

Étude d'une nouvelle classe de métallochaperons impliqués dans la résistance à l'intoxication par les métaux chez Mycobacterium tuberculosis

Yves-Marie Boudehen

▶ To cite this version:

Yves-Marie Boudehen. Étude d'une nouvelle classe de métallochaperons impliqués dans la résistance à l'intoxication par les métaux chez Mycobacterium tuberculosis. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT: 2020TOU30196. tel-03178431

HAL Id: tel-03178431 https://theses.hal.science/tel-03178431

Submitted on 23 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Yves-Marie BOUDEHEN

Le 16 octobre 2020

Étude d'une nouvelle classe de métallochaperons impliqués dans la résistance à l'intoxication par les métaux chez Mycobacterium tuberculosis

Ecole doctorale : BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité : MICROBIOLOGIE

Unité de recherche : IPBS - Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale

> Thèse dirigée par Claude GUTIERREZ

> > Jury

Mme Hilde DE REUSE, Rapporteure M. Pascal ARNOUX, Rapporteur M. Laurent KREMER, Examinateur M. Matthieu ARLAT, Examinateur M. Olivier NEYROLLES, Examinateur M. Claude GUTIERREZ, Directeur de thèse

ABSTRACT

Metals are essential trace elements for all living organisms yet their accumulation is toxic and causes deleterious effects. Immune cells have many mechanisms for the elimination of pathogens. In particular, they are capable of manipulating intracellular metal concentrations, and can poison them by confining them into specialized cell compartments enriched in metals such as copper or zinc. Resistance to intoxication by transition metals has emerged as an important virulence feature of bacterial pathogens. In the major human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, resistance to zinc is mediated by the P-type ATPase efflux pump CtpC. The ctpC gene is located in operon with Rv3269, a gene encoding a 93-amino acids protein of unknown function. The main objective of my thesis focused on the involvement of Rv3269 in zinc resistance and its relationship with CtpC. Using molecular genetic and biochemical approaches, my thesis work demonstrated that Rv3269 is a novel membranebound zinc-binding protein necessary for zinc resistance in *M. tuberculosis*. Rv3269 and CtpC co-localize in functional membrane microdomains (FMMs) in M. tuberculosis, and Rv3269 contains motifs typical of prokaryotic flotillin (FloT)-like scaffold proteins that are involved in FMM assembly. Genetic disruption of the transmembrane domain, of the zinc-binding domain or of the FloT-like motifs in Rv3269 renders *M. tuberculosis* highly sensitive to zinc. Similar *Rv3269-ctpC*-like tandems are present in the genome of other bacteria. Thus, Rv3269 defines an unprecedented class of metallochaperone scaffold-like proteins dedicated to P-ATPasemediated metal efflux through FMMs in prokaryotes.

RESUME

Les métaux sont des oligo-éléments essentiels pour tous les organismes vivants, néanmoins leur accumulation est toxique et provoque des effets délétères. Les cellules immunitaires sont dotées de nombreux moyens pour l'élimination d'agents pathogènes. Capable de manipuler les concentrations métalliques intracellulaires, elles peuvent en particulier les intoxiquer en les confinant dans des compartiments cellulaires spécialisés riches en métaux, comme le cuivre ou le zinc. La résistance à l'intoxication par les métaux de transition est récemment apparue comme un des mécanismes importants de la virulence des bactéries pathogènes. Chez Mycobacterium tuberculosis, un pathogène majeur responsable de la tuberculose, la résistance au zinc est médiée par une pompe à efflux, l'ATPase de type P CtpC. Le gène ctpC se trouve en opéron avec Rv3269, un gène codant une protéine de 93 acides aminés de fonction inconnue. L'objectif principal de ma thèse s'est concentré sur l'implication de Rv3269 dans la résistance au zinc et sa relation avec CtpC. Par des approches de génétique moléculaire et biochimie, mes travaux de thèse ont permis de démontrer que Rv3269 est elle aussi nécessaire pour la résistance au zinc. Rv3269 contient un motif de fixation du zinc et est associée à la membrane cytoplasmique. Rv3269 et CtpC co-localisent dans des microdomaines membranaires fonctionnels dynamiques au sein de la membrane de M. tuberculosis et Rv3269 présente des motifs typiquement rencontrés chez les flotillines (FIoT), des protéines organisatrices de microdomaines membranaires chez les bactéries. L'analyse génétique de Rv3269 a montré que l'altération du domaine transmembranaire, des motifs de type FloT ou du domaine de fixation du zinc ont toutes pour conséquence de rendre M. tuberculosis sensible au zinc. Deux autres P-ATPases de M. tuberculosis sont aussi associées à de petites protéines similaires à Rv3269. Ces petites protéines co-localisent avec Rv3269. Une analyse phylogénétique indique que ce type d'organisation est retrouvé chez d'autres espèces bactériennes. Nous proposons que Rv3269 est le premier exemple décrit d'une nouvelle classe de métallochaperons capables d'organiser des plateformes fonctionnelles dédiées à l'efflux des métaux de transition chez les bactéries.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) qui a financé mes trois années de thèse et, qui a alloué ses fonds et continué de soutenir ce projet une année supplémentaire. Sans vous, ces travaux n'auraient pas été possibles.

Merci aux membres de mon jury de thèse

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon jury, mes rapporteurs le Pr Hilde De Reuse et le Dr Pascal Arnoux, mes examinateurs le Dr Laurent Kremer ainsi que le Pr Matthieu Arlat qui a également présidé le jury. Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail et suis très honoré de l'intérêt que chacun y a porté. Je souhaite également remercier chaleureusement le Dr Patrice Catty, présent en tant que membre invité dans ce jury, pour les nombreux échanges partagés sur ce projet.

Merci aux membres de mon comité de thèse

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, Olivier Dussurget et Anthony Henras, pour les deux journées dédiées à nos recherches, pour vos conseils avisés tant sur les projets scientifiques que sur les côtés humains et personnels.

Merci à mes collaborateurs, aux plateformes et intervenants

Je tiens à remercier nos différents collaborateurs pour leurs expertises respectives. Merci à Jérôme Rech et Jean-Yves Bouet du LMGM à Toulouse pour les heures de microscopie de fluorescence que j'ai pu passer sur votre appareil. Merci pour votre accueil et nombreux conseils lors de ces petites séances dans votre équipe qui m'ont permis de m'évader un peu de l'IPBS.

Merci à Patrice Catty et Roger Miras du CEA de Grenoble pour l'analyse biochimique de Rv3269 et ... leur ténacité concernant CtpC, qui montre que ce sujet n'est pas si facile. Merci particulièrement Patrice d'avoir fait le déplacement à Toulouse pour assister à ma soutenance malgré les conditions sanitaires actuelles et le soutien que tu as pu me fournir depuis que je travaille sur ce projet.

Un grand merci à Olivier Saurel de l'IPBS pour les expériences et traitement des données de RMN.

J'aimerais remercier les plateformes d'imagerie du CBI et de l'IPBS à Toulouse.

Merci à Brice Ronsin du CBI pour le développement de la macro-commande automatisée pour la quantification de la co-localisation qui m'a, assurément, économisé des dizaines d'heures d'analyse d'images.

A l'IPBS, plus spécifiquement, merci à Serge Mazeres pour son aide précieuse en imagerie, pour ImageJ, Excel et toutes tes interventions et solutions qui ont simplifié l'analyse de données. Merci à Emmanuelle Naser pour l'analyse de bactéries par cytométrie en flux. Je me souviendrais toujours la première fois que tu m'as demandé le nombre de tubes et de fluorescences que j'avais et où ta réponse fut aussi brève que concise : « c'est tout ?! ».

Je tiens à remercier fortement toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein de l'équipe pendant ces quatre années. Vous avez fait de cette expérience un environnement amical et plus qu'agréable au quotidien qui est, pour moi, une chose principale pour pouvoir travailler de manière optimale.

