbbL2 : Rhamnosyltransferase.

En conclusion, les analyses bioinformatiques suggèrent que les deux polycétide synthases prédites dans le locus génétique des LOSs de *M. marinum* sont nécessaires à la synthèse de cette famille de glycolipides. De manière à confirmer l'importance des deux enzymes dans la biosynthèse des LOSs, il serait intéressant d'interrompre les gènes *Pks5* et *Pks5.1*. L'analyse du locus génétique de biosynthèse des LOSs de *M. canettii* a révélé la présence de deux gènes supplémentaires (*pks5.1* et *papA*) en comparaison avec le locus des LOSs de *M. tuberculosis* H37Rv. Ces deux gènes sont également absents dans d'autres souches de *M. tuberculosis*. Nous émettons l'hypothèse que la perte de *Pks5.1* et *PapA* chez *M. tuberculosis* est à la base de l'absence de LOSs dans cette espèce. Cependant, plusieurs études ont démontré que l'interruption de gènes dans le locus des LOSs de *M. tuberculosis* (ex : Rv1505c, *pks5*) entraine une altération de la paroi de la mycobactérie et une diminution de la virulence (Rousseau *et al.*, 2003b; Lynett et Stokes, 2007; Brodin *et al.*, 2010). En conséquence, il est possible que le locus génétique des LOSs de *M. tuberculosis* soit impliqué dans la synthèse de composés nécessaires à la virulence mais non identifiés à ce jour.

ORF	Nom du gène	Nombre d'acides aminés	protéine prédite	Similarité de séquence	Identité/similarité (%)	
MMAR 2344	Dle 5 1	2084	Polyketide	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv , Rv1527c (pks5)	63/74	
MMAK_2344	F KSJ.1	2084	synthase	<i>M. canettii</i> , contig001063 (139633 à 145917)	64/74	
MMAR_2343	Dom 14	470	Polyketide	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, Rv1528c ( <i>papA4</i> , seulement 165aa)	52/69	
	Гарл4	478	protein	<i>M. canettii, papA</i> contig001063 (146014 à 147393)	48/59	
MMAR_2340	Dha 5	2000	Polyketide	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, Rv1527c (pks5),	69/79	
	1 155	2090	synthase	<i>M. canettii</i> , contig001063 (147579 à 153851)	69/78	

 Tableau IV-2 : Protéines prédites de la région génétique impliquée dans l'acylation des LOSs de *M. marinum* et conservée chez *M. tuberculosis* et *M. canettii*.

# 3. Conclusion

A l'aide de nombreuses techniques physico-chimiques complémentaires, nous avons établi les structures précises et complètes des lipooligosaccharides (LOS) de *Mycobacterium marinum*. Nos études ont permis d'identifier et de caractériser au moins six LOSs qui diffèrent par la nature de leurs chaines oligosaccharidiques.

Dans une première étape, nous nous sommes concentré sur l'analyse structurale des LOS-I à -III afin de déterminer la nature d'un monosaccharide atypique possédant la masse d'un disaccharide. En particulier, l'étude du LOS-II a permis de démontrer que le monosaccharide atypique était de l'a-3,6-didéoxy-4-C-(D-altro-1,3,4,5-tétrahydroxyhexyl)-Dxylo-hexopyranose, également nommé caryophyllose (Figure IV-7A). Avant nos études, le caryophyllose avait uniquement été identifié dans le lipopolysaccharide d'une espèce de bactéries phytopathogènes : Pseudomonas caryophylli (Adinolfi et al., 1995). Cependant, un monosaccharide analogue C-4 branché a également été caractérisé dans les LOSs de Mycobacterium gastri (Gilleron et al., 1994). De façon minoritaire, le caryophyllose du LOS-II peut être remplacé par un 3-hydroxy-caryophyllose ou plus précisément un α-6-déoxy-4-C-(D-altro-1,3,4,5-tétrahydroxyhexyl)-D-galactopyranose. L'étude structurale du LOS-III a démontré la présence d'une seconde unité de caryophyllose liée en  $\alpha$ -1,9 sur le premier. De même que pour le LOS-II, les caryophylloses du LOS-III peuvent être remplacés par une ou deux unités de leurs analogues hydroxylés, augmentant encore la diversité ces glycolipides. En plus des LOS-I à -III, nous avons également caractérisé un intermédiaire de biosynthèse nommé LOS-I\* selon la nomenclature d'une précédente étude (Ren et al., 2007).

Dans une deuxième étape, nous avons procédé à l'analyse structurale du LOS-IV composé du squelette oligosaccharidique du LOS-III auquel s'ajoute un autre monosaccharide atypique. Ce dernier possède également une masse proche de celle d'un disaccharide. Cet ose terminal a été caractérisé comme un nouveau 4-*N*-4,6-didéoxy-Gal*p N*-acylé par un cycle de type pyrrolidone (Figure IV-7B). Plus précisément, le monosaccharide terminal du LOS-IV majeur de *Mycobacterium marinum* est un résidu d' $\alpha$ -4-[(2S, 3S, 4R) 2-carbamoyl-3-hydroxy-4-méthoxy-1,3-diméthyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylique acide]-4,6-didéoxy-Gal*p* lié en 1,9 sur le second caryophyllose. En plus de ce LOS-IV majoritaire, trois autres composés ont été identifiés qui différent par la conformation du cycle pyrrolidone et/ou par la présence de groupements chimiques (acide carboxylique, hydroxyle, méthyle). Bien que de structure différente, le monosaccharide *N*-acylés du LOS-IV de *M. marinum* présente des similitudes

avec le *N*-acyl kansosamine du LOS de *M. kansasii* (Hunter *et al.*, 1984). De même, *Mycobacterium canettii* synthétise un LOS caractérisé par la présence d'un 4-*N*-acyl-4,6didéoxy-Gal*p* dont le substituant n'a pas été identifié (Daffe *et al.*, 1991b). Nos analyses structurales et bioinformatiques suggèrent que le monosaccharide *N*-acylé de *M. canettii* est un monosaccharide analogue à l'une des formes minoritaires du monosaccharide *N*-acylé du LOS-IV de *M. marinum*.

Dans une troisième étape, nous nous sommes intéressé à l'acylation des LOSs de *M. marinum*. Nous avons démontré que tous les LOSs sont acylés par trois acides gras en positions C-4 et C-6 du résidu d' $\alpha$ -Glc*p* terminal et C-2 du second  $\alpha$ -Glc*p* du tréhalose. Les acides gras ont été identifiés comme étant majoritairement des acides 2,4diméthylhexadécanoique (C18:1) et 2,4-diméthyl-2-pentadécenoique (C17:1). De plus, nos résultats suggèrent que chaque position est substituée par un type d'acide gras spécifique (Figure IV-4). La découverte de deux familles d'acides gras a été corrélée par des études bioinformatiques à la présence de deux gènes codant pour des enzymes de synthèse (polycétides synthases, PKS) dans le locus génétique des LOSs de *M. marinum*.



Figure IV-7 : Structures de (A) l' $\alpha$ -3,6-didéoxy-4-*C*-(D-*altro*-1,3,4,5-tétrahydroxyhexyl)-D-*xylo*-hexopyranose (caryophyllose) retrouvé dans les LOS-II à -IV et (B) du  $\alpha$ -4-[(2S, 3S, 4R) 2-carbamoyl-3-hydroxy-4-méthoxy-1,3-diméthyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxyl]-4,6-didéoxy-Gal*p* spécifique au LOS-IV de *M. marinum*.

Après avoir caractérisé la structure des LOSs de M. marinum, nous avons étudié les propriétés immunomodulatrices de ces glycolipides *in vitro* en utilisant une lignée leucémique pro-monocytaire humaine THP-1 différenciée vers un stade macrophagique. Nos résultats démontrent que les LOSs sont de puissants modulateurs de la sécrétion macrophagique de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8) et de la production d'antigènes de surface (CD40, ICAM-1) intervenant dans les différentes étapes de la formation des granulomes. Dans un premier temps, nos analyses ont révélé que les LOSs de M. marinum n'induisaient pas la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages THP-1. Au contraire, les LOSs inhibent la sécrétion macrophagique de TNF- $\alpha$  induite par le LPS (agoniste de TLR4) ou par le lipopeptide Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (agoniste de TLR2). Ces résultats suggéraient un rôle antiinflammatoire des LOSs durant l'infection mycobactérienne. Lors de nos analyses, nous avons comparé le pouvoir inhibiteur des LOSs et des PGLs sur la production de TNF-a (résultats non publiés). Cette comparaison a révélé que les LOSs étaient plus inhibiteurs que les PGLs. Le ManLAM de M. tuberculosis est également décrit comme un puissant inhibiteur de la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Ce mécanisme est expliqué par une libération de la cytokine antiinflammatoire IL-10 et par une surexpression d'IRAKM (IL-1 receptor-associated kinase M) décrit comme un répresseur intracellulaire de la voie de signalisation des TLRs (Geijtenbeek et al., 2003; Pathak et al., 2005). Cependant dans le cas des LOSs, aucun de ces deux mécanismes n'a pu être observé. A ce jour, l'activité inhibitrice des LOSs n'a pas été élucidée. Le TNF- $\alpha$  est une cytokine indispensable au maintient des granulomes (Clay *et al.*, 2008). Il est possible que la synthèse accrue de LOSs et de PGLs par M. marinum dans les granulomes inhibe la production de TNF- $\alpha$  et fragilise le granulome pour faciliter la phase de réactivation. Dans de futurs travaux, nous tenterons d'élucider les voies de signalisation permettant aux LOSs d'inhiber la sécrétion de TNF- $\alpha$ .

Dans un deuxième temps, nous avons testé le pouvoir inducteur des LOSs sur la production de chimiokines (IL-8) et d'antigènes de surface (CD40, ICAM-1) par les macrophages. De manière surprenante, nous avons établi que le LOS-IV était le seul glycolipide à induire rapidement la production d'IL-8, de CD40 et d'ICAM-1. Ces résultats suggèrent que le monosaccharide *N*-acylé spécifique au LOS-IV lui confère des propriétés immunomodulatrices uniques. La présence de ce monosaccharide avait déjà été associée à la phagocytose de *M. marinum in vitro* par des macrophages (Burguiere *et al.*, 2005). Nous proposons que le monosaccharide *N*-acylé du LOS-IV est reconnu spécifiquement par un récepteur cellulaire des macrophages impliqué dans la phagocytose et dans la production de

médiateurs de l'inflammation. Nous essaierons de déterminer la nature du ou des récepteurs macrophagiques impliqués dans la reconnaissance du LOS-IV. Alors que l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  fragilise les granulomes, la production d'IL-8, de CD40 et d'ICAM-1 est nécessaire au recrutement cellulaire et à la formation des granulomes. Nos analyses suggèrent donc que les LOSs jouent plusieurs rôles pendant les différentes étapes de la réponse granulomateuse. Nous pouvons également supposer qu'une régulation fine dans la synthèse de la partie oligosaccharidique des LOSs de *M. marinum* permet de moduler la réponse inflammatoire globale durant l'infection mycobactérienne.

# B. Les glycolipides et lipoglycannes à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol

# 1. Introduction

Les phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIM), lipomannane (LM) et lipoarabinomannane (LAM) sont des glycoconjugués ubiquitaires chez les mycobactéries. Des modifications discrètes de la structure de ces composés peuvent conduire à un large spectre de propriétés immunomodulatrices impliquées dans la virulence des mycobactéries (Cf. chapitre II). Nous avons donc voulu savoir si ces glycoconjugués de *M. marinum* possédaient certaines spécificités. Les résultats présentés dans cette partie rapportent une analyse structurale préliminaire des PIMs, du LM et du LAM isolés de la souche M de *M. marinum*.

# 2. Résultats

a. Les phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIMs)

Nous avons purifié trois fractions de PIMs à partir des glycolipides polaires extraits de la paroi de *M. marinum*. D'après leurs caractéristiques chromatographiques sur couche mince, ces composés ont été identifiés comme les PIM<sub>2</sub> tri- et tétra-acylés (Ac<sub>3</sub>PIM<sub>2</sub> et Ac<sub>4</sub>PIM<sub>2</sub>) et le PIM<sub>6</sub> (Ac<sub>4</sub>PIM<sub>6</sub>). Les analyses par spectrométrie de masse et par RMN ont confirmé la nature des trois glycolipides (Figure IV-8). En particulier, l'absence d'un signal <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C aux alentours de 4.70-70.0 ppm sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de l'Ac<sub>3</sub>PIM<sub>2</sub> démontre que contrairement aux deux autres PIMs, ce glycolipide n'est pas acylé en position 3 de l'inositol. D'après les données de la littérature portant sur les PIMs de *M. bovis* BCG, nous avons associé chacune des masses à une composition en lipides (Tableau IV-3) (Hsu *et al.*, 2007). Par la suite, il sera primordial de vérifier la nature des acides gras par GC-MS et spectrométrie de masse.



Figure IV-8 : Spectres de masse MALDI-TOF (à gauche) et analyse RMN <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (à droite) des phosphatidyl-*myo*-inositol dimannosides tri- et tétra-acylés (Ac<sub>3</sub>PIM<sub>2</sub> et Ac<sub>4</sub>PIM<sub>2</sub>) et du phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannosides tétra-acylés (Ac<sub>4</sub>PIM<sub>6</sub>) de *M. marinum*. L'analyse RMN a été réalisée à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1; v/v) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Attribution des signaux observés par spectrométrie de masse (MALDI-MS) des phosphatidyl-*myo*-inositol dimannosides tri- et tétra-acylés (Ac<sub>3</sub>PIM<sub>2</sub> et Ac<sub>4</sub>PIM<sub>2</sub>) et du phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannosides tétra-acylés (Ac<sub>4</sub>PIM<sub>6</sub>) de M.

*marinum*. Les spectres de masse des PIMs sont présentés dans la **Figure IV-8**. Les valeurs entre parenthèse représentent les acides gras sur le glycérol. Le premier acide gras supplémentaire est lié en position C-6 du résidu Man-2 et le second en position C-3 de l'inositol (Cf. Schéma de la Figure IV-8). Les structures proposées sont basées sur une étude précédente des PIMs de *M. bovis* BCG (Hsu *et al.*, 2007).

Masse [M+2Na-H] <sup>+</sup>	Structure	Masse [M+2Na-H] <sup>+</sup>	Structure
1417.7	16:0-(16:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	1711.6	(16:0/16:0)-(18:0/18:0)-PIM <sub>2</sub>
1431.7	16:0-(17:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	-	(16:0/18:0)-(16:0/18:0)-PIM <sub>2</sub>
1443.7	16:0-(18:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>		(16:0/17:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
	18:0-(16:0/16:1)-PIM <sub>2</sub>	1723.6	(16:0/18:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
1445.7	16:0-(18:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	-	(16:0/19:0)-(18:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>
1457.7	16:0-(19:0/16:1)-PIM <sub>2</sub>	1725.6	(16:0/18:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
	16:1-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>		(16:0/19:0)-(18:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
	16:0-(19:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>	1739.6	(16:0/19:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
	17:0-(18:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>	1751.6	(18:0/18:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
1459.8	16:0-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>		(18:0/19:0)-(18:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>
1471.7	17:0-(19:0/16:1)-PIM <sub>2</sub>		(18:0/19:0)-(18:0/16:1)-PIM <sub>2</sub>
1473.7	17:0-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>		(18:0/18:0)-(18:1/17:0)-PIM <sub>2</sub>
	16:0-(19:0/17:0)-PIM <sub>2</sub>	1753.6	(18:0/18:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
1487.7	18:0-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	-	(17:0/18:0)-(19:0/17:0)-PIM <sub>2</sub>
	16:0-(19:0/18:0)-PIM <sub>2</sub>		(16:0/18:0)-(19:0/18:0)-PIM <sub>2</sub>
	17:0-(19:0/17:0)-PIM <sub>2</sub>	1767.6	(18:0/19:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>
1501.7	19:0-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>		(16:0/19:0)-(19:0/18:0)-PIM <sub>2</sub>
	18:0-(19:0/17:0)-PIM <sub>2</sub>	1781.6	(16:0/19:0)-(19:0/19:0)-PIM <sub>2</sub>
1669.6	(16:0/16:0)-(17:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2331.3	(16:0/16:0)-(18:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
1683.6	(16:0/16:0)-(18:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2343.2	(16:0/16:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
1695.6	(16:0/16:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2345.2	(16:0/16:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
	(16:0/16:0)-(19:0/16:1)-PIM <sub>2</sub>	2357.3	(16:0/18:0)-(18:1/16:0)-PIM <sub>6</sub>
	(16:0/16:0)-(18:1/17:0)-PIM <sub>2</sub>	2359.3	(16:0/18:0)-(18:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
	(16:0/16:0)-(19:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>		(16:0/17:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
1697.6	(16:0/16:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2371.4	(16:0/18:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
	(16:0/17:0)-(18:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2373.4	(16:0/18:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
1709.6	(16:0/18:0)-(18:1/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2385.3	(17:0/18:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
	(16:0/17:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>2</sub>	2387.3	(16:0/19:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
	(16:0/16:0)-(18:1/18:0)-PIM <sub>2</sub>	2399.3	(18:0/18:1)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
		2401.3	(18:0/18:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>
		2415.3	(18:0/19:0)-(19:0/16:0)-PIM <sub>6</sub>

## b. Le lipommannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM)

Le LM et le LAM de *M. marinum* ont principalement été analysés par RMN. Les spectres ont été interprétés d'après les données de la littérature et des analyses précédemment réalisées au laboratoire sur le LM et le LAM de *M. kansasii* et de *M. chelonae* (Guerardel *et al.*, 2002; Guerardel *et al.*, 2003). Dans le but de faciliter l'attribution des signaux et en considérant la filiation structurale du LM et du LAM, les deux lipoglycannes ont été analysés simultanément.

#### *i. Analyse de l'ancre phosphatidyl-myo-inositol*

Afin d'étudier la structure de l'ancre des lipoglycannes, nous avons procédé à des expériences RMN en une dimension <sup>31</sup>P et en deux dimensions <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-HSOC. Nos analyses ont d'abord été réalisées sur le LM puis comparées au LAM. Sur le spectre <sup>31</sup>P à une dimension du LM, nous avons observé un signal à 1,9 ppm correspondant à l'atome de phosphore de l'ancre phosphatidyl-myo-inositol (résultats non présentés). En accord avec les données de la littérature, l'expérience <sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P-HSQC a établi que le phosphore est di-estérifié entre le C-3 du glycérol et le C-1 de l'inositol (Gilleron et al., 2006). Selon la nomenclature de Gilleron et collaborateurs, l'atome de phosphore à 1,9 ppm a été identifié comme étant de type P3 (Gilleron et al., 1999; Gilleron et al., 2006). Ce dernier indique la présence de trois positions d'acylation dont deux sur le glycérol en position C-1 et C-2 et une sur le C-2 du résidu d'a-Manp (Man-2) lié en a-1,2 sur l'inositol (Ins). De manière concordante, l'observation des déplacements chimiques déblindés des protons H-1,1' (8 4.35, 4.12) et H-2 (δ 5.09) (Figure IV-9; Tableau IV-4) du glycérol sont caractéristiques d'une acylation en position C-1 et C-2. De plus, les valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C du Man-2 et de l'α-Manp (Man-1) lié en position C-6 de l'inositol montrent que le glycérol est di-acylé en C-1 et C-2 et que le Man-2 est mono-acylé en C-2 (Tableau IV-4) (Guerardel et al., 2003). Les résultats similaires obtenus pour le LAM, nous permettent d'affirmer que les deux lipoglycannes de *M. marinum* sont majoritairement tri-acylés comme le LM et le LAM de *M.* tuberculosis.



Figure IV-9 : Régions anomère des spectres RMN <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du lipomannane (LM) et lipoarabinomannane (LAM) de *M. marinum*. L'analyse RMN a été réalisée à 343° K dans le DMSO en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées dans le Tableau IV-4. Résidus monosaccharidiques I : 3,5- $\alpha$ -Araf; II : 5- $\alpha$ -Araf; III : 2- $\alpha$ -Araf; IV : t- $\alpha$ -Manp; V :  $\beta$ -Araf VI : 6- $\alpha$ -Manp; VII : 2- $\alpha$ -Manp; VIII : t- $\alpha$ -Manp. MTP :  $\alpha$ -5-déoxy-méthylthio-xylofuranose; Succ : succinylé.

#### ii. Analyse du domaine mannane et arabinomannane

Afin d'étudier le domaine mannane du LM et arabinomannane du LAM, nous avons réalisé des expériences RMN <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC à deux dimensions. En comparant les spectres avec les données disponibles dans la littérature, nous avons attribué les signaux anomères des différents résidus de mannose et d'arabinose en tenant compte de la nomenclature établie (Figure IV-9 ; Tableau IV-4) (Guerardel *et al.*, 2002; Guerardel *et al.*, 2003).

Brièvement, la région anomérique du spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du LM montre la présence de signaux caractéristiques d' $\alpha$ -Manp (IV<sub>1</sub> et IV<sub>2</sub>) substitués en position C-6, représentant la chaîne linéaire d' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Manp du LM. Le signal VIII correspond aux résidus d' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Manp substitués en positon C-2 par des résidus uniques d' $\alpha$ -Manp (noté IV). Les signaux identiques présents sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC dans le LAM, établissent clairement que les domaines mannanes du LM et du LAM sont tous deux constitués d'un squelette  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-Manp partiellement substitué en position C-2 par des unités d' $\alpha$ -Manp terminaux. En plus de ces signaux, le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC LM montre la présence de signaux anomères correspondant à des résidus d'Araf, même après un second cycle de purification. Le cas du LM de *M. marinum* n'est pas isolé puisque les analyses RMN publiées des LMs de *M. kansasii* et de *M. bovis* BCG montrent également de des signaux mineurs correspondant à des résidus d'Araf (Gilleron *et al.*, 1999; Guerardel *et al.*, 2003). Aujourd'hui, l'origine de ces signaux n'a pas été identifiée mais il est probable qu'ils proviennent d'une contamination de LAM et/ou d'arabinomannane libre.

L'analyse du domaine arabinane sur le spectre  ${}^{1}\text{H}{-}^{13}\text{C}$  HSQC du LAM permet de visualiser les signaux de résidus de 3,5- $\alpha$ -Araf (I), 5- $\alpha$ -Araf (II, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>), 2- $\alpha$ -Araf (III<sub>1</sub>, III<sub>2</sub>) et de  $\beta$ -Araf (V), en accord avec les données de la littérature (Guerardel *et al.*, 2002; Guerardel *et al.*, 2003).

### iii. Analyse de la coiffe et des substitutions

Dans des études précédentes, le LAM de *M. marinum* a été décrit comme étant substitué par une coiffe oligomannosidique (Pitarque *et al.*, 2005)(Gilleron, 2008 #2236). Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du LAM, le signal VII ( $\delta^{1}$ H/<sup>13</sup>C 4.83/98.8) d'un résidu d' $\alpha$ -Man*p*-(1 $\rightarrow$ 2) substitué en position C-2, confirme que tout comme *M. tuberculosis*, *M. marinum* synthétise du ManLAM (Figure IV-9 ; Tableau IV-4).

Le LAM des mycobactéries peut également être substitué par des groupements succinates et/ou par des résidus de 5-déoxy-5-méthylthio-xylofuranose (MTP pour thiométhyl-pentose). Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du ManLAM, le signal <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C à 4.79-79.7 ppm est caractéristique des H-3/C-3 d'un résidu d' $\alpha$ -5-Araf succinylé, comme décrit chez *M. kansasii* (Guerardel *et al.*, 2003). Ceci a été confirmé par l'identification du système de spin du résidu dont le signal anomère <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C est à 4.93/108.1 ppm (non indiqué sur le spectre de la Figure IV-9). Enfin, dans la région anomère du spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du ManLAM, le signal annoté MTP ( $\delta^1$ H/<sup>13</sup>C 5.20/103.5) indique la présence de 5-déoxy-5-méthylthio-xylofuranose. Pour rappel, le MTP est lié à la coiffe oligomannosidique du ManLAM de *M. tuberculosis*, mais substitue le corps mannane des LM et ManLAM de *M. Kansasii* (Treumann *et al.*, 2002; Guerardel *et al.*, 2003). La présence d'un signal intense correspondant au MTP sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du LM de *M. marinum* suggère qu'il est lié sur le corps mannane des deux lipoglycannes (Figure IV-9).

# 3. Conclusion

Nos résultats sur les glycolipides et lipoglycannes à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol de *M. marinum* ont démontré quelques spécificités liées à l'espèce. En particulier, le domaine mannane du lipomannane (LM) semble être substitué par des résidus d' $\alpha$ -5-déoxy-méthylthio-xylofuranose (MTP) comme pour le LM de *M. kansasii* (Guerardel *et al.*, 2003). Concernant le LAM, nos études ont d'abord confirmé que le domaine arabinane était substitué par une coiffe oligomannosidique. Nous avons également démontré une substitution par le MTP et par des groupements succinates. Ces derniers substituent des résidus d' $\alpha$ -5-Araf en position C-3 comme décrit dans le ManLAM chez *M. kansasii*, et non en C-2 comme pour le ManLAM de *M. bovis* BCG. Les monosaccharides substitués par le MTP doivent encore être identifiés. Au vue de ces résultats partiels, des analyses complémentaires par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse seront nécessaires pour préciser la structure du LM et du LAM de *M. marinum*.

dans le DMSO pour le LM et le LAM. Dans toutes les expériences, le tétraméthylsilane a été utilisé comme standard interne). MTP :  $\alpha$ -5-déoxy-méthylthio-xylofuranose ; inositol dimannosides tri- et tétra-acylés (Ac<sub>3</sub>PIM<sub>2</sub> et AC<sub>4</sub>PIM<sub>2</sub>) et du phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannosides tétra-acylés (Ac<sub>4</sub>PIM<sub>6</sub>), du lipomannane (LM) et du lipoarabinomanne (LAM) de M. marinum (Mesurées à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1 ; v/v) pour les PIMs et à 343°K Tableau IV-4 : Valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (en ppm) des signaux anomères des monosaccharides phosphatidyl-*myo*-Succ : succinylé.

	Résidus	$\alpha$ -Manp 1	$\alpha$ -Manp 2	2 de Gro	3 de Ins	α-Manp 3	$\alpha$ -Manp 4	$\alpha$ -Manp 5	$\alpha$ -Manp 6	t- $\alpha$ -Manp IV	$6-\alpha$ -Manp $VI_1$	VI2	2,6-α-Manp VIII	MTP	3 d'Ara succ	3,5- $\alpha$ -Araf I	5- $\alpha$ -Araf II <sub>1</sub>	$\Pi_2$	$\Pi_3$	2- $\alpha$ -Araf III <sub>1</sub>	III <sub>2</sub>	$\beta$ -Araf V	2-α-Mann VII
LAM	$H_{I}$	4.97	5.11	5.10	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	4.87	4.67	4.76	4.87	5.20	4.79	4.91	4.79	4.85	4.95	4.95	5.07	4.90	4.83
AC <sub>3</sub> Man	<sup>13</sup> C	101.6	100.7	71.7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	102.5	9.99	101.1	98.9	103.5	79.7	108.2	108.5	108.5	107.6	106.1	105.7	101.3	98.8
М	$H^{1}$	4.97	5.11	5.09	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	4.88	4.67	4.76	4.87	5.22									
$AC_{3}L$	<sup>13</sup> C	101.4	100.2	70.7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	102.1	9.66	8.66	99.4	103.6									
$M_6$	$H^{1}$	5.06	5.06	5.26	4.80	4.86	5.12	5.22	5.06														
$AC_4PI$	$^{13}$ C	101.4	101.4	69.7	70.7	99.2	97.4	100.5	101.4														
$M_2$	$H^{1}$	5.05	5.02	5.15	4.66					1													
$AC_4PI$	<sup>13</sup> C	101.1	101.4	70.3	71.3																		
$M_2$	$H^{1}$	5.12	5.08	5.24	N.D																		
AC <sub>3</sub> PI	<sup>13</sup> C	100.9	101.4	70.2	N.D																		
# **Chapitre V - Analyse structurale des**

glycolipides apolaires

# Chapitre V- Analyse structurale des glycolipides apolaires

L'étude des glycolipides apolaires de la souche témoin de *M. marinum* a été entreprise pour deux raisons. Premièrement, bien que les structures des glycolipides phénoliques (PGLs) et des tréhaloses mono- et di-mycolates (TMM et TDM) de *M. marinum* ont été décrites dans des études précédentes, leurs parties lipidiques peuvent varier selon la souche. Comme énoncé dans le chapitre II, des variations structurales discrètes des glycoconjugués pariétaux ont parfois des conséquences importantes sur la virulence des mycobactéries. Deuxièmement, au vue de la présence spécifique de glycoconjugués dans certaines espèces de mycobactéries, il était nécessaire de caractériser tous les glycolipides de la paroi de *M. marinum* afin de justifier son utilisation en tant que modèle d'étude. Lors de la purification des glycolipides apolaires nous avons mis en évidence une famille de glycolipides (X1, X2 et X3) encore non identifiés. La deuxième partie de ce chapitre présente l'analyse structurale des glycolipides X de *M. marinum*. Cette étude a été complétée par la caractérisation du composé X1 dans d'autres espèces de mycobactéries incluant *Mycobacterium bovis* BCG.

# A. Les glycolipides phénoliques et les tréhaloses dimycolates

# 1. Les glycolipides phénoliques (PGLs)

La purification du PGL de la souche M de *M.marinum* a permis de séparer deux glycolipides que nous avons appelé PGL-I pour le composé majoritaire et PGL-II pour le composé minoritaire (Figure V-1A).

#### a. Spectrométrie de masse

Dans un premier temps, les fractions PGL-I et PGL-II ont été analysées par spectrométrie de masse. L'analyse par MALDI-TOF-MS de la fraction PGL-I révèle la présence d'une série d'ions pseudo-moléculaires  $[M+Na]^+$  de m/z 1502, 1516, 1530, <u>1544</u>, 1558, <u>1572</u>, 1586, 1600, 1614, 1628, et 1642, dont les espèces majeures sont soulignées (Figure V-1B). Ces valeurs correspondent aux masses du PGL majeur de *M. marinum* 

composé d'un noyau lipidique phénolphtiocérol (Stinear *et al.*, 2007). Sur ce même spectre, une série minoritaire d'ions pseudo-moléculaires  $[M + Na]^+$  de m/z=1528, 1556 et 1584 indique la présence d'un autre PGL (Figure V-1B). Ces ions inferieurs de 16 unités de masse atomique (uma) peuvent correspondre à un PGL possédant un noyau lipidique de type phénolphtiodiolone.



Figure V-1 : (A) Chromatographie sur couche mince des fractions enrichies en PGL-I et PGL-II de la souche M de *Mycobacterium marinum* obtenue après une séparation sur une colonne de silice. La migration a été réalisée dans le solvant  $CHCl_3/CH_3OH$  (96:4; v/v) et les glycolipides ont été révélés par l'orcinol sulfurique. (B et C) Spectres MALDI-TOF-MS des fractions enrichies en PGL-I et PGL-II. Les masses (en uma) sont représentatives d'ions pseudo-moléculaires  $[M + Na]^+$ .

L'analyse par MALDI-TOF-MS de la fraction PGL-II révèle la présence d'une série d'ions pseudo-moléculaires  $[M + Na]^+$  de m/z= 1488, 1502, 1516, <u>1530</u>, 1544, <u>1558</u>, 1572, 1586, 1600, 1614 et 1628, dont les espèces majeures sont soulignées (Figure V-1C). Ces ions sont inférieurs de 14 uma à ceux du glycosylphénolphtiotriol diphtiocéranates de la fraction PGL-I. Cette différence peut s'expliquer par l'absence d'un groupe méthoxyle sur le noyau lipidique du PGL-II. Nous avons donc supposé que le PGL-II correspondait au glycosylphénolphtiotriol diphtiocéranates (Huet *et al.*, 2009).

#### b. Chromatographie en phase gazeuse

Les fractions PGL-I et PGL-II ont ensuite été analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC) afin de caractériser leurs parties glycanniques. Dans des études précédentes, la partie glycannique du PGL de *M. marinum* a été identifiée comme étant composée d'un unique 3-*O*-méthyl- $\alpha$ -L-Rhamnopyranose (Villé et Gastambide-Odier, 1970). Nous avons donc analysé la composition en monosaccharides des PGL-I et -II par GC-MS après hydrolyse, réduction et per-*O*-acétylation des échantillons. Pour les deux fractions, les chromatogrammes obtenus permettent de visualiser la présence d'un pic majeur (Figure V-2A). Le spectre de masse après ionisation électronique (EI-MS) donne des ions fragments de *m/z* 190, 203 et 262 qui caractérisent un 3-*O*-méthyl-6-déoxyhexose, probablement le 3-*O*-Me-Rhap (Figure V-2B).

De plus, la GC nous a permis de déterminer la longueur et le nombre de branchements constituant les acides gras polyméthylés des PGL-I et PGL-II. Les acides gras polyméthylés des PGLs de *M. marinum* sont des acides phtiocéraniques, énantiomères des acides mycocérosiques retrouvés dans les PGLs de *M. tuberculosis* (Daffe, 1991). La taille et le nombre de branchements varient entre les souches de *M. marinum* (Dobson *et al.*, 1990). Après méthanolyse, les acides phtiocéraniques des PGL-I et -II de la souche M de *M. marinum* ont été analysés par GC-MS. Des chromatogrammes similaires ont également été obtenus pour les deux échantillons (Figure V-3A). Ces chromatogrammes indiquent la présence d'un acide gras majoritaire à plus de 99% (Figure V-3B). Sur le spectre EI-MS, les ions fragments de *m/z* 88 (réarrangement de McLafferty), 101, 127 et 171 et l'ion pseudomoléculaire de *m/z* 424 démontrent que l'acide gras est un acide 2,4,6-triméthyl-phtiocéranique en C27 (Figure V-3B).



**Figure V-2 : Analyse par GC-MS du PGL-I de la souche M de** *Mycobacterium marinum* **après hydrolyse acide, réduction et per-***O***-acétylation.** (A) Chromatogramme de la fraction PGL-I. Un chromatogramme similaire a été obtenu pour la fraction PGL-II analysée dans les mêmes conditions. (B) Après impact électronique, l'interprétation des ions fragments (*m/z*) démontre que le monosaccharide est un 3-*O*-méthyl-6-déoxyhexose. (Cf. matériel et méthode programme température 2)

## c. Résonance magnétique nucléaire

Afin d'établir clairement la nature des noyaux lipidiques et du monosaccharide des PGL-I et -II, ces derniers ont été analysés par RMN du proton (Figure V-4B et 4C). Sur les spectres <sup>1</sup>H à une dimension, les signaux correspondants aux noyaux lipidiques (phénolphtioglycols) et aux acides gras polyméthylés ont été interprétés d'après une étude précédente de Dobson *et al.*, et sont annotés par les lettres (**a**) à (**l**) (Dobson *et al.*, 1990). Les signaux des protons correspondants à la partie glycannique sont annotés **H-1** à **H-6** pour le cycle monosaccharidique et O-CH<sub>3</sub> pour le méthyle du groupe méthoxyle. Les valeurs des déplacements chimiques des protons sont référencées dans les Tableaux V-1 et V-2.

Le spectre <sup>1</sup>H de la fraction PGL-I confirme la présence d'un noyau lipidique majoritaire de type phénolphtiocérol et un noyau minoritaire de type phénolphtiodiolone. En particulier, les signaux **b** (singulet) et **c** (multiplet) à 3.25 et 2.78 ppm, correspondent respectivement aux protons des groupes méthoxyle et méthine de la partie phtiocérol. Les signaux **g** (doublet) et **h** (triplet) de faibles intensités (0.97 et 2.38 ppm) sont représentatifs

des protons de groupes méthine et méthoxyle proches d'une fonction carbonyle, indiquant la présence d'un noyau phénolphtiodiolone.

Au contraire, le spectre <sup>1</sup>H de la fraction PGL-II ne montre aucun signal associé aux protons des noyaux lipidiques phénolphtiocérol ou phénolphtiodiolone (Figures V-4A et 4C). A la place, le signal **i** à 3.26 ppm, typique du proton d'un groupe méthine substitué par un hydroxyle démontre que le PGL-II est constitué d'un noyau lipidique de type phénolphtiotriol.

Afin de déterminer la nature du monosaccharide composant les PGL-I et -II, nous avons réalisé une expérience RMN <sup>1</sup>H à deux dimensions. Pour les deux fractions, les spectres <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 90 indiquent la présence d'un seul et même monosaccharide comme en témoigne les déplacements chimiques et les constantes de couplage vicinales  $({}^{3}J_{H-H})$  (Tableau V-2). Les constantes de couplages  ${}^{3}J_{H1-H2}$  et  ${}^{3}J_{H2-H3}$  petites (<5Hz) et  ${}^{3}J_{H3-H4}$  et  ${}^{3}J_{H4-H5}$  grandes démontrent sans ambiguité la configuration  $\alpha$ -mannose et la conformation  ${}^{4}C_{1}$  du cycle monosaccharidique (Koerner et al., 1983). Les protons H-6 à 1.22 ppm indiquent que le monosaccharide est désoxygéné en position C-6. Le monosaccharide de configuration amannose désoxygéné en position C-6 est aussi appelé  $\alpha$ -rhamnopyranose. Le signal à 3.48 ppm sur les spectres du protons des PGL-I et PGL-II est caractéristique du méthyle d'un groupe méthoxyle. Bien que les expériences RMN réalisées ne permettent pas d'affirmer que le méthyle substitue l'hydroxyle en position C-3 de l'α-rhamnopyranose, le déplacement chimique légèrement déblindé du H-3 similaire ( $\Delta\delta$ =0.02) à celui de l' $\alpha$ -3-O-Me-Rhap des LOSs tend à le démontrer (Rombouts et al., 2009). De plus, les informations obtenues par RMN couplées avec celles de la GC-MS identifient clairement le monosaccharide comme étant un  $\alpha$ -3-O-Me-rhamnopyranose.



Acide 2,4,6-triméthylphtiocéranique en C27

**Figure V-3 : Analyse par GC-MS du PGL-II de la souche M de** *Mycobacterium marinum* **après méthanolyse**. (A) Le chromatogramme montre la présence d'un pic majeur correspondant à un acide gras polyméthylé. Un chromatogramme similaire a été obtenu pour la fraction PGL-I analysée dans les mêmes conditions. (B) Après impact électronique, l'interprétation des ions fragments (m/z) démontrent que l'acide gras est un 2,4,6-triméthyl-phtiocéranate en C27. (Cf. matériel et méthode programme température 1)





spectres RMN H du POL-I (B) et du POL-II (C) realisés à 300 K dans le CDCl<sub>3</sub> en duffisant le tetramethylshane comme standard interne. Les lettres (**a-l**) correspondent aux résonances des protons décrits dans les structures des PGLs en (A). Les annotations **H-1** à **H-5** et OCH<sub>3</sub> correspondent aux protons du cycle et au groupe méthoxyle de l' $\alpha$ -3-*O*-méthyl-Rhap. Les déplacements chimiques des protons appartenant à la partie lipidique (**a-l**) et au monosaccharide des PGLs sont respectivement résumés dans les **Tableaux IV-1** et **IV-2**. \* correspond à un proton non identifié

Tableau V-1 : Valeurs des déplace	cements	chimiques of	lu <sup>1</sup> F	l (en	(mdd	de la	a part	ie lipidio	que de	s PGL	I et P	<b>GL-II</b>	de la	souche	M
Mycobacterium marinum (mesurées à	à 300°K da	ns le CDCl <sub>3</sub> er	utilis.	ant le t	étramét	hylsila	ne comr	ne standare	d interne	). Les le	tres (a-l	corres)	ponden	t aux prot	nob anc
les résonances sont annotées sur les spectres	s RMN de l	a Figure V-4.													

	ອ	q	ပ	q	Ð	÷	σ	٩			×	_
PGL-I	4.81	3.25	2.78	2.47	0.8-0.9	1.07	0.97	2.38			6.90	7.03
PGL-II	4.81			2.47	0.8-0.9	1.07			3.26	06.0	6.90	7.03

Tableau V-2: Valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H (en ppm) et des constantes de couplages (en Hz) de l' $\alpha$ -3-O-méthylrhamnopyranose des PGL-I et PGL-II de la souche M de Mycobacterium marinum (mesurées à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub> en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne). Les valeurs entre parenthèses (en Hz) correspondent aux constantes de couplages vicinales des protons.

$({}^{3}J_{H1-H2})$		ř	H-4	ς Γ	Н-6	0-CH <sub>3</sub>
	( <sup>3</sup> J <sub>H2-H3</sub> )	( <sup>3</sup> J <sub>H3-H4</sub> )	( <sup>3</sup> J <sub>H4-H5</sub> )			
<b>PGL-I</b> 5.47	4.18	3.53	3.50	3.75	1.22	3.48
(1.7)	(3.8)	-10	(6~)			
<b>PGL-II</b> 5.47	4.18	3.53	3.50	3.75	1.22	3.48
(1.7)	(3.9)	(6.6)	(6~)			

## d. Conclusion

Comme décrit dans la littérature, nous avons identifié trois PGLs qui diffèrent par la nature du noyau phénolphtioglycol (Dobson *et al.*, 1990). Deux d'entres eux ont été copurifiés dans la fraction PGL-I alors que le troisième a été séparé dans la fraction PGL-II. L'analyse structurale de la fraction PGL-I a permis de caractériser le PGL majoritaire comme étant le 3-*O*-méthyl- $\alpha$ -Rhap-phénolphtiocérol diphtiocéranates et le PGL minoritaire comme étant le 3-*O*-méthyl- $\alpha$ -Rhap-phénolphtiodiolone diphtiocéranates. L'étude structurale de la seconde fraction de purification (PGL-II) a mis en évidence un unique composé, le 3-*O*méthyl- $\alpha$ -Rhap-phénolphtiocéranates. Les trois PGLs de cette souche sont composés en très large majorité d'acides 2,4,6-triméthyl-phtiocéranate en C27. L'estérification des PGLs par un unique acide gras de type C27 2,4,6-triméthyl-phtiocéranate a déjà été observée dans la souche MMN 842 de *M. marinum* (Dobson *et al.*, 1990). L'étude structurale des PGLs de *M.marinum* et de leurs équivalents non glycosylés, les phtioglycols diphtiocéranates (DIMs), a fait l'objet d'une publication soumise dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Laurent Kremer (résumé en annexe).

# 2. Le tréhalose di-mycolates (TDM)

# a. Résonance magnétique nucléaire

A la suite de sa purification, le TDM de la souche M de *M.marinum* a été analysé par des expériences RMN homonucléaires <sup>1</sup>H (Figure V-5) mono- et bi-dimensionnelles et hétéronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C à deux dimensions. Les signaux correspondants aux acides mycoliques ont été identifiés d'après une étude précédente de Watanabe *et al.*, et annotés par les lettres (**a**) à (**y**) (Watanabe *et al.*, 2001). Les signaux **H-1** à **H-6** correspondent aux protons des deux  $\alpha$ -glucopyranoses du tréhalose. Les valeurs des déplacements chimiques des protons appartenant aux acides mycoliques et au tréhalose sont référencées dans les Tableaux V-3 et V-4 respectivement.

Le spectre <sup>1</sup>H du TDM à une dimension démontre la présence de cinq groupements fonctionnels appartenant aux familles d'acides mycoliques alpha ( $\alpha$ -mycolates), cétoniques (cétomycolates) et méthoxylés (méthoxymycolates) (Figure V-5 ; Tableau V-3). Les signaux **k** et **n** à 5.34 et 5.23 ppm correspondent aux protons des groupes méthine des fonctions *cis* et *trans*-éthyléniques ; le signal **i** à -0.33 ppm est caractéristique d'un des deux protons du groupe méthylène d'une fonction *cis*-cyclopropane ; les protons **s** et **t** à 2.95 et 3.33 ppm appartiennent respectivement à un groupe méthine substitué par un méthoxyle et au groupe méthyle du méthoxyle; enfin, les signaux **w** et **y** à 2.49 et 2.40 ppm correspondent aux protons des groupes méthine et méthylène voisins d'une fonction *cé*one. En accord avec des études précédentes, aucun signal associé aux protons de la fonction *trans*-cyclopropane n'a été observé sur le spectre RMN (Daffe *et al.*, 1991a).

Afin de quantifier la proportion de chaque famille d'acides mycoliques, nous avons intégré les signaux des protons **i**, **s** et **w** représentatifs des  $\alpha$ -, méthoxy- et céto-mycolates chez *M*. *marinum* (Figure V-5 et Tableau V-3) (Daffe *et al.*, 1991a; Watanabe *et al.*, 2002). Les intégrations ont été normalisées sur le signal **b** du proton du groupe méthine en C-2 des acides mycoliques. Ainsi, nous avons défini que cette fraction purifiée de TDM de la souche M de *M.marinum* est constituée à 38 % d' $\alpha$ -mycolates, à 44 % de céto-mycolates et à 18% de méthoxy-mycolates.





**Tableau V-3 : Valeurs des déplacements chimiques du** <sup>1</sup>**H (en ppm) des acides mycoliques du TDM et du glycolipide X1 de la souche M de** *Mycobacterium marinum* (mesurées à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub> en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne). Les lettres (a-y) correspondent aux protons dont les résonances sont annotées sur les spectres RMN des Figures V-5 et V-9.

Groupes et fonctions chimiques	Signaux <sup>1</sup> H	TDM	X1
	а	2,43	2,43
	b	3,71	3,69
Communs à tous les acides	C	1,55	1,55
mycoliques	d	1,35	1,35
	е	1,25	1,25
	f	0,88	0,89
	g	0,64	0,64
<i>cis</i> -cyclopropane	h	0,56	0,56
	i	-0,33	-0,33
	j	2,01	2,01
	k	5,34	5,34
	I	1,95	1,95
cis- et <i>trans-</i> éthylènes	m	5,33	5,33
	n	5,23	5,23
	ο	2,02	2,02
	р	0,93	0,93
	q	1,63	1,63
	r	0,84	0,84
méthoxyle	s	2,95	2,95
	t	3,33	3,33
	u	1,40	1,40
cétone	v	1,62	1,62
	w	2,49	2,50
	x	1,04	1,04
	У	2,40	2,40

Les systèmes de spins, déplacements chimiques et constantes de couplages de deux  $\alpha$ glucopyranoses ( $\alpha$ -Glcp) du TDM ont été identifiés à partir des données expérimentales des spectres homonucléaire <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 90 et hétéronucléaire <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC. Comme le présente le Tableau V-4, les paramètres RMN des deux monosaccharides n'ont pas pu être discernés. Par comparaison avec les déplacements chimiques des  $\alpha$ -Glcp d'un tréhalose, les déplacements chimiques déblindés des carbones C-6 de  $\Delta\delta$ = +2.5 des  $\alpha$ -Glcp du TDM démontrent qu'ils sont estérifiés en position 6 (Bradbury et Jenkins, 1984).

Tableau V-4 : Valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (en ppm) et des constantes de couplages (en Hz) des  $\alpha$ -6-O-mycolyl-glucopyranoses du TDM de *Mycobacterium marinum* (measurées à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub> en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux constantes de couplages vicinales.

	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
	( <sup>3</sup> J <sub>H1-H2</sub> )	( <sup>3</sup> Ј <sub>н2-н3</sub> )	( <sup>3</sup> J <sub>H3-H4</sub> )	( <sup>3</sup> J <sub>H4-H5</sub> )		
том	5.07/93.7	3.54/71.1	3.87/72.5	3.31/70.7	4.07/70.1	4.68, 4.03 /64.0
1 Din	(1.7)	(-11)	(-10)	(~9)		

#### b. Spectrométrie de masse

Afin de caractériser la taille des acides mycoliques, ces derniers ont été libérés, méthyl-estérifiés et analysés par spectrométrie de masse (Figure V-6). L'analyse MALDI-TOF-MS des acides mycoliques méthyl-estérifiés démontre que les  $\alpha$ -mycolates sont constitués de 74 à 80 carbones, les céto-mycolates de 78 à 86 carbones et les méthoxy-mycolates de 79 à 87 carbones (Tableau V-5).

L'obtention du nombre de carbones dans chaque famille d'acides mycoliques a permis de calculer les différentes masses possibles du TDM de la souche M de *Mycobacterium marinum*. (Tableau V-6). A partir de ces valeurs théoriques, nous avons interprété les massifs de masses obtenus par l'analyse du TDM en spectrométrie de masse (Figure V-7A).



Figure V-6 : Spectres de masse (MALDI-TOF) des acides mycoliques méthyl-estérifiés du TDM (à gauche) et du glycolipide X1 (à **droite).** Les signaux ont été attribués aux trois familles d'acides mycoliques de *M. marinum* ( $\alpha$ = alpha, m= méthoxy et k=céto). Les chiffres représentent le nombre de carbones des acides mycoliques. Les masses correspondantes sont décrites dans le Tableau V-5.

Tableau V-5: Attribution des signaux observés par spectrométrie de masse (MALDI-MS) des acides mycoliques méthyl-estérifiés provenant du TDM et du glycolipide X1 de la souche M de *Mycobacterium*. Les valeurs (en uma) représentent les masses pseudo-moléculaires [M + Na]<sup>+</sup> des acides mycoliques méthyl-estérifiés.  $\alpha$  = alpha ; m= méthoxy; k= céto. Les acides mycoliques majeurs de chaque famille sont en gras.

-																
	Acides						Nom	bre de ce	arbones							
		74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	%
	ъ	1118	1132	1146	1160	1174	1188	1202								38
TDM	¥					1190	1204	1218	1232	1246	1260	1274	1288	1302	1	44
	E						1206		1234		1262		1290		1318	18
	σ	1118	1132	1146	1160	1174	1188	1202								34
X1	k					1190	1204	1218	1232	1246	1260	1274	1288	1302	L	54
	E						1206		1234		1262		1290		1318	12

256



**Figure V-7 : Spectres de masse (MALDI-TOF) du TDM (en haut) et du glycolipide X1 (en bas).** Les valeurs (en uma) correspondent aux masses pseudo-moléculaires [M + Na]<sup>+</sup> interprétées dans les **Tableaux V-6 et V-8**.

## c. Conclusion

L'étude structurale du TDM de la souche M de *M. marinum* a mis en évidence la présence d' $\alpha$ -, méthoxy- et céto-mycolates. Les mêmes familles d'acides mycoliques avaient été identifiées dans d'autres souches de *M. marinum* (Daffe *et al.*, 1991a; Watanabe *et al.*, 2002). L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire a permis de définir les familles d'acides mycoliques et d'obtenir leurs quantifications relatives. Cependant, des différences de quantité relative ont été observées dans chaque fraction de TDM préparée. Ces variations sont principalement dues à la méthode de purification qui mériterait d'être optimisée. Le spectre de masse des acides mycoliques libérés du TDM démontre qu'ils sont constitués de 74 à 87 carbones (Tableau V-5). L'identification de céto-mycolates possédant un nombre impair de carbones est en accord avec la structure des acides mycoliques de *M. marinum* décrite par Daffé *et al.*, 1991a). La caractérisation structurale des acides mycoliques, nous a permis d'interpréter le spectre de masse du glycolipide natif et de définir clairement la composition de chaque molécule du TDM (Figure V-7 et Tableau V-6).

Tableau V-6 : Attribution des signaux observés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) du TDM de la souche M de *Mycobacterium marinum*. Les valeurs (en uma) représentent les masses pseudo-moléculaires  $[M + Na]^+$  du TDM. Chaque masse a été corrélée avec la présence de deux acides mycoliques des familles alpha ( $\alpha$ ), méthoxy (m) et céto (k). Les chiffres représentent le nombre de carbones des acides mycoliques. Les masses correspondantes aux acides mycoliques sont décrites dans le Tableau V-5. Le spectre de masse du TDM est présenté dans la Figure V-7.

2491 α74:α74   2505 α74:α75	
2505 α74:α75	
$  2519   \alpha 74: \alpha 76   \alpha 75: \alpha 75$	
2533 α74:α77 α75:α76	
2547 α74:α78 α75:α77 α76:α76	
2561 α74:α79 α75:α78 α76:α77	
2563 α74:k78	
2575 α74:α80 α75:α79 α76:α78 α77:α77	
2577 α74:k79 α75:k78	
2579 α74:m79	
2589 α75:α80 α76:α79 α77:α78	
2591 α74:k80 α75:k79 α76:k78	
2593 α75:m79	
2603 α76:α80 α77:α79 α78:α78	
2605 α74:k81 α75:k80 α76:k79 α77:k78	
2607 $\alpha$ 74:m81 $\alpha$ 76:m79	
2617 α77:α80 α78:α79	
2619 α74:k82 α75:k81 α76:k80 α77:k79 α78:k78	
2621 α75:m81 α77:m79	
2631 α78:α80 α79:α79	
2633 α74:k83 α75:k82 α76:k81 α77:k80 α78:k79 α79:k78	
2635 α74:m83 α76:m81 α78:m79 k78:k78	
2645 α79:α80	
2647 α74:k84 α75:k83 α76:k82 α77:k81 α78:k80 α79:k79 α80:k7	78
2649 $\alpha$ 75:m83 $\alpha$ 77:m81 $\alpha$ 79:m79 k79:k78	
2651 k78:m79	
2659 α80:α80	
$2661  \alpha 74:k85  \alpha 75:k84  \alpha 76:k83  \alpha 77:k82  \alpha 78:k81  \alpha 79:k80  \alpha 80:k7$	79
2663 $\alpha$ 74:m85 $\alpha$ 76:m83 $\alpha$ 78:m81 $\alpha$ 80:m79 k78:k79	
2665 k79:m79	
2667 m/9:m/9	~~
$26/5$ $\alpha/4:k86$ $\alpha/5:k85$ $\alpha/6:k84$ $\alpha/7:k83$ $\alpha/8:k82$ $\alpha/9:k81$ $\alpha80:k8$	80
$2677 \alpha/5:m85 \alpha/7:m83 \alpha/9:m81 k80:k78 k79:k79$	
26/9 K/8:m81 K80:m/9	
$2009  \alpha/5:K80  \alpha/6:K85  \alpha/1:K84  \alpha/8:K83  \alpha/9:K82  \alpha80:K81 \\ 2004  -74:m 07  -70:m 05  -70:m 02  00:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -74:m 07  -70:m 05  -70:m 02  00:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -74:m 07  -70:m 05  -70:m 02  00:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -74:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -74:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -74:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -74:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -76:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -76:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -76:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k90:k61 \\ -76:m 07  -70:m 05  -70:m 04  k70:k92  k70:k94  k70:k94$	20
$2691$ $\alpha/4:m87$ $\alpha/6:m85$ $\alpha/8:m83$ $\alpha80:m81$ K/8:K82 K/9:K81 K80:K8	30
2605 K/9.1110 K01.111/9 2605 m70·m81	
2030 mm 3.mo 1 2703 a76·k86 a77·k85 a77·k84 a78·k83 a80·k82	
$2705$ $\alpha75$ m87 $\alpha77$ m85 $\alpha70$ m83 $k78$ k83 $k70$ k80 k81	
2707 k78·m83 k80·m81 k82·m79	

Masses du TDM (suite)			Types d	'acides my (suite)	coliques		
2717	α77:k86	α78:k85	α79:k84	α80:k83			
2719	α76:m87	α78:m85	α80:m83	k78:k84	k79:k83	k80:k82	k81:k81
2721	k79:m83	k81:m81	k83:m79				
2723	m79:m83	m81:m81					
2731	α78:k86	α79:k85	α80:k84				
2733	α77:m87	α79:m85	k78:k85	k79:k84	k80:k83	k81:k82	
2735	k78:m85	k80:m83	k82:m81	k84:m79			
2745	α79:k86	α80:k85					
2747	α78:m87	α80:m85	k78:k86	k79:k85	k80:k84	k81:k83	k82:k82
2749	k79:m85	k81:m83	k83:m81	k85:m79			
2751	m79:m85	m81:m83					
2759	α80:k86						
2761	α79:m87	k79:k86	k80:k85	k81:k84	k82:k83		
2763	k78:m87	k80:m85	k82:m83	k84:m81	k86:m79		
2775	α80:m87	k80:k86	k81:k85	k82:k84	k83:k83		
2777	k79:m87	k81:m85	k83:m83	k85:m81			
2779	m79:m87	m81:m85	m83:m83				
2789	k81:k86	k82:k85	k83:k84				
2791	k80:m87	k82:m85	k84:m83	k86:m81			
2803	k82:k86	k83:k85	k84:k84				
2805	k81:m87	k83:m85	k85:m83				
2807	m81:m87	m83:m85					
2817	k83:k86	k84:k85					
2819	k82:m87	k84:m85	k86:m83				
2831	k84:k86	k85:k85					
2833	k83:m87	K85:m85					
2835	m83:m87	m85:m85					
2845	K85:K86	1.00.000					
2047	KO4:MO/	K00:M05					
2009	KOO.KOO						
200 I	KOJ.[[]Ŏ/						
2003 2875	11100.11107						
2010	m87·m97						
2091	101.101						

# **B.** Etude du glycolipide X1 : description d'une nouvelle famille de glycolipides chez *Mycobacterium marinum*

# 1. Analyse structurale du glycolipide X1

L'analyse par chromatographie couche mince (CCM) des glycolipides apolaires de M. marinum a permis de mettre en évidence un glycolipide X<sub>1</sub> de polarité intermédiaire entre le PGL et le TDM, présent en quantité non négligeable (Figure V-8A). Ce glycolipide se colore spécifiquement en bleu à l'orcinol sulfurique. Cette coloration est en générale caractéristique de certains monosaccharides tels que les pentoses et les acides sialiques (Bruckner, 1955). Afin de déterminer la nature du glycolipide X<sub>1</sub>, ce dernier a été purifié par chromatographie d'adsorption sur colonne de silice puis par chromatographie préparative sur couche mince. Le glycolipide X1 a ensuite été analysé par spectrométrie de masse (MS), chromatographie en phase gazeuse (GC) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

# a. Spectrométrie de masse

L'analyse MALDI-TOF-MS du glycolipide X1 révèle la présence d'une série d'ions pseudomoléculaires [M+Na]<sup>+</sup> similaire à celle observée pour le TDM (Figure V-7). Toutefois, le profil de masse diffère d'une valeur moyenne de +14 uma par rapport à celui obtenu pour le TDM. Les valeurs élevées des masses de X1 suggèrent fortement que ce glycolipide contient des acides mycoliques. Pour confirmer cette hypothèse, les acides mycoliques ont été libérés et analysés par spectrométrie de masse. L'analyse MALDI-TOF-MS démontre que des acides mycoliques de masses identiques à ceux du TDM (Figure V-6 et Tableau V-5) entrent dans la composition du glycolipide X1.



#### Figure V-8 : Analyse chromatographique du glycolipide X1

(A) Chromatographie sur couche mince des PGLs, du TDM et du glycolipide X1 après migration dans le solvant chloroforme/méthanol (96 :4, v/v). Les glycolipides ont été révélés par l'orcinol sulfurique. (B) Analyse par GC de la composition en monosaccharides du glycolipide X1 après méthanolyse et dérivation par l'anhydride heptafluorobutyrique. La lysine est utilisée comme étalon interne (C) Analyse par GC-MS de la séquence monosaccharidique du glycolipide X1 après déacylation et per-*O*-acétylation de l'échantillon. Les ions fragments du pic majoritaire révèlent une séquence de type arabinose-arabinose-glycérol. Les liaisons proposées sur le schéma sont indicatives à ce stade de l'analyse. (Cf. matériel et méthode programme température 3)

# b. Chromatographie en phase gazeuse

Afin de déterminer la nature des monosaccharides du glycolipide X1, nous avons procédé à une analyse de composition molaire par GC après méthanolyse et dérivation de l'échantillon par l'anhydride heptafluorobutyrique. L'analyse chromatographique révèle la présence majoritaire de glycérol et d'arabinose (Figure V-8B). Les pics de glucose ont été interprétés comme provenant d'une contamination. Une analyse par GC-MS a confirmé la nature des constituants.

La masse du glycolipide X1 et sa composition en glycérol, arabinose et acides mycoliques, nous a orienté vers un glycolipide décrit chez *M. avium-intracellulare* : le 5-*O*mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol (Watanabe *et al.*, 1992). Dans le but de vérifier cette structure, nous avons analysé la séquence du glycolipide X1 par GC-MS après déacylation et peracétylation de l'échantillon (Figure V-8C). Le chromatogramme obtenu montre la présence d'un pic unique. L'analyse des ions fragments après impact électronique confirme une séquence glycannique de type pentose-pentoseglycérol.





## c. Résonance magnétique nucléaire

Comme pour le TDM, le spectre proton à une dimension du glycolipide X1 montre la présence de signaux correspondants aux  $\alpha$ -, méthoxy- et céto-mycolates, annotés par les lettres (a) à (y) (Figure V-9 et Tableau V-3). Afin de simplifier nos études structurales, la partie glycannique de X1 a d'abord été étudiée après déacylation de l'échantillon et purification du glycanne sur colonne de charbon. Le spectre <sup>1</sup>H du glycolipide X1 déacylé (Figure V-10A) permet de visualiser deux protons anomères à 5.12 et 5.13 ppm (Tableau V-7). Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY (Figure V-10B), la constante vicinale  ${}^{3}J_{H1-H2}$  du proton à 5.12 ppm est d'environ 2,5 Hz, ce qui indique une anomérie de type  $\alpha$ . Par contre, la constante vicinale  ${}^{3}J_{H1-H2}$  du proton à 5.13 ppm est supérieure à 5 Hz témoignant d'une anomérie  $\beta$ . La lecture des déplacements chimiques sur les spectres COSY 90, COSY relayés et TOCSY a permis de déterminer les systèmes de spins et la nature pentasaccharidique des deux résidus (Figure V-10B). Les déplacements chimiques des protons et carbones des deux pentoses ont été identifiés par des expériences hétéronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (Figure V-10C). Les valeurs des déplacements chimiques <sup>13</sup>C des deux monosaccharides sont caractéristiques de résidus d'arabinofuranose (Araf) impliqués dans une liaison (Bock et al., 1983). En particulier, le déplacement chimique des C-4 des deux arabinoses au-delà de 80.0 ppm indique une conformation furane (Tableau V-7). De plus, les corrélations vicinales  ${}^{3}J_{H-C}$  observées sur les spectres <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC entre les H-1 des deux arabinoses et leurs C-4 respectifs confirment la nature furanique des cycles (données non présentées). Enfin, le déblindage ( $\Delta\delta$ = +6.4) du C-2 du résidu d' $\alpha$ -Araf par rapport à un  $\alpha$ -Araf terminal indique une substitution sur cette position (Tableau V-7) (Bock et al., 1983). En plus des signaux correspondants aux Araf, les spectres <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYs et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC ont permis d'identifier le système de spin et les déplacements chimiques <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C d'un groupement glycérol (Gro) (Figure V-10C, Tableau V-7). Le glissement chimique du C-1 supérieur de 6 ppm par rapport à celui du C-3 démontre une substitution en position C-1 (Tableau V-7). Ces informations ainsi que celles obtenues par GC-MS indiquent de manière formelle la séquence  $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')glycérol.