Merci à mes encadrants

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, Claude. Un énorme merci ne suffirait pas. Je suis très heureux d'avoir pu réaliser cette thèse avec toi et particulièrement apprécié la complémentarité qu'on a pu avoir à la paillasse, au P3 et de manière générale dans le laboratoire. Pour ça et les différents projets, tu m'as fait confiance dès le début et t'en suis extrêmement reconnaissant. Tu as toujours gardé un œil sur les innombrables constructions, les expériences, les présentations mais aussi et surtout, en dehors du professionnel, sur moi.

Olivier, merci infiniment de m'avoir accueilli dans ton équipe. J'espère que ce ne sont pas que les gâteaux bretons qui ont fait ce choix à l'origine ! CtpC est d'abord ton projet et je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant de travailler dessus. Ton dynamisme et l'énergie débordante que tu y as insufflée ont été une source de motivation indéniable pour moi, pour construire des plasmides et obtenir des résultats toujours plus vite afin de nourrir ton enthousiasme pour ce projet. Merci pour tes précieux conseils et encouragements, particulièrement lors de préparations et présentations orales. Je suis ravi d'avoir effectué ces années de doctorat dans ton équipe, je n'aurais pas pu trouver mieux.

Merci à toute l'équipe et aux collègues du laboratoire

Marion, tu es arrivée à un moment clé pour moi au laboratoire et pour laquelle ton aide a été précieuse. Comme promis je n'ai rien dit des (nombreuses) petites boulettes que tu as pu faire et qui te voudrait bien des gâteaux si Yannick et Flo le savaient ... ! Malgré ta petite dyslexie pour CtpC, on a formé un bon duo et j'espère aussi que tu le vois comme ça aussi. Merci beaucoup pour tes petites attentions et ton soutien indéfectible durant la fin de cette thèse, je t'en suis extrêmement reconnaissant.

Je ne peux remercier l'un sans l'autre, Florence et Yannick. Je me souviendrais toujours du premier mois ou je suis arrivé dans l'équipe, ou j'ai passé une semaine essentiellement avec vous deux alors que les autres personnes étaient en congrès. Cette semaine a tout de suite façonné la vie au laboratoire et m'a permis d'être très vite à l'aise. C'est certainement aussi avec vous deux que j'ai passé la majeure partie de mon temps dans le laboratoire et c'était un plaisir de travailler dans la bonne humeur avec comme supplément les rires à gogo qui pouvaient s'avérer très ... rafraichissants !

Merci Florence, chef P3, pour tes nombreux conseils, ton immense expérience de Mtb, les qRT-PCR et surtout ... Ton rire communicatif sans égal !

Merci infiniment Yannick, le « genius » du laboratoire. Merci de ton avis sur toutes les expériences que j'ai pu entreprendre, en biomol, en microscopie à fluorescence et dans ton domaine de prédilection qu'est la biochimie bien sûr. Un grand merci pour les soirées passées au stadium, à ce TFC-FCL d'anthologie qui restera graver dans ton esprit (j'espère). Entre nous, terminer cette thèse avec le FCL en L1, le TFC en L2 et non l'inverse (peu importe le classement actuel) est une autre petite victoire !

Denis, je te remercie d'abord pour tes coups de fils anonymes et tes qualités d'enquêteur hors pair. Je me rappellerais toujours autant de mon premier Trail que du succès que tu peux avoir aux soirées de thèse ! Merci pour ta bonne humeur constante, ton énergie, ta disponibilité. Merci pour le recul scientifique que tu as apporté aux différents aspects de ce projet de thèse qui m'a grandement aidé à construire et à trouver le bon fil conducteur de ce travail.

GC, merci beaucoup pour tous les encouragements que tu as apporté à ce projet et moimême. Quand nous (les étudiants) pensons toujours voir le mauvais côté d'une critique, tu as une manière incroyable de synthétiser avec enthousiasme et reformuler ces remarques d'un point de vue optimiste et extrêmement constructif. Merci aux soirées Champion's League, aux attentions que tu as avec chacun. J'attends avec impatience le prochain levé de coudes à base de mezcal avec toi !

Yoann, merci pour le temps que tu as pu accorder à cette initiation aux CoIP et surtout à ton expérience de biochimiste, ta positivité et ton réalisme. Ton appétit insatiable pour la science ainsi que cette fougue de curiosité sont les premières choses qui me viennent à l'esprit chez toi, choses que j'admire énormément. Tes retards au bar ne t'empêchent pas de trinquer tout autant et pour ça on peut remercier les bons gènes nordistes et bretons que les autres n'ont pas !

Thank you Ben for all your wise advices in biochem. I wish I will be as efficient as you are in the future in postdoc. I like your kindness and your availability, always ready to help at any time.

À tout le groupe des étudiants, « les jeunes ». Cette communauté modelée par le départ et l'arrivée de certains mais dans lequel l'esprit qui y règne reste toujours soudé, joyeux et délirant. Merci à chacun d'entre vous pour votre gentillesse, amitié et tous ces nombreux moments partagés entre escapades, week-ends, voyages, trails, mariages et soirées plus folles les unes que les autres. Merci à tous mille fois.

Merci Anthony que j'ai dû croiser plus de fois au bar que le mois de vie commune au laboratoire. Toujours à deux milles à l'heure surtout quand il s'agit de trinquer, pastis ou peu importe le contenu du contenant.

Merci Alexia pour ces sorties cyclistes nocturnes à pleurer de rire clôturées par le B52, pour les heures aux P3 où les plus grands DJ n'auraient pu te voler les platines et pour ton soutien microbio et biomol parmi tous les immunologistes qui nous entouraient.

Merci Lucie qui n'aura eu de cesse de me surprendre avec ses LuB monumentales parfois plus farfelues les unes que les autres. Fais tout de même attention de ne pas te faire surprendre par la Triple Karmeliet ... A chaque fois que je regarde les grands sacs en papier marron, je te revois dedans cachée et en sortir avec ton papier bulle.

Merci Maeva pour ton air-karaté dynamique et journalier au laboratoire, ton aptitude à t'exténuer pour tirer la langue le plus loin possible (:p) et mes premiers pas en tant que Zozo cat-sitter.

Merci Giulia pour ta présence rayonnante au quotidien, ton état d'esprit fédérateur et ton « ma che dici » main levée, italiennement vôtre.

Merci Tamara (cette fois je le mets dans le bon sens, je crois ...), chilleuse estivale couleur watermelon et maitre Shifu en la matière, ce combo explosif toujours enjoué à la vue d'un bon plat et de verres !

Merci Dan, confrère des 4 années en parallèle et maître d'orchestre hors pair des montages photos, des soirées jeux de sociétés et bien d'autres. Par extension, merci Andréa l'archiduchesse, binôme hors IPBS adoratrice des Kili tout fluffy.

Merci Alison pour ton énergie débordante que tu fais partager tous les jours et ta spontanéité sans réserve, peu importe le sujet de conversation !

Merci Wendy, détentrice du flambeau : il est à toi. La lueur de la biomol et de la microbio continuera et perdurera grâce à toi. Je n'ai aucun doute que tu vas faire soufr'ir TB et n'en fera qu'une bouchée (comme le pastis et les ti-punchs) !

Merci Sarah, on se croise mais je suis sûr que tu es sur une très belle lancée de sciences avec GC.

Aux colocataires du bureau 146

Merci Danilo pour ta compétitivité et combativité à toute épreuve, les parties/soirées de volley, ta fierté italienne avec les meilleures pâtes et pizza que j'ai pu manger jusqu'ici. Ciao bello. Merci André notre digne poète avant toujours le mot pour rire, ambianceur officiel du bureau

Merci André notre digne poète ayant toujours le mot pour rire, ambianceur officiel du bureau, sans filtre bien entendu.

Merci Karine, « quickette » fana des licornes et paillettes, la seule qui ait eu le courage de mettre un peu d'ordre dans ce bureau.

Un grand merci à Aurélien, mamène. Tu as d'innombrables d'autres surnoms mais pour moi, ça sera toujours celui-ci qui te définira. A tous ces moments insolites dans le 146, fou rires inarrêtables et soirées déjantées.

Merci Camille pour ta douceur et instants de folie, présente dès les premiers instants à Toulouse et partisanes des pauses « choco fort fort » sacrées.