**Figure V-10 : Zoom des spectres RMN** <sup>1</sup>**H (A)**, <sup>1</sup>**H-**<sup>1</sup>**H TOCSY (B)**, <sup>1</sup>**H-**<sup>13</sup>**C HSQC (C) du glycolipide X1 déacylé et** <sup>1</sup>**H-**<sup>13</sup>**C HSQC (D) du glycolipide X1 natif de la souche M de** *M. marinum.* Les spectres A, B et C ont été réalisés à 300°K dans le D<sub>2</sub>O en utilisant l'acétone comme standard interne. Le spectre D a été réalisé à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub> en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne. Ara : Arabinofuranose ; Gro : Glycérol. Les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplages sont référencées dans le Tableau V-7.

Le corps glycannique de X1 étant désormais connu, l'interprétation des spectres de masse (Figure V-7) démontrent que ce glycolipide contient deux acides mycoliques (Tableau V-8). Afin de déterminer les deux positions d'estérification du  $\beta$ -D-Ara*f*-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Ara*f*-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol par les acides mycoliques, nous avons procédé à de nouvelles analyses RMN sur le glycolipide X1 natif. En utilisant la même approche que pour le glycolipide déacylé, nous avons identifié les déplacements chimiques <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C du corps glycannique. En tenant compte du changement de solvant de solubilisation lors des expériences RMN, la comparaison des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du corps glycannique de X1 natif et X1 déacylé indique formellement que les deux résidus d'Ara*f* sont substitués en position C-5. En effet, les variations de déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) de +0.51 à +0.55 ppm des H-5 des résidus d'Ara*f* de X1 natif par rapport aux H-5 des Ara*f* de X1 déacylé, sont en accord avec une substitution en cette position. De même, les glissements chimiques des C-5 des Ara*f* sont supérieurs de  $\Delta\delta$ = +2.8 et +3.0 dans la forme acylée.

En conclusion, les analyses par RMN démontrent clairement que le glycolipide X1 est un 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Ara*f*-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Ara*f*-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol.

Tableau V-7 : Valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (en ppm) du glycolipide X1 déacylé (β-D-Araf-(1→2)-α-D-Araf-(1↔1')-glycérol) et du glycolipide X1 natif (5-*O*-mycolyl-β-D-Araf-(1→2)-5-*O*-mycolyl-α-D-Araf-(1↔1')-glycérol) de *Mycobacterium marinum* (mesurées respectivement à 300°K dans le D<sub>2</sub>O en utilisant l'acétone comme standard interne et à 300 K dans le CDCl<sub>3</sub> en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne).

		2	X1 Déacylé					X1 Natif		
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5
β-Ara <i>f</i>	5.13/102.4	4.14/77.4	4.05/75.6	3.90/83.4	3.79, 3.66/64,1	5.06/103.1	4.08/78.1	4.05/77.3	4.05/80.7	4.30, 4.21/66,9
α-Araf	5.12/107.1	4.18/88.2	4.12/76.2	4.06/ <b>84.0</b>	3.84, 3.73/62.0	5.07/107.7	4.05/89.7	4.07/77.1	4.15/ <b>81.3</b>	4.39, 4.24/65.0
Glycérol (Gro)	3.73, 3.64/69.8	3.91/71.5	3.60, 3.69/63.8			3.70, 3.60/70.5	3.83/71.5	3.62, 3.57/64.4		

Tableau V-8 : Attribution des signaux observés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) du glycolipide X1 de la souche M de *Mycobacterium marinum*. Les valeurs (en uma) représentent les masses pseudo-moléculaires  $[M + Na]^+$  de X1. Chaque masse a été corrélée avec la présence de deux acides mycoliques des familles alpha ( $\alpha$ ), méthoxyle (m) et cétone (k). Les chiffres représentent le nombre de carbones des acides mycoliques. Les masses correspondantes aux acides mycoliques sont décrites dans le **Tableau V-5**. Le spectre de masse du glycolipide X1 est présenté dans la **Figure V-7**.

Masses de X1			Types o	d'acides myc	oliques		
2505	α74:α74						
2519	α74:α75						
2533	α74:α76	α75:α75					
2547	α74:α77	α75:α76					
2561	α74:α78	α75:α77	α76:α76				
2575	α74:α79	α75:α78	α76:α77				
2577	α74:k78						
2589	α74:α80	α75:α79	α76:α78	α77:α77			
2591	α74:k79	α75:k78					
2593	α74:m79						
2603	α75:α80	α76:α79	α77:α78				
2605	α74:k80	α75:k79	α76:k78				
2607	α75:m79						
2617	α76:α80	α77:α79	α78:α78				
2619	α74:k81	α75:k80	α76:k79	α77:k78			
2621	α74:m81	α76:m79					
2631	α77:α80	α78:α79					
2633	α74:k82	α75:k81	α76:k80	α77:k79	α78:k78		
2635	α75:m81	α77:m79					
2645	α78:α80	α79:α79					
2647	α74:k83	α75:k82	α76:k81	α77:k80	α78:k79	α79:k78	
2649	α74:m83	α76:m81	α78:m79	k78:k78			
2659	α79:α80						
2661	α74:k84	α75:k83	α76:k82	α77:k81	α78:k80	α79:k79	α80:k78
2663	α75:m83	α77:m81	α79:m79	k79:k78			
2665	k78:m79						
2673	α80:α80						
2675	α74:k85	α75:k84	α76:k83	α77:k82	α78:k81	α79:k80	α80:k79
2677	α74:m85	α76:m83	α78:m81	α80:m79	k78:k79		
2679	k79:m79						
2681	m79:m79						
2689	α74:k86	α75:k85	α76:k84	α77:k83	α78:k82	α79:k81	α80:k80
2691	α75:m85	α77:m83	α79:m81	k80:k78	k79:k79		
2693	k78:m81	k80:m79					
2703	α75:k86	α76:k85	α77:k84	α78:k83	α79:k82	α80:k81	
2705	α74:m87	α76:m85	α78:m83	α80:m81	k78:k82	k79:k81	k80:k80
2/07	k/9:m81	k81:m79					
2709	m/9:m81						

Masses de X1 (suite)			Types d'ac	ides mycoliq	ues (suite)		
2717	a76.k86	a77.k85	a77.k84	a78.k83	a80.k82		
2710	a75:m87	a77:m85	$\alpha 70 \cdot m83$	k78·k83	k79.k82	k80.k81	
2721	k78·m83	k80.m81	k82·m79	K70.K00	K7 0.102	100.101	
2721	a77:k86	a78.k85	~79·k84	~80·k83			
2733	a76:m87	$\alpha 78 m 85$	a80:m83	k78·k84	k79.k83	k80.k82	k81·k81
2735	k79.m83	k81.m81	k83·m79	K70.K04	K7 5.K05	R00.R02	KOT.KOT
2737	m79·m83	m81·m81	K00.1117 0				
2745	α78·k86	α79·k85	α80·k84				
2747	α77·m87	$\alpha$ 79·m85	k78 <sup>.</sup> k85	k79 <sup>.</sup> k84	k80.k83	k81·k82	
2749	k78 <sup>·</sup> m85	k80.m83	k82·m81	k84·m79	Reentee		
2759	α79 <sup>.</sup> k86	α80 <sup>.</sup> k85					
2761	$\alpha$ 78·m87	$\alpha 80^{\circ}m85$	k78:k86	k79:k85	k80:k84	k81:k83	k82:k82
2763	k79:m85	k81:m83	k83:m81	k85:m79			
2765	m79:m85	m81:m83					
2773	α80:k86						
2775	α79:m87	k79:k86	k80:k85	k81:k84	k82:k83		
2777	k78:m87	k80:m85	k82:m83	k84:m81	k86:m79		
2789	α80:m87	k80:k86	k81:k85	k82:k84	k83:k83		
2791	k79:m87	k81:m85	k83:m83	k85:m81			
2793	m79:m87	m81:m85	m83:m83				
2803	k81:k86	k82:k85	k83:k84				
2805	k80:m87	k82:m85	k84:m83	k86:m81			
2817	k82:k86	k83:k85	k84:k84				
2819	k81:m87	k83:m85	k85:m83				
2821	m81:m87	m83:m85					
2831	k83:k86	k84:k85					
2833	k82:m87	k84:m85	k86:m83				
2845	k84:k86	k85:k85					
2847	k83:m87	k85:m85					
2849	m83:m87	m85:m85					
2859	K85:K86	1.00.000					
2001	K84:M87	K80:M85					
2013 2875	KOU.KOU						
2075	m85·m87						
2889	k86.m87						
2905	m87:m87						

# 2. Etude structurale des glycolipides X2 et X3

La purification des glycolipides apolaires a permis d'isoler deux glycolipides mineurs (X2 et X3) qui se colorent également en bleu à l'orcinol sulfurique (Figure V-11). Par analogie, nous avons supposé qu'ils étaient apparentés au glycolipide X1. Les composés X2 et X3 ont été plus difficiles à purifier en raison de leur polarité proche de celle du TDM (Figure V-11). Après avoir réalisé deux chromatographies d'absorption sur gel de silice, la purification des glycolipides a été finalisée par chromatographie préparative sur couche mince. Les paragraphes suivants concernent l'analyse structurale préliminaire des glycolipides X1 et X2 par RMN et spectrométrie de masse.



Figure V-11: Analyse par chromatographie sur couche mince des glycolipides X1, X2 et X3 avant et après purification. La purification des glycolipides a été réalisée par chromatographie d'absorption sur colonne de silice puis par chromatographie préparative sur couche mince. Les glycolipides ont migrés dans un solvant chloroforme/méthanol (93:7; v/v) et ont été révélés par l'orcinol sulfurique. Alors que le TDM se révèle en violet à l'orcinol sulfurique, les glycolipides X sont colorés en bleu, ce qui suggère leur appartenance à une même famille.

## a. Le glycolipide X2

Les spectres RMN <sup>1</sup>H à une dimension du glycolipide X2 permet de visualiser les signaux **a** à **y** correspondants aux protons des acides mycoliques (Figure V-12A). Les valeurs des déplacements chimiques de ces signaux, identifiées sur les spectres <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY en deux dimensions, sont similaires à celles obtenues pour le glycolipide X1 et pour le TDM (résultats non présentés, Tableau V-3). En plus de ces signaux, le spectre RMN <sup>1</sup>H à une dimension montre la présence d'un proton anomère à 4.98 ppm (Figure V-12A). Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 90, la constante de couplage vicinale <sup>3</sup>*J*<sub>H1-H2</sub> de ce proton est d'environ 2,5 Hz, ce qui indique une anomérie de type  $\alpha$ . La lecture des déplacements chimiques sur les spectres <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC a permis d'identifier le système de spins du monosaccharide

(Tableau V-9, Figure V-12B). Selon ses paramètres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, ce monosaccharide a été caractérisé comme un résidu d' $\alpha$ -arabinofuranose ( $\alpha$ -Ara*f*). Les déplacements chimiques déblindés des H-5 et C-5 de ce monosaccharide par rapport à un résidu de 1-*O*-méthyl- $\alpha$ -Ara*f* terminal (Bock *et al.*, 1983) indiquent que cette position est substituée, probablement par un acide mycolique. De même, le déplacement chimique du C-1 de l' $\alpha$ -Ara*f* à 107.6 ppm démontre que ce monosaccharide est lié en cette position. Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, nous avons également identifié les signaux d'un glycérol lié en position 1 comme pour le glycolipide X1 (Figure V-12B). Les intensités stœchiométriques des signaux H-2/C-2 du glycérol et H-1/C-1 de l' $\alpha$ -Ara*f* démontrent qu'ils appartiennent à la même molécule. Aux vues de la nature glycolipidique du composé X2 et de la structure du glycolipide X1, nos analyses par RMN démontrent que le glycolipide X2 est un 5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Ara*f*-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol.

Tableau V-9 : Valeurs des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (en ppm) du glycolipide X2 (5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol) de *Mycobacterium marinum* (mesurées à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1, v/v) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne).

	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5
α-Araf	4.98/107.6	4.10/80.7	3.99/78.3	4.18/ <b>82.9</b>	4.44, 4.30/63.2
Glycérol (Gro)	3.76, 3.61/69.4	3.85/70.1	3.68, 3.62/63.5		



**Figure V-12 : (A) Spectres RMN** <sup>1</sup>**H des glycolipides X2 et X3 et (B) spectre RMN** <sup>1</sup>**H**-<sup>13</sup>**C HSQC du glycolipide X2 de la souche M de** *M. marinum* **réalisés à 300°K dans le CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1, v/v) en utilisant le tétraméthylsilane comme standard interne. Les lettres (<b>a**-**y**) sur le spectre correspondent aux résonances des protons des acides mycoliques dont les structures sont schématisées dans la **Figure V-9**. L'annotation H-1 dans la Figure A fait référence au proton anomère d'un monosaccharide. Les valeurs des déplacements chimiques des signaux de la Figure B sont référencées dans les **Tableaux V-9**. Ara : Arabinofuranose ; Gro : Glycérol.

En accord avec nos interprétations de RMN, le spectre MALDI-TOF-MS de X2 montre une série d'ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  dont les masses (*m/z* en uma) corroborent avec la structure proposée (Figure V-13 et Tableau V-10). Les ions pseudomoléculaires  $[M+Na]^+$  les plus intenses à *m/z* 1466, 1480-1482, 1494, 1510 uma correspondent au glycolipide X2 acylé par des céto et méthoxy-mycolates. Le spectre présente peu d'ions pseudo-moléculaires qui indiquent l'acylation du glycolipide X2 par des  $\alpha$ -mycolates. En effet, lors de la purification, nous avons séparé différentes formes du glycolipide X2 en fonction de la taille et des groupements fonctionnels des acides mycoliques. Comme le montre la Figure V-11, deux glycolipides X2 migrent de façon très proche en chromatographie sur couche mince. De même, deux glycolipides X3 co-migrant peuvent être visualisés (Figure V-11). Des analyses comparatives en chromatographie sur couche mince ont révélé que nous avions purifié le glycolipide X2 le plus polaire, migrant le plus bas sur couche mince (résultats non présentés). Par contre, nous avons purifié les deux glycolipides X3 ensemble (Figure V-11).

#### b. Le glycolipide X3

Le spectre MALDI-TOF-MS du glycolipide X3 montre une série d'ions pseudomoléculaires supérieure de 132 uma à celle du glycolipide X2 (Figure V-13, Tableau V-10). Cette différence a été attribuée à la présence d'un pentose supplémentaire sur le glycolipide X3. Ces résultats suggèrent que le glycolipide X3 est l'équivalent mono acylé du glycolipide X1. Cependant, il nous a été impossible de déterminer avec précision cette structure par RMN. En effet, l'analyse RMN <sup>1</sup>H à une dimension de X3 a révélé la présence majoritaire de signaux caractéristiques de tri-*O*-acylglycérol (Figure V-12A). La nature de ces signaux a été confirmée par l'interprétation des spectres <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC. Les valeurs des masses visualisées sur les spectres MALDI-TOF-MS de X3 étant trop élevées pour correspondre aux masses de triglycérides, nous avons supposé que ces composés sont exogènes à la purification. En accord avec cette hypothèse, les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC du glycolipide X3 montrent la présence de signaux minoritaires appartenant aux protons d'acides mycoliques tel que le signal **i** d'une fonction cyclopropane (Figure V-12A). De plus, le signal non résolu à 5.00 ppm visualisable sur le spectre <sup>1</sup>H à une dimension correspond en réalité à deux protons anomères (résultats non présentés). Sur le spectre <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 90, la constante vicinale <sup>3</sup>J<sub>HI</sub>.  $_{H2}$  du premier proton anomère à δ 5.00 est d'environ 3 Hz, ce qui indique une anomérie de type α. La constante vicinale  ${}^{3}J_{H1-H2}$  du second proton anomère à δ 4.99 montre qu'il possède une anomérie de type β. Les paramètres carbone des deux signaux monosaccharidiques ont été identifiés sur le spectre  ${}^{1}$ H- ${}^{13}$ C HSQC à δ 105.2 pour l'anomère α et à δ 100.2 pour l'anomère β (résultats non présentés). Des paramètres  ${}^{1}$ H/ ${}^{13}$ C similaires avaient été obtenus pour l' α-Araf et le β-Araf du composé X1. Selon toutes ces données, nous proposons que le glycolipide X3 correspond probablement au β-D-Araf-(1→2)-5-*O*-mycolyl-α-D-Araf-(1↔1')glycérol ou au 5-*O*-mycolyl-β-D-Araf-(1→2)-α-D-Araf-(1↔1')-glycérol ou à un mélange des deux composés.

# 3. Conclusion

Nos analyses structurales ont permis de caractériser le glycolipide X1 comme du 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Ara*f*-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Ara*f*-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol et le glycolipide X2 comme du 5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Ara*f*-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol (Figure V-14). Ces deux glycoconjugués appartiennent à une même famille. L'étude structurale partielle du glycolipide X3 suggère que ce glycolipide est un monomycolyl-di-arabino-glycérol.



Figure V-13 : Spectres MALDI-TOF-MS du glycolipide X2 (à gauche) et du glycolipide X3 (à gauche) de la souche M de *Mycobacterium marinum.* Les masses en uma correspondent aux ions pseudo-moléculaires [M + Na]<sup>+</sup> interprétées dans le Tableau V-10.

Tableau V-10 : Attribution des signaux observés par spectrométrie de masse (MALDI-MS) du glycolipide X2 et X3 de la souche M de Mycobacterium marinum. Les valeurs (en uma) représentent les masses pseudo-moléculaires [M + Na]<sup>+</sup> de X2 et X3. Chaque masse a été corrélée avec la présence d'un acide mycolique des familles alpha (α), méthoxy- (m) et céto- (k). Les masses correspondantes aux acides mycoliques sont décrites dans le Tableau V-5. Les spectres de masse des glycolipides X2 et X3 sont présentés dans la Figure V-13.

Acides mycoliques			_	Masse du	glycolipic	ie X2 en f	onction d	u nombre	de carbone	es et de la	famille de	l'acide m	iycolique			
	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
α	1310	1324	1338	1352	1366	1380	1394	1408	1422							
¥					1382	1396	1410	1424	1438	1452	1466	1480	1494	1508	1522	
E						1398		1426		1454		1482		1510		1538
Acides mycoliques				Masse du	glycolipi	de X3 en f	onction d	u nombre (	de carboné	ss et de la	famille de	l'acide m	iycolique			
σ	1442	1456	1470	1484	1498	1512	1526	1540	1554							
k					1514	1528	1542	1556	1570	1584	1598	1612	1626	1640	1654	
ш						1530		1558		1586		1614		1642		1670





 $5\text{-}\textit{O}\text{-}mycolyl\text{-}\beta\text{-}Araf\text{-}(1 \rightarrow 2)\text{-}5\text{-}\textit{O}\text{-}mycolyl\text{-}\alpha\text{-}Araf\text{-}(1 \rightarrow 1')\text{-}Glycérol$ 





 $\beta\text{-Araf-(1\rightarrow2)-5-}\textit{O}\text{-mycolyl-}\alpha\text{-Araf-(1\rightarrow1')-Glycérol}$ 

5-*O*-mycolyl- $\beta$ -Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -Araf-(1 $\rightarrow$ 1')-Glycérol

Figure V-14 : Structures caractérisées des glycolipides X1 et X2, et X3.

# C. Etude du glycolipide X1 chez M. bovis BCG

# 1. Identification du glycolipide X1 chez Mycobacterium bovis BCG

Le glycolipide X1, caractérisé comme étant le 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol ou DMDA (pour Di-Mycolyl-Di-Arabinoglycérol), a été décrit dans plusieurs espèces de mycobactéries incluant le complexe de *M. avium-M. intracellulare* et *M. kansasii* (Watanabe *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1997). La découverte du DMDA chez *Mycobacterium marinum*, phylogénétiquement éloigné de *M. avium-M. intracellulare* et *M. kansasii* (Cf. Chapitre I, Figure I-2), suggère que ce glycolipide est synthétisé par de nombreuses espèces de mycobactéries. Ainsi, nous avons souhaité contrôler la présence du DMDA dans les différentes espèces de mycobactéries auxquelles nous avions accès dans le cadre de notre collaboration avec le Dr L. Krémer. Les espèces de mycobactéries utilisées incluent *M. bovis* BCG Pasteur, *M. smegmatis, M. thermoresistibile, M. xenopi, M. chelonae, M. kansassii, M. scrofulaceum* et *M. tuberculosis* CD1551.

Afin de visualiser la présence du DMDA dans ces espèces, les glycolipides apolaires ont été extraits et analysés par chromatographie sur couche mince en suivant un protocole standardisé décrit dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Comme le montre la Figure V-15, le DMDA est présent dans les glycolipides apolaires de *M. bovis* BCG et *M. scrofulaceum*. Ce glycolipide a également été identifié chez *M. kansasii* (résultats non montrés). Par contre, nous n'avons pas détecté de DMDA chez *M. smegmatis, M. thermoresistibile, M. tuberculosis* CD1551 (Figure V-15), *M. xenopi* et *M. chelonae* (résultats non présentés). La quantité de glycolipides déposée étant difficile à standardiser, il est délicat de comparer la production du DMDA dans les différentes espèces de mycobactéries. Cependant, en prenant le TDM comme étalon sur la chromatographie, nous pouvons constater qu'une quantité équivalente de DMDA est retrouvée chez *M. bovis* BCG et *M. scrofulaceum*. Ces résultats ont été confirmés par la suite lors de nouvelles extractions glycolipidiques dans ces mêmes espèces.


**Figure V-15 : Analyse par chromatographie sur couche mince des glycolipides apolaires de plusieurs espèces de mycobactéries.** Le solvant de migration utilisé est le CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v). Les glycolipides ont été révélés par l'orcinol sulfurique. TAC : thiacétazone. Le DMDA témoin a été extrait et purifié de *M. marinum*.

#### 2. Inhibition de la synthèse du DMDA par la thiacétazone

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche s'intéresse aux effets de la thiacétazone, drogue antituberculeuse de seconde ligne, sur la paroi des mycobactéries. En raison de son faible coût de production, la thiacétazone a été largement utilisée dans les pays en voie de développement. Néanmoins, cette drogue provoque de nombreux effets secondaires qui peuvent conduire au décès du patient traité. Son utilisation est donc prohibée dans certains pays et fortement déconseillée par la communauté scientifique. Aujourd'hui, la thiacétazone est utilisée en combinaison avec l'isoniazide pour soigner les patients atteints par des formes de tuberculose multi-résistantes (MDR). Le but de nos travaux est de comprendre la cible mycobactérienne principale de la thiacétazone et de ses métabolites de manière à

pouvoir, à terme, synthétiser des analogues plus efficaces contre les mycobactéries et surtout moins toxiques pour l'homme.

Nous avons démontré récemment que la thiacétazone (TAC) était une pro-drogue activée par la flavine monooxygénase EthA et par la méthyltransférase des acides mycoliques MmaA4 (Dover *et al.*, 2007; Alahari *et al.*, 2009). Une fois activée par EthA, la TAC inhibe la cyclopropanation des acides mycoliques (Alahari *et al.*, 2007). Néanmoins, la protéine MmaA4 semble requise pour activer la TAC en un composé bactéricide dont la cible moléculaire est inconnue (Alahari *et al.*, 2009). Le but de notre travail était de déterminer si la TAC inhibait la synthèse des glycolipides. Nous avons donc extrait les glycolipides polaires et apolaires de *M. bovis* BCG traité ou non par la thiacétazone et comparé leurs profils glycolipidiques par chromatographie sur couche mince. Comme le montre la Figure V-16A, les profils chromatographiques des glycolipides polaires de *M. bovis* BCG traité ou non par la TAC sont similaires. Par contre, le profil chromatographique des glycolipides apolaires de *M. bovis* BCG traité à la TAC se caractérise par la disparition du 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol (DMDA).

Pour confirmer que la production du DMDA est inhibée par la thiacétazone, nous avons étudié l'effet de cette drogue sur les glycolipides apolaires de *M. marinum*. Pour des raisons inconnues, *M. marinum* est naturellement plus résistant à la TAC que *M. bovis BCG*. Nous avons donc administré des concentrations croissantes de la drogue sur les bacilles de *M. marinum* et analysé le profil des glycolipides apolaires par chromatographie. La CCM des glycolipides apolaires de *M. marinum* traité par la TAC permet de visualiser une diminution de la quantité de DMDA proportionnelle aux concentrations de drogues utilisées (Figure V-16). A l'opposé, un composé non glycosidique coloré en jaune par l'orcinol sulfurique augmente avec la quantité de TAC servant à traiter *M. marinum*. Ces résultats confirment que la production de DMDA des mycobactéries est inhibée par la TAC.





Récemment, nous avons démontré que la TAC est létale pour les mycobactéries seulement après son activation successive par EthA et MmaA4 (Alahari *et al.*, 2009). Nous avons voulu vérifier que seule la TAC activée par les deux enzymes pouvait inhiber la production de DMDA dans *M. bovis* BCG. Nous avons donc utilisé une souche mutante de *M. bovis* BCG (R2) incapable de synthétiser la protéine MmaA4 et donc résistante à la TAC. Comme le montre la Figure V-16A, les souches R2 de *M. bovis* BCG traitées ou non par la TAC présentent le même profil de glycolipides apolaires sur CCM, témoignant de la présence du DMDA.

En conclusion, la TAC activée par EthA et MmaA4 inhibe la synthèse du DMDA chez *M. bovis* BCG et *M. marinum*. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la synthèse du DMDA est liée au mécanisme létal de la TAC.

### 3. Le DMDA : produit du métabolisme de l'arabinogalactane

Nous venons de montrer que la production du DMDA est altérée par la TAC. Nous avons voulu savoir si cet effet inhibiteur était spécifique de la TAC ou si d'autres drogues antituberculeuses présentaient la même activité. Les bacilles de M. bovis BCG ont donc été traités par trois drogues de première ligne : l'isoniazide (INH), l'éthambutol (EMB) et la rifampicine (RIF). L'isoniazide et l'éthambutol sont des inhibiteurs de la synthèse du mycolyl-arabinogalactane peptidoglycanne (Sacchettini et al., 2008; Zhang et Yew, 2009). Alors que l'isoniazide empêche la synthèse des acides mycoliques, l'éthambutol inhibe la synthèse du domaine arabinane de l'arabinogalactane et du lipoarabinomannane. La rifampicine quant à elle, inhibe l'activité de l'ARN polymérase. Le profil chromatographique des glycolipides apolaires de M. bovis BCG traité par l'INH montre l'absence du DMDA et de TDM, tous deux constitués d'acides mycoliques (Figure V-16C). Au contraire, ces deux glycolipides sont encore représentés après que M. bovis BCG ait été traité par la RIF (Figure V-16C). De façon surprenante, la CCM a révélé que le traitement de M. bovis BCG par l'EMB inhibe également la production de DMDA (Figure V-16C). Ces résultats montrent un lien direct entre la cible moléculaire de l'EMB et la production du DMDA. Les enzymes EmbA et EmbB (impliquées dans la synthèse de l'arabinogalactane) et EmbC (impliquée dans la production de l'arabinomannane) sont les protéines cibles de l'EMB. Les protéines Emb sont encore mal connues mais jouent un rôle fondamental dans le transfert du motif [ $\beta$ -D-Araf- $(1 \rightarrow 2)$ - $\alpha$ -D-Araf] en  $\alpha$ -1,3 de la chaîne ramifiée de l'arabinane. Dans l'arabinogalactane, ce motif est acylé par des acides mycoliques liés en position 5 des deux résidus de D-Araf. Le motif  $[\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Araf] est identique à celui du DMDA. Les résultats obtenus suggèrent que le DMDA est soit synthétisé par les mêmes enzymes que l'arabinogalactane, soit un produit dérivé du mycolyl-arabinogalactane, comme par exemple un produit de dégradation.

Enfin, pour tenter de déterminer l'origine du DMDA, nous avons incubé pendant 6 heures les bacilles de *M. bovis* BCG et de *M. marinum* avec de l'acétate radiomarqué au <sup>14</sup>C dont le devenir est suivi par autoradiographie. L'acétate est métabolisé par les mycobactéries pour synthétiser les acides mycoliques. Ainsi si le DMDA est synthétisé rapidement, ses acides mycoliques seront radiomarqués et le glycolipide pourra être visualisé par autoradiographie. Au contraire, si le glycolipide est synthétisé lentement ou provient de la dégradation du mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne, il n'aura pas le temps d'être radiomarqué. Les glycolipides apolaires radiomarqués de *M. bovis* BCG et de *M. marinum* ont été extraits et déposés sur une couche mince chromatographique. Après migration, la CCM a été mise en contact avec un film d'autoradiographie durant 48 heures. Comme le présente l'autoradiogramme de la Figure V-16D, le TDM et les PGLs sont marqués par l'acétate <sup>14</sup>C, ce qui montre qu'ils ont été nouvellement synthétisés. Par contre, aucune bande ne correspond au DMDA. Ce dernier est donc synthétisé plus lentement.

En conclusion, nous avons montré que le DMDA semble étroitement lié au métabolisme du mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne. Nos analyses préliminaires ont également révélé que ce glycolipide est synthétisé très lentement par les *M. marinum* et *M. bovis* BCG. Ces résultats suggèrent que le DMDA est un produit du catabolisme du mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne.

## **D.** Conclusion

L'analyse des glycolipides apolaires de la souche M de *Mycobacterium marinum* avait pour objectif premier d'établir la structure fine des glycolipides phénoliques (PGLs) et des tréhaloses di-mycolates (TDM).

Nos études ont montré que les PGLs de cette souche sont majoritairement composés d' $\alpha$ -3-*O*-Me-L-Rhap phénolphtiocérol di-2,4,6-triméthylphtiocéranates et minoritairement d' $\alpha$ -3-*O*-Me-L-Rhap phénolphtiodiolone et phénolphtiotriol di-2,4,6-triméthylphtiocéranates. D'après les voies de biosynthèse connues, les PGLs possédant un corps lipidique phénolphtiotriol et phénolphtiodiolone sont les précurseurs de biosynthèse du PGL à noyau phénolphtiocérol (Huet *et al.*, 2009). Il n'est donc pas surprenant que ce dernier soit le PGL majoritaire de la paroi de *M. marinum*.

L'analyse structurale du TDM de la souche M de *M. marinum* a mis en évidence la présence d' $\alpha$ -, méthoxy- et céto-mycolates. L'utilisation combinée de la résonance magnétique nucléaire et de la spectrométrie de masse a permis de définir la nature des acides mycoliques et d'établir le nombre de carbones qui les composent. Sur la base de ces résultats, nous avons montré que le TDM était composé de deux acides mycoliques pouvant être de familles et de tailles différentes. Les positionnements exacts des groupes et des fonctions chimiques devront être définis par GC-MS.

Le second objectif de cette étude des glycolipides apolaires de *M. marinum* était de définir plus précisément la composition de cette fraction. En plus des PGLs et TDM, nous avons identifié une nouvelle famille de glycolipides représentée majoritairement par le composé X1 et de façon plus discrète par les composés X2 et X3. Nos analyses structurales ont caractérisé le glycolipide X1 comme étant le 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol et le glycolipide X2 comme étant le 5-*O*-mycolyl- $\alpha$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol. L'étude partielle de la structure du glycolipide X3 suggère qu'il est constitué de 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Araf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol. L'étude partielle de la structure du compréhension, le glycolipide X1 a été nommé DMDA pour <u>Di-M</u>ycolyl-<u>Di-A</u>raf-(1 $\leftrightarrow$ 1')-glycérol. Par analogie, les acronymes MMMA (<u>Mono-M</u>ycolyl-<u>Mono-A</u>rabino-glycérol) et MMDA (<u>Mono-M</u>ycolyl-<u>D</u>i-<u>A</u>rabino-glycérol) et MMDA (<u>Mono-M</u>ycolyl-<u>D</u>i-<u>A</u>rabino-glycérol) et X3 repectivement.