Aux stagiaires Maximilian et Marc

Maximilian, our dear Erasmus student. Thank you a lot for your participation and your constant enthusiasm. You performed a great job with us and helped me a lot with quantification, colocalization and designing some macros on ImageJ. DJ proclaimed of the office « 146 motherf***** » I think and above all I hope you spent good times to work with us. And please, no more rasperry tart in the office!

Merci Marc arrivé tout récemment et, pour qui, j'attends déjà avec impatience une piècemontée digne des plus grands banquets.

Merci à toutes les autres personnes de l'IPBS que j'ai pu croiser dans les couloirs de l'institut et en-dehors. Merci Etienne et son équipe, Patricia, Laurie et toutes les autres « guilhotes », J-B, Sébastien, Emilie L., Arnaud L. et les étudiants de l'équipe Parini, Antonio.

Merci aux amis d'ici et de là

Dans l'ombre de l'environnement du laboratoire se cache un nombre de personnes, d'ami(e)s qui ont, de près et surtout de loin, contribuer à l'aboutissement de cette expérience. Ces moments partagés où l'esprit se relâche, se déconnecte et s'évade de notre sphère professionnelle et sont des plus importants. Pour votre soutien indéniable quant aux doutes que j'ai pu avoir mais surtout à vos personnalités et moments de folie, je tiens à remercier fortement Vincent, Florian, Pierre, Kevin, Céline, Emilie. Merci à Cécile et toute sa bande, merci à Maëva, Guillaume, Jacquie, Ingrid le groupe des pouces-cassés volleyeurs dans l'âme (ou pas) pour les tournois, les parties improvisées mais aussi les troisièmes mi-temps.

Merci à ma famille

Je tiens à remercier infiniment toute ma famille pour son éternel soutien qu'elle m'a apporté durant cette aventure et, bien au-delà, depuis tant d'années. Merci à mes cousins, mes parents et mes grands-parents.

Merci à toi papa, qui me montre sans cesse comment apprécier chaque moment, même les plus compliqués, merci pour ton support inébranlable. Merci à mon frère, Guillaume, qui est mon et le plus bel exemple d'engagement et de détermination. Merci pour la force que tu as pu me donner à travers tes messages et les séances de sport purifiantes en Bretagne. Enfin, merci à toi maman. Tu es à l'origine de mon goût pour la science ; tu es pour moi la fondatrice et, si je reprends un terme de ce manuscrit, « l'échafaudage » de tout ce parcours qui vient de toucher à sa fin. Merci pour tout.

ABREVIATIONS

ABC: ATP-biding-cassette ADC : Albumine dextrose catalase ADN : acide désoxyribonucléique AG: arabinogalactane AGS/AGI : acide gras saturé/insaturé ALF : alveolar lining fluid AM : alveolar macrophage ARN : acide ribonucléique ARNt : ARN de transfert AT-I et AT-II : alveolar epithelial cells type I and II ATPBD : ATP binding domain BCG : Bacille de Calmette et Guerin BLAST: Basic Local Alignment Search Tool CFP-10: 10 kDa culture filtrate protein CFU: colony-forming unit CDF: cation diffusion facilitator CE : Esters de cholesterol CFP-10 : culture filtrate protein 10 CLRs : C-type lectins receptors CMH : complexe majeur d'histocompatibilité **CMI** : concentration minimale inhibitrice Ct : cycle de seuil en gPCR DC : Dendritic Cell DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin dif: deletion induced filamentation **DIM**: Phtiocerol dimycoserosates **DOTS** : Directly observed therapy short course DRM : detergent resistant membranes DUF : domain of unknown function EEA1 : Early endosome antigen 1 EMB: éthambutal ESAT-6: 6 kDa early secretory antigenic target ESX-1 : ESAT-6 secretion system 1 Fcr : Immunoglobulin Fc receptor FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer GFP : green fluorescent protein GPI: glycosylphosphatidylinositol HDT : host-directed therapy HMBD : Heavy Metal Binding Domain IDR : intradermoréaction à la tuberculine IGRA : interferon gamma release assay IL : Interleukine IFNy : interféron gamma INH: isoniazide iNOS : Inducible nitric oxide synthase IRGM : Immunity-related GTPase M kb: kilobase kDa: kilodalton KO: knock-out LAM : lipoarabinomannane Ld : état fluide désordonné

LM : lipomannane Lo : état fluide ordonné LT : lymphocytes T ManLAM : lipomannane cappé par des mannoses MBD : metal binding domain **MBT** : mycobactine cMBT : carboxy-mycobactine MCP-1 : Monocyte chimoattractant protein 1 MDR : Multi-drug resistant MMF : microdomaine membranaire fonctionnel MR : Mannose receptor Mtb: Mycobacterium tuberculosis **MTBC** : *Mycobacterium tuberculosis* complex MyD88 : myeloid differenciation primary response protein 88 **NBD**: nucleotide binding domain NLR : NOD-like receptor NO : oxyde nitrique NRAMP1: Natural resistance-associated macrophage protein 1 OM : outer membrane OMS : Organisation mondiale de la sante PAMPs : Pathogen associated molecular pattern P-ATPase : ATPase de type P PCR : polymerase chain reaction PDIM : dimycocérosates de phthiocérol **PE**: Phosphatidylethanolamines PFA : paraformaldéhyde PHB: Prohibitin PG: peptidoglycane PI3K : Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate PIM : phosphatidylinositol mannoside PRR : pattern recognition receptor PZA : pyrazinamide RT-qPCR : reverse transcription and quantitative PCR RND : resistance nodulation cell division Rpf: resuscitation-promoting factors SBP : substrate binding protein So: état solide ordonné TB: tuberculose TDM : dimycolates de tréhalose **TDR** : totally drug-resistant TLR : toll-like receptor TM, TMD : domaine transmembranaire TMM : monomycolates de tréhalose TNF: tumor necrosis factor XDR : extensively drug-resistant VIH : virus de l'immunodéficience humaine WT : wild-type Zeo: zéocine

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Organisation de l'enveloppe des mycobactéries.	1
Figure 2. La tuberculose est une des principales causes de décès dans le monde	6
Figure 3. Incidence mondiale de la tuberculose.	8
Figure 4. Différents stades de la tuberculose et diagnostics associés1	0
Figure 5. Nombre annuel de décès causés par des maladies évitables par la vaccination 1	6
Figure 6. Efficacité de la vaccination par le BCG.	6
Figure 7. Classification des vaccins en développement contre la tuberculose1	8
Figure 8. Nombre de patients atteints de tuberculose multi-résistante (MDR-TB) entre 2009	
et 2018 selon les rapports mondiaux de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)24	4
Figure 9. HDT ciblant le macrophage dans la tuberculose2	8
Figure 10. Anatomie des voies respiratoires3	0
Figure 11. Initiation de la défense immunitaire dans les alvéoles pulmonaires	2
Figure 12. Organisation multi-cellulaire du granulome tuberculeux3	6
Figure 13. Maturation du phagosome4	2
Figure 14. Tableau périodique des éléments5	8
Figure 15. Mécanisme d'import des complexes Fer-mycobactine ou Fer-carboxy-	
mycobactine à travers la membrane plasmique via le transporteur IrtAB de M. tuberculosis.	
	8
Figure 16. Organisation schématique et mécanisme d'import des métaux par les	
transporteurs ABC (ATP-binding cassette)8	8
Figure 17. Modélisation de l'efflux du cuivre à travers l'enveloppe d' <i>E. coli</i> via le système de	
type « RND » CusABC	0
Figure 18. Topologie schématique d'une ATPase de type P _{1B} 94	4
Figure 19. Organisation schématique des sous-classes d'ATPases de type P _{1B} 9	8
Figure 20. Cycle réactionnel de type Post-Albers des P1 _B -ATPase	0
Figure 21. Structure tridimensionnelle de la P-ATPase à cuivre CopA de	_
Legionella pneumophila	2
Figure 22. Modelisation de l'organisation d'un transporteur de cuivre à travers la membrane	! ~
cytoplasmique	8
Figure 23. Modelisation des interactions entre une P-ATPase à cuivre et un metallochaperon	~
soluble. 11°	J
Figure 24. Construction et validation des mutants $\Delta(RV3269-ctpc)::zeo^{(1)}$ (gauche) et	~
$\Delta Rv3269::dif4 (droite)12$	b
Figure 25. La P-ATPase CtpC et la proteine RV3269 sont toutes les deux necessaires pour	~
conferer la resistance au zinc chez <i>IVI. tuberculosis.</i>	8
Figure 26. Le genome de IVI. smegmatis code des proteines similaires à CtpC et RV3269 12	9
Figure 27. Developpement à un modele chez <i>IVI. smegmatis</i> pour étudier le rôle de RV3269	~
El CIPE DATIS la resistance au zina chaz Ma amagmatic	บ ว
Figure 20. RV5269 et CIPC conferent la resistance au ZINC CREZ IVI. Smegmatis	L C
Figure 29. Prediction de l'organisation topologique de la proteine RV3269	0
Figure 30. Analyse biochimique de la partie soluble de KV3269 (***KV3269)	ŏ
Figure 31. Impact de la deletion du motif C-terminal de liaison du zinc de KV3269 sur le	~
pnenotype de resistance au zinc14	U

Figure 32. Les protéines CtpC et Rv3269 co-localisent dans des patchs au niveau des	
membranes	142
Figure 33. Quantification des patchs de Rv3269 _{mT}	146
Figure 34. La délétion des acides aminés 8 à 27 abolit la localisation membranaire de R	v3269
et le phénotype de résistance au zinc	148
Figure 35. Organisation schématique des membranes biologiques	150
Figure 36. Différents états des bicouches lipidiques.	152
Figure 37. L'état des membranes interfère avec la conformation des protéines	
membranaires.	154
Figure 38. Représentation topologique potentielle des flotillines eucaryotes	156
Figure 39. Représentation schématique des domaines protéiques des deux flotillines Fl	oA et
FloT de Bacillus subtilis	160
Figure 40. Implication des flotillines dans différents processus cellulaires chez B. subtili.	s160
Figure 41. La flotilline de Mtb Rv1488 ne co-localise pas avec Rv3269 et CtpC	166
Figure 42. Le mutant Rv1488-KO n'est pas sensible au zinc	168
Figure 43. Le domaine N-terminal de liaison du métal est nécessaire à CtpC pour confé	rer la
résistance au zinc	176
Figure 44. La mutation des trois motifs AE de Rv3269 déstabilise CtpC et la résistance fa	ace au
zinc chez M. smegmatis.	178
Figure 45. Rv0968 et Rv1993c co-localisent avec Rv3269.	180
Figure 46. Distribution des protéines de type DUF1490 chez les bactéries et les archées	184

Tableau 1.Thérapie antituberculeuse actuelle	
Tableau 2. Nouveaux médicaments antituberculeux en développement clinique	
Tableau 3. Liste des plasmides	188
Tableau 4. Souches et mutants	188
Tableau 5. Oligonucléotides utilisés pour les RT-qPCR	190

TABLE DES MATIERES

INT	RODUC	CTION	I	1
Part	ie 1 : P⊦	IYSIOL	OGIE DE LA TUBERCULOSE	1
1.	La tu	berculo	DSe	1
	1.1.	Le bac	ille de Koch, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
	1.2.	Epidén	niologie	5
	1.3.	Diagno	ostic	11
	1.4.	Préver	ition	15
	1.4.1.	BCG		
	1.4.2.	Nou	veaux vaccins	17
	1.5.	Traiter	nent	21
	1.5.1.	Anti	biothérapie actuelle	21
	1.5.2.	Anti	biothérapie et multirésistance aux antibiotiques	25
	1.5.3.	Nou	velles stratégies thérapeutiques antituberculeuses	27
2.	Cycle	e infect	ieux et interactions de Mtb avec son hôte	31
	2.1.	Recon	naissance et phagocyte / immunité innée	31
	2.2.	Répon	se immunitaire adaptative : formation du granulome	35
	2.3.	Dorma	nce / réactivation	37
3.	Inter	actions	de Mtb avec les macrophages	41
	3.1.	Matura	ation du phagosome et inhibition de la fusion phagosome/lysosome	43
	3.2.	Mécan	ismes bactéricides du macrophage et résistance de Mtb	45
	3.2.1.	Rési	stance à l'acidité du phagosome	45
	3.2.2.	Rési	stance aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	49
	3.2.3.	Echa	appement du compartiment phagosomal	51
	3.2.4.	Indu	iction et contrôle de la mort cellulaire	51
	3.2.5.		unite et virulence nutritionnelles	
	3.2	2.5.1.	Immunité nutritionnelle : intoxication par le zinc ou le cuivre	55
Part	ie 2 : IVI	EIALLO	DBIOLOGIE ET INFECTIONS BACTERIENNES	59
1.	Méta	al et mo	onde vivant	59
2.	Les n	nétaux	de transition	63
	2.1.	« Méta	allomique » : un terme nouveau	65
	2.2.	Homéo	ostasie métallique: limitation/privation et empoisonnement/intoxication	67
	2.2.1.	Тохі	cité des ions cuivre	71
	2.2.2.	Toxi	cité des ions Zinc	
	2.3.	System	nes de régulation bactériens	/3
	2.3.1.	Met	allo-capteurs/senseurs	/3
	2.3.2.	NIEC	anismes de regulation par les metallo-capteurs/senseurs	/5
	2.3.3.	Pánon	nation post-transcriptionnelle : stabilité et traduction des Arivin	
	2.4.	Cant	ses physiologiques aux calences ou exces de metaux	OL Q1
	2.4.1.	Svst	èmes d'import des métaux	81
	2.4.3.	Svst	èmes d'export des métaux	
	2.4	4.3.1.	Svstèmes RND	
	2.4	1.3.2.	Systèmes CDF	
	2.4	1.3.3.	Systèmes ATPases de type P	95
3.	ATPa	ises de	tуре Р	95
	3.1.	Organi	sation topologique des P-ATPases	95
	3.2.	Classifi	ication des P-ATPases	97
	3.3.	Mécan	isme catalytique des P-ATPases	101

3.4.	Domaine de liaison des métaux	
3.5.	Concept de métallochaperons	
3.5.1	L. Métallochaperons et maturation protéique	
3.5.2	2. Métallochaperons et trafic métallique	
3.6.	Interactions métallochaperons/P _{1B} -ATPases	
4. Mtb	et P-ATPases	113
RESULTA	\TS	117
Chapitre 1	: Développement d'un outil génétique pour la construction	on de mutants stables

et non marqués chez les mycobactéries 11	۲7
Chapitre 2 : Etude du rôle du métallochaperon à zinc putatif Rv3269 associé à la P-ATPase	•
CtpC de Mycobacterium tuberculosis	27
1. CtpC et Rv3269 sont toutes les deux nécessaires pour assurer la résistance au zinc chez	
Mycobacterium tuberculosis	27

- 4.3. La délétion du domaine de fixation du zinc abolit partiellement la fonction de Rv3269. 141 Chapitre 3 : Les protéines Rv3269 et CtpC co-localisent au sein de patchs dynamiques à la

Chapitre 4 : Des microdomaines membranaires fonctionnels liés à l'efflux des métaux ? 1511.Membranes, microdomaines fonctionnels et protéines d'échafaudage1511.1.Organisation et hétérogénéité membranaire1511.2.Notion de radeaux lipidiques1531.3.Protéines associées aux radeaux lipidiques1551.4.Les flotillines1551.5.Microdomaines membranaires fonctionnels (MMF) chez les bactéries159

Les microdomaines contenant Rv3269 et CtpC sont indépendants de la flotilline Rv1488 167

1.	CtpC, une pompe à efflux du zinc ? 171
2.	Transport du zinc par CtpC ; Rv3269, un métallochaperon à zinc présumé 173
3.	Rv3269, une protéine d'échafaudage organisant des MMF au niveau de la membrane 179
4.	Des microdomaines dédiés à l'homéostasie des métaux organisés par une ou des protéines
écł	nafaudage ?
5.	La notion de MMF dédiés à l'homéostasie des métaux, un concept généralisable ? 185
МАТ	ERIELS ET METHODES185
REF	ERENCES BIBLIOGRAPHIQUES195



Figure 1. Organisation de l'enveloppe des mycobactéries.