Avant nos travaux, le DMDA et le MMMA avaient été identifiés dans d'autres espèces de mycobactéries incluant *M. avium-intracellulare* et *M. kansasii* (Watanabe *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1999). Nos études ont révélé la présence de DMDA chez *M. marinum*, *M. scrofulaceum* et *M. bovis* BCG Pasteur. Néanmoins, la quantité du DMDA extraite des mycobactéries est variable en fonction de l'espèce et des conditions de cultures. Parfois, ce glycolipide est à peine détectable par chromatographie couche mince (résultats non présentés). Nous émettons l'hypothèse que certaines espèces de mycobactéries dont *M. tuberculosis* synthétisent le DMDA mais en quantité trop faible pour être détectée lors de nos analyses chromatographiques. Nous vérifierons la présence de ce glycolipide dans plusieurs espèces de mycobactéries en utilisant des quantités plus élevées de matériel biologique.

En parallèle à ces travaux, nous avons étudié les modifications de la composition glycolipidique de la paroi de *M. bovis* BCG induite par la thiacétazone (TAC), drogue antituberculeuse de seconde intention. Nos résultats démontrent que la TAC inhibe la production de DMDA par les mycobactéries mais pas celle des autres glycolipides polaires et apolaires. De même, la synthèse du DMDA est altérée suite à l'utilisation d'éthambutol, drogue antituberculeuse qui inhibe la synthèse du domaine arabinane de l'arabinogalactane-peptidoglycanne. Ces résultats suggèrent que la synthèse du DMDA est liée au métabolisme de l'arabinogalactane-peptidoglycanne. Nous avons donc émis trois hypothèses reliant ces deux glycoconjugués (Figure V-17). Selon la première hypothèse, le DMDA est synthétisé par les mêmes enzymes (protéines EMB) que la partie terminale du domaine arabinomannane. Dans ce cas l'inhibition de l'activité enzymatique des protéines Emb par l'éthambutol entraine l'inhibition de la synthèse de l'arabinane et du DMDA.

Dans une deuxième hypothèse, le DMDA peut être un intermédiaire de biosynthèse du mycolyl-arabinogalactane. Après la synthèse du DMDA, la structure 5-*O*-mycolyl- $\beta$ -D-Ara*f*-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Ara*f*-(1 pourrait être transférée directement du glycolipide au domaine arabinane par une oligosaccharidyl-transférase encore inconnue. Il n'est pas exclu non plus que le DMDA soit utilisé par les mycolyltransférases Ag85 comme donneur d'acides mycoliques pour la synthèse du mycolyl-arabinogalactane.



**Figure V-17 : Hypothèses reliant le DMDA au métabolisme du mycolylarabinogalactane-peptidoglycanne (mAGp).** (A) Le DMDA est synthétisé par les enzymes de biosynthèse du mAGp. (B) Le DMDA est un intermédiaire de biosynthèse du mAGp. (C) Le DMDA est un produit du catabolisme du mAGp.

Selon la troisième hypothèse, le DMDA résulte du catabolisme du domaine arabinane de l'arabinogalactane-peptidoglycanne (Figure V-17). A notre connaissance, aucune étude n'indique clairement la possibilité d'un catabolisme de l'arabinogalactane-peptidoglycanne chez les mycobactéries. Nos résultats préliminaires de marquage métabolique à l'acétate-<sup>14</sup>C suggèrent que le DMDA n'est pas synthétisé aussi rapidement que le TDM ou les PGLs et qu'il pourrait donc provenir du catabolisme de l'arabinogalactane-peptidoglycanne. De plus, la présence du glycérol démontre qu'il ne s'agit pas d'un composé simplement libéré par hydrolyse mais plutôt d'un glycolipide produit de manière enzymatique. Dans le futur, nous essaierons d'établir clairement l'origine du DMDA chez M. marinum et M. bovis BCG. En premier lieu, les glycolipides seront extraits après incubation des mycobactéries avec de l'acétate radiomarqué au <sup>14</sup>C et une chasse métabolique plus longue. Nous espérons ainsi déterminer le temps nécessaire pour la biosynthèse du DMDA. Ensuite, nous incuberons du mycolyl-arabinogalactane peptidoglycanne radiomarqués au  $^{14}$ C avec un lysat cellulaire de M. bovis BCG ou de M. marinum. Si le DMDA est un produit de catabolisme, l'action des enzymes contenues dans le lysat cellulaire devrait permettre la production de ce glycolipide à partir du mycolyl-arabinogalactane peptidoglycanne. L'apparition du DMDA sera suivie par autoradiographie après migration des glycolipides sur une couche mince chromatographique.

# Discussion

Les glycoconjugués de l'enveloppe des mycobactéries, en particulier les glycolipides et les lipoglycannes, sont dotés de propriétés immunomodulatrices dépendantes de leurs structures fines. Qu'ils soient ubiquitaires ou spécifiques d'espèces, ces composés influencent de nombreux phénomènes au cours de la physiopathologie des mycobactéries incluant la formation et la maturation des granulomes. *Mycobacterium marinum* est une mycobactérie modèle utilisée pour comprendre la formation des granulomes tuberculeux. Cependant, la composition et la nature des glycoconjugués de son enveloppe étaient jusque récemment mal définies.

Les travaux de cette thèse avaient pour objectifs de purifier et de caractériser les glycolipides et les lipoglycannes de l'enveloppe d'une souche témoin de *Mycobacterium marinum* communément employée en laboratoire (souche ATCC BAA-535 / M). Dans un premier temps, nous avons optimisé les méthodes d'extraction et de purification afin d'obtenir les composés d'intérêts purs et en quantité suffisante pour permettre des analyses structurales approfondies et envisager des tests d'activités biologiques. Ainsi, durant cette étape nous avons pu séparer d'une part les glycolipides et lipoglycannes polaires et d'autre part les glycolipides apolaires. La structure de ces composés a ensuite été étudiée grâce à l'utilisation complémentaire de plusieurs méthodes physico-chimiques comprenant la résonance magnétique nucléaire, la spectrométrie de masse, la chromatographie en phase gazeuse et la modélisation moléculaire.

L'étude structurale des composés polaires a montré qu'ils appartenaient soit à la famille des lipooligosaccharides (LOSs), soit à la famille des glycolipides et des lipoglycannes à ancre phosphatidyl-*myo*-inositol. Nous nous sommes particulièrement intéressé aux LOSs qui avaient été caractérisés dans de nombreuses espèces de mycobactéries mais dont le rôle dans la virulence était méconnu. Nos analyses ont permis d'établir les structures complètes d'au moins six LOSs synthétisés par *M. marinum*, qui diffèrent essentiellement par leurs structures glycanniques. En particulier, nos études ont mis en évidence un dodécaoside rare (le caryophyllose) dans les LOS-I à -IV, et un monosaccharide *N*-acylé unique dans le LOS-IV de *M. marinum* (Cf. chapitre IV). Les tests d'activités biologiques ont démontré pour la première fois que les LOSs étaient de puissants inhibiteurs de la sécrétion macrophagique de TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle majeur dans le contrôle de l'infection tuberculeuse. En absence de TNF- $\alpha$ , l'infection d'embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) par *M. marinum* entraine la formation rapide des

granulomes, suivie de la rupture de ces agrégats cellulaires (Clay *et al.*, 2008). De même, la neutralisation du TNF- $\alpha$  par un agent chimique induit la réactivation et la dissémination des bacilles dans une autre espèce animale en l'occurrence le macaque (*Macaca fascicularis*) infecté par *M. tuberculosis* (Lin *et al.*, 2010). Le TNF- $\alpha$  est donc indispensable au maintien des granulomes mais pas à leur formation.

En dehors des LOSs de M. marinum, d'autres glycoconjugués tels que les sulfatides (SLs), les glycolipides phénoliques (PGLs) et les di-O-acyltréhaloses (DATs) sont également capables d'inhiber la production macrophagique de TNF- $\alpha$  (Reed *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006; Lee et al., 2007; Robinson et al., 2008). Ainsi, une synthèse importante de ces glycolipides mycobactériens dans les granulomes pourrait favoriser le phénomène de réactivation et de dissémination du pathogène. De façon intéressante, la diminution des nutriments et de l'oxygène dans les granulomes conduit M. tuberculosis à utiliser les lipides (ex : cholestérol) de la cellule hôte comme source principale de carbone et d'énergie (Munoz-Elias et al., 2006; Pandey et Sassetti, 2008). Paradoxalement, ce métabolisme énergétique nécessite un système de détoxification intracellulaire qui entraine chez la mycobactérie la synthèse d'une grande quantité de glycolipides pariétaux à acides gras polyméthylés incluant les DATs, PATs et SLs (Singh et al., 2009). Par conséquent, ce mécanisme de régulation métabolique induit la production et la libération dans les granulomes de ces mêmes glycolipides qui possèdent des propriétés inhibitrices de la réponse pro-inflammatoire. Comme le montrent les travaux réalisés dans cette thèse, M. marinum ne synthétise ni DATs, ni SLs. Les PGLs et les LOSs sont les seuls glycolipides constitués d'acides gras méthylbranchés synthétisés par cette espèce. Nous proposons qu'au même titre que les DATs et les SLs de M. tuberculosis, les LOSs pourraient être produits en grande quantité par M. marinum à l'intérieur des granulomes, et ainsi induire la réactivation bactérienne. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier le taux d'expression des gènes de biosynthèse des LOSs de M. marinum durant l'infection chronique dans le poisson zèbre (Danio rerio) et dans la grenouille léopard (Rana pipiens). Pour rappel, ce dernier modèle animal permet en effet d'étudier la réponse granulomateuse sur plusieurs mois. De plus, la création d'une souche mutante de M. marinum déficiente dans la synthèse de tous les LOSs pourrait permettre de comprendre le rôle de ces glycolipides dans la réponse granulomateuse. Comme le suggèrent nos études bioinformatiques, l'interruption de l'un des deux gènes codant pour les polycétides synthases (PKS) (enzymes nécessaires à la production des acides gras polymethylés) dans la région génétique des LOSs de M. marinum, devrait annuler la biosynthèse de ces glycolipides.

De plus, il est important de comprendre le ou le(s) mécanisme(s) permettant aux LOSs, DATs, SLs et PGLs d'inhiber la production macrophagique de TNF-a. A supposer qu'un seul et même mécanisme inhibiteur soit mis en jeu, la présence d'acides gras polyméthylés est l'unique lien structural entre ces quatre glycolipides. Certains récepteurs macrophagiques tels que les récepteurs « scavenger » reconnaissent spécifiquement les parties acylées des glycolipides. En particulier, l'interaction entre le « scavenger receptor-A » (SR-A) et le tréhalose di-mycolates (TDM), glycolipide ubiquitaire chez les mycobactéries, entraine l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés (Ozeki *et al.*, 2006). L'interaction des acides gras polyméthylés avec SR-A ou d'autres récepteurs de même type pourrait expliquer le potentiel inhibiteur des LOSs, DATs, SLs et PGLs. De plus, comme pour certains autres glycoconjugués, l'insertion de ces composés directement dans la membrane plasmique et/ou phagosomale pourrait entrainer une altération de la fluidité membranaire et une activation des voies de signalisation intracellulaires inhibitrices de la réponse pro-inflammatoire (Sut et al., 1990; Vergne et al., 1995; Shabaana et al., 2005). On notera également qu'à l'exception des PGLs, les SLs, les DATs et les LOSs ont en commun la présence d'un tréhalose multi-acylé. Ces similitudes structurales suggèrent que le tréhalose facilite la présentation des acides gras polyméthylés aux récepteurs « scavenger ».

Pour tenter de répondre à ces différentes interrogations, les LOSs d'autres espèces de mycobactéries incluant *M. canettii* et *M. kansasii* devront être isolées. En dehors du tréhalose, les LOSs de ces deux espèces de mycobactéries possèdent des structures oligosaccharidique et lipidique différentes de celles des LOSs de *M. marinum* (Cf Chapitre II). Les tests d'activités biologiques qui seront réalisés sur les LOSs de ces différentes espèces permettront de vérifier que ces glycolipides ont également des propriétés immunomodulatrices. De plus, par une méthode de dégradation chimique, les structures minimales requises qui confèrent aux LOSs cette activité inhibitrice seront déterminées.

L'étude des LOSs de *M. marinum* a mis en évidence des propriétés immunomostimulatrices spécifiques au LOS-IV, liées à la présence du monosaccharide *N*-acylé unique. Ainsi, seul le LOS-IV induit l'expression macrophagique de chimiokines (IL-8) ou d'antigènes de surfaces (CD40, ICAM-1) indispensables à la formation des granulomes. En accord avec un rôle spécifique de ce glycolipide dans la pathogénicité, une étude a démontré qu'un mutant de *M. marinum* déficient dans la synthèse du LOS-IV était moins phagocyté par les macrophages (Burguiere *et al.*, 2005). Par conséquent, nous suggérons que le monosaccharide *N*-acylé spécifique au LOS-IV influence l'internalisation de *M. marinum* 

par les macrophages (Burguiere *et al.*, 2005). Ce monosaccharide atypique pourrait être reconnu par un récepteur lectinique, à la surface des macrophages. De manière à étudier plus en détail les activités biologiques liées au monosaccharide *N*-acylé, des analogues chimiques seront synthétisés. En s'appuyant sur les données de la littérature, nos analyses structurales et bioinformatiques suggèrent que *M. canettii*, un des agents étiologiques de la tuberculose humaine, pourrait synthétiser un LOS constitué d'un monosaccharide *N*-acylé analogue à celui du LOS-IV de *M. marinum*. La purification des LOSs de *M. canettii* confirmerait cette hypothèse et permettrait de vérifier si ce monosaccharide confère les mêmes propriétés inductrices que celles observées pour le LOS-IV de *Mycobacterium marinum*.

La seconde partie de l'étude des composés polaires a porté sur l'analyse structurale des glycolipides et des lipoglycannes à ancre phosphatidyl-myo-inositol, ubiquitaires chez les mycobactéries. Nous avons purifié et caractérisé trois phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIMs) ainsi que le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM) de Mycobacterium marinum. Bien que ces études soient préliminaires, les travaux réalisés sur les PIMs n'ont pas mis en évidence de différences structurales notables par rapport aux PIMs de Mycobacterium bovis BCG et de M. tuberculosis (Gilleron et al., 2001; Gilleron et al., 2003). Cependant, nos analyses chromatographiques montrent la présence d'une quantité plus importante de phosphatidyl-myo-inositol dimannosides (PIM<sub>2</sub>) chez M. marinum par rapport à celle retrouvées chez M. tuberculosis (Cf. chapitre III, Figure III-2) (Torrelles et al., 2006). Cette différence pourrait s'expliquer par la perte des PIM<sub>6</sub> de M. marinum durant l'extraction des glycolipides polaires (Cf. chapitre III). L'analyse structurale du LM et du LAM a mis en évidence des lipoglycannes majoritairement tri-acylés comme chez M. tuberculosis. Nous avons confirmé que le LAM possédait une coiffe oligomannosidique comme dans le LAM du pathogène humain. Néanmoins, la présence de substitutions spécifiques (succinate, méthylthio-pentose) indique que le ManLAM de M. marinum est structuralement plus proche du ManLAM de M. kansasii que du ManLAM de M. tuberculosis (Guerardel et al., 2003). L'acylation des lipoglycannes influence grandement ses propriétés immunomodulatrices. Ainsi, alors que le LM di-acylé est inhibiteur de la réponse pro-inflammatoire, les LM tri- et tétra-acylé sont plutôt activateurs (Doz et al., 2007). Comme pour les lipoglycannes de M. tuberculosis, nous avons observé que le LM de M. marinum était un puissant inducteur de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8), et de l'expression d'antigènes de surface (ICAM-1, CD40, CD80) par les macrophages humains THP-1 (résultats non présentés). A l'opposé, le ManLAM de M. tuberculosis est identifié comme un inhibiteur de la réponse pro-inflammatoire (Gilleron *et al.*, 2008). Il serait intéressant de vérifier si le ManLAM de *M. marinum* possède également cette activité inhibitrice. Ces travaux permettraient également d'évaluer l'influence des substituants caractéristiques au ManLAM de *M. marinum* sur la modulation de la réponse pro-inflammatoire.

Dans une troisième partie, nous avons procédé à une analyse structurale systématique des glycolipides apolaires de la souche témoin de *M. marinum*. Nos analyses ont établi la structure précise des glycolipides phénoliques (PGLs) et du tréhalose di-mycolates (TDM) dans cette souche. Avant nos travaux, ces deux familles de glycolipides avaient été étudiées dans différentes souches de *M. marinum*. Néanmoins des variations subtiles dans l'acylation de ces glycolipides avaient été observées entre les souches de cette même espèce (Dobson *et al.*, 1990). Dans ce contexte, nos études ont précisé la nature des lipides des deux glycoconjugués dans la souche témoin de *M. marinum*.

Le rôle des PGLs dans l'infection tuberculeuse n'est à ce jour pas clairement défini. Pourtant, de nombreuses études ont relié cette famille de glycolipides à la virulence des souches et des espèces de mycobactéries (Reed et al., 2004; Sinsimer et al., 2008; Huet et al., 2009). Tout comme les PGLs de M. tuberculosis (souche Beijing), les PGLs de M. marinum inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-12). Les résultats obtenus lors de nos travaux ont suscité plusieurs interrogations auxquelles nous tenterons de répondre. En premier lieu, quelle est l'influence des différents noyaux phénolphtioglycols sur le pouvoir immunmodulateur des PGLs ? En effet, deux enzymes sont nécessaires pour convertir les corps lipidiques phénolphtiotriols en phénolphtiocérols (Huet et al., 2009). Cette modification fine des PGLs pourrait avoir un intérêt pour la mycobactérie. Il est possible que ces modifications soient régulées au cours de l'infection afin de conférer différentes activités biologiques à ces glycolipides. Pour tenter d'apporter des premiers éléments de réponse, le pouvoir immunomodulateur de la fraction PGL-I contenant majoritairement des PGLs à noyau phénolphtiocérol sera comparé à celui de la fraction PGL-II contenant uniquement un glycolipide à noyau phénolphtiotriol. Ensuite, les PGLs à noyau phénolphtiotriol et à noyau phénolphtiodiolone, tous deux contenus dans la fraction PGL-I, seront séparés par chromatographie liquide haute pression. De nouveaux tests d'activités biologiques seront alors pratiqués sur ces composés purifiés.

Deuxièmement, pour quelle(s) raison(s) la longueur des chaines et le nombre de branchements des acides phtiocéraniques sont variables en fonction des souches de *M. marinum* ? (Dobson *et al.*, 1990). Ces variations peuvent-elles modifier les propriétés immunomodulatrices des PGLs ? La réponse à la première question se trouve peut être simplement dans la possibilité d'une diversification des souches de *M. marinum* pour s'adapter à des niches écologiques spécifiques. Notre collaboration avec le Dr Kremer offre la possibilité de travailler sur plusieurs souches de *M. marinum* isolées dans différents hôtes incluant les poissons, les reptiles et l'homme. Pour répondre à la seconde question, nous purifierons les PGLs de quelques unes de ces souches de manière à comparer la structure des acides phtiocéraniques et les propriés immunomodulatrices des glycolipides.

En plus des PGLs, les mycobactéries synthétisent des lipides analogues (DIMs), composés uniquement des phtioglycols mycocérosiques. Les DIMs participent à plusieurs phénomènes impliqués dans la virulence des mycobactéries incluant l'internalisation et la survie des mycobactéries dans les phagosomes des macrophages (Astarie-Dequeker et al., 2009). Les similitudes structurales entre les DIMs et les PGLs suggèrent qu'ils possèdent des propriétés biologiques similaires. En effet, les PGLs de M. marinum ont récemment été impliqués dans l'inhibition de la fusion phagolysosomale dans les macrophages, processus nécessaire à la survie des mycobactéries dans ces cellules (Robinson et al., 2007; Robinson et al., 2008). Au cours de cette thèse, en collaboration avec le laboratoire du Dr. Laurent Kremer, les DIMs de la souche témoin de *M. marinum* ont également été purifiés. En effet, cette équipe souhaitait identifier certains lipides absents dans une souche mutante, par comparaison à la souche sauvage (Cf. annexe). Cette souche mutante s'est révélée être déficiente pour les DIMs et les PGLs. Une perspective de ce travail pourrait être la mise en contact des DIMs ou PGLs purifiés avec les cellules de la souche mutante (par « coating », (Astarie-Dequeker et al., 2009)). L'analyse de la virulence de ces cellules « enrobées », in vitro ou in vivo dans le poisson zèbre, pourrait conduire à élucider les propriétés communes ou spécifiques de ces lipides/glycolipides.

De par sa structure, le TDM est un glycolipide immunogène majeur dans la pathologie tuberculeuse (Cf. chapitre II). En particulier, il peut induire la sécrétion de cytokines proinflammatoires *in vitro* et la formation de granulomes *in vivo* (Yarkoni et Rapp, 1977; Geisel *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2006; Welsh *et al.*, 2008). Des études récentes ont rapporté que les groupes et fonctions chimiques des acides mycoliques sont à l'origine des propriétés immunomodulatrices duTDM (Rao *et al.*, 2006; Dao *et al.*, 2008). Par ailleurs, d'autres travaux suggèrent que la taille des acides mycoliques peut également influencer les propriétés biologiques du TDM (Fujita *et al.*, 2007). Afin de vérifier cette hypothèse, le TDM sera purifié selon la taille des acides mycoliques par chromatographie d'absorption et/ou de tamisage moléculaire.

De plus, nos études ont révélé la présence d'une nouvelle famille de glycolipides apolaires jamais étudiée dans Mycobacterium marinum. Le représentant majoritaire de cette famille a été caractérisé comme un Di-Mycolyl-Di-Arabinoglycérol (DMDA). Avant nos études, ce glycolipide avait été identifié chez M. avium-intracellulare et M. kansasii (Watanabe et al., 1992; Watanabe et al., 1997). Afin de vérifier si ce glycolipide était ubiquitaire chez les mycobactéries, nous l'avons recherché dans d'autres espèces. Nos analyses ont permis de détecter le DMDA uniquement dans quelques espèces de mycobactéries, incluant Mycobacterium bovis BCG. Ces résultats suggèrent que le DMDA serait synthétisé par des mycobactéries pathogènes pour l'homme, appartenant au complexe de M. tuberculosis. Aux vues des similitudes structurales entre le TDM et le DMDA, nous sommes demandé si ce glycolipide possédait également des propriétés nous immunostimulatrices (Geisel et al., 2005). Nos résultats préliminaires indiquent que le DMDA induit la sécrétion macrophagique de diverses cytokines (telles que TNF- $\alpha$ , IL-8), et l'expression d'antigènes de surface (ICAM-1, CD40, CD80) (données non publiées). Par ces effets, le DMDA pourrait donc également influencer la pathogénicité des mycobactéries. En s'appuyant sur les nombreuses études portant sur le TDM, une étude plus poussée des propriétés biologiques de cette nouvelle famille de glycolipides pourra être effectuée. De plus, les récepteurs impliqués dans leur reconnaissance seront identifiés (Geisel et al., 2005; Bowdish et al., 2009; Ishikawa et al., 2009).

Enfin, des études complémentaires visant à déterminer la cible moléculaire de la thiacétazone (TAC, drogue antituberculeuse de seconde ligne) ont mis en évidence un lien entre la synthèse du DMDA et le métabolisme du mycolyl-arabinogalactane peptidoglycanne (mAGp). Etant à la base de l'architecture de la paroi, le mAGp est essentiel à la survie des mycobactéries. Il sera donc nécessaire de déterminer plus précisément la relation entre ces deux glycoconjugués pour comprendre le mode d'action de la TAC et permettre la synthèse de drogues analogues plus efficaces et surtout moins toxiques pour l'homme.

Mes travaux de thèse ont permis de purifier et d'établir la structure précise des glycolipides et des lipoglycannes majoritaires de la souche témoin de *M. marinum*. En

collaboration avec le Pr. Philippe Herbomel et le Dr. Emma Collucci-Guyon (Institut Pasteur), ces différents glycoconjugués, couplés à des billes fluorescentes, seront injectés dans les embryons de poisson zèbre. Ainsi, nous pourrons visualiser *in vivo* et en temps réel, le rôle des différents glycolipides sur le recrutement cellulaire et la formation de granulomes précoces. De plus, l'expression de certains médiateurs inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  pourra être étudiée durant l'infection mycobactérienne des embryons. Finalement, ces travaux permettront de préciser le rôle de chaque glycolipide et lipoglycanne durant la formation des granulomes tuberculeux.

# Annexe

# Annexe- Résumé de l'article 3

# Title: The virulence defect of a *Mycobacterium marinum* cell wall mutant is rescued in the zebrafish notochord.

Titre: Le défaut de virulence d'un mutant de *M. marinum* déficient dans la synthèse de lipides pariétaux est contrebalancé lors d'une infection de la notochorde du poisson zèbre.

# Auteurs : Laeticia Alibaud<sup>1</sup>, Yoann Rombouts<sup>3</sup>, Xavier Trivelli<sup>3</sup>, Adeline Burguière<sup>1</sup>, Suat L. G. Cirillo<sup>4</sup>, Jeffrey D. Cirillo<sup>4</sup>, Jean-François Dubremetz<sup>1</sup>, Yann Guérardel<sup>3</sup>, Georges Lutfalla<sup>1,#</sup> et Laurent Kremer<sup>1,2,#</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier II et I, CNRS; UMR 5235, case 107, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France; <sup>2</sup>INSERM, DIMNP, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France; <sup>3</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, Cédex, France. <sup>4</sup>Texas A&M Health Science Center, 467 Reynolds Medical Building, College Station, TX 77843-1114.

Summary: Mycobacterium marinum, the closest genetic relative of the Mycobacterium tuberculosis complex, is a natural pathogen of fish, commuting between hosts and environmental niches. Infection of the zebrafish with *M. marinum* is now regarded as a well established experimental model to study of the pathogenicity of *M. tuberculosis*. In order to decipher M. marinum-zebrafish interactions, a transposon mutant library was screened for attenuated *M. marinum* phenotypes using a *Dictyostelium discoideum* assay. In one attenuated mutant, the transposon was located within the tesA gene, encoding a putative type II thioesterase, and functional complementation with *tesA* fully restored the parental phenotype in D. discoideum. Thin layer chromatography analyses indicated that the tesA::Tn mutant failed to produce two major cell wall-associated lipids. Structural determination by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance clearly established the nature of missing lipids as phtioglycol diphtioceranates and phenolic glycolipids, respectively, thus indicating that TesA is required for the synthesis of both lipids. When injected into the zebrafish embryo bloodstream, the mutant was found to be highly attenuated, thus validating the performance and relevance of our screen performed in D. discoideum to identify attenuated M. marinum mutants. Unexpectedly, virulence was retained when bacteria were injected into the notochord. Histological and ultrastructural studies of the infected notochord indeed revealed

the presence of actively-proliferating mycobacteria, leading to larval death. This work presents for the first time the notochord as a compartment highly susceptible to mycobacterial infection. Because the notochord becomes ossified in regions of forming vertebrae, we propose this biological system as a valuable model to dissect early pathophysiological events leading to bone destruction in Pott's disease.

Résumé: Mycobacterium marinum est une mycobactérie génétiquement proche de Mycobacterium tuberculosis, qui infecte naturellement les poissons. Aussi, l'infection du poisson zèbre (Danio rerio) par M. marinum est considérée aujourd'hui comme un modèle expérimental efficace permettant de mieux comprendre les mécanismes de pathogénicité de *M. tuberculosis*. Afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la virulence des mycobactéries, une bibliothèque de mutants de M. marinum a été construite, à l'aide de transposons s'insérant aléatoirement dans le génome de la mycobactérie. La virulence des mutants a par la suite été criblée dans l'organisme modèle unicellulaire Dictyostelium discoideum. Dans un des mutants de virulence atténuée, le transposon s'est révélé être situé dans le gène TesA, prédit pour coder pour une thioestérase de type II. La complémentation fonctionnelle avec TesA a entièrement restauré le phénotype parental dans D. discoideum. Les analyses par chromatographie sur couche mince ont alors montré que ce mutant TesA<sup>-</sup> était incapable de produire deux types de lipides pariétaux majeurs. Ces lipides ont été purifiés à partir de la souche sauvage de M. marinum et caractérisés par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Ils ont ont ainsi été identifiés comme étant des phtioglycol diphtiocéranates (DIMs) et des glycolipides phénoliques (PGLs).

L'injection du mutant TesA<sup>-</sup> dans la circulation sanguine des embryons de poisson zèbre démontre que celui-ci est peu virulent, validant le crible réalisé chez *D. discoideum*. De façon inattendue, l'injection de ce mutant dans la notochorde du poisson n'a révélé aucune modification de la virulence en comparaison avec la souche parentale. En effet, les études histologiques et ultra-structurelles de la notochorde ont mis en évidence la présence de mycobactéries mutantes proliférant rapidement, et entrainant la mort des larves du poisson. Ce travail présente donc pour la première fois la notochorde comme un compartiment particulièrement sensible à l'infection mycobactérienne. La notochorde est l'axe primitif autour duquel apparaissent et se développent les vertèbres ; aussi, nous proposons ce système biologique comme un modèle intéressant pour étudier les stades précoces conduisant à la destruction osseuse dans le Mal de Pott.

# Matériel et Méthodes

# Matériel et méthodes

# A. Extraction et purification des glycolipides et lipoglycannes

### 1. Souches de mycobactéries et conditions de cultures

Les mycobactéries utilisées dans ce travail ont été fournies par l'équipe du Dr. Laurent Kremer. Leurs conditions de cultures ont été décrites par Kremer et collaborateurs dans une étude précédente (Kremer *et al.*, 2002a).

## 2. Extraction et purification des glycolipides

#### a. Extraction des glycolipides

L'extraction des glycolipides a été décrite par Burguière et collaborateurs dans une étude publiée en 2005 (Burguiere et al., 2005). Les glycolipides sont extraits à partir des mycobactéries inactivées par la chaleur et lyophilisées. Les volumes de solvant sont donnés à titre indicatif et concernent l'extraction des lipides à partir de 10g de cellules en poids sec. Les lipides apolaires sont isolés à la suite de deux extractions bi-phasiques dans une solution de méthanol salin (220 mL; 0.3% NaCl/méthanol, 1:10 vol/vol) et d'éther de pétrole (220 mL; 1:1 vol/vol). Après centrifugation (4000 x g, 15 minutes à température ambiante), la phase supérieure (éther de pétrole) contenant les lipides apolaires est prélevée. Les glycolipides polaires sont extraits en ajoutant 260 mL d'une solution de chloroforme, méthanol, 0.3% NaCl (9:10:3, v/v/v) à la phase inférieure. Le mélange est filtré sur Büchner et le retentât reextrait deux fois avec 85 mL d'une solution de chloroforme, méthanol, 0.3% NaCl (5:10:4, v/v/v). Les filtrats sont ensuite mélangés pendant 1 heure après ajout de 145 mL de chloroforme et 145 mL de 0,3% NaCl. Après décantation du mélange, la phase inférieure (chloroforme/méthanol) contenant les lipides polaires est séchée dans un évaporateur rotatif. Les lipides apolaires et polaires sont visualisés par chromatographie sur couche mince (CCM).

#### b. Purification des glycolipides apolaires

Les glycolipides apolaires isolés sont dissous dans du chloroforme et déposés sur colonne de silice préalablement conditionnée dans ce même solvant. La chromatographie est effectuée à basse pression (0,6 à 1 bar). La colonne est lavée par 500mL de chloroforme (v/v) et éluée par un gradient discontinu de chloroforme/méthanol en augmentant progressivement les concentrations en méthanol (2-50%). Des fractions de 30 mL sont récoltées et les glycolipides sont visualisés par CCM. Les fractions contenant les glycolipides d'intérêts sont regroupées et séchées dans un évaporateur rotatif. Les composés contenus dans ces fractions sont ensuite purifiés séparément. Les glycolipides sont solubilisés dans du chloroforme et déposés sur colonne de Florisil® (silicate de magnésium) préalablement conditionnée dans ce même solvant. L'élution de la colonne s'effectue de la même manière que pour la colonne de silice précédente. La purification finale des glycolipides est réalisée par CCM préparative. Après migration et révélation par l'iode, les glycolipides ont été récupérés par grattage de la silice et élués dans le chloroforme ou le chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Les surnageants sont filtrés sur colonne de laine de verre et dessalés sur une cartouche de C18 en chloroforme/méthanol (Sep Pack, Waters®).