L'enveloppe des mycobactéries est organisée en plusieurs couches depuis l'intérieur (cytoplasme) jusqu'à l'extérieur. La membrane plasmique (*inner membrane*) entoure le cytoplasme. Plusieurs couches de peptidoglycane (PG) assurent la rigidité et la résistance mécanique de l'enveloppe. Des chaines d'arabinogalactane (AG) sont liées de manière covalente au PG d'un côté et à des acides mycoliques vers l'extérieur. Le repliement des longues chaines d'acides gras des acides mycoliques (en vert foncé) forme la mycomembrane (*outer membrane*). Divers glycolipides sont insérés dans la mycomembrane. Une capsule formée principalement de polysaccharides et de protéines entoure la mycomembrane.

Les sucres sont représentés par des symboles de couleur : bleu = arabinose ; rouge = galactose ; marron = mannose ; noir = glucose.

Des carrés jaunes représentent des molécules de tréhalose. LM : lipomannane. ManLAM : lipoarabinomannane « cappé » par des mannoses.

(d'après Jackson, 2014)

INTRODUCTION

D'origines virales, bactériennes ou parasitaires, les maladies infectieuses ont accompagné l'évolution des sociétés humaines pour lesquelles elles ont de tous temps représenté une cause majeure de mortalité. De nombreuses maladies infectieuses ont reculé ou ont même été éradiquées grâce aux progrès de l'hygiène et de la médecine. Cependant, bien que son incidence sur les populations humaines ait fortement reculé au cours du XX^{ème} siècle, la tuberculose reste en 2020 un problème de santé mondiale, et l'OMS a fixé l'objectif d'éradiquer cette maladie d'ici 2030 (WHO, 2019).

Partie 1 : PHYSIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE

1. La tuberculose

1.1. Le bacille de Koch, *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculose est une maladie infectieuse de l'homme et d'autres mammifères causée par des bactéries du complexe Mycobacterium tuberculosis (MTBC). Ces bacilles regroupent principalement Mycobacterium tuberculosis (Mtb) stricto sensu, l'agent étiologique de la tuberculose chez l'homme, ainsi que d'autres espèces pathogènes comme M. africanum, M. bovis ou M. canettii. Ils appartiennent à la famille des Mycobacteriaceae et au genre Mycobacterium composé principalement d'espèces environnementales non pathogènes et de quelques espèces ou groupes d'espèces pathogènes ou opportunistes, en plus du groupe MTBC, dont par exemple l'agent responsable de la lèpre (M. leprae). Des études phylogénétiques indiquent que les bactéries du MTBC possèdent un ancêtre commun, M. prototuberculosis, dont l'apparition est estimée à plus de 40 000 ans en Afrique (Wirth et al., 2008). Cette famille de bactéries est caractérisée par la structure et l'organisation particulière de son enveloppe (distincte des autres bactéries) composée de sucres et lipides complexes. En effet, chez Mtb, les lipides de l'enveloppe cellulaire sont très abondants et constituent 40 % de la masse sèche des cellules (Jackson, 2014). L'enveloppe des cellules mycobactériennes comprend (i) la membrane plasmique superposée par (ii) le complexe peptidoglycane-arabinogalactane et la mycomembrane et, en surface, (iii) la capsule (Figure 1).

La membrane plasmique est composée de lipides classiques mais aussi d'éléments lipidiques ancrés et exclusivement retrouvés chez les actinomycètes (dont font partis les mycobactéries) comme le phosphatidylinositol mannoside (PIM) et ses dérivés, le lipomannane (LM), lipoarabinomannane (LAM) et ManLAM (*mannose-capped lipoarabinomannan*) (Dulberger et al., 2020; Zhou et al., 2019).

Au-dessus se forme un complexe de peptidoglycane (PG) et de polysaccharides, l'arabinogalactane (AG), liés l'un à l'autre par liaison covalente. L'AG est aussi lié par une liaison ester à la partie inférieure des acides mycoliques, des acides gras à longues chaines carbonées (de 60 jusqu'à 90 atomes de carbone). Ces derniers s'agencent avec d'autres lipides essentiels et exposés vers la surface (dits « extractibles ») comme les monomycolates de tréhalose (TMM), les dimycolates de tréhalose (TDM) ou encore les dimycocérosates de phthiocérol (PDIM), pour former une membrane externe, plus communément appelée « mycomembrane ». Paradoxalement, bien que les mycobactéries soient considérées comme des bactéries à Gram positif, la mycomembrane et la membrane cytoplasmique délimitent un espace périplasmique où la mycomembrane contribue fortement au caractère imperméable des mycobactéries et à leur résistance caractéristique à de nombreux agents thérapeutiques (Jarlier & Nikaido, 1990).

Enfin, à la surface, une structure capsulaire est associée au côté externe de la paroi cellulaire. Elle est formée principalement de polysaccharides, de protéines et d'une faible proportion de lipides (1 à 6 %) (Lemassu & Daffe, 1994; Ortalo-Magne et al., 1995). Certains composés comme le ManLAM ainsi que d'autres polysaccharides libres sécrétés (non-ancrés à la mycomembrane) contenant du mannose se retrouvent dans la capsule (Lemassu & Daffe, 1994; Turner & Torrelles, 2018), jouant des rôles primordiaux dans l'établissement de l'infection et l'interaction entre hôte et pathogène.

1.2. Epidémiologie

Mtb est un pathogène humain obligatoire, sans autre réservoir connu dans l'environnement. Historiquement, la tuberculose est considérée comme l'une des maladies les plus anciennes affectant l'homme. Des observations physiopathologiques de tuberculose pulmonaire (zones fibrotiques, traces de sang dans la trachée) et extra-pulmonaires (le « mal de Pott », une atteinte des vertèbres par Mtb) ainsi que des analyses moléculaires par PCR ont indiqué la présence de Mtb sur des momies (3300 av. J.-C.) et des squelettes égyptiens (5400 av. J.-C.) (Crubézy et al., 1998; Zimmerman, 1979). Mais ce sont sur des ossements humains âgés d'approximativement 9000 ans provenant d'une civilisation néolithique submergée (Atlit Yam) au large des côtes israéliennes, que les plus anciennes traces d'ADN et de biomarqueurs lipidiques de l'acide mycolique, spécifique du complexe MTBC, ont été détectées (Hershkovitz et al., 2008, 2015).

Antérieurement nommée phtisie, scrofule, consomption ou encore peste blanche, c'est dans les années 1820-1830 que la maladie a pris le nom de « tuberculose », proposé par l'allemand Johann Schönlein. Elle a longtemps été perçue comme une maladie héréditaire mais Jean-Antoine Villemin a démenti cette supposition en 1865, prouvant que la tuberculose est une maladie infectieuse et transmissible de l'homme. C'est en 1882 que Robert Koch identifie l'agent pathogène responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, aussi appelé « bacille de Koch ». Cette découverte lui a valu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1905 (Barberis et al., 2017; Jay et al., 2018).



В

Α



Figure 2. La tuberculose est une des principales causes de décès dans le monde.

(A) Estimation du nombre global de décès causés par des maladies infectieuses depuis ~200 ans (d'après Paulson, 2013).

(B) Les principales causes de décès dans le monde en 2017. Les décès dus à la tuberculose chez les personnes séropositives pour le VIH sont indiqués en gris. (WHO, 2019)

La tuberculose a tué plus qu'aucune autre maladie infectieuse. Plus d'un milliard de personnes en seraient décédées ces 200 dernières années (Figure 2A) (Paulson, 2013). De nos jours, elle est la première cause de décès due à un agent infectieux unique, devançant le paludisme et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), et elle est la seule maladie infectieuse classée dans les dix premières causes de décès dans le monde (Figure 2B). Au niveau mondial en 2018, on dénombre au total près d'1,5 millions de morts dues à la tuberculose (1,2 millions chez les personnes VIH-négatives et 250000 parmi celles VIH-positives) et environ 7 millions de nouveaux cas de tuberculose (WHO, 2019).