#### c. Purification des glycolipides polaires

Les glycolipides polaires extraits sont dissous dans du chloroforme/méthanol (2:1, v/v) et déposés sur colonne de DEAE-cellulose. La colonne est lavée par 500 mL de chloroforme/méthanol 2:1 (v/v) et éluée par un gradient discontinu (fractions de 500 mL) d'acétate d'ammonium (5-500 mM) dans du chloroforme/méthanol 2:1 (v/v). Des fractions de 50 mL sont récoltées et les glycolipides sont visualisés par CCM. Les fractions contenant les glycolipides sont regroupées et séchées. L'excès de sels est éliminé par extraction de Folch (Folch *et al.*, 1957). La phase organique est séchée puis les composés sont dissous dans du chloroforme et déposés sur une colonne de silice préalablement conditionnée dans ce même solvant. La colonne est lavée par 300 mL de chloroforme puis éluée par un gradient discontinu de chloroforme/méthanol en augmentant les concentrations en méthanol (5-80%). Des fractions de 50 mL sont récoltées et les glycolipides sont réunies et séchées. La purification finale des glycolipides est réalisée par CCM préparative (Cf. &2b).

### 3. Extraction et purification des lipoglycannes

#### a. Extraction des lipoglycannes

Les mycobactéries lyophilisées sont lysées par presse de French dans un tampon de lyse (8% (v/v) Triton X-114 dans le PBS, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) puis mélangées toute la nuit à 4°C. Après centrifugation (27 000 x g, 30 minutes à 4°C), les débris cellulaires sont éliminés. Le surnagent est incubé à 37°C pour induire une séparation en deux phases, la phase inférieure enrichie en détergent (X-114) et la phase supérieure appauvrie en détergent. Les lipoglycannes contenus dans la phase inferieure sont précipités par addition de 5 volumes d'éthanol à froid puis centrifugation (27 000 x g, 30 minutes à 4°C). Le précipitat est reconstitué dans de l'eau et les acides nucléiques sont digérés par la protéinase K. Les protéines sont éliminées par deux extractions successives dans le phénol. La phase aqueuse contenant les lipoglycannes est dialysée contre de l'eau pendant 72 heures à 4°C. Les lipoglycannes sont finalement lyophilisées.

#### b. Purification des lipoglycannes

Les lipoglycannes lyophilisés sont solubilisés dans un tampon Tris déoxycholate (10 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 0.2 M NaCl, 0,25 % déoxycholate) puis déposés sur colonne gel filtration de Sephacryl S-200 (GE Healthcare®). L'élution des composés est suivie par réfractométrie différentielle. Les fractions d'intérêt sont déposées sur électrophorèse en gel SDS-PAGE de 13% et les lipoglycannes révélés selon le protocole de Tsai et Frasch (Tsai et Frasch, 1982). Les fractions contenant le LM ou le LAM sont regroupées et dialysées contre du Tris-HCl 8 mM (pH 8) pendant 48 Heures puis contre de l'eau durant la même période. Les lipoglycannes sont finalement lyophilisées.

# **B.** Dérivation des glycolipides

### 1. Déacylation des glycolipides

Les glycolipides sont déacylés à 37°C par une solution de méthanol 0,1% NaOH pendant 4 heures. La réaction est arrêtée par l'acide acétique jusqu'à l'obtention d'un pH neutre et le produit de réaction est séché sous azote. Les lipides sont éliminés sur une cartouche de C18 (Sep Pack, Waters®) et les oligosaccharides sont finalement purifiés sur une colonne de charbon dans l'acétonitrile (SPE-Carbograph, Alltech®).

#### 2. Perméthylation

Les glycolipides lyophilisés et solubilisés dans 300  $\mu$ L de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont mélangés à 50 mg de soude broyée et 300  $\mu$ L d'iodure de méthyle (ICH<sub>3</sub>). Après incubation 2 heures au bain à ultrasons, la réaction est arrêtée par addition de 1 mL d'eau. Les composés perméthylés sont extraits par 1 mL de chloroforme et lavés 8 fois avec 2 mL d'eau (Ciucanu et Kerek, 1984). Les composés sont ensuite purifiés sur une cartouche Sep Pack C18 préalablement conditionnée dans 5 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v), 5 mL de méthanol et dans 5 mL de méthanol/eau (1:1, V/V). La colonne est ensuite lavée par 15 mL de méthanol puis par 5mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v). Ils sont ensuite concentrés dans un évaporateur rotatif sous vide puis lyophilisés.

### 3. Peracétylation

Les glycolipides natifs ou perméthylés lyophilisés sont hydrolysés par 0.5 mL d'acide trifluoroacétique (ATFA) 4 heures à 100°C. Puis, les monosaccharides sont réduits avec 0,5 mL d'une solution à 20 mg/mL de BD<sub>4</sub>Na dans l'ammoniaque 0.05 M pendant 4 heures à température ambiante. La réduction est arrêtée par quelques gouttes d'acide acétique 5%, jusqu'à l'arrêt du dégagement d'hydrogène gazeux (pH 4). L'excédent de BD<sub>4</sub>Na est codistillé 5 fois en présence de méthanol sous courant d'azote. Les monosaccharides réduits sont lyophilisés et per-*O*-acétylés par 0.5 mL d'anhydride acétique à 100°C pendant 4 heures. Les peracétylglycosides ou les glycosides partiellement méthylés et acétylés sont séchés sous azote, repris dans 1.5 mL de chloroforme et lavés 5 fois par 1 mL d'eau. Les dérivés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Pour analyser la séquence du glycolipide X1, ce dernier a été dé-*O*-acylé puis per-*O*-acétylé sans hydrolyse ou réduction intermédiaire.

# 4. Analyse de la composition molaire en monosaccharides des glycolipides

Les glycolipides sont méthanolysés pendant 20 heures à 80°C par 0.5 mL de méthanol chlorhydrique 0.5 N. Après évaporation sous courant d'azote, les méthylglycosides libérés sont repris par 200  $\mu$ L d'acétonitrile anhydre et dérivés par addition de 25  $\mu$ L d'anhydride heptafluorobutyrique (Zanetta *et al.*, 1999). La réaction est réalisée pendant 30 minutes à

150°C. Après évaporation, les perheptafluorobutyryl-1-O-méthylglycosides sont solubilisés dans 50 µL d'acétonitrile anhydre puis analysés en chromatographie en phase gazeuse (GC) ou GC-MS.

# C. Méthodes analytiques

#### 1. Chromatographie sur couche mince

Les chromatographies sur couche mince sont réalisées sur des plaques en verre HPTLC gel de silice 60 (20 x 20 cm). Les solvants de migration utilisés sont décrits dans le Tableau III-1 du chapitre III. Les glycolipides sont révélés par pulvérisation d'un mélange d'orcinol/acide sulfurique (2% d'orcinol dans l'acide sulfurique 20%, v/v) puis chauffage à 110°C pendant 5 minutes.

### 2. Chromatographie en phase gazeuse (GC)

La GC est réalisée sur un chromatographe Shimadzu®, équipé d'un injecteur de Ross et d'une colonne capillaire ECTM 1 (Alltech®) 30m x 0.25mm (épaisseur de phase 0.25 $\mu$ m). Le gradient de température utilisé est le suivant : de 100°C à 140°C à 1,2°C/min puis de 140°C à 250°C à 4°C/min.

# 3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Pour les analyses en GC-MS, la séparation en GC est effectuée sur un chromatographe Carlo Erba GC 8000 équipé d'une colonne capillaire apolaire SOLGEL1 (société SGE) de 30 m x 0.25 mm. La température de l'injecteur de Ross est de 280°C. Selon la nature des échantillons, différents programmes températures sont utilisés (Cf. légendes des Figures). La colonne est couplée à un spectromètre de masse Finnigan® Automass II (limite de masse : 1000). Les analyses de masse sont réalisées en mode Impact Electronique (EI) (énergie d'ionisation 70 eV ; température de la source : 150°C).

#### Programme température 1 :

de 120°C à 280°C à 5°C/min.

#### Programme température 2 :

• de 120°C à 230°C à 3°C/min puis de 230°C à 270°C à 10°C/min.

#### Programme température 3 :

• de 120°C à 300°C à 10°C/min.

### 4. Spectrométrie de masse MALDI-TOF MS

Les analyses MALDI-TOF (Ionisation par Désorption Laser Assistée par une Matrice, analyseur à temps de vol) sont réalisées sur un spectromètre de masse Voyager Elite (DE-STR, PerSeptive Biosystem®). La désorption et l'ionisation sont obtenues à l'aide d'un laser à azote pulsé (longueur d'onde : 337 nm). Le spectromètre opère en mode réflectron positif ou négatif avec une tension d'accélération de 20 KV, le délai d'extraction étant de 200 nsec. Les données présentées résultent de l'accumulation de spectres acquis après 100 à 200 tirs laser. Les oligosaccharides natifs ou perméthylés sont solubilisés respectivement dans du méthanol/eau (80:20, v/v) ou du méthanol, à une concentration de 5 à 10 pmoles/µL. 1µL d'échantillon est mélangé, directement sur la cible MALDI, à 1 µL de matrice DHB (acide 2,5 dihydroxy benzoïque à 10 mg/mL en solution dans l'eau/méthanol 80/20 v/v). Les lipides et glycolipides sont solubilisés dans du chloroforme ou du chloroforme/méthanol (2:1, v/v) et mélangés, avant dépôt sur la cible, avec du DHB à 10 mg/mL en solution dans le chloroforme/méthanol (2:1, v/v).

## 5. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les glycolipides natifs sont échangés deux fois dans du CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (1:1, v/v) et finalement solubilisés dans 500  $\mu$ L de CDCl<sub>3</sub> ou de CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (2:1, v/v) (99.97% purity, Euriso-top®) dans des tubes BB-5mm selon la polarité des composés. Les lipoglycannes et les glycannes issus des glycolipides sont échangés deux fois dans du D<sub>2</sub>O avec une étape intermédiaire de lyophilisation. Les lipoglycannes sont finalement repris dans 500  $\mu$ L de DMSO-*d*6 (Euriso-top®) et les glycannes sont solubilisés dans 500  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O (99.97% <sup>2</sup>H, Euriso-top®) dans des tubes BB-5mm. Les échantillons sont analysés sur un spectromètre Bruker® Avance-400 équipé avec une sonde BBI (<sup>1</sup>H 400.33 MHz et <sup>13</sup>C 100.66 MHz).

Les analyses sont effectuées aux températures indiquées dans les expériences réalisées (Cf. légendes des Figures) en utilisant les programmes d'impulsions de la banque de données Bruker®. Les délais et durées d'impulsions sont optimisés pour chaque expérience. Les expériences TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) ont été enregistrées avec des temps de mélange de 40, 80 et 120 ms et les expériences ROESY (Rotating Overhauser Effect

SpectroscopY) avec des temps de mélange de 300 et 400 ms. Les expériences hétéronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HSQC-TOCSY, et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) sont enregistrées avec une fenêtre spectrale de 4000Hz pour le <sup>1</sup>H et 20000 Hz pour le <sup>13</sup>C.

# Bibliographie
- Abebe, F. and G. Bjune (2009). "The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection." <u>Clin. Exp. Immunol.</u> **157**(2): 235-243.
- Adinolfi, M., *et al.* (1995). "The relative and absolute configurations of stereocenters in caryophyllose." <u>Carbohydr.Res.</u> **274**: 223-232.
- Alahari, A., et al. (2009). "Mycolic acid methyltransferase, MmaA4, is necessary for thiacetazone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Mol. Microbiol.</u> **71**(5): 1263-1277.
- Alahari, A., *et al.* (2007). "Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria." <u>PLoS One.</u> **2**(12): e1343.
- Alatas, F., *et al.* (2004). "Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis." <u>Chest.</u> **125**(6): 2156-2159.
- Alderwick, L. J., et al. (2007). "Structure, function and biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets." <u>Biochem. Soc. Trans.</u> **35**(Pt 5): 1325-1328.
- Alderwick, L. J., et al. (2005). "Deletion of Cg-emb in corynebacterianeae leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of Cg-ubiA results in an arabinan-deficient mutant with a cell wall galactan core." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> 280(37): 32362-32371.
- Aleman, M., et al. (2007). "Spontaneous or Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response." <u>Eur. J. Immunol.</u> **37**(6): 1524-1537.
- Algood, H. M., *et al.* (2005). "Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis." <u>Clin. Infect. Dis.</u> 41
   Suppl 3: S189-193.
- Aly, S., et al. (2006). "Oxygen status of lung granulomas in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice." <u>J Pathol</u> **210**(3): 298-305.
- Amin, A. G., *et al.* (2008). "EmbA is an essential arabinosyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Microbiology</u>. **154**(Pt 1): 240-248.
- Anand, S., et al. (2010). "SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases." <u>Nucleic Acids Res</u> **38 Suppl**: W487-496.
- Andersen, C. A., *et al.* (2009). "Novel generation mycobacterial adjuvant based on liposome-encapsulated monomycoloyl glycerol from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin." J. Immunol. **183**(4): 2294-2302.
- Andersen, P. and T. M. Doherty (2005). "The success and failure of BCG implications for a novel tuberculosis vaccine." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **3**(8): 656-662.
- Anes, E., et al. (2006). "Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages." <u>Cell. Microbiol.</u> **8**(6): 939-960.
- Appelberg, R. (2007). "Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing." <u>Trends Microbiol.</u> **15**(2): 87-92.
- Appelmelk, B. J., *et al.* (2008). "The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the *Mycobacterium*-host interaction." <u>Cell. Microbiol.</u> **10**(4): 930-944.

- Ariza, M. A., et al. (1994). "A family of diacyltrehaloses isolated from *Mycobacterium* fortuitum." <u>Microbiology</u>. **140 ( Pt 8)**: 1989-1994.
- Asselineau, C. P., et al. (1972). "[Polyunsaturated glycolipids synthesized by Mycobacterium phlei]." Eur. J. Biochem. **28**(1): 102-109.
- Astarie-Dequeker, C., et al. (2009). "Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids." <u>PLoS Pathog.</u> **5**(2): e1000289.
- Astarie-Dequeker, C., et al. (1999). "The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages." Infect. Immun. **67**(2): 469-477.
- Aubry, A., *et al.* (2000). "Antibiotic susceptibility pattern of *Mycobacterium marinum*." <u>Antimicrob. Agents Chemother.</u> **44**(11): 3133-3136.
- Axelrod, S., *et al.* (2008). "Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide." <u>Cell. Microbiol.</u> **10**(7): 1530-1545.
- Azad, A. K., et al. (1997). "Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria." <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u> 272(27): 16741-16745.

## B

- Bach, H., et al. (2008). "Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B." <u>Cell Host Microbe.</u> 3(5): 316-322.
- Baena, A. and S. A. Porcelli (2009). "Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Tissue Antigens</u> **74**(3): 189-204.
- Bafica, A., *et al.* (2005). "TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*." <u>J. Exp. Med.</u> **202**(12): 1715-1724.
- Balcewicz-Sablinska, M. K., et al. (1998). "Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha." J. Immunol. **161**(5): 2636-2641.
- Ballou, C. E., et al. (1963). "Structural studies on the myo-inositol phospholipids of Mycobacterium tuberculosis (var. bovis, strain BCG)." J. Biol. Chem. 238: 69-76.
- Barbazuk, W. B., *et al.* (2000). "The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes." <u>Genome Res.</u> **10**(9): 1351-1358.
- Barker, L. P., *et al.* (1997). "Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages." <u>Infect. Immun.</u> **65**(4): 1497-1504.
- Barry, C. E., 3rd, *et al.* (2009). "The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **7**(12): 845-855.
- Beatty, W. L., *et al.* (2002). "Association of a macrophage galactoside-binding protein with *Mycobacterium*-containing phagosomes." <u>Cellular Microbiology</u> **4**(3): 167-176.
- Beatty, W. L., *et al.* (2000). "Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages." <u>Traffic.</u> **1**(3): 235-247.
- Beatty, W. L., *et al.* (2001). "Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event." <u>Eur. J. Cell. Biol.</u> **80**(1): 31-40.

- Becq, J., *et al.* (2007). "Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli." <u>Mol. Biol. Evol.</u> **24**(8): 1861-1871.
- Behar, S. M., et al. (2010). "Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?" <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **8**(9): 668-674.
- Behr, M.*, et al.* (2010). "TB: screening for responses to a vile visitor." <u>Cell.</u> **140**(5): 615-618.
- Behr, M. A., *et al.* (1999). "Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli." <u>Lancet.</u> **353**(9151): 444-449.
- Belisle, J. T. and P. J. Brennan (1989). "Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria." J. Bacteriol. **171**(6): 3465-3470.
- Belisle, J. T., *et al.* (1997). "Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis." <u>Science</u>. **276**(5317): 1420-1422.
- Belkaid, Y. and K. Tarbell (2009). "Regulatory T cells in the control of hostmicroorganism interactions (\*)." <u>Annu. Rev. Immunol.</u> **27**: 551-589.
- Berg, S., et al. (2007). "The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates." <u>Glycobiology</u>. **17**(6): 35-56R.
- Bergsbaken, T., et al. (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." <u>Nat.</u> <u>Rev. Microbiol.</u> **7**(2): 99-109.
- Berthou, C., *et al.* (1998). "[Granzyme B: an essential protease for the inflammatory response]." <u>Pathol Biol (Paris)</u> **46**(8): 617-624.
- Besra, G. S. (1998). "Preparation of cell-wall fractions from mycobacteria." <u>Methods</u> <u>Mol. Biol.</u> **101**: 91-107.
- Besra, G. S., *et al.* (1992a). "Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Biochemistry.</u> **31**(40): 9832-9837.
- Besra, G. S., *et al.* (1994a). "New pyruvylated, glycosylated acyltrehaloses from *Mycobacterium smegmatis* strains, and their implications for phage resistance in mycobacteria." <u>Carbohydr. Res.</u> **251**: 99-114.
- Besra, G. S., *et al.* (1991). "Structural elucidation and antigenicity of a novel phenolic glycolipid antigen from *Mycobacterium haemophilum*." <u>Biochemistry</u>. **30**(31): 7772-7777.
- Besra, G. S., *et al.* (1992b). "Characterization of the specific antigenicity of *Mycobacterium fortuitum*." <u>Biochemistry</u>. **31**(28): 6504-6509.
- Besra, G. S., *et al.* (1993a). "Trehalose-containing lipooligosaccharides of *Mycobacterium gordonae*: presence of a mono-O-methyltetra-O-acyltrehalose "core" and branching in the oligosaccharide backbone." <u>Biochemistry.</u> **32**(47): 12705-12714.
- Besra, G. S., *et al.* (1993b). "Further structural definition of a new family of glycopeptidolipids from *Mycobacterium xenopi*." <u>Biochemistry</u>. **32**(1): 347-355.
- Besra, G. S., et al. (1994b). "Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**(26): 12735-12739.
- Bhamidi, S., *et al.* (2008). "The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl arabinogalactan." J. Biol. Chem. **283**(19): 12992-13000.
- Bhatt, K., et al. (2007). "Two polyketide-synthase-associated acyltransferases are required for sulfolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Microbiology</u>. **153**(Pt 2): 513-520.
- Bhatty, M. A., *et al.* (2000). "*Mycobacterium marinum* hand infection: case reports and review of literature." <u>Br. J. Plast. Surg.</u> **53**(2): 161-165.

- Birch, H. L., *et al.* (2010). "A truncated lipoglycan from mycobacteria with altered immunological properties." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **107**(6): 2634-2639.
- Birch, H. L., *et al.* (2008). "Biosynthesis of mycobacterial arabinogalactan: identification of a novel alpha(1-->3) arabinofuranosyltransferase." <u>Mol.</u> <u>Microbiol.</u> **69**(5): 1191-1206.
- Biswas, D., et al. (2008). "ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages." <u>BMC</u> <u>Immunol.</u> **9**: 35.
- Blumenthal, A., et al. (2009). "RP105 facilitates macrophage activation by Mycobacterium tuberculosis lipoproteins." <u>Cell Host Microbe</u>. **5**(1): 35-46.
- Bock, K., *et al.* (1983). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Monosaccharides. <u>Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry</u>, Academic Press. **Volume 41:** 27-66.
- Boom, W. H. (2007). "New TB vaccines: is there a requirement for CD8 T cells?" <u>J.</u> <u>Clin. Invest.</u> **117**(8): 2092-2094.
- Boom, W. H., *et al.* (1991). "Human *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD4+ T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes." <u>Infect. Immun.</u> **59**(8): 2737-2743.
- Boshoff, H. I. and C. E. Barry, 3rd (2005). "Tuberculosis metabolism and respiration in the absence of growth." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **3**(1): 70-80.
- Boshra, H., et al. (2006). "Recent advances on the complement system of teleost fish." Fish Shellfish Immunol **20**(2): 239-262.
- Bouley, D. M., et al. (2001). "Dynamic nature of host-pathogen interactions in *Mycobacterium marinum* granulomas." <u>Infect. Immun.</u> **69**(12): 7820-7831.
- Bowdish, D. M., *et al.* (2009). "MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*." <u>PLoS Pathog.</u> **5**(6): e1000474.
- Bradbury, J. H. and G. A. Jenkins (1984). "Determination of the structures of trisaccharides by 13C-n.m.r. spectroscopy." <u>Carbohydr.Res.</u> **126**(1): 125-156.
- Brennan, P. J. and H. Nikaido (1995). "The envelope of mycobacteria." <u>Annu. Rev.</u> <u>Biochem.</u> **64**: 29-63.
- Brigl, M. and M. B. Brenner (2004). "CD1: antigen presentation and T cell function." Annu. Rev. Immunol. 22: 817-890.
- Briken, V. and J. L. Miller (2008). "Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Future Microbiol.</u> **3**: 415-422.
- Briken, V., *et al.* (2004). "Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response." <u>Mol. Microbiol.</u> **53**(2): 391-403.
- Brinker, K. G., et al. (2003). "Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells." <u>Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol.</u> <u>Physiol.</u> 284(1): L232-241.
- Brinkmann, V. and A. Zychlinsky (2007). "Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **5**(8): 577-582.
- Brodin, P., *et al.* (2010). "High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling." <u>PLoS Pathog.</u> **6**(9).
- Brosch, R., et al. (2002). "A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **99**(6): 3684-3689.

Broussard, G. W. and D. G. Ennis (2007). "*Mycobacterium marinum* produces longterm chronic infections in medaka: a new animal model for studying human tuberculosis." <u>Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.</u> **145**(1): 45-54.

Bruckner, J. (1955). "Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction." <u>The Biochemical journal</u>.

Burgdorf, S., *et al.* (2007). "Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation." <u>Science.</u> **316**(5824): 612-616.

Burguiere, A., *et al.* (2005). "LosA, a key glycosyltransferase involved in the biosynthesis of a novel family of glycosylated acyltrehalose lipooligosaccharides from *Mycobacterium marinum*." J. Biol. Chem. **280**(51): 42124-42133.

C

- Caceres, N., *et al.* (2009). "Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models." <u>Tuberculosis (Edinb).</u> **89**(2): 175-182.
- Camacho, L. R., *et al.* (2001). "Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier." J. Biol. Chem. **276**(23): 19845-19854.
- Camphausen, R. T., *et al.* (1987). "Location of acyl groups of trehalose-containing lipooligosaccharides of mycobacteria." J. Bacteriol. **169**(12): 5473-5480.
- Canaday, D. H., et al. (1999). "Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway." J. Immunol. **162**(1): 372-379.
- Cardona, P. J. (2009). "A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection." Infection. **37**(2): 80-86.
- Carlsson, F. and E. J. Brown (2009). "Cell biology. The art of making an exit." <u>Science</u>. **323**(5922): 1678-1679.
- Carlsson, F., et al. (2010). "Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection." <u>PLoS Pathog.</u> **6**(5): e1000895.
- Carroll, K. K. (1961). "Separation of lipid classes by chromatography on Florisil." <u>J.</u> <u>Lipid. Res.</u> **2**: 135-141.
- Cennimo, D. J., *et al.* (2009). "*Mycobacterium marinum* Hand Infection in a "Sushi Chef"." <u>Eplasty</u>. **9**: e43.
- Chackerian, A. A., *et al.* (2002). "Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity." <u>Infect. Immun.</u> **70**(8): 4501-4509.
- Chambers, M. A., et al. (2010). "Non-acylated *Mycobacterium bovis* glycoprotein MPB83 binds to TLR1/2 and stimulates production of matrix metalloproteinase 9." <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u>
- Chan, J., *et al.* (1989). "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **86**(7): 2453-2457.
- Chan, J., et al. (1992). "Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages." J. Exp. <u>Med.</u> **175**(4): 1111-1122.

- Chatterjee, D., *et al.* (1991). "Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. **266**(15): 9652-9660.
- Chatterjee, D., *et al.* (1992). "Lipoarabinomannan. Multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols." <u>J. Biol. Chem.</u> **267**(9): 6228-6233.
- Chatterjee, D. and K. H. Khoo (1998). "Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects." <u>Glycobiology</u>. **8**(2): 113-120.
- Chatterjee, D. and K. H. Khoo (2001). "The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties." <u>Cell. Mol. Life Sci.</u> **58**(14): 2018-2042.
- Chaurasiya, S. K. and K. K. Srivastava (2009). "Downregulation of protein kinase Calpha enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG." <u>BMC</u> <u>Microbiol.</u> **9**: 271.
- Chen, 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**(12): 2791-2801.
- Chiba, A., *et al.* (2008). "Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection." J. Immunol. **181**(4): 2292-2302.
- Chieppa, M., et al. (2003). "Cross-linking of the mannose receptor on monocytederived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program." J. Immunol. **171**(9): 4552-4560.
- Chopra, T., *et al.* (2008). "Novel intermolecular iterative mechanism for biosynthesis of mycoketide catalyzed by a bimodular polyketide synthase." <u>PLoS Biol.</u> **6**(7): e163.
- Ciucanu, I. and F. Kerek (1984). "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates." <u>Carbohydr.Res.</u> **131**(2): 209-217.
- Clark, H. F. and C. C. Shepard (1963). "Effect of Environmental Temperatures on Infection with *Mycobacterium Marinum* (Balnei) of Mice and a Number of Poikilothermic Species." J. Bacteriol. **86**: 1057-1069.
- Clark, R. B., et al. (1990). "Osteomyelitis and synovitis produced by *Mycobacterium marinum* in a fisherman." J. Clin. Microbiol. **28**(11): 2570-2572.
- Clay, H., *et al.* (2008). "Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death." <u>Immunity.</u> **29**(2): 283-294.
- Clemens, D. L. and M. A. Horwitz (1996). "The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin." J. Exp. Med. **184**(4): 1349-1355.
- Collins, F. M. and D. S. Cunningham (1981). "Systemic *Mycobacterium kansasii* infection and regulation of the alloantigenic response." <u>Infect. Immun.</u> **32**(2): 614-624.
- Collins, F. M., *et al.* (1975). "Growth and immunogenicity of photochromogenic strains of mycobacteria in the footpads of normal mice." <u>Infect. Immun.</u> **11**(5): 1079-1087.
- Constant, P., *et al.* (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**(41): 38148-38158.

- Converse, S. E., *et al.* (2003). "MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **100**(10): 6121-6126.
- Cook, G. M., et al. (2009). "Physiology of mycobacteria." <u>Adv. Microb. Physiol.</u> 55: 81-182, 318-189.
- Cooper, A. M. (2009). "Cell-mediated immune responses in tuberculosis." <u>Annu. Rev.</u> <u>Immunol.</u> **27**: 393-422.
- Cooper, A. M. and S. A. Khader (2008). "The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis." <u>Immunol. Rev.</u> **226**: 191-204.
- Cosma, C. L., *et al.* (2004). "Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas." <u>Nat. Immunol.</u> **5**(8): 828-835.
- Cosma, C. L., *et al.* (2008). "Trafficking of superinfecting *Mycobacterium* organisms into established granulomas occurs in mammals and is independent of the Erp and ESX-1 mycobacterial virulence loci." J. Infect. Dis. **198**(12): 1851-1855.
- Cosma, C. L., *et al.* (2003). "The secret lives of the pathogenic mycobacteria." <u>Annu.</u> <u>Rev. Microbiol.</u> **57**: 641-676.
- Cosma, C. L., *et al.* (2006). "Zebrafish and frog models of *Mycobacterium marinum* infection." <u>Curr. Protoc. Microbiol.</u> **Chapter 10**: Unit 10B 12.
- Court, N., *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." J. Immunol. **184**(12): 7057-7070.
- Crellin, P. K., *et al.* (2008). "Mutations in pimE restore lipoarabinomannan synthesis and growth in a *Mycobacterium smegmatis* lpqW mutant." <u>J. Bacteriol.</u> **190**(10): 3690-3699.
- Crick, D. C., *et al.* (2001). "Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Glycobiology</u>. **11**(9): 107R-118R.
- Cyster, J. G. (1999a). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." <u>Science</u>. **286**(5447): 2098-2102.
- Cyster, J. G. (1999b). "Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs." J. Exp. Med. **189**(3): 447-450.
- Cywes, C., *et al.* (1997). "Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent." Infect. Immun. **65**(10): 4258-4266.

- Daffe, M. (1991). "Further stereochemical studies of phthiocerol and phenol phthiocerol in mycobacteria." <u>Res. Microbiol.</u> **142**(4): 405-410.
- Daffe, M. and P. Draper (1998). "The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity." <u>Adv. Microb. Physiol.</u> **39**: 131-203.
- Daffe, M. and G. Etienne (1999). "The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity." <u>Tuber. Lung Dis.</u> **79**(3): 153-169.
- Daffe, M., et al. (1988a). "Polyphthienoyl trehalose, glycolipids specific for virulent strains of the tubercle bacillus." <u>Eur. J. Biochem.</u> **172**(3): 579-584.
- Daffe, M., et al. (1987). "Structure of the major triglycosyl phenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain Canetti)." <u>Eur. J. Biochem.</u> **167**(1): 155-160.

- Daffe, M. and M. A. Laneelle (1988). "Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria." J. Gen. Microbiol. **134**(7): 2049-2055.
- Daffe, M., et al. (1991a). "Structure and stereochemistry of mycolic acids of Mycobacterium marinum and Mycobacterium ulcerans." <u>Res. Microbiol.</u> 142(4): 397-403.
- Daffe, M., et al. (1988b). "Monoglycosyldiacylphenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*." <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> **958**(3): 443-449.
- Daffe, M., et al. (1991b). "Novel type-specific lipooligosaccharides from Mycobacterium tuberculosis." <u>Biochemistry</u>. **30**(2): 378-388.
- Daffe, M., *et al.* (1992). "The phenolic mycoside of *Mycobacterium ulcerans*: structure and taxonomic implications." <u>J. Gen. Microbiol.</u> **138**(1): 131-137.
- Dahm, R. and R. Geisler (2006). "Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species." <u>Mar. Biotechnol. (NY).</u> **8**(4): 329-345.
- Danila, E. and E. Zurauskas (2008). "Diagnostic value of epithelioid cell granulomas in bronchoscopic biopsies." Intern Med **47**(24): 2121-2126.
- Dao, D. N., et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages." <u>Infect. Immun.</u> 72(4): 2067-2074.
- Dao, D. N., *et al.* (2008). "Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production." <u>PLoS Pathog.</u> **4**(6): e1000081.
- Daugelat, S., et al. (2003). "The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization." <u>Microbes Infect.</u> **5**(12): 1082-1095.
- Davis, J. M. and L. Ramakrishnan (2009). "The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection." <u>Cell.</u> **136**(1): 37-49.
- de Chastellier, C., *et al.* (2009). "*Mycobacterium* requires an all-around closely apposing phagosome membrane to maintain the maturation block and this apposition is re-established when it rescues itself from phagolysosomes." <u>Cell.</u> <u>Microbiol.</u> **11**(8): 1190-1207.
- de Chastellier, C. and L. Thilo (2006). "Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles." <u>Cell. Microbiol.</u> **8**(2): 242-256.
- de Jonge, M. I., *et al.* (2007). "ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity." <u>J. Bacteriol.</u> **189**(16): 6028-6034.
- de la Salle, H., *et al.* (2005). "Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e." <u>Science.</u> **310**(5752): 1321-1324.
- De Smet, K. A., et al. (2000). "Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria." <u>Microbiology.</u> **146 ( Pt 1)**: 199-208.
- Deghmane, A. E., et al. (2007). "Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation." <u>J.</u> <u>Cell. Sci.</u> **120**(Pt 16): 2796-2806.
- Delmas, C., *et al.* (1997). "Comparative structural study of the mannosylatedlipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains: characterization and localization of succinates." <u>Glycobiology</u>. **7**(6): 811-817.

- Deretic, V. and B. Levine (2009). "Autophagy, immunity, and microbial adaptations." <u>Cell Host Microbe.</u> **5**(6): 527-549.
- Diaz-Silvestre, H., et al. (2005). "The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria." <u>Microb. Pathog.</u> **39**(3): 97-107.
- Divangahi, M., et al. (2009). "Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair." <u>Nat. Immunol.</u> **10**(8): 899-906.
- Divangahi, M., et al. (2010). "Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis." <u>Nat. Immunol.</u> **11**(8): 751-758.
- Dobos, K. M., *et al.* (1996). "Definition of the full extent of glycosylation of the 45kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>J. Bacteriol.</u> **178**(9): 2498-2506.
- Dobson, G., et al. (1990). "Characterisation of phenolic glycolipids from Mycobacterium marinum." <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> **1042**(2): 176-181.
- Domenech, P., et al. (2004). "The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. **279**(20): 21257-21265.
- Dorman, S. E. and R. E. Chaisson (2007). "From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis." <u>Nat. Med.</u> **13**(3): 295-298.
- Dos Vultos, T., *et al.* (2008). "Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>PLoS One.</u> **3**(2): e1538.
- Dover, L. G., *et al.* (2007). "EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets." <u>Antimicrob. Agents</u> <u>Chemother.</u> **51**(3): 1055-1063.
- Doz, E., *et al.* (2009). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannosides negatively regulate host Toll-like receptor 4, MyD88-dependent proinflammatory cytokines, and TRIF-dependent co-stimulatory molecule expression." J. Biol. <u>Chem.</u> **284**(35): 23187-23196.
- Doz, E., *et al.* (2007). "Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan." J. Biol. Chem. **282**(36): 26014-26025.
- Drage, M. G., *et al.* (2009). "TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Cell. Immunol.</u> **258**(1): 29-37.
- Draper, P. (1971). "The walls of Mycobacterium lepraemurium: chemistry and ultrastructure." J. Gen. Microbiol. **69**(3): 313-324.
- Draper, P. (1976). "Cell walls of Mycobacterium leprae." <u>Int J Lepr Other Mycobact</u> <u>Dis</u> **44**(1-2): 95-98.
- Draper, P. (1998). "The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers." <u>Front. Biosci.</u> **3**: D1253-1261.
- Draper, P., et al. (1997). "Galactosamine in walls of slow-growing mycobacteria." <u>Biochem. J.</u> **327 ( Pt 2)**: 519-525.
- Driessen, N. N., et al. (2009). "Role of phosphatidylinositol mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN." Infect. Immun. **77**(10): 4538-4547.

- Dubey, V. S., et al. (2003). "Biochemical function of msl5 (pks8 plus pks17) in Mycobacterium tuberculosis H37Rv: biosynthesis of monomethyl branched unsaturated fatty acids." J. Bacteriol. **185**(15): 4620-4625.
- Dubey, V. S., et al. (2002). "Disruption of msl3 abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation." <u>Mol.</u> <u>Microbiol.</u> 45(5): 1451-1459.
- Dubnau, E., *et al.* (2000). "Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice." <u>Mol. Microbiol.</u> **36**(3): 630-637.

F)

- Eckstein, T. M., *et al.* (2003). "Proposed pathway for the biosynthesis of serovarspecific glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* serovar 2." <u>Microbiology</u>. **149**(Pt 10): 2797-2807.
- Eckstein, T. M., et al. (1998). "Identification and recombinant expression of a *Mycobacterium avium* rhamnosyltransferase gene (rtfA) involved in glycopeptidolipid biosynthesis." J. Bacteriol. **180**(21): 5567-5573.
- Edavana, V. K., *et al.* (2004). "Cloning and expression of the trehalose-phosphate phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison to the enzyme from *Mycobacterium smegmatis*." <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> **426**(2): 250-257.
- Ehlers, S. (2009). "Lazy, dynamic or minimally recrudescent? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis." <u>Infection.</u> **37**(2): 87-95.
- Ehrt, S. and D. Schnappinger (2009). "Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses." <u>Cell. Microbiol.</u> **11**(8): 1170-1178.
- Ehrt, S., *et al.* (2001). "Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase." J. Exp. Med. **194**(8): 1123-1140.
- Eisenreich, W., *et al.* (2010). "Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **8**(6): 401-412.
- El-Etr, S. H. and J. D. Cirillo (2001). "Entry mechanisms of mycobacteria." <u>Front.</u> <u>Biosci.</u> **6**: D737-747.
- El-Etr, S. H., et al. (2001). "Fish monocytes as a model for mycobacterial hostpathogen interactions." Infect. Immun. **69**(12): 7310-7317.
- Elass, E., et al. (2007). "Identification by surface plasmon resonance of the mycobacterial lipomannan and lipoarabinomannan domains involved in binding to CD14 and LPS-binding protein." <u>FEBS Lett.</u> **581**(7): 1383-1390.
- Elbein, A. D., *et al.* (2003). "New insights on trehalose: a multifunctional molecule." <u>Glycobiology</u>. **13**(4): 17R-27R.
- Ernst, W. A., *et al.* (2000). "Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability." J. Immunol. **165**(12): 7102-7108.
- Eruslanov, E. B., *et al.* (2005). "Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice." <u>Infect. Immun.</u> **73**(3): 1744-1753.
- Escuyer, V. E., *et al.* (2001). "The role of the embA and embB gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan." J. Biol. Chem. **276**(52): 48854-48862.

- Espitia, C. and R. Mancilla (1989). "Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens." <u>Clin.</u> <u>Exp. Immunol.</u> **77**(3): 378-383.
- Etienne, G., et al. (2009). "Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in mycobacteria." J. Bacteriol. **191**(8): 2613-2621.
- Faldt, J., *et al.* (1999). "Activation of human neutrophils by mycobacterial phenolic glycolipids." <u>Clin. Exp. Immunol.</u> **118**(2): 253-260.
- Fäldt, J., et al. (2001). "Priming of human neutrophils by mycobacterial lipoarabinomannans: role of granule mobilisation." <u>Microbes Infect.</u> **3**(13): 1101-1109.
- Falkinham, J. O. (2010). "Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria." <u>Future Microbiol.</u> **5**(6): 951-960.
- Falkinham, J. O., 3rd (1996). "Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria." <u>Clin. Microbiol. Rev.</u> **9**(2): 177-215.
- Fan, Z. M., *et al.* (1998). "Macronodular multi-organs tuberculoma: CT and MR appearances." J. Gastroenterol. **33**(2): 285-288.
- Fayyazi, A., *et al.* (2000). "Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis." J Pathol **191**(4): 417-425.
- Ferguson, J. S., et al. (1999). "Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages." <u>J.</u> <u>Immunol.</u> 163(1): 312-321.
- Ferrari, G., *et al.* (1999). "A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria." <u>Cell.</u> **97**(4): 435-447.
- Ferreras, J. A., et al. (2008). "Mycobacterial phenolic glycolipid virulence factor biosynthesis: mechanism and small-molecule inhibition of polyketide chain initiation." <u>Chem. Biol.</u> **15**(1): 51-61.
- Fine, P. E. (1995). "Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity." <u>Lancet.</u> **346**(8986): 1339-1345.
- Fischer, K., *et al.* (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **101**(29): 10685-10690.

Flannagan, R. S., *et al.* (2009). "Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **7**(5): 355-366.

- Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." <u>Annu. Rev. Immunol.</u> **19**: 93-129.
- Folch, J., *et al.* (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J. Biol. Chem. **226**(1): 497-509.
- Fournie, J. J., et al. (1987). "Structural elucidation of the major phenolic glycolipid from *Mycobacterium kansasii*. I. Evidence for tetrasaccharide structure of the oligosaccharide moiety." J. Biol. Chem. **262**(7): 3174-3179.
- Fratazzi, C., *et al.* (1999). "Macrophage apoptosis in mycobacterial infections." <u>J.</u> <u>Leukoc. Biol.</u> **66**(5): 763-764.

- Fratti, R. A., *et al.* (2003). "*Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest." <u>Proc. Natl. Acad.</u> <u>Sci. U. S. A.</u> **100**(9): 5437-5442.
- Fujita, Y., et al. (2007). "Molecular and supra-molecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice." <u>Microb. Pathog.</u> 43(1): 10-21.
- Fujiwara, N., et al. (2007). "Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway." <u>J. Bacteriol.</u> **189**(3): 1099-1108.
- Fujiwara, N., et al. (2008). "Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*." J. Bacteriol. **190**(10): 3613-3621.

G

- Gagliardi, M. C., et al. (2007). "Cell wall-associated alpha-glucan is instrumental for Mycobacterium tuberculosis to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte." <u>Cell. Microbiol.</u> 9(8): 2081-2092.
- Gagliardi, M. C., *et al.* (2009). "Mycobacteria exploit p38 signaling to affect CD1 expression and lipid antigen presentation by human dendritic cells." <u>Infect.</u> <u>Immun.</u> **77**(11): 4947-4952.
- Gagliardi, M. C., et al. (2005). "Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production." J. Leukoc. Biol. **78**(1): 106-113.
- Gagneux, S., et al. (2006). "Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **103**(8): 2869-2873.
- Gagneux, S. and P. M. Small (2007). "Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development." <u>Lancet.</u> <u>Infect. Dis.</u> **7**(5): 328-337.
- Galdiero, M., et al. (2005). "A case of granulomatous skin lesions caused by *Mycobacterium marinum* in the Campania region." <u>New Microbiol.</u> **28**(1): 89-92.
- Gan, H., *et al.* (2008). "*Mycobacterium tuberculosis* blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence." <u>Nat. Immunol.</u> **9**(10): 1189-1197.
- Gandhi, N. R., *et al.* (2010). "Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis." <u>Lancet.</u> **375**(9728): 1830-1843.
- Gangadharam, P. R., *et al.* (1963). "Infectivity, Pathogenicity and Sulpholipid Fraction of Some Indian and British Strains of Tubercle Bacilli." <u>Tubercle.</u> **44**: 452-455.
- Gansert, J. L., *et al.* (2003). "Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity." J. Immunol. **170**(6): 3154-3161.
- Gao, L. Y., *et al.* (2004). "A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion." <u>Mol.</u> <u>Microbiol.</u> **53**(6): 1677-1693.

- Garcia-Perez, B. E., *et al.* (2008). "Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells." <u>Microb. Pathog.</u> **45**(1): 1-6.
- Garcia-Perez, B. E., *et al.* (2003). "Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells." <u>Microb. Pathog.</u> **35**(2): 49-55.
- Garg, A., *et al.* (2006). "Vimentin expressed on *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor." <u>J. Immunol.</u> **177**(9): 6192-6198.
- Gauthier, D. T., et al. (2004). "Ultrastructure of *Mycobacterium marinum* granuloma in striped bass Morone saxatilis." <u>Dis. Aquat. Organ.</u> **62**(1-2): 121-132.
- Gautier, N., et al. (1992). "Structure of mycoside F, a family of trehalose-containing glycolipids of *Mycobacterium fortuitum*." <u>FEMS Microbiol. Lett.</u> **77**(1-3): 81-87.
- Geijtenbeek, T. B., *et al.* (2003). "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function." J. Exp. Med. **197**(1): 7-17.
- Geisel, R. E., et al. (2005). "In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin is due principally to trehalose mycolates." J. Immunol. **174**(8): 5007-5015.
- Geurtsen, J., *et al.* (2009). "Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation." J. Immunol. **183**(8): 5221-5231.
- Gey van Pittius, N. C., *et al.* (2006). "Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions." <u>BMC Evol. Biol.</u> **6**: 95.
- Gill, W. P., et al. (2009). "A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Nat.</u> <u>Med.</u> **15**(2): 211-214.
- Gilleron, M., et al. (2000). "Mycobacterium tuberculosis H37Rv parietal and cellular lipoarabinomannans. Characterization of the acyl- and glyco-forms." J. Biol. Chem. 275(1): 677-684.
- Gilleron, M., et al. (1997). "Mycobacterium smegmatis phosphoinositolsglyceroarabinomannans. Structure and localization of alkali-labile and alkalistable phosphoinositides." J. Biol. Chem. **272**(1): 117-124.
- Gilleron, M., et al. (2008). "Structure, activities and biosynthesis of the Phosphatidylmyo-Inositol-based lipoglycans." <u>The Mycobacterial Cell Envelope</u>: 75-105.
- Gilleron, M., et al. (1999). "Structural study of the lipomannans from *Mycobacterium bovis* BCG: characterisation of multiacylated forms of the phosphatidyl-myoinositol anchor." J. Mol. Biol. **285**(5): 2147-2160.
- Gilleron, M., *et al.* (2006). "The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through toll-like receptor 2." <u>Chem. Biol.</u> **13**(1): 39-47.
- Gilleron, M. and G. Puzo (1995). "Lipooligosaccharidic antigens from *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gastri*." <u>Glycoconj. J.</u> **12**(3): 298-308.
- Gilleron, M., et al. (2003). "Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response." J. Biol. Chem. **278**(32): 29880-29889.
- Gilleron, M., et al. (2001). "Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells." <u>J. Biol. Chem.</u> **276**(37): 34896-34904.

- Gilleron, M., et al. (1990a). "Structural and immunological properties of the phenolic glycolipids from *Mycobacterium gastri* and *Mycobacterium kansasii*." <u>Eur. J.</u> <u>Biochem.</u> **189**(1): 167-173.
- Gilleron, M., et al. (1990b). "Carbohydrate epitope structural elucidation by 1H-NMR spectroscopy of a new *Mycobacterium kansasii* phenolic glycolipid antigen." <u>Eur. J. Biochem.</u> **193**(2): 449-457.
- Gilleron, M., *et al.* (1993). "Lipooligosaccharidic antigen containing a novel C4branched 3,6-dideoxy-alpha-hexopyranose typifies *Mycobacterium gastri*." <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u> **268**(5): 3168-3179.
- Gilleron, M., et al. (1994). "Lipo-oligosaccharidic antigen from *Mycobacterium gastri*. Complete structure of a novel C4-branched 3,6-dideoxy-alpha-xylohexopyranose." <u>Biochemistry</u>. **33**(7): 1930-1937.
- Gilmour, D. T., et al. (2002). "Manipulating gene expression in the zebrafish." <u>Zebrafish: A Practical Approach</u>: 121-143.
- Glickman, M. S., *et al.* (2000). "A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Mol. Cell.</u> **5**(4): 717-727.
- Gluckman, S. J. (1995). "Mycobacterium marinum." Clin. Dermatol. 13(3): 273-276.
- Gokhale, R. S., et al. (2007a). "Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity." <u>Curr. Opin. Struct. Biol.</u> **17**(6): 736-743.
- Gokhale, R. S., *et al.* (2007b). "Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids." <u>Nat. Prod. Rep.</u> **24**(2): 267-277.
- Gonzalez-Avila, G., et al. (2009). "Mycobacterium tuberculosis effects on fibroblast collagen metabolism." <u>Respiration.</u> **77**(2): 195-202.
- Gonzalez-Juarrero, M., et al. (2001). "Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect. Immun. **69**(3): 1722-1728.
- Gordon, S. B. and R. C. Read (2002). "Macrophage defences against respiratory tract infections." <u>Br. Med. Bull.</u> **61**: 45-61.
- Goren, M. B. (1970a). "Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. I. Purification and properties." <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> **210**(1): 116-126.
- Goren, M. B. (1970b). "Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. II. Structural studies." <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> **210**(1): 127-138.
- Goude, R., *et al.* (2008). "The critical role of embC in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u> **190**(12): 4335-4341.
- Goude, R., *et al.* (2009). "The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Antimicrob. Agents Chemother.</u> **53**(10): 4138-4146.
- Gould, C. V., *et al.* (2004). "Fatal Disseminated *Mycobacterium marinum* Infection With Bacteremia in a Patient Misdiagnosed as Pyoderma Gangrenosum." <u>Infectious Diseases in clinical Practice.</u> **12**(1): 26-29.
- Greenberg, A. E. and E. Kupka (1957). "Swimming pool injuries, mycobacteria, and tuberculosis-like disease." <u>Public. Health. Rep.</u> **72**(10): 902-904.
- Gu, X., *et al.* (2005). "Expression and purification of a functionally active recombinant GDP-mannosyltransferase (PimA) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv." <u>Protein Expr. Purif.</u> **42**(1): 47-53.
- Guerardel, Y., et al. (2003). "Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii:* novel structural features and apoptosis-inducing properties." J. Biol. Chem. **278**(38): 36637-36651.

- Guerardel, Y., *et al.* (2002). "Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains." J. Biol. Chem. **277**(34): 30635-30648.
- Guerin, M. E., *et al.* (2009). "New insights into the early steps of phosphatidylinositol mannoside biosynthesis in mycobacteria: PimB' is an essential enzyme of Mycobacterium smegmatis." J. Biol. Chem. **284**(38): 25687-25696.
- Guerin, M. E., *et al.* (2007). "Molecular recognition and interfacial catalysis by the essential phosphatidylinositol mannosyltransferase PimA from mycobacteria." J. Biol. Chem. **282**(28): 20705-20714.
- Guinn, K. M., *et al.* (2004). "Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Mol.</u> <u>Microbiol.</u> **51**(2): 359-370.
- Gurcha, S. S., et al. (2002). "Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*." Biochem. J. **365**(Pt 2): 441-450.
- Gutierrez, M. C., et al. (2005). "Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>PLoS Pathog.</u> **1**(1): e5.
- Gutierrez, M. G., *et al.* (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages." <u>Cell.</u> **119**(6): 753-766.

## Η

- Hall-Stoodley, L., *et al.* (2006). "*Mycobacterium tuberculosis* binding to human surfactant proteins A and D, fibronectin, and small airway epithelial cells under shear conditions." Infect. Immun. **74**(6): 3587-3596.
- Hamasaki, N., *et al.* (2000). "In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6, 6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits." <u>Infect. Immun.</u> **68**(6): 3704-3709.
- Hancock, G. E., et al. (1989). "The generation of antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes of the CD4+ phenotype. Enhancement by the cutaneous administration of interleukin 2." <u>J.</u> <u>Exp. Med.</u> 169(3): 909-919.
- Hanekom, W. A., *et al.* (2003). "*Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro." J. Infect. Dis. **188**(2): 257-266.
- Harding, C. V. and W. H. Boom (2010). "Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> 8(4): 296-307.
- Harding, C. V., *et al.* (1991). "Liposome-encapsulated antigens engender lysosomal processing for class II MHC presentation and cytosolic processing for class I presentation." J. Immunol. **147**(9): 2860-2863.
- Harriff, M. J., *et al.* (2007). "Experimental exposure of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton), to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: a potential model for environmental mycobacterial infection." J. Fish Dis. **30**(10): 587-600.
- Hatzios, S. K., et al. (2009). "PapA3 is an acyltransferase required for polyacyltrehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. 284(19): 12745-12751.

Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." <u>Annu. Rev. Immunol.</u> **18**: 975-1026.

- Hedlund, S., et al. (2010). "Dendritic cell activation by sensing *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils via DC-SIGN." <u>Hum. Immunol.</u> **71**(6): 535-540.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." <u>Nature.</u> **407**(6805): 770-776.
- Herrmann, J. L., et al. (2000). "Analysis of post-translational modification of mycobacterial proteins using a cassette expression system." <u>FEBS Lett.</u> 473(3): 358-362.
- Herrmann, J. L., *et al.* (1996). "Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Embo J.</u> **15**(14): 3547-3554.
- Hinchey, J., *et al.* (2007). "Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*." J. Clin. Invest. **117**(8): 2279-2288.
- Hmama, Z., et al. (2004). "Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway." <u>J. Cell.</u> <u>Sci.</u> **117**(Pt 10): 2131-2140.
- Hoang, T. T., et al. (1999). "Construction and use of low-copy number T7 expression vectors for purification of problem proteins: purification of mycobacterium tuberculosis RmID and pseudomonas aeruginosa LasI and RhII proteins, and functional analysis of purified RhII." <u>Gene.</u> 237(2): 361-371.
- Hoffmann, C., *et al.* (2008). "Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryoelectron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **105**(10): 3963-3967.
- Holmes, G. F., *et al.* (1999). "Recurrent, disseminated *Mycobacterium marinum* infection caused by the same genotypically defined strain in an immunocompromised patient." J. Clin. Microbiol. **37**(9): 3059-3061.
- Holt, P. G., et al. (1993). "Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages." J. Exp. Med. 177(2): 397-407.
- Holt, P. G., *et al.* (2008). "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract." <u>Nat. Rev. Immunol.</u> **8**(2): 142-152.
- Honda, I., et al. (1993). "Evaluation of the use of 5-mycoloyl-beta-arabinofuranosyl-(1-->2)-5-mycoloyl- alpha-arabinofuranosyl-(1-->1')-glycerol in serodiagnosis of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection." <u>Res. Microbiol.</u> **144**(3): 229-235.
- Hoppe, H. C., *et al.* (1997). "Identification of phosphatidylinositol mannoside as a mycobacterial adhesin mediating both direct and opsonic binding to nonphagocytic mammalian cells." <u>Infect. Immun.</u> **65**(9): 3896-3905.
- Hsu, F. F., *et al.* (2007). "Structural characterization of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin by multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. II. Monoacyl- and diacyl-PIMs." J. Am. Soc. Mass Spectrom. **18**(3): 479-492.
- Hsu, T., *et al.* (2003). "The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **100**(21): 12420-12425.
- Huet, G., et al. (2009). "A lipid profile typifies the Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a mutation responsible for a modification of the

structures of phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> **284**(40): 27101-27113.

- Hunter, R. L., *et al.* (2006). "Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease." Ann. Clin. Lab. Sci. **36**(4): 371-386.
- Hunter, S. W., *et al.* (1988). "Trehalose-containing lipooligosaccharide antigens of Mycobacterium sp.: presence of a mono-O-methyltri-O-acyltrehalose "core"." <u>Biochemistry</u>. **27**(5): 1549-1556.
- Hunter, S. W. and P. J. Brennan (1990). "Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. **265**(16): 9272-9279.
- Hunter, S. W., et al. (1982). "Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*." J. Biol. Chem. **257**(24): 15072-15078.
- Hunter, S. W., *et al.* (1984). "N-acylkansosamine. A novel N-acylamino sugar from the trehalose-containing lipooligosaccharide antigens of *Mycobacterium kansasii*." J. Biol. Chem. **259**(15): 9729-9734.
- Hunter, S. W., *et al.* (1986). "Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> **261**(26): 12345-12351.
- Hunter, S. W., *et al.* (1983). "Trehalose-containing lipooligosaccharides. A new class of species-specific antigens from *Mycobacterium*." J. Biol. Chem. **258**(17): 10481-10487.

## I-J

- Indrigo, J., et al. (2003). "Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages." <u>Microbiology.</u> **149**(Pt 8): 2049-2059.
- Ishikawa, E., *et al.* (2009). "Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle." <u>J. Exp. Med.</u> **206**(13): 2879-2888.
- Jackson, M., et al. (2000). "Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria." J. Biol. Chem. **275**(39): 30092-30099.
- Jackson, M., *et al.* (1999). "Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope." <u>Mol. Microbiol.</u> **31**(5): 1573-1587.
- Jagannath, C., *et al.* (2009). "Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells." <u>Nat. Med.</u> **15**(3): 267-276.
- Jang, J., *et al.* (2008). "Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli." <u>Trends Microbiol.</u> **16**(7): 303-308.
- Jarlier, V. and H. Nikaido (1990). "Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonei*." <u>J. Bacteriol.</u> **172**(3): 1418-1423.
- Jayachandran, R., *et al.* (2007). "Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin." <u>Cell.</u> **130**(1): 37-50.
- Jo, E. K. (2008). "Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs." <u>Curr. Opin. Infect. Dis.</u> **21**(3): 279-286.

- Jo, E. K. (2010). "Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy." <u>Cell.</u> <u>Microbiol.</u> **12**(8): 1026-1035.
- Joe, M., et al. (2006). "The 5-deoxy-5-methylthio-xylofuranose residue in mycobacterial lipoarabinomannan. absolute stereochemistry, linkage position, conformation, and immunomodulatory activity." J. Am. Chem. Soc. **128**(15): 5059-5072.
- Johnson, P. D., *et al.* (2005). "Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control." <u>PLoS Med.</u> **2**(4): e108.
- Jordao, L., *et al.* (2008). "On the killing of mycobacteria by macrophages." <u>Cell.</u> <u>Microbiol.</u> **10**(2): 529-548.
- Jung, S. B., *et al.* (2006). "The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes." <u>Infect. Immun.</u> **74**(5): 2686-2696.
- Kaarteenaho-Wiik, R., *et al.* (2007). "Extracellular matrix proteins and myofibroblasts in granulomas of sarcoidosis, atypical mycobacteriosis, and tuberculosis of the lung." <u>Hum. Pathol.</u> **38**(1): 147-153.

K

- Kahnert, A., *et al.* (2007). "*Mycobacterium tuberculosis* triggers formation of lymphoid structure in murine lungs." <u>J. Infect. Dis.</u> **195**(1): 46-54.
- Kamisango, K., *et al.* (1985). "Pyruvylated glycolipids from *Mycobacterium smegmatis*. Nature and location of the lipid components." J. Biol. Chem. **260**(7): 4117-4121.
- Kana, B. D. and V. Mizrahi (2010). "Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling." <u>FEMS Immunol. Med. Microbiol.</u> 58(1): 39-50.
- Kang, P. B., *et al.* (2005). "The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis." J. Exp. Med. **202**(7): 987-999.
- Kaplan, G., *et al.* (1987). "*Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro." J. Immunol. **138**(9): 3028-3034.
- Kappelman, J., *et al.* (2008). "First *Homo erectus* from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia." <u>Am. J. Phys. Anthropol.</u> **135**(1): 110-116.
- Katoch, V. M. (2004). "Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM)." Indian J. Med. Res. **120**(4): 290-304.
- Kaufmann, S. H. (2010). "Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response." J. Intern. Med. **267**(4): 337-353.
- Kaufmann, S. H., et al. (2005). "Mycobacterium tuberculosis and the host response." J. Exp. Med. **201**(11): 1693-1697.
- Kaufmann, S. H. and S. K. Parida (2008). "Tuberculosis in Africa: learning from pathogenesis for biomarker identification." <u>Cell Host Microbe.</u> **4**(3): 219-228.
- Kaur, D., et al. (2006). "Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: role of a branching mannosyltransferase." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> 103(37): 13664-13669.

- Kaur, D., *et al.* (2009). "Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Adv. Appl. Microbiol.</u> **69**: 23-78.
- Kaur, D., *et al.* (2007). "New insights into the biosynthesis of mycobacterial lipomannan arising from deletion of a conserved gene." J. Biol. Chem. **282**(37): 27133-27140.
- Kaur, D., et al. (2008). "Lipoarabinomannan of Mycobacterium: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **105**(46): 17973-17977.
- Keane, J., *et al.* (2000). "Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages." J. Immunol. **164**(4): 2016-2020.
- Keane, J., *et al.* (2002). "TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following *Mycobacterium tuberculosis* infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner." <u>Tuberculosis (Edinb).</u> **82**(2-3): 55-61.
- Kent, M. L., *et al.* (2006). "In vivo and in vitro growth of *Mycobacterium marinum* at homoeothermic temperatures." <u>FEMS Microbiol. Lett.</u> **257**(1): 69-75.
- Khader, S. A., *et al.* (2007). "IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge." <u>Nat. Immunol.</u> **8**(4): 369-377.
- Khader, S. A. and A. M. Cooper (2008). "IL-23 and IL-17 in tuberculosis." <u>Cytokine.</u> **41**(2): 79-83.
- Khader, S. A., et al. (2006). "Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection." <u>J. Exp. Med.</u> 203(7): 1805-1815.
- Khader, S. A., et al. (2005). "IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available." <u>J. Immunol.</u> 175(2): 788-795.
- Khoo, K. H., *et al.* (1996a). "Novel O-methylated terminal glucuronic acid characterizes the polar glycopeptidolipids of *Mycobacterium habana* strain TMC 5135." J. Biol. Chem. **271**(21): 12333-12342.
- Khoo, K. H., et al. (1995a). "Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of Mycobacterium." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> 270(21): 12380-12389.
- Khoo, K. H., *et al.* (1995b). "Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan." <u>Glycobiology</u>. **5**(1): 117-127.
- Khoo, K. H., *et al.* (1996b). "Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol." J. Biol. Chem. **271**(45): 28682-28690.
- Khoo, K. H., *et al.* (1995c). "Structural definition of the glycopeptidolipids and the pyruvylated, glycosylated acyltrehalose from *Mycobacterium butyricum*." <u>Carbohydr. Res.</u> **276**(2): 449-455.
- Khoo, K. H., *et al.* (2001). "Variation in mannose-capped terminal arabinan motifs of lipoarabinomannans from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex." J. Biol. Chem. **276**(6): 3863-3871.
- Kim, M. J., *et al.* (2010). "Caseation of *human tuberculosis* granulomas correlates with elevated host lipid metabolism." <u>EMBO Mol. Med.</u>
- Kinhikar, A. G., *et al.* (2010). "Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells." <u>Mol. Microbiol.</u> **75**(1): 92-106.

- Koerner, T. A., Jr., *et al.* (1983). "High-resolution proton NMR studies of gangliosides.
  1. Use of homonuclear two-dimensional spin-echo J-correlated spectroscopy for determination of residue composition and anomeric configurations." Biochemistry. **22**(11): 2676-2687.
- Kong, Y., et al. (2005). "Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C genes and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study." J. Clin. Microbiol. **43**(12): 6048-6053.
- Koo, I. C., et al. (2008). "Role for lysosomal enzyme beta-hexosaminidase in the control of mycobacteria infection." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **105**(2): 710-715.
- Korbel, D. S., *et al.* (2008). "Innate immunity in tuberculosis: myths and truth." <u>Microbes Infect.</u> **10**(9): 995-1004.
- Kordulakova, J., *et al.* (2002). "Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria." J. Biol. Chem. **277**(35): 31335-31344.
- Kordulakova, J., *et al.* (2003). "Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of mycobacterium species." J. Biol. Chem. **278**(38): 36285-36295.
- Korn, T., et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu. Rev. Immunol. 27: 485-517.
- Koul, A., *et al.* (2004). "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **2**(3): 189-202.
- Kovacevic, S., *et al.* (2006). "Identification of a novel protein with a role in lipoarabinomannan biosynthesis in mycobacteria." J. Biol. Chem. **281**(14): 9011-9017.
- Kremer, L., *et al.* (2002a). "Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Biochem. J.</u> **364**(Pt 2): 423-430.
- Kremer, L., *et al.* (2001). "Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> **276**(28): 26430-26440.
- Kremer, L., *et al.* (2002b). "Characterization of a putative alpha-mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Biochem. J.</u> **363**(Pt 3): 437-447.
- Kresch, M. J., *et al.* (2010). "Surfactant Protein A Stimulates Release of Neutrophil Chemotactic Factors by Alveolar Type II Pneumocytes." <u>Lung.</u>
- Kresch, M. J., *et al.* (1998). "Isolation and partial characterization of a receptor to surfactant protein A expressed by rat type II pneumocytes." <u>Am. J. Respir.</u> <u>Cell. Mol. Biol.</u> **19**(2): 216-225.
- Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes." <u>Annu. Rev. Immunol.</u> **23**: 877-900.
- Kugathasan, K., *et al.* (2008). "CD11c+ antigen presenting cells from the alveolar space, lung parenchyma and spleen differ in their phenotype and capabilities to activate naive and antigen-primed T cells." <u>BMC Immunol.</u> **9**: 48.
- Kumar, A., *et al.* (2008). "Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon." <u>J. Biol. Chem.</u> **283**(26): 18032-18039.
- Kumar, A., *et al.* (2007a). "*Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **104**(28): 11568-11573.