La tuberculose est une maladie principalement pulmonaire, très contagieuse du fait qu'une seule bactérie peut engendrer la maladie et de son mode de transmission par aérosols, démontré par Richard Riley dans les années 1950. Cette voie de contamination a permis la propagation de cette maladie au niveau mondial avec notamment le flux migratoire des populations durant les ères passées. A l'époque actuelle, les multitudes d'échanges internationaux et la mondialisation des épidémies sont toujours omniprésents comme le montre la pandémie de COVID-19, provoquée par le coronavirus SARS-CoV-2 et propagée à l'échelle planétaire en l'espace de quelques mois en 2020. Malgré la diminution de la prévalence de la tuberculose, l'OMS estime qu'un quart de la population mondiale est infectée par Mtb de manière asymptomatique, et exposée au risque de développer la tuberculose (WHO, 2019).



Figure 3. Incidence mondiale de la tuberculose. (d'après WHO, 2019)

La tuberculose a une forte prévalence en Asie du Sud-Est (44 %), en Afrique (24 %) et dans le pacifique Occidental (18 %) (Figure 3). Ces régions reflètent une susceptibilité à la tuberculose liée aux conditions de vie de ces populations. En effet, la tuberculose est considérée comme une maladie de la pauvreté et plusieurs facteurs contribuent à sa prévalence, dont le manque d'hygiène, l'insalubrité, la mal- ou sous-nutrition, la surpopulation. Huit pays engloberaient près de deux tiers des cas de tuberculose totaux : l'Inde (27 %), la Chine (9 %), l'Indonésie (8 %), les Philippines (6 %), le Pakistan (6 %), le Nigéria (4 %), le Bangladesh (4 %) et l'Afrique du Sud (3 %) (WHO, 2019). Dans les zones à haute prévalence du VIH, la co-infection VIH/Mtb augmenterait redoutablement (facteur 20) la (ré-)activation de la tuberculose chez les individus immuno-déficients (Pawlowski et al., 2012). D'autres facteurs de susceptibilité à la tuberculose comme la consommation d'alcool, le tabagisme, le diabète (Ayelign et al., 2019) sont propices au développement de la maladie, notamment dans les pays plus développés. Enfin, l'infection par Mtb est variable selon les individus, par exemple en fonction du sexe et de l'âge, puisque les hommes (57 %) sont presque deux fois plus nombreux que les femmes (32 %) à développer la tuberculose, suivi par les enfants (âgés de moins de 15 ans) représentant 11 % des malades (WHO, 2019).



Figure 4. Différents stades de la tuberculose et diagnostics associés.

(d'après Pai et al., 2016)

1.3. Diagnostic

La contamination inter-humaine s'effectue par voie aéroportée et démarre avec la production de gouttelettes microscopiques par un individu malade sujet à des toux et éternuements (Churchyard et al., 2017). L'aérosol contenant les bacilles tuberculeux peut être inhalé par des individus sains et atteint l'arbre respiratoire (Figure 4). Mtb peut être rapidement stoppé et éliminé de l'organisme avant d'atteindre les tissus pulmonaires et d'infecter les poumons. Cette éradication est due à la clairance mucociliaire, barrière physique formée par le mucus qui tapisse l'épithélium pulmonaire. L'éradication de Mtb est aussi effectuée par l'action efficace du système immunitaire. Chez les individus qui n'éliminent pas le pathogène, il peut persister tout en étant maintenu sous contrôle dans 90 % des cas. Cette situation correspond à une infection appelée tuberculose « latente », un stade asymptomatique et nontransmissible de la maladie. Cependant, l'altération des fonctions immunitaires rend la multiplication des mycobactéries possible et l'infection progresse vers une forme dite « active » et transmissible. Les symptômes de la tuberculose active peuvent aller de modérés (expectorations sanguinolentes, toux persistante, perte de poids, fièvre, sueurs nocturnes, pneumonie) à sévères avec la destruction des tissus pulmonaires menant à la mort du patient dans 50% des cas en absence de traitement.

La compréhension de la physiopathologie de la tuberculose est un élément clé du diagnostic, mais reste toutefois compliquée. Afin d'endiguer la propagation de la maladie et favoriser la survie des individus, de meilleurs outils de diagnostic sont requis. Différents tests sont disponibles et effectués suivant les suspicions de pronostic (Pai et al., 2016).

- L'IDR (intradermoréaction à la tuberculine), ou test de Mantoux, est le test de première ligne pour la détection des tuberculoses latentes et le principal élément de prévention du fait de son faible coût. Ce test tuberculinique est couramment utilisé pour détecter des personnes ayant été en contact avec une espèce mycobactérienne. Néanmoins, il manque de spécificité (réponses faux-positives) à cause du composé commercial utilisé, le PPD (*purified protein derivative*) qui contient des antigènes communs à d'autres espèces, dont la souche utilisée comme vaccin (*Mycobacterium bovis* BCG).

- L'IGRA (« *interferon gamma release assay* ») est un test sanguin *ex vivo* qui traduit la réponse immunitaire des cellules T face à Mtb. Plus spécifique, ce test mesure l'interféron gamma (cytokine inflammatoire) produit par les lymphocytes T en réponse à une stimulation face aux antigènes spécifiques du MTBC appartenant au locus RD1, « *region of differenciation 1* » du génôme de Mtb (ESAT-6, « *early secreted antigenic target 6* » et CFP-10, « *culture filtrate protein 10* ») (Pai et al., 2016).

11

Ces tests sont majoritairement utilisés afin d'identifier les personnes qui présentent des signes d'infection par Mtb et un risque accru de développement d'une tuberculose active. Cependant, ni l'un ni l'autre n'est capable de différencier la tuberculose latente de la tuberculose active.

L'examen de patients susceptibles d'être atteints d'une tuberculose active peut se faire directement sur des échantillons d'expectoras. Bien que la culture microbiologique soit un outil très utile pour l'identification d'espèce bactérienne et utilisée pour la recherche de Mtb, celleci prend énormément de temps du fait du temps de génération très élevé de Mtb (entre 18 et 24h). La recherche directe de Mtb peut être favorisée par sa morphologie reconnaissable et sa propriété de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR). Cette dernière peut être mise en évidence grâce à des colorations spécifiques de Ziehl-Neelsen (fuschine) et de fluorescence (auramine), malheureusement ces techniques révèlent d'autres espèces du genre Mycobacterium et sont donc peu spécifiques. Les technologies d'imagerie médicale sont adaptées au suivi de l'infection : l'examen radiographique des poumons permet d'identifier des structures caractéristiques de la maladie chez les patients infectés (les granulomes), ou encore le PET-SCAN (tomographie par émission de positons), une technique sensible pouvant déterminer la charge bactérienne dans le corps. Cette dernière consiste en l'injection du composé radioactif ¹⁸F-FDG (¹⁸F-fluorodeoxyglucose), marqueur du métabolisme du glucose, visualisé en plus forte concentration dans les zones inflammatoires associées à la tuberculose active (Agarwal et al., 2017; Ankrah et al., 2018). Enfin, des outils moléculaires reposant sur des tests d'amplification génique (NAAT, nucleic acid amplification test) sont devenus des méthodes privilégiées pour la détection de Mtb. Rapides, avec des sensibilités bien supérieures aux précédents, ces tests mettent en évidence la présence de Mtb tout en ciblant des gènes souvent porteurs de mutations chez les souches multi-résistantes aux antibiotiques. Le test GenoType® MTBDRplus rend des informations primordiales sur le statut de la résistance aux antibiotiques du germe, notamment les résistances à la rifampicine (gène cible rpoB) et à l'isoniazide (gènes cibles inhA et katG) avec des sensibilités respectives de 98 et 87 % (Guillet-Caruba et al., 2014; Ling et al., 2008). Ciblé sur rpoB, le test Xpert MTB/RIF® est très rapide (2 heures) et spécifique (98 %) pour des échantillons comportant une charge bactérienne minimale de 100 bactéries (Theron et al., 2013; van Zyl-Smit et al., 2011).

Le diagnostic de la tuberculose repose donc sur une complémentarité des techniques phénotypiques (micro- et macroscopique) et moléculaires existantes. Celui-ci est primordial pour traiter de manière efficace cette maladie et les efforts de développement pour des tests rapides, spécifiques et sensibles devront permettre d'identifier des infections chez des patients pour lesquels l'identification de Mtb est complexe tels que les enfants ou les personnes atteintes du VIH. Toutes les méthodes citées ne sont pas toujours envisageables, notamment à cause du manque de laboratoires et de la complexité du recueil et du traitement des échantillons tuberculeux, dans les pays en développement.

1.4. Prévention

1.4.1. BCG

Originellement, la souche vaccinale utilisée pour la prévention des maladies associées à Mtb est dérivée d'une souche virulente d'une espèce étroitement apparentée, Mycobacterium *bovis*, responsable de la tuberculose bovine. Isolée en 1901, elle fut étudiée par les chercheurs français Albert Calmette et Camille Guérin qui ont cultivé cette souche pendant 13 années. Plus de 200 passages plus tard, leur souche présentait une atténuation de la virulence et une protection contre la tuberculose dans plusieurs modèles animaux. Nommé BCG (pour vaccin Bilié Calmette-Guérin), c'est en 1921 que fût inoculé chez l'homme le premier vaccin préventif contre la tuberculose. Le BCG est un vaccin vivant injecté par voie sous-cutanée. Utilisé depuis 1924, il reste encore, en 2020, le seul vaccin distribué contre cette maladie au niveau mondial. La fin des années 1990 a été marquée par les progrès de séquençage de grande ampleur. Ils ont permis notamment d'identifier une région absente chez M. bovis BCG par rapport au génome de Mtb (Cole et al., 1998; Mahairas et al., 1996). Composée de neuf gènes (Rv3871-Rv3878 et Rv3879c), RD1 code un des systèmes de sécrétion de type VII (ESX-1) et des protéines sécrétées très immunogènes telles que ESAT-6 (Rv3874) et CFP-10 (Rv3875) (Berthet et al., 1998). La perte de cette région appelée RD1 (région de différence 1) a rendu la souche *M. bovis* avirulente.


Figure 5. Nombre annuel de décès causés par des maladies évitables par la vaccination. *Hib : *Haemophilus influenzae* de type b.

(ourworldindata.org/grapher/deaths-caused-by-vaccine-preventable-diseases-overtime?time=latest)



Figure 6. Efficacité de la vaccination par le BCG.

Illustration de la réponse immunitaire induite par le vaccin BCG (courbe verte continue) et l'action proposée (courbe pointillée rouge) de vaccin amélioré (A) et de rappel (B). (d'après Andersen and Doherty, 2005)

La vaccination par le BCG a joué un rôle indéniable dans toute l'Europe, stoppant l'épidémie. Une étude sur 157 pays ayant adopté la stratégie de vaccination systématique des nouveaunés a montré des taux d'efficacité de protection très satisfaisants, atteignant 90 % dans 101 pays (Roy et al., 2014; Trunz et al., 2006). En revanche, la vaccination des personnes adultes et des résidents de régions à forte incidence de tuberculose n'avoisine qu'environ 50 % d'efficacité (Pai et al., 2016; WHO, 2019). Les causes de cette variabilité et de protection entravée peuvent être expliquées par le contact de mycobactéries environnementales (des eaux et des sols) possédant des antigènes communs (Weir et al., 2006; Young et al., 2007), une protection non durable dans le temps après plusieurs années (10-20 ans) (Andersen & Doherty, 2005) ou encore des susceptibilités génétiques de l'hôte variables selon les populations.

Bien qu'il soit massivement utilisé depuis un siècle, les mécanismes de protection engendrée par le BCG restent peu compris. Cette maladie complexe associée à d'autres facteurs (sociaux, génétiques) nécessite des préventions plus efficaces. En effet, malgré les campagnes de vaccination menées à l'échelle mondiale, la tuberculose tue bien plus que ne le font les autres maladies contre lesquelles on dispose d'un vaccin (Figure 5). C'est pourquoi d'autres stratégies de lutte vaccinale doivent être étudiées.

1.4.2. Nouveaux vaccins

Le développement de nouveaux vaccins comporte deux stratégies distinctes : les vaccins préventifs et les vaccins thérapeutiques (Fletcher & Schrager, 2016; B. E. Kwon et al., 2018). Les premiers consistent à prévenir l'infection par les bactéries du MTBC et d'éviter le développement (ou réactivation) de la tuberculose chez les personnes saines ou diagnostiquées avec une tuberculose latente. Ils sont basés sur l'utilisation d'éléments antigéniques impliqués dans la réponse immunitaire lors de l'infection afin de conférer une protection efficace et durable soit par (i) remplacement du vaccin BCG actuel par une souche de Mtb atténuée ou une souche de *M. bovis* BCG recombinante exprimant des antigènes de Mtb (stratégie dite de « *priming* ») soit par (ii) l'addition d'un composé vaccinale capable de renforcer la réponse immunitaire – « *booster* » – après une vaccination antérieure ou une infection tuberculeuse latente (Andersen & Doherty, 2005) (Figure 6).



Figure 7. Classification des vaccins en développement contre la tuberculose.

Les vaccins contre la tuberculose sont divisés en vaccins préventifs et thérapeutiques. Les vaccins de « *priming* » induisent des réponses immunitaires avant l'infection par Mtb et sont destinés à remplacer le vaccin BCG. Les vaccins de rappel, ou « *boosters* », sont appliqués pour renforcer les réponses immunitaires. Les vaccins thérapeutiques sont utilisés pour soigner la tuberculose ou ses symptômes à l'aide de médicaments anti-mycobactériens. (d'après Kwon et al., 2018 et WHO, 2019).

Les vaccins thérapeutiques sont quant à eux utilisés directement dans le traitement de la maladie active afin d'aider à l'élimination des bactéries dormantes ou réplicatives. Ils sont généralement administrés en même temps que l'antibiothérapie dans l'optique de raccourcir la période de traitement (*voir partie* 1 - 1.5).

Quatorze vaccins sont actuellement en cours d'essais cliniques et plusieurs approches sont développées. Ils peuvent être classés en quatre groupes (Gong et al., 2018) (Figure 7).

- Les <u>vaccins vivants atténués</u> sont développés à partir de mycobactéries génétiquement modifiées afin de diminuer leur virulence (le BCG est un vaccin vivant entier qui a été atténué par perte génétique de la RD1). Les vaccins VPM1002 et MTBVAC ont tous les deux pour but de remplacer le BCG, ils sont destinés à une utilisation en amont d'une première exposition à Mtb. VPM1002 est un BCG recombinant inactivé dans une sous-unité de l'uréase et supplémenté par l'expression de la listériolysine O (un des facteurs de virulence principal de *Listeria monocytogenes*) (Grode et al., 2005). Cette protéine induit la formation de pores dans les membranes phagosomales libérant la bactérie dans le cytosol, afin d'améliorer la présentation antigénique du BCG et la stimulation des lymphocytes T. Ce vaccin est depuis 2017 en phase clinique III en Inde (Nieuwenhuizen et al., 2017). Comme son nom l'indique, MTBVAC est un vaccin avec une souche atténuée de Mtb. Ce candidat vaccin vivant possède deux mutations, affectant les gènes *phoP/phoR* et *fadD26*. Il est en phase clinique IIa (Fletcher & Schrager, 2016; Gonzalo-Asensio et al., 2017).

- Les <u>vaccins inactivés</u> sont élaborés à partir de bacilles entiers tués à la chaleur ou chimiquement. Cette action supprime leurs effets infectieux tout en conservant le pouvoir antigénique. Deux d'entre eux sont aussi en phase clinique III : les vaccins MIC/Immuvac (*Mycobacterium indicus pranii*, une mycobactérie environnementale inactivée à la chaleur) et Vaccae[™] (*Mycobacterium vaccae* inactivé à la chaleur) (C. Y. Huang & Hsieh, 2017).