Kumar, D., *et al.* (2010). "Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Cell.</u> **140**(5): 731-743.

Kumar, P., et al. (2007b). "PapA1 and PapA2 are acyltransferases essential for the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor sulfolipid-1." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **104**(27): 11221-11226.

- Labbe, K. and M. Saleh (2008). "Cell death in the host response to infection." <u>Cell.</u> <u>Death. Differ.</u> **15**(9): 1339-1349.
- Lacaille, F., *et al.* (1990). "Persistent *Mycobacterium marinum* infection in a child with probable visceral involvement." <u>Pediatr. Infect. Dis. J.</u> **9**(1): 58-60.
- Ladel, C. H., *et al.* (1995). "Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and IIdeficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance." <u>Eur. J. Immunol.</u> **25**(2): 377-384.
- Lahey, T. (2003). "Invasive *Mycobacterium marinum* infections." <u>Emerg. Infect. Dis.</u> **9**(11): 1496-1498.
- Laing, K. J., *et al.* (2008). "A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish." <u>BMC Evol. Biol.</u> **8**: 42.
- Lam, S. H., *et al.* (2009). "Zebrafish spotted-microarray for genome-wide expression profiling experiments. Part I: array printing and hybridization." <u>Methods Mol.</u> <u>Biol.</u> **546**: 175-195.
- Laneelle, M. A., *et al.* (1996). "Structures of the glycolipid antigens of members of the third biovariant complex of *Mycobacterium fortuitum*." <u>Eur. J. Biochem.</u> **238**(1): 270-279.
- Laskin, A. and J. P. Cowin (2001). "Automated single-particle SEM/EDX analysis of submicrometer particles down to 0.1 microm." <u>Anal. Chem.</u> **73**(5): 1023-1029.
- Layre, E., *et al.* (2009). "Mycolic acids constitute a scaffold for mycobacterial lipid antigens stimulating CD1-restricted T cells." <u>Chem. Biol.</u> **16**(1): 82-92.
- Lazarevic, V. and F. Martinon (2008). "Linking inflammasome activation and phagosome maturation." <u>Cell Host Microbe.</u> **3**(4): 199-200.
- Lazarevic, V., et al. (2005). "Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses." J. Immunol. **175**(2): 1107-1117.
- Lea-Smith, D. J., et al. (2008). "Analysis of a new mannosyltransferase required for the synthesis of phosphatidylinositol mannosides and lipoarbinomannan reveals two lipomannan pools in corynebacterineae." J. Biol. Chem. 283(11): 6773-6782.
- Lee, A., *et al.* (2006a). "Sequencing of oligoarabinosyl units released from mycobacterial arabinogalactan by endogenous arabinanase: identification of distinctive and novel structural motifs." <u>Biochemistry.</u> **45**(51): 15817-15828.
- Lee, E. Y., *et al.* (2004). "Recurrent *Mycobacterium marinum* tenosynovitis of the wrist mimicking extraarticular synovial chondromatosis on MR images." <u>Skeletal Radiol.</u> **33**(7): 405-408.

- Lee, H. M., *et al.* (2009a). "Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells." J <u>Clin Immunol</u> **29**(6): 795-805.
- Lee, J., *et al.* (2009b). "Macrophage apoptosis in tuberculosis." <u>Yonsei Med. J.</u> **50**(1): 1-11.
- Lee, J., *et al.* (2006b). "Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway." J. Immunol. **176**(7): 4267-4274.
- Lee, K. S., *et al.* (2007). "Diacyltrehalose of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits lipopolysaccharide- and mycobacteria-induced proinflammatory cytokine production in human monocytic cells." <u>FEMS Microbiol. Lett.</u> **267**(1): 121-128.
- Lee, Y. C. and C. E. Ballou (1965). "Complete structures of the glycophospholipids of mycobacteria." <u>Biochemistry.</u> **4**(7): 1395-1404.
- Lemassu, A., *et al.* (1992). "Lack of correlation between colony morphology and lipooligosaccharide content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex." J. <u>Gen. Microbiol.</u> **138**(7): 1535-1541.
- Lemassu, A., *et al.* (1996). "Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria." <u>Microbiology</u>. **142 ( Pt 6)**: 1513-1520.
- Lesley, R. and L. Ramakrishnan (2008). "Insights into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish." <u>Curr. Opin. Microbiol.</u> **11**(3): 277-283.
- Levine, B. and V. Deretic (2007). "Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity." <u>Nat. Rev. Immunol.</u> **7**(10): 767-777.
- Li, G. L., *et al.* (2010). "Molecular Characterization of Drug-Resistant Beijing Family Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Tianjin, China." <u>Biomed. Environ.</u> <u>Sci.</u> **23**(3): 188-193.
- Lin, P. L., et al. (2010). "Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent *Mycobacterium tuberculosis* infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model." <u>Arthritis Rheum.</u> 62(2): 340-350.
- Lin, P. L., *et al.* (2007). "Tumor necrosis factor and tuberculosis." <u>J. Investig.</u> <u>Dermatol. Symp. Proc.</u> **12**(1): 22-25.
- Linell, F. and A. Norden (1954). "*Mycobacterium balnei*, a new acid-fast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans." <u>Acta. Tuberc. Scand. Suppl.</u> **33**: 1-84.
- Loeuillet, C., *et al.* (2006). "*Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors." J. Immunol. **177**(9): 6245-6255.
- Lohmann-Matthes, M. L., *et al.* (1994). "Pulmonary macrophages." <u>Eur. Respir. J.</u> **7**(9): 1678-1689.
- Lopez Marin, L. M., *et al.* (1993). "Structures of the glycopeptidolipid antigens of two animal pathogens: *Mycobacterium senegalense* and *Mycobacterium porcinum*." <u>Eur. J. Biochem.</u> **215**(3): 859-866.
- Lopez Marin, L. M., *et al.* (1991). "Glycopeptidolipids from *Mycobacterium fortuitum*: a variant in the structure of C-mycoside." <u>Biochemistry</u>. **30**(43): 10536-10542.
- Lopez Ramirez, G. M., et al. (1994). "Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cells." Infect. Immun. **62**(6): 2515-2520.
- Luquin, M., *et al.* (1992). "Identification of sulpholipid I by thin-layer chromatography in the rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Res. Microbiol.</u> **143**(2): 225-227.
- Lynett, J. and R. W. Stokes (2007). "Selection of transposon mutants of *Mycobacterium tuberculosis* with increased macrophage infectivity identifies

fadD23 to be involved in sulfolipid production and association with macrophages." <u>Microbiology</u>. **153**(Pt 9): 3133-3140.

- Ma, J., *et al.* (2003). "Regulation of macrophage activation." <u>Cell. Mol. Life Sci.</u> **60**(11): 2334-2346.
- Ma, Y., et al. (1997). "Determination of the pathway for rhamnose biosynthesis in mycobacteria: cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding alpha-D-glucose-1-phosphate thymidylyltransferase." <u>Microbiology</u>. **143** ((Pt 3)): 937-945.
- Ma, Y., *et al.* (2001). "Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose." <u>Antimicrob. Agents Chemother.</u> **45**(5): 1407-1416.
- MacGregor, R. R. (1995). "Cutaneous tuberculosis." Clin. Dermatol. 13(3): 245-255.
- MacGurn, J. A. and J. S. Cox (2007). "A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system." <u>Infect. Immun.</u> **75**(6): 2668-2678.
- MacMicking, J. D., et al. (2003). "Immune control of tuberculosis by IFN-gammainducible LRG-47." <u>Science</u>. **302**(5645): 654-659.
- Maeda, N., *et al.* (2003). "The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan." J. Biol. Chem. **278**(8): 5513-5516.
- Maes, E., *et al.* (2007). "Polysaccharide structural variability in mycobacteria: identification and characterization of phosphorylated mannan and arabinomannan." <u>Glycoconj. J.</u> **24**(8): 439-448.
- Maglione, P. J. and J. Chan (2009). "How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Eur. J. Immunol.</u> **39**(3): 676-686.
- Mahapatra, S., et al. (2008). "Unique structural features of the peptidoglycan of *Mycobacterium leprae*." J. Bacteriol. **190**(2): 655-661.
- Mahapatra, S., *et al.* (2005). "N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of *Mycobacterium* spp. is altered by drug treatment." J. Bacteriol. **187**(7): 2341-2347.
- Mahon, R. N., et al. (2009). "Mycobacterium tuberculosis cell wall glycolipids directly inhibit CD4+ T-cell activation by interfering with proximal T-cell-receptor signaling." Infect. Immun. **77**(10): 4574-4583.
- Maiti, D., *et al.* (2001). "Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." J. Biol. Chem. **276**(1): 329-333.
- Malaga, W., *et al.* (2008). "Deciphering the genetic bases of the structural diversity of phenolic glycolipids in strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex." <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u> **283**(22): 15177-15184.
- Malik, Z. A., *et al.* (2003). "Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca2+ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase." J. Immunol. **170**(6): 2811-2815.
- Manca, C., et al. (2004). "Differential monocyte activation underlies strain-specific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis." Infect. Immun. **72**(9): 5511-5514.

- Manca, C., *et al.* (2005). "Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway." J Interferon Cytokine Res **25**(11): 694-701.
- Marcenaro, E., et al. (2003). "CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity." <u>Eur. J. Immunol.</u> **33**(12): 3367-3376.
- Master, S. S., *et al.* (2008). "*Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation." <u>Cell Host Microbe.</u> **3**(4): 224-232.
- Mathavan, S., et al. (2005). "Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays." PLoS Genet. **1**(2): 260-276.
- Matsunaga, I., et al. (2004). "Mycobacterium tuberculosis pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells." J. Exp. Med. 200(12): 1559-1569.
- Matsunaga, I., et al. (2008). "Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria." J. Biol. Chem. **283**(43): 28835-28841.
- McDonough, K. A., *et al.* (1993). "The interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages: a study of phagolysosome fusion." <u>Infect. Agents Dis.</u> **2**(4): 232-235.
- McNeil, M., *et al.* (1989). "Mycobacterial glycolipids: isolation, structures, antigenicity, and synthesis of neoantigens." <u>Methods Enzymol.</u> **179**: 215-242.
- McNeil, M., *et al.* (1990). "Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls." J. Biol. Chem. **265**(30): 18200-18206.
- McNeil, M., *et al.* (1991). "Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria." J. Biol. Chem. **266**(20): 13217-13223.
- McNeil, M., *et al.* (1987). "Definition of the surface antigens of *Mycobacterium malmoense* and use in studying the etiology of a form of mycobacteriosis." <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u> **169**(7): 3312-3320.
- Meeker, N. D. and N. S. Trede (2008). "Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease." <u>Dev. Comp. Immunol.</u> **32**(7): 745-757.
- Mehta, P. K., *et al.* (2006). "Identification of *Mycobacterium marinum* macrophage infection mutants." <u>Microb. Pathog.</u> **40**(4): 139-151.
- Meijer, A. H., *et al.* (2004). "Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish." <u>Mol. Immunol.</u> **40**(11): 773-783.
- Meijer, A. H., *et al.* (2005). "Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection." <u>Mol.</u> <u>Immunol.</u> **42**(10): 1185-1203.
- Mendez-Samperio, P., *et al.* (2008). "Expression and secretion of cathelicidin LL-37 in human epithelial cells after infection by *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin*." <u>Clin. Vaccine Immunol.</u> **15**(9): 1450-1455.
- Menozzi, F. D., et al. (2006). "Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions." Microbes Infect. **8**(1): 1-9.
- Michell, S. L., *et al.* (2003). "The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1-->3)-mannobiose moieties." <u>J. Biol. Chem.</u> **278**(18): 16423-16432.
- Middlebrook, G., *et al.* (1959). "Sulfolipid from Virulent Tubercle Bacilli." <u>Proc. Natl.</u> <u>Acad. Sci. U. S. A.</u> **45**(12): 1801-1804.
- Mikrou, A., *et al.* (2009). "CR3 complement receptor: cloning and characterization in rainbow trout." <u>Fish Shellfish Immunol</u> **26**(1): 19-28.

Mikusova, K., *et al.* (2006). "Identification of a novel galactosyl transferase involved in biosynthesis of the mycobacterial cell wall." <u>J. Bacteriol.</u> **188**(18): 6592-6598.

- Mikusova, K., et al. (1996). "Biosynthesis of the linkage region of the mycobacterial cell wall." J. Biol. Chem. **271**(13): 7820-7828.
- Mikusova, K., et al. (2000). "Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall." J. Biol. Chem. **275**(43): 33890-33897.
- Miller, J. L., *et al.* (2010). "The type I NADH dehydrogenase of Mycobacterium tuberculosis counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis." <u>PLoS Pathog.</u> **6**(4): e1000864.
- Millington, K. A., *et al.* (2007). "Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load." <u>J.</u> Immunol. **178**(8): 5217-5226.
- Mills, J. A., *et al.* (2004). "Inactivation of the mycobacterial rhamnosyltransferase, which is needed for the formation of the arabinogalactan-peptidoglycan linker, leads to irreversible loss of viability." <u>J. Biol. Chem.</u> **279**(42): 43540-43546.
- Miner, M. D., et al. (2009). "Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection." Indian J. Exp. Biol. **47**(6): 407-411.
- Minnikin, D. E. (1982). "Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles." <u>The Biology of the Mycobacteria</u> **1**: 95-184.
- Minnikin, D. E., *et al.* (1985). "Mycolipenates and mycolipanolates of trehalose from *mycobacterium tuberculosis*." J. Gen. Microbiol. **131**(6): 1369-1374.
- Minnikin, D. E., *et al.* (2002). "The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Chem. Biol.</u> **9**(5): 545-553.
- Mishra, A. K., et al. (2007). "Identification of an alpha(1-->6) mannopyranosyltransferase (MptA), involved in Corynebacterium glutamicum lipomanann biosynthesis, and identification of its orthologue in Mycobacterium tuberculosis." Mol. Microbiol. 65(6): 1503-1517.
- Mishra, A. K., *et al.* (2009). "Characterization of the Corynebacterium glutamicum deltapimB' deltamgtA double deletion mutant and the role of *Mycobacterium tuberculosis* orthologues Rv2188c and Rv0557 in glycolipid biosynthesis." <u>J. Bacteriol.</u> **191**(13): 4465-4472.
- Miyamoto, Y., *et al.* (2008). "The *Mycobacterium avium* complex gtfTB gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid." <u>J. Bacteriol.</u> **190**(24): 7918-7924.
- Miyamoto, Y., *et al.* (2007). "Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex." <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u> **189**(15): 5515-5522.
- Miyamoto, Y., *et al.* (2006). "Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipid biosynthesis." <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u> **188**(1): 86-95.
- Moody, D. B. (2001). "Polyisoprenyl glycolipids as targets of CD1-mediated T cell responses." <u>Cell. Mol. Life Sci.</u> **58**(10): 1461-1474.
- Moody, D. B. and G. S. Besra (2001). "Glycolipid targets of CD1-mediated T-cell responses." Immunology **104**(3): 243-251.
- Moody, D. B., et al. (2000a). "CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection." J. Exp. Med. **192**(7): 965-976.
- Moody, D. B., *et al.* (1997). "Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells." <u>Science.</u> **278**(5336): 283-286.

- Moody, D. B., *et al.* (2000b). "CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection." <u>Nature.</u> **404**(6780): 884-888.
- Moody, D. B., et al. (2004). "T cell activation by lipopeptide antigens." <u>Science</u>. **303**(5657): 527-531.
- Moretta, A., *et al.* (2008). "NK cells at the interface between innate and adaptive immunity." <u>Cell. Death. Differ.</u> **15**(2): 226-233.
- Morita, Y. S., et al. (2006). "PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria." J. Biol. Chem. **281**(35): 25143-25155.
- Moss, L. D., *et al.* (2009). "Identification of phagocytic cells, NK-like cytotoxic cell activity and the production of cellular exudates in the coelomic cavity of adult zebrafish." <u>Dev. Comp. Immunol.</u> **33**(10): 1077-1087.
- Mougous, J. D., *et al.* (2004). "Identification, function and structure of the mycobacterial sulfotransferase that initiates sulfolipid-1 biosynthesis." <u>Nat.</u> <u>Struct. Mol. Biol.</u> **11**(8): 721-729.
- Munoz-Elias, E. J., et al. (2005). "Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice." Infect. Immun. **73**(1): 546-551.
- Munoz-Elias, E. J., *et al.* (2006). "Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence." <u>Mol. Microbiol.</u> **60**(5): 1109-1122.
- Munoz, M., *et al.* (1997a). "Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>FEMS</u> <u>Microbiol. Lett.</u> **157**(2): 251-259.
- Munoz, M., *et al.* (1997b). "Distribution of surface-exposed antigenic glycolipids in recent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Res. Microbiol.</u> **148**(5): 405-412.
- Munoz, M., et al. (1998). "Seroreactive species-specific lipooligosaccharides of Mycobacterium mucogenicum sp. nov. (formerly Mycobacterium chelonae-like organisms): identification and chemical characterization." <u>Microbiology.</u> 144 ( Pt 1): 137-148.
- Myrvik, Q. N., *et al.* (1984). "Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence." <u>Am. Rev. Respir. Dis.</u> **129**(2): 322-328.
  - N
- Neill, M. A. and S. J. Klebanoff (1988). "The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages." <u>J.</u> <u>Exp. Med.</u> **167**(1): 30-42.
- Ng, H., et al. (1973). "Analogy of *Mycobacterium marinum* disease to *Mycobacterium leprae* infection in footpads of mice." <u>Infect. Immun.</u> **8**(6): 860-867.
- Nicol, M. P. and R. J. Wilkinson (2008). "The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.</u> **102**(10): 955-965.
- Niederweis, M. (2003). "Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes." <u>Mol. Microbiol.</u> **49**(5): 1167-1177.

Niederweis, M., *et al.* (2010). "Mycobacterial outer membranes: in search of proteins." <u>Trends Microbiol.</u> **18**(3): 109-116.

- Nigou, J., *et al.* (1997). "The phosphatidyl-myo-inositol anchor of the lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. Heterogeneity, structure, and role in the regulation of cytokine secretion." J. Biol. Chem. **272**(37): 23094-23103.
- Nigou, J., et al. (2002). "Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response." <u>Microbes Infect.</u> **4**(9): 945-953.
- Nigou, J., *et al.* (2000). "New structural insights into the molecular deciphering of mycobacterial lipoglycan binding to C-type lectins: lipoarabinomannan glycoform characterization and quantification by capillary electrophoresis at the subnanomole level." J. Mol. Biol. **299**(5): 1353-1362.
- Nigou, J., *et al.* (2001). "Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor." J. Immunol. **166**(12): 7477-7485.
- Noss, E. H., *et al.* (2001). "Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*." J. Immunol. **167**(2): 910-918.
- Nunes, P. and N. Demaurex (2010). "The role of calcium signaling in phagocytosis." <u>J. Leukoc. Biol.</u> **88**(1): 57-68.

## 0

- O'Toole, R. (2010). "Experimental models used to study human tuberculosis." <u>Adv.</u> Appl. Microbiol. **71**: 75-89.
- Oddo, M., et al. (1998). "Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*." J. Immunol. **160**(11): 5448-5454.
- Ojha, A. K., *et al.* (2010). "Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms." J. Biol. Chem. **285**(23): 17380-17389.
- Okamoto, Y., *et al.* (2006). "Mycobacterial sulfolipid shows a virulence by inhibiting cord factor induced granuloma formation and TNF-alpha release." <u>Microb.</u> <u>Pathog.</u> **40**(6): 245-253.
- Okamoto Yoshida, Y., *et al.* (2010). "Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung." J. Immunol. **184**(8): 4414-4422.
- Onwueme, K. C., *et al.* (2004). "Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: proof of principle with *Mycobacterium tuberculosis* PapA5." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **101**(13): 4608-4613.
- Onwueme, K. C., *et al.* (2005a). "The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria." <u>Prog Lipid Res</u> **44**(5): 259-302.
- Onwueme, K. C., *et al.* (2005b). "Identification of phthiodiolone ketoreductase, an enzyme required for production of mycobacterial diacyl phthiocerol virulence factors." J. Bacteriol. **187**(14): 4760-4766.
- Ordway, D., *et al.* (2007). "The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation." <u>J.</u> <u>Immunol.</u> **179**(1): 522-531.

- Ordway, D., et al. (2005). "Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with Mycobacterium tuberculosis express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family." J. Immunol. **175**(6): 3873-3881.
- Ortalo-Magne, A., *et al.* (1996a). "The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli." <u>Microbiology.</u> **142** (**Pt 4**): 927-935.
- Ortalo-Magne, A., *et al.* (1995). "Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus." <u>Microbiology</u>. **141 ( Pt 7)**: 1609-1620.
- Ortalo-Magne, A., *et al.* (1996b). "Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species." J. Bacteriol. **178**(2): 456-461.
- Otsuka, A., *et al.* (2008). "Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs." <u>J. Immunol.</u> **181**(12): 8528-8533.
- Ozeki, Y., et al. (2006). "Macrophage scavenger receptor down-regulates mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages." <u>Microb. Pathog.</u> **40**(4): 171-176.
- Pan, Y. T., *et al.* (2008). "Trehalose synthase converts glycogen to trehalose." <u>Febs</u> J. **275**(13): 3408-3420.
- Pan, Y. T., et al. (2002). "Trehalose-phosphate synthase of Mycobacterium tuberculosis. Cloning, expression and properties of the recombinant enzyme." <u>Eur. J. Biochem.</u> 269(24): 6091-6100.
- Pandey, A. K. and C. M. Sassetti (2008). "Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **105**(11): 4376-4380.
- Pandian, T. K., *et al.* (2008). "*Mycobacterium marinum* infections in transplant recipients: case report and review of the literature." <u>Transpl. Infect. Dis.</u> **10**(5): 358-363.
- Pang, H. N., *et al.* (2007). "*Mycobacterium marinum* as a cause of chronic granulomatous tenosynovitis in the hand." J. Infect. **54**(6): 584-588.
- Parent, L. J., *et al.* (1995). "Disseminated *Mycobacterium marinum* infection and bacteremia in a child with severe combined immunodeficiency." <u>Clin. Infect.</u> <u>Dis.</u> **21**(5): 1325-1327.
- Park, J. S., et al. (2006). "Virulent clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages." J. Leukoc. Biol. **79**(1): 80-86.
- Pathak, S. K., *et al.* (2005). "*Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannanmediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12 p40 production in macrophages." <u>J. Biol. Chem.</u> **280**(52): 42794-42800.
- Patterson, J. H., *et al.* (2000). "Identification of a methyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* involved in glycopeptidolipid synthesis." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> **275**(32): 24900-24906.

- Pedrosa, J., *et al.* (2000). "Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice." <u>Infect. Immun.</u> **68**(2): 577-583.
- Perez, E., et al. (2004). "Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* complex." J. Biol. Chem. **279**(41): 42574-42583.
- Perskvist, N., et al. (2002). "Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/BclxL via an oxygen-dependent pathway." J. Immunol. **168**(12): 6358-6365.
- Persson, Y. A., *et al.* (2008). "*Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria." <u>Microbes Infect.</u> **10**(3): 233-240.
- Peyron, P., *et al.* (2008). "Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence." <u>PLoS Pathog.</u> **4**(11): e1000204.
- Phan, T. A. and J. Relic (2010). "Sporotrichoid *Mycobacterium marinum* infection of the face following a cat scratch." <u>Australas J. Dermatol.</u> **51**(1): 45-48.
- Philips, J. A. (2008). "Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting." <u>Cell. Microbiol.</u> **10**(12): 2408-2415.
- Philips, J. A., et al. (2005). "Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection." <u>Science</u>. **309**(5738): 1251-1253.
- Piddington, D. L., *et al.* (2001). "Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst." Infect. Immun. **69**(8): 4980-4987.
- Pitarque, S., et al. (2005). "Deciphering the molecular bases of *Mycobacterium tuberculosis* binding to the lectin DC-SIGN reveals an underestimated complexity." <u>Biochem. J.</u> **392**(Pt 3): 615-624.
- Pitarque, S., *et al.* (2008). "The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface." <u>Tuberculosis</u> (Edinb). **88**(6): 560-565.
- Polotsky, V. Y., et al. (1997). "Interaction of human mannose-binding protein with Mycobacterium avium." J. Infect. Dis. **175**(5): 1159-1168.
- Pourshafie, M. R., *et al.* (1999). "Immunological and ultrastructural disruptions of T lymphocytes following exposure to the glycopeptidolipid isolated from the *Mycobacterium avium* complex." <u>Scand. J. Immunol.</u> **49**(4): 405-410.
- Pozos, T. C. and L. Ramakrishnan (2004). "New models for the study of Mycobacterium-host interactions." <u>Curr. Opin. Immunol.</u> **16**(4): 499-505.
- Prehm, P. (1980). "Methylation of carbohydrates by methyl trifluoromethanesulfonate in trimethyl phosphate." <u>Carbohydr.Res.</u> **78**(2): 372-374.
- Puech, V., *et al.* (2000). "Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85." <u>Mol. Microbiol.</u> **35**(5): 1026-1041.
- Puech, V., *et al.* (2002). "Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Mol. Microbiol.</u> **44**(4): 1109-1122.
- Puissegur, M. P., et al. (2007). "Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta1 integrinmediated pathway." J. Immunol. **178**(5): 3161-3169.

- Ragas, A., *et al.* (2007). "The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A." <u>J. Biol. Chem.</u> **282**(8): 5133-5142.
- Rajasingh, J., *et al.* (2006). "IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression." <u>Faseb. J.</u> **20**(12): 2112-2114.
- Ramakrishnan, L. (2004). "Using *Mycobacterium marinum* and its hosts to study tuberculosis " <u>Curr. Sci.</u> **86**(1): 1057-1069.
- Ramakrishnan, L. and S. Falkow (1994). "Mycobacterium marinum persists in cultured mammalian cells in a temperature-restricted fashion." <u>Infect. Immun.</u> 62(8): 3222-3229.
- Ramakrishnan, L., et al. (1997). "Mycobacterium marinum causes both long-term subclinical infection and acute disease in the leopard frog (Rana pipiens)." Infect. Immun. 65(2): 767-773.
- Ramos-Kichik, V., et al. (2009). "Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis." <u>Tuberculosis (Edinb)</u>. **89**(1): 29-37.
- Rao, V., et al. (2006). "Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses Mycobacterium tuberculosis -induced inflammation and virulence." <u>J. Clin. Invest.</u> **116**(6): 1660-1667.
- Rastogi, N., *et al.* (1991). "A new insight into the mycobacterial cell envelope architecture by the localization of antigens in ultrathin sections." <u>Zentralbl.</u> <u>Bakteriol.</u> **275**(3): 287-302.
- Raymond, J. B., *et al.* (2005). "Identification of the namH gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan." J. Biol. Chem. **280**(1): 326-333.
- Reed, M. B., *et al.* (2004). "A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response." <u>Nature.</u> **431**(7004): 84-87.
- Reinhardt, R. L., *et al.* (2006). "Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation." J. Immunol. **177**(3): 1618-1627.
- Ren, H., *et al.* (2007). "Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*." <u>Mol. Microbiol.</u> **63**(5): 1345-1359.
- Reyrat, J. M. and D. Kahn (2001). "*Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis?" <u>Trends Microbiol.</u> **9**(10): 472-474.
- Rhoades, E. R., et al. (1997). "Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Tuber. Lung</u> <u>Dis.</u> 78(1): 57-66.
- Ripoll, F., *et al.* (2007). "Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*." <u>BMC Genomics.</u> **8**: 114.
- Riviere, M., *et al.* (1993). "Structure of a novel glycopeptidolipid antigen containing a O-methylated serine isolated from *Mycobacterium xenopi*. Complete 1H-NMR and 13C-NMR assignment." <u>Eur. J. Biochem.</u> **214**(2): 395-403.
- Riviere, M., *et al.* (1987). "A novel mannose containing phenolic glycolipid from *Mycobacterium kansasii*." J. Biol. Chem. **262**(31): 14879-14884.

- Riviere, M., et al. (2004). "Highly ordered supra-molecular organization of the mycobacterial lipoarabinomannans in solution. Evidence of a relationship between supra-molecular organization and biological activity." <u>J. Mol. Biol.</u> **344**(4): 907-918.
- Riviere, M. and G. Puzo (1992). "Use of 1H NMR ROESY for structural determination of O-glycosylated amino acids from a serine-containing glycopeptidolipid antigen." <u>Biochemistry.</u> **31**(14): 3575-3580.
- Roach, D. R., *et al.* (2002). "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection." J. Immunol. **168**(9): 4620-4627.
- Robinson, N., *et al.* (2008). "Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response." <u>Traffic.</u> **9**(11): 1936-1947.
- Robinson, N., *et al.* (2007). "A mycobacterial gene involved in synthesis of an outer cell envelope lipid is a key factor in prevention of phagosome maturation." <u>Infect. Immun.</u> **75**(2): 581-591.
- Rodriguez, G. M. (2006). "Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Trends Microbiol.</u> **14**(7): 320-327.
- Rojas, M., et al. (2000). "Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca+2dependent cell signaling." J. Infect. Dis. **182**(1): 240-251.
- Rojas, M., et al. (2002). "Activation of JAK2/STAT1-alpha-dependent signaling events during *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis." <u>Cell. Immunol.</u> **217**(1-2): 58-66.
- Rombouts, Y., et al. (2009). "Mycobacterium marinum lipooligosaccharides are unique caryophyllose-containing cell wall glycolipids that inhibit tumor necrosis factor-alpha secretion in macrophages." J. Biol. Chem. **284**(31): 20975-20988.
- Rosas-Magallanes, V., *et al.* (2006). "Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Mol. Biol. Evol.</u> **23**(6): 1129-1135.
- Roura-Mir, C., et al. (2005). "Mycobacterium tuberculosis regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR-2." J. Immunol. **175**(3): 1758-1766.
- Rousseau, C., *et al.* (2003a). "Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells." <u>Cell. Microbiol.</u> **5**(6): 405-415.
- Rousseau, C., et al. (2003b). "Virulence attenuation of two Mas-like polyketide synthase mutants of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Microbiology.</u> **149**(Pt 7): 1837-1847.
- Rousseau, C., *et al.* (2003c). "Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs." <u>Infect. Immun.</u> **71**(8): 4684-4690.
- Runyon, E. H. (1981). "Mycobacteria: an overview." Rev Infect Dis 3(5): 819-821.
- Russell-Goldman, E., *et al.* (2008). "A Mycobacterium tuberculosis Rpf doubleknockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes." <u>Infect. Immun.</u> **76**(9): 4269-4281.
- Russell, D. G. (2007). "Who puts the tubercle in tuberculosis?" <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **5**(1): 39-47.
- Russell, D. G., *et al.* (2009). "Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma." <u>Nat. Immunol.</u> **10**(9): 943-948.

Rustad, T. R., *et al.* (2008). "The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>PLoS One.</u> **3**(1): e1502.

Rustad, T. R., et al. (2009). "Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency." <u>Cell. Microbiol.</u> **11**(8): 1151-1159.

Ryll, R., *et al.* (2001). "Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages." <u>Microbes</u> <u>Infect.</u> **3**(8): 611-619.

- Saadat, S. and C. E. Ballou (1983). "Pyruvylated glycolipids from *Mycobacterium smegmatis*. Structures of two oligosaccharide components." J. Biol. Chem. **258**(3): 1813-1818.
- Saavedra, R., *et al.* (2006). "Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells." <u>Microbes</u> <u>Infect.</u> **8**(2): 533-540.
- Sacchettini, J. C., *et al.* (2008). "Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **6**(1): 41-52.
- Sada-Ovalle, I., et al. (2008). "Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria." <u>PLoS Pathog.</u> **4**(12): e1000239.
- Saita, N., *et al.* (2000). "Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats." <u>Infect. Immun.</u> **68**(10): 5991-5997.
- Sakaguchi, I., *et al.* (2000). "Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages." <u>Infect. Immun.</u> **68**(4): 2043-2052.
- Sakamoto, K., *et al.* (2010). "Fibrinogen regulates the cytotoxicity of mycobacterial trehalose dimycolate but is not required for cell recruitment, cytokine response, or control of mycobacterial infection." Infect. Immun. **78**(3): 1004-1011.
- Sallusto, F., *et al.* (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J. Exp. Med. **182**(2): 389-400.
- Sanal, H. T., *et al.* (2009). "Atypical mycobacterial tenosynovitis and bursitis of the wrist." <u>Diagn. Interv. Radiol.</u> **15**(4): 266-268.
- Sanchez, A., *et al.* (2009). "*Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages." <u>Scand. J. Immunol.</u> **69**(1): 20-28.
- Sani, M., et al. (2010). "Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins." <u>PLoS Pathog.</u> 6(3): e1000794.
- Sartain, M. J. and J. T. Belisle (2009). "N-Terminal clustering of the O-glycosylation sites in the *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein SodC." <u>Glycobiology</u>. **19**(1): 38-51.

- Sathyamoorthy, N. and K. Takayama (1987). "Purification and characterization of a novel mycolic acid exchange enzyme from *Mycobacterium smegmatis*." <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u> **262**(28): 13417-13423.
- Saunders, B. M. and W. J. Britton (2007). "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis." Immunol Cell Biol **85**(2): 103-111.
- Schaeffer, M. L., *et al.* (1999). "The pimB gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a mannosyltransferase involved in lipoarabinomannan biosynthesis." J. Biol. Chem. **274**(44): 31625-31631.
- Schafer, G., *et al.* (2009). "Non-opsonic recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by phagocytes." J. Innate Immun. **1**(3): 231-243.
- Scherman, H., *et al.* (2009). "Identification of a polyprenylphosphomannosyl synthase involved in the synthesis of mycobacterial mannosides." J. Bacteriol. **191**(21): 6769-6772.
- Schleifer, K. H. and O. Kandler (1972). "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications." <u>Bacteriol. Rev.</u> **36**(4): 407-477.
- Schlesinger, L. S. (1993). "Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors." J. Immunol. **150**(7): 2920-2930.
- Schlesinger, L. S. and M. A. Horwitz (1991). "Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes." J. Exp. Med. **174**(5): 1031-1038.
- Schoenen, H., et al. (2010). "Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate." J. Immunol. **184**(6): 2756-2760.
- Schorey, J. S. and L. Sweet (2008). "The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis." <u>Glycobiology</u>. **18**(11): 832-841.
- Schreiber, H. A. and M. Sandor (2010). "The role of dendritic cells in mycobacteriuminduced granulomas." <u>Immunol. Lett.</u> **130**(1-2): 26-31.
- Seidel, M., *et al.* (2007). "Identification of a novel arabinofuranosyltransferase AftB involved in a terminal step of cell wall arabinan biosynthesis in *Corynebacterianeae*, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. **282**(20): 14729-14740.
- Sena, C. B., *et al.* (2010). "Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis." J. Biol. Chem. **285**(18): 13326-13336.
- Shabaana, A. K., *et al.* (2005). "Mycobacterial lipoarabinomannans modulate cytokine production in human T helper cells by interfering with raft/microdomain signalling." <u>Cell. Mol. Life Sci.</u> **62**(2): 179-187.
- Shepard, C. C. and J. A. Habas (1967). "Relation of infection to tissue temperature in mice infected with *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium leprae*." <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u> 93(3): 790-796.
- Shi, L., *et al.* (2008). "Transfer of the first arabinofuranose residue to galactan is essential for *Mycobacterium smegmatis* viability." <u>J. Bacteriol.</u> **190**(15): 5248-5255.
- Shiloh, M. U. and P. A. DiGiuseppe Champion (2010). "To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis?" <u>Curr. Opin. Microbiol.</u> **13**(1): 86-92.
- Shiloh, M. U., *et al.* (2008). "*Mycobacterium tuberculosis* senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection." <u>Cell Host Microbe.</u> **3**(5): 323-330.

- Shimada, K., *et al.* (2006). "Involvement of mannose receptor in glycopeptidolipidmediated inhibition of phagosome-lysosome fusion." <u>Microbiol. Immunol.</u> **50**(3): 243-251.
- Shimakata, T. and Y. Minatogawa (2000). "Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*." <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> **380**(2): 331-338.
- Sidobre, S., *et al.* (2000). "Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition." J. Biol. Chem. **275**(4): 2415-2422.
- Sidobre, S., *et al.* (2002). "Lipid-restricted recognition of mycobacterial lipoglycans by human pulmonary surfactant protein A: a surface-plasmon-resonance study." <u>Biochem. J.</u> **365**(Pt 1): 89-97.
- Silva, M. T., et al. (2007). "Aquatic insects and Mycobacterium ulcerans: an association relevant to Buruli ulcer control?" PLoS Med. 4(2): e63.
- Silva, M. T., *et al.* (2009). "Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite *Mycobacterium ulcerans* leading to Buruli ulcer." <u>Lancet. Infect. Dis.</u> **9**(11): 699-710.
- Simeone, R., *et al.* (2009). "ESX/type VII secretion systems and their role in hostpathogen interaction." <u>Curr. Opin. Microbiol.</u> **12**(1): 4-10.
- Simeone, R., *et al.* (2007). "Identification of the missing trans-acting enoyl reductase required for phthiocerol dimycocerosate and phenolglycolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." J. Bacteriol. **189**(13): 4597-4602.
- Simeone, R., *et al.* (2010). "Delineation of the roles of FadD22, FadD26 and FadD29 in the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates and related compounds in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Febs J.</u> **277**(12): 2715-2725.
- Singh, A., et al. (2009). "Mycobacterium tuberculosis WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response." <u>PLoS Pathog.</u> **5**(8): e1000545.
- Singh, S. B., *et al.* (2006). "Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria." <u>Science.</u> **313**(5792): 1438-1441.
- Sinsimer, D., et al. (2008). "The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence." <u>Infect. Immun.</u> **76**(7): 3027-3036.
- Sirakova, T. D., *et al.* (2002). "Regulation of expression of mas and fadD28, two genes involved in production of dimycocerosyl phthiocerol, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*." J. Bacteriol. **184**(24): 6796-6802.
- Sirakova, T. D., *et al.* (2001). "The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis." <u>J. Biol. Chem.</u> **276**(20): 16833-16839.
- Sivan, M., et al. (2008). "Mycobacterium marinum osteomyelitis of a long bone." Joint. Bone. Spine. **75**(5): 600-602.
- Skold, M. and S. M. Behar (2008). "Tuberculosis triggers a tissue-dependent program of differentiation and acquisition of effector functions by circulating monocytes." <u>J. Immunol.</u> **181**(9): 6349-6360.
- Skovierova, H., et al. (2009). "AftD, a novel essential arabinofuranosyltransferase from mycobacteria." <u>Glycobiology</u>. **19**(11): 1235-1247.
- Smith, 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." <u>Infect. Immun.</u> **76**(12): 5478-5487.

Smith, N. H., *et al.* (2009). "Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Nat. Rev. Microbiol.</u> **7**(7): 537-544.

Sonden, B., *et al.* (2005). "Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface." <u>Mol. Microbiol.</u> **58**(2): 426-440.

Stadthagen, G., *et al.* (2006). "Comparative investigation of the pathogenicity of three *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the synthesis of p-hydroxybenzoic acid derivatives." <u>Microbes Infect.</u> **8**(8): 2245-2253.

- Stadthagen, G., et al. (2005). "p-Hydroxybenzoic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." J. Biol. Chem. **280**(49): 40699-40706.
- Stamm, L. M. and E. J. Brown (2004). "*Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium." <u>Microbes Infect.</u> **6**(15): 1418-1428.
- Stamm, L. M., *et al.* (2003). "*Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility." <u>J. Exp. Med.</u> **198**(9): 1361-1368.
- Stamm, L. M., et al. (2005). "Role of the WASP family proteins for *Mycobacterium* marinum actin tail formation." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **102**(41): 14837-14842.
- Stegelmann, F., *et al.* (2005). "Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*." J. Immunol. **175**(11): 7474-7483.
- Steinert, M. and K. Heuner (2005). "*Dictyostelium* as host model for pathogenesis." <u>Cell. Microbiol.</u> **7**(3): 307-314.
- Stenger, S., et al. (1998). "An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin." <u>Science.</u> **282**(5386): 121-125.
- Stenger, S., et al. (1997). "Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection." <u>Science</u>. **276**(5319): 1684-1687.
- Stern, R. J., *et al.* (1999). "Conversion of dTDP-4-keto-6-deoxyglucose to free dTDP-4-keto-rhamnose by the rmIC gene products of *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Microbiology</u>. **145** ((Pt 3)): 663-671.
- Stinear, T. P., et al. (2008). "Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Genome Res.</u> **18**(5): 729-741.
- Stinear, T. P., *et al.* (2007). "Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer." <u>Genome Res.</u> **17**(2): 192-200.
- Stokes, R. W., et al. (2004). "The glycan-rich outer layer of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages." <u>Infect. Immun.</u> 72(10): 5676-5686.
- Stover, C. K., *et al.* (2000). "A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis." <u>Nature.</u> **405**(6789): 962-966.
- Streisinger, G., et al. (1981). "Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)." <u>Nature.</u> **291**(5813): 293-296.
- Streit, M., et al. (2006). "Disseminated *Mycobacterium marinum* infection with extensive cutaneous eruption and bacteremia in an immunocompromised patient." <u>Eur. J. Dermatol.</u> **16**(1): 79-83.
- Sturgill-Koszycki, S., *et al.* (1996). "Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis." <u>Embo J.</u> **15**(24): 6960-6968.

- Sugawara, I., et al. (2002). "Pulmonary granulomas of guinea pigs induced by inhalation exposure of heat-treated BCG Pasteur, purified trehalose dimycolate and methyl ketomycolate." J Med Microbiol **51**(2): 131-137.
- Sugawara, I., et al. (2004). "Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis." Infect. Immun. **72**(3): 1804-1806.
- Sut, A., *et al.* (1990). "Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: alteration of model and natural membranes." <u>Biochemistry</u>. **29**(36): 8498-8502.
- Swaim, L. E., *et al.* (2006). "*Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity." <u>Infect. Immun. **74**</u>(11): 6108-6117.
- Swanson, J. A. (2008). "Shaping cups into phagosomes and macropinosomes." <u>Nat.</u> <u>Rev. Mol. Cell. Biol.</u> **9**(8): 639-649.
- Sweet, L., *et al.* (2010). "Mannose receptor-dependent delay in phagosome maturation by *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids." <u>Infect. Immun.</u> **78**(1): 518-526.
- Sweet, L., *et al.* (2008). "*Mycobacterium avium* glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through toll-like receptor 2." J. Biol. Chem. **283**(48): 33221-33231.

Τ

- Tailleux, L., *et al.* (2003a). "Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells." <u>J. Immunol.</u> **170**(4): 1939-1948.
- Tailleux, L., *et al.* (2005). "DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis." <u>PLoS Med.</u> **2**(12): e381.
- Tailleux, L., *et al.* (2003b). "DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells." <u>J. Exp. Med.</u> **197**(1): 121-127.
- Takayama, K., et al. (2005). "Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Clin. Microbiol. Rev.</u> **18**(1): 81-101.
- Takimoto, H., *et al.* (2006). "Interferon-gamma independent formation of pulmonary granuloma in mice by injections with trehalose dimycolate (cord factor), lipoarabinomannan and phosphatidylinositol mannosides isolated from *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Clin. Exp. Immunol.</u> **144**(1): 134-141.
- Talaat, A. M., *et al.* (1998). "Goldfish, *Carassius auratus*, a novel animal model for the study of *Mycobacterium marinum* pathogenesis." Infect. Immun. **66**(6): 2938-2942.
- Tan, B. H., *et al.* (2006a). "Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens." J. Immunol. **177**(3): 1864-1871.
- Tan, T., *et al.* (2006b). "The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation." <u>Cell. Microbiol.</u> **8**(9): 1417-1429.
- Tanaka, Y., *et al.* (1995). "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells." <u>Nature.</u> **375**(6527): 155-158.
- Tatituri, R. V., *et al.* (2007). "Inactivation of *Corynebacterium glutamicum* NCgl0452 and the role of MgtA in the biosynthesis of a novel mannosylated glycolipid involved in lipomannan biosynthesis." <u>J. Biol. Chem.</u> **282**(7): 4561-4572.
- Tchornobay, A. M., *et al.* (1992). "Fatal disseminated *Mycobacterium marinum* infection." Int. J. Dermatol. **31**(4): 286-287.
Telenti, A., et al. (1997). "The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol." <u>Nat. Med.</u> **3**(5): 567-570.

- ten Bokum, A. M., *et al.* (2008). "The case for hypervirulence through gene deletion in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Trends Microbiol.</u> **16**(9): 436-441.
- Thoma-Uszynski, S., *et al.* (2000). "CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis." <u>J.</u> <u>Immunol.</u> **165**(10): 5773-5779.
- Thurman, P. F., *et al.* (1993). "Possible intermediates in the biosynthesis of mycoside B by *Mycobacterium microti*." <u>Eur. J. Biochem.</u> **212**(3): 705-711.
- Tobin, D. M. and L. Ramakrishnan (2008). "Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Cell. Microbiol.</u> **10**(5): 1027-1039.
- Tonjum, T., et al. (1998). "Differentiation of Mycobacterium ulcerans, M. marinum, and M. haemophilum: mapping of their relationships to M. tuberculosis by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis." J. Clin. Microbiol. 36(4): 918-925.
- Torrelles, J. B., et al. (2006). "Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors." <u>J. Immunol.</u> **177**(3): 1805-1816.
- Torrelles, J. B., *et al.* (2009). "Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase pimB reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death." <u>Glycobiology</u>. **19**(7): 743-755.
- Tortoli, E. (2003). "Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s." <u>Clin. Microbiol. Rev.</u> **16**(2): 319-354.
- Tortoli, É. (2006). "The new mycobacteria: an update." <u>FEMS Immunol. Med.</u> <u>Microbiol.</u> **48**(2): 159-178.
- Tortoli, E. (2009). "Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections." <u>Clin. Microbiol. Infect.</u> **15**(10): 906-910.
- Tostmann, A., *et al.* (2008). "Tuberculosis transmission by patients with smearnegative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands." <u>Clin.</u> <u>Infect. Dis.</u> **47**(9): 1135-1142.
- Traver, D., *et al.* (2003). "The zebrafish as a model organism to study development of the immune system." <u>Adv. Immunol.</u> **81**: 253-330.
- Travis, W. D., et al. (1985). "The histopathologic spectrum in *Mycobacterium* marinum infection." <u>Arch. Pathol. Lab. Med.</u> **109**(12): 1109-1113.
- Trede, N. S., *et al.* (2004). "The use of zebrafish to understand immunity." <u>Immunity</u>. **20**(4): 367-379.
- Treumann, A., *et al.* (2002). "5-Methylthiopentose: a new substituent on lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis*." J. Mol. Biol. **316**(1): 89-100.
- Trimble, W. S. and S. Grinstein (2007). "TB or not TB: calcium regulation in mycobacterial survival." <u>Cell.</u> **130**(1): 12-14.
- Trivedi, O. A., *et al.* (2004). "Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyladenylates in mycobacteria." <u>Nature.</u> **428**(6981): 441-445.
- Tsai, C. M. and C. E. Frasch (1982). "A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels." <u>Anal. Biochem.</u> **119**(1): 115-119.

- Tsai, M. C., *et al.* (2006). "Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension." <u>Cell. Microbiol.</u> **8**(2): 218-232.
- Tsolaki, A. G., *et al.* (2004). "Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains." <u>Proc. Natl. Acad.</u> <u>Sci. U. S. A.</u> **101**(14): 4865-4870.
- Tsukaguchi, K., *et al.* (1995). "CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production." J. Immunol. **154**(4): 1786-1796.
- Tsukaguchi, K., et al. (1999). "Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alphabetaTCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra." <u>Cell. Immunol.</u> **194**(1): 12-20.
- Turnbull, W. B., et al. (2004). "Identification of the 5-methylthiopentosyl substituent in Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan." <u>Angew. Chem. Int. Ed. Engl.</u> 43(30): 3918-3922.

## U-V

- Ulrichs, T., *et al.* (2004). "Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung." J Pathol **204**(2): 217-228.
- Umesiri, F. E., *et al.* (2010). "Recent advances toward the inhibition of mAG and LAM synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Med. Res. Rev.</u> **30**(2): 290-326.
- van der Sar, A. M., *et al.* (2004a). "*Mycobacterium marinum* strains can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence." <u>Infect.</u> <u>Immun.</u> **72**(11): 6306-6312.
- van der Sar, A. M., *et al.* (2004b). "A star with stripes: zebrafish as an infection model." <u>Trends Microbiol.</u> **12**(10): 451-457.
- van der Sar, A. M., *et al.* (2009). "Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components." <u>Mol. Immunol.</u> **46**(11-12): 2317-2332.
- van der Wel, N., *et al.* (2007). "*M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells." <u>Cell.</u> **129**(7): 1287-1298.
- van der Werf, T. S., *et al.* (2005). "*Mycobacterium ulcerans* disease." <u>Bull. World.</u> <u>Health. Organ.</u> **83**(10): 785-791.
- Vandal, O. H., et al. (2009). "Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>J.</u> <u>Bacteriol.</u> **191**(15): 4714-4721.
- Vandal, O. H., et al. (2008). "A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Nat. Med.</u> **14**(8): 849-854.
- VanderVen, B. C., et al. (2005). "Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways." <u>Science.</u> **309**(5736): 941-943.
- Vankayalapati, R. and P. F. Barnes (2009). "Innate and adaptive immune responses to human *Mycobacterium tuberculosis* infection." <u>Tuberculosis (Edinb).</u> 89
  Suppl 1: S77-80.

- Vankayalapati, R., et al. (2002). "The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium." <u>J. Immunol.</u> 168(7): 3451-3457.
- Vazquez, J. A. and J. D. Sobel (1992). "A case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection in an immunocompetent patient." <u>Eur. J. Clin. Microbiol.</u> <u>Infect. Dis.</u> **11**(10): 908-911.
- Venisse, A., et al. (1993). "Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry." J. Biol. Chem. **268**(17): 12401-12411.
- Venisse, A., et al. (1995). "Structural analysis of the mannan region of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Heterogeneity in phosphorylation state." J. Biol. Chem. **270**(25): 15012-15021.
- Vergne, I., et al. (2003). "Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca2+/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade." <u>J. Exp. Med.</u> **198**(4): 653-659.
- Vergne, I., *et al.* (2005). "Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</u> **102**(11): 4033-4038.
- Vergne, I., et al. (2004a). "Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **20**: 367-394.
- Vergne, I., et al. (2004b). "*Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion." <u>Mol. Biol. Cell.</u> **15**(2): 751-760.
- Vergne, I., et al. (1995). "Mycobacterial glycopeptidolipid interactions with membranes: a monolayer study." <u>FEBS Lett.</u> **375**(3): 254-258.
- Via, L. E., *et al.* (1997). "Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> **272**(20): 13326-13331.
- Via, L. E., *et al.* (1998). "Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation." J. Cell. Sci. **111 ( Pt 7)**: 897-905.
- Via, L. E., *et al.* (2008). "Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates." Infect. Immun. **76**(6): 2333-2340.
- Vignal, C., *et al.* (2003). "Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism." J. <u>Immunol.</u> **171**(4): 2014-2023.
- Villé, C. and M. Gastambide-Odier (1970). "Le 3-O-méthyl-rhamnose, sucre isolé du mycoside G de *Mycobacterium marinum*." <u>Carbohydr. Res.</u> **12**: 97-107.
- Villeneuve, C., *et al.* (2003). "Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids." <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u> **278**(51): 51291-51300.
- Villeneuve, C., *et al.* (2005a). "Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process." J. Lipid. <u>Res.</u> **46**(3): 475-483.
- Villeneuve, M., *et al.* (2005b). "Temperature dependence of the Langmuir monolayer packing of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Biochim. Biophys.</u> <u>Acta.</u> **1715**(2): 71-80.

- Villeneuve, M., et al. (2007). "Conformational behavior of oxygenated mycobacterial mycolic acids from *Mycobacterium bovis* BCG." <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> **1768**(7): 1717-1726.
- Villeneuve, M., *et al.* (2010). "Differential conformational behaviors of alpha-mycolic acids in Langmuir monolayers and computer simulations." <u>Chem Phys Lipids</u> **163**(6): 569-579.
- Volkman, H. E., *et al.* (2010). "Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium." <u>Science.</u> **327**(5964): 466-469.
- von Garnier, C., *et al.* (2005). "Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract." <u>J. Immunol.</u> **175**(3): 1609-1618.

- Walker, J. M., *et al.* (2001). Analysis of the Lipids of *Mycobacterium tuberculosis*. <u>Mycobacterium tuberculosis Protocols</u>, Humana Press. **54:** 229-245.
- Watanabe, M., *et al.* (2002). "Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids." <u>Microbiology.</u> **148**(Pt 6): 1881-1902.
- Watanabe, M., et al. (1997). "Structures of phenolic glycolipids from *Mycobacterium* kansasii." <u>Eur. J. Biochem.</u> **248**(1): 93-98.
- Watanabe, M., *et al.* (2001). "Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria." <u>Microbiology</u>. **147**(Pt 7): 1825-1837.
- Watanabe, M., et al. (1992). "A new glycolipid from *Mycobacterium avium---Mycobacterium intracellulare* complex." <u>Biochim. Biophys. Acta.</u> **1165**(1): 53-60.
- Watanabe, M., *et al.* (1999). "Structure of a new glycolipid from the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex." J. Bacteriol. **181**(7): 2293-2297.
- Welsh, K. J., et al. (2008). "A role for tumour necrosis factor-alpha, complement C5 and interleukin-6 in the initiation and development of the mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate induced granulomatous response." <u>Microbiology.</u> **154**(Pt 6): 1813-1824.
- West, M. A., et al. (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." <u>Science</u>. **305**(5687): 1153-1157.
- WHO. (2009a). Global Tuberculosis Control: a short update to the 2009 report. Genova, WHO Report 2009, World Health Organization.
- WHO. (2009b). Global Tuberculosis Control: Epidemiology, strategy, Financing. Genova, WHO Report 2009, World Health Organization. **Genova**.
- Wieland, C. W., et al. (2004). "Non-mannose-capped lipoarabinomannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2." <u>Am. J. Respir. Crit. Care. Med.</u> **170**(12): 1367-1374.
- Wietzerbin, J., *et al.* (1974). "Occurrence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of Mycobacteria." <u>Biochemistry</u>. **13**(17): 3471-3476.
- Wilkinson, K. A., *et al.* (2009). "Genetic determination of the effect of posttranslational modification on the innate immune response to the 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*." <u>BMC Microbiol.</u> **9**: 93.

- Winau, F., *et al.* (2004). "Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria." <u>Cell. Microbiol.</u> **6**(7): 599-607.
- Winslow, G. M., et al. (2008). "Early T-cell responses in tuberculosis immunity." Immunol. Rev. 225: 284-299.
- Wolf, A. J., *et al.* (2008). "Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs." <u>J. Exp. Med.</u> **205**(1): 105-115.
- Wolf, A. J., *et al.* (2007). "*Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo." <u>J. Immunol.</u> **179**(4): 2509-2519.
- Wolucka, B. A. (2008). "Biosynthesis of D-arabinose in mycobacteria a novel bacterial pathway with implications for antimycobacterial therapy." <u>Febs J.</u> 275(11): 2691-2711.
- Wolucka, B. A., et al. (1994). "Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria." J. Biol. Chem. **269**(37): 23328-23335.
- Wong, K. C., *et al.* (2007). "Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages." <u>Clin. Vaccine Immunol.</u> **14**(10): 1279-1284.
- Xu, S., et al. (1994). "Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages." J. Immunol. **153**(6): 2568-2578.

X-Y-Z

- Yagi, T., *et al.* (2003). "Polymerization of mycobacterial arabinogalactan and ligation to peptidoglycan." J. Biol. Chem. **278**(29): 26497-26504.
- Yan, M., et al. (2005). "Coronin-1 function is required for phagosome formation." <u>Mol.</u> <u>Biol. Cell.</u> **16**(7): 3077-3087.
- Yang, L., *et al.* (2008). "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." <u>Nature.</u> **454**(7202): 350-352.
- Yang, Y., et al. (2007). "NOD2 pathway activation by MDP or *Mycobacterium tuberculosis* infection involves the stable polyubiquitination of Rip2." J. Biol. Chem. **282**(50): 36223-36229.
- Yarkoni, E. and H. J. Rapp (1977). "Granuloma formation in lungs of mice after intravenous administration of emulsified trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor): reaction intensity depends on size distribution of the oil droplets." Infect. Immun. **18**(2): 552-554.
- Ye, P., *et al.* (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." J. Exp. Med. **194**(4): 519-527.
- Young, D. C. and D. B. Moody (2006). "T-cell recognition of glycolipids presented by CD1 proteins." <u>Glycobiology</u>. **16**(7): 103R-112R.
- Yuan, Y., et al. (1998). "The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Mol.</u> <u>Microbiol.</u> 29(6): 1449-1458.
- Zanetta, J. P., *et al.* (1999). "Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids." <u>Glycobiology</u>. **9**(3): 255-266.

- Zhang, L., *et al.* (1994). "Neutrophil Priming Mechanisms of Sulfolipid-I and N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine." J. Biomed. Sci. **1**(4): 253-262.
- Zhang, L., et al. (2009). "Rv0901 from *Mycobacterium tuberculosis*, a possible novel virulent gene proved through the recombinant Mycobacterium smegmatis." Jpn. J. Infect. Dis. **62**(1): 26-31.
- Zhang, N., *et al.* (2003). "The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region." <u>Mol. Microbiol.</u> **50**(1): 69-76.
- Zhang, Y. (2004). "Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis." <u>Front. Biosci.</u> **9**: 1136-1156.
- Zhang, Y. and W. W. Yew (2009). "Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." <u>Int. J. Tuberc. Lung Dis.</u> **13**(11): 1320-1330.
- Zilka, A., *et al.* (2005). "Characterization of the heparin/heparan sulfate binding site of the natural cytotoxicity receptor NKp46." <u>Biochemistry.</u> **44**(44): 14477-14485.
- Zimmerli, S., *et al.* (1996). "Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages." <u>Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.</u> **15**(6): 760-770.
- Zuber, B., *et al.* (2008). "Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state." J. Bacteriol. **190**(16): 5672-5680.
- Zuber, B., *et al.* (2006). "Granular layer in the periplasmic space of gram-positive bacteria and fine structures of *Enterococcus gallinarum* and *Streptococcus gordonii* septa revealed by cryo-electron microscopy of vitreous sections." J. <u>Bacteriol.</u> **188**(18): 6652-6660.

*Mycobacterium marinum* est une mycobactérie pathogène des ectothermes génétiquement proche de *M. tuberculosis*. Ce modèle peut être utilisé pour mieux comprendre la formation des granulomes tuberculeux et déterminer le rôle des glycoconjugués pariétaux dans la régulation de la réponse immunitaire. Dans ce contexte, nos travaux ont porté sur la purification des glycolipides polaires et apolaires extraits de la paroi de *M. marinum* et leur caractérisation en utilisant la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse.

Nos résultats concernant l'analyse structurale de la famille des lipooligosaccharides polaires (LOSs, comprenant les LOS-I à LOS-IV) ont démontré la présence de monosaccharides rares, dont le caryophyllose et un monosaccharide *N*-acylé, spécifique du LOS-IV. Nous avons également observé que tous les LOSs inhibent la sécrétion macrophagique d'une cytokine pro-inflammatoire, le TNF- $\alpha$ . En revanche, seul le LOS-IV stimule l'expression d'antigènes (ICAM-1 et CD40) à la surface des macrophages et la production de chimiokine (IL-8). Cet effet inducteur du LOS-IV pourrait être lié à la présence du monosaccharide terminal *N*-acylé. Par ailleurs, les autres glycolipides polaires analysés, incluant les phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIM), le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM), possèdent des structures similaires à celles de *M. tuberculosis*.

L'étude des glycolipides apolaires a permis de préciser la structure des glycolipides phénoliques (PGL) et des tréhaloses di-mycolates (TDM). De plus, une famille de glycolipides méconnue comprenant le Di-Mycolyl-Di-Arabinoglycérol (DMDA) a été identifiée. Le DMDA présente une structure très proche de la partie terminale du mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycanne (mAGp), macro-complexe pariétal majoritaire des mycobactéries. Des études complémentaires effectuées chez *M. bovis* BCG ont démontré que ce glycolipide était lié au métabolisme du mAGp, ce qui ouvre de nouvelles pistes pour la compréhension du mode d'action de certaines drogues anti-tuberculeuses telles que la thiacétazone.

\*\*\*

*Mycobacterium marinum* is a natural pathogen of ectotherms genetically close to *M. tuberculosis.* This pathogen model is useful for deciphering the role of mycobacterial cell wall glycolipids in granulomatous infection. In this context, our work focused on the purification of both polar and apolar glycolipids extracted from *M. marinum* cell wall and their structural characterization using nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

Analysis of the polar lipooligosaccharide family (LOSs, including LOS-I to LOS-IV) demonstrated the presence of several rare or even unique monosaccharides including caryophyllose, derivatives and a *N*-acylated monosaccharide specific of LOS-IV. Biological activity assays showed that LOSs exert an important pro-inflammatory effect by decreasing the TNF- $\alpha$  secretion from macrophages. Moreover, LOS-IV was found to stimulate the expression of the chemokine IL-8 and cell surface antigens (CD40 and ICAM-1) on macrophages. This specific immunostimulatory property was related to the presence of the terminal *N*-acylated monosaccharide in LOS-IV. In addition, other polar glycolipids analyzed, including phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIM), lipomannane (LM) and lipoarabinomannan (LAM), possess similar structures than *M. tuberculosis*.

The study of apolar glycolipids permitted to precise the structure of phenolic glycolipids (PGL) and trehalose di-mycolates (TDM). Moreover, a family of unusual glycolipids, including Di-Mycolyl-Di-Arabinoglycérol (DMDA), was identified. DMDA structure is very close from the terminal part of peptidoglycan-arabinogalactan-mycolyl (mAGp), the mycobacterial cell wall macro-complex. Additional studies performed in *M. bovis* BCG showed that this glycolipid is related to mAGp, providing new insights about the mode of action of anti-tuberculous drugs such as thiacetazone.