- En plus des vaccins entiers, certains vaccins se basent sur l'utilisation de protéines mycobactériennes recombinantes. Le choix s'est porté sur des protéines pour lesquelles la réponse et le mécanisme immunitaires sont bien décrits et cliniquement prouvés (par exemple, les antigènes sécrétés ESAT-6 et Ag85B) (Andersen, 2001; Stewart et al., 2019). On appelle ces vaccins les <u>vaccins protéiques</u>, qui sont délivrés grâce à un adjuvant (souvent des liposomes) (Mearns et al., 2017; Van Der Meeren et al., 2018) ou les <u>vaccins à vecteurs viraux</u>, pour lesquels les protéines mycobactériennes sont exprimées à partir de vecteurs viraux (non virulents). Ces vaccins sont typiquement associés à une protection antérieure déjà effectuée afin de renforcer l'efficacité du BCG (utilisation en tant que *boosters*).

On recense en études cliniques les vaccins protéiques H56:IC31 (phase IIb), M72/AS01_E (phase IIb) et ID93+GLA-SE (phase IIa), et les vecteurs viraux Ad5 Ag85A (phase I), ChAdOx185A-MVA85A (phase I) et TB/FLU-04L (phase IIa) (B. E. Kwon et al., 2018; WHO, 2019). En particulier, les données récentes de l'utilisation du vaccin candidat M72/AS01_E sur des patients adultes (18-50 ans) présentant une tuberculose latente ont révélé qu'il était significativement protecteur. En effet, l'efficacité de protection du vaccin rapportée est de 50 % contre le développement d'une forme active de la maladie (Tait et al., 2019; Van Der Meeren et al., 2018).

1.5. Traitement

La streptomycine est la première molécule dont l'effet bactéricide contre Mtb fut démontré, par Selman Waksman en 1943 (Prix Nobel 1952) (Woodruff, 2014). Cependant l'utilisation d'un seul médicament a conduit à l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques et, très vite, une approche multi-thérapeutique a été mise en place (Daniel, 2006).

1.5.1. Antibiothérapie actuelle

Depuis les années 1990, le traitement médicamenteux de <u>première ligne</u> utilisé contre la tuberculose est une prise de quatre antibiotiques par voie orale – isoniazide (INH), rifampicine (RIF), pyrazinamide (PZA) et éthambutol (EMB) – pendant une durée de deux mois, puis le maintien de deux de ces composés, l'INH et l'EMB, pendant quatre mois. Chez les patients qui reçoivent ce traitement très long et contraignant avec une prise stricte et journalière d'antibiotiques, le taux d'efficacité de guérison est d'environ 85 % pour une tuberculose sensible aux antibiotiques (WHO, 2019). En accord avec le temps de génération très lent de Mtb, l'effet n'est pas immédiat et l'efficacité du traitement n'est généralement visible qu'au bout de 3 mois de thérapie (Dobbs & Webb, 2017).

Tableau 1.Thérapie antituberculeuse actuelle.

(d'après Pai et al., 2016)

	Classe	Mécanisme d'action	Composé	
Antibiotiques de première ligne				
	Hydrazide de l'acide isonicotinique	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	Isoniazide	
	Rifamycines	Inhibition de la transcription de l'ADN	Rifampicine	
		Inhibition de la synthèse protéique	Pyrazinamide	
		Inhibition de la synthèse d'arabinogalactane	Ethambutol	
Antibiotiques de seconde ligne				
	Groupe A : fluoroquinolor	ies		
	Fluoroquinolones	Inhibition de l'ADN gyrase	LevofloxacineMoxifloxacineGatifloxacine	
	Groupe B : agents de seco	onde ligne injectables		
	Aminoglycosides	Inhibition de la synthèse protéique	 Amikacine Capreomycine Kanamycine Streptomycine 	
	Groupe C : principaux agents de seconde ligne			
	Thioamides	Inhibition de la synthèse de la paroi	EthionamideProthionamide	
	Oxazolidinones	Inhibition de la synthèse protéique	 Cycloserine Terizidone Linezolide Clofazimine 	
	Groupe D : agents complé	mentaires		
		Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	Isoniazide (forte dose)	
	D1	Perturbation de la membrane plasmique	Pyrazinamide	
		Inhibition de la synthèse de la paroi	Ethambutol	
	D2	Inhibition de l'ATP synthase mitochondriale	Bedaquiline	
		Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	Delamanid	
		Inhibition de la synthèse des précurseurs d'ADN	Acide para-amino salicylique	
	D3	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Imipénem + Cilastatine, ou Méropénem + Clavulanate	
		Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	Thiocetazone	

L'exposition prolongée des bacilles tuberculeux aux antibiotiques, le manque de rigueur dans le suivi de traitements longs et contraignants pour les patients, qui ont tendance à interrompre la prise des antibiotiques dès que leurs symptômes s'améliorent, ont favorisé l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques, notamment pour la RIF et l'INH (Kochi et al., 1993). A la différence de nombreuses autres espèces bactériennes, chez le pathogène intracellulaire exclusivement inféodé à l'homme qu'est Mtb, l'acquisition de la résistance aux antibiotiques provient uniquement de mutations chromosomiques, et non de transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance (Eldholm & Balloux, 2016). Afin de traiter les souches résistantes, l'utilisation de composés antituberculeux de <u>seconde intention</u> est nécessaire. Elle regroupe l'association de composés de 4 classes (A-D) : une fluoroquinolone récente, un agent injectable et au moins deux autres molécules de deuxième ligne (Tableau 1). Toutefois, ce traitement est encore plus lourd et dure de 9 jusqu'à plus de 20 mois. Selon l'OMS seulement la moitié des patients traités terminent leur traitement avec succès.





(d'après WHO, 2019)

1.5.2. Antibiothérapie et multirésistance aux antibiotiques

La multi-résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes est devenue une problématique majeure qui limite de façon considérable l'efficacité des traitements disponibles. A l'échelle mondiale, 3,4 % des nouveaux cas de tuberculose et 18 % des cas déjà traités présenteraient une tuberculose multi-résistante (Figure 8).

Les bacilles tuberculeux résistants aux antibiotiques sont classés en 3 catégories :

- Les souches multi-résistantes aux antibiotiques ou « **MDR** » (*multidrug resistant*) sont résistantes aux deux antituberculeux centraux de première ligne, l'INH et la RIF.
- Les souches extrêmement résistantes aux antibiotiques ou « XDR » (extensively drugresistant), résistantes à l'INH, la RIF, et aussi aux fluoroquinolones et à au moins un agent injectable de seconde intention (amikacine, kanamycine, capreomycine). Les premiers cas de XDR ont été recensés en 2006 (Masjedi et al., 2006).
- Les souches totalement résistantes aux antibiotiques ou « TDR » (totally drug-resistant) sont, elles, résistantes à tous les composés de première et seconde lignes actuellement disponibles (Velayati et al., 2009).

De manière inquiétante, le nombre d'infections par des souches résistantes augmente d'année en année : en 2018, plus de 180 000 cas ont été notifiés, soit environ 20 000 de plus qu'en 2017. En parallèle, le taux de succès des thérapies diminue, puisqu'il est de 56% pour les souches MDR et de seulement 39 % pour les XDR et, inversement, le taux de mortalité des patients augmente de 16% pour les MDR à 28 % pour les XDR (WHO, 2019).

De plus, la complexité des régimes thérapeutiques utilisés avec les souches résistantes, les doses d'antibiotiques et les durées de traitement présentent des risques de toxicité médicamenteuse, contribuant à leur échec (Gygli et al., 2017). De nombreux troubles sont recensés aux niveaux hépatique, gastro-intestinal ou encore des réactions allergiques. Cette toxicité est d'autant plus fréquente chez les patients à facteurs de risque tels que l'âge avancé, la malnutrition, les maladies hépatiques et la co-infection avec le VIH (Canetti et al., 2020). De plus, chez ces patients, des interactions entre les médicaments antirétroviraux et antituberculeux sont rencontrées. L'ensemble de ces préoccupations met en avant la nécessité de développer des nouveaux traitements et d'améliorer la prévention de la tuberculose.

Tableau 2. Nouveaux médicaments antituberculeux en développement clinique.(d'après Pai et al., 2016, Tiberi et al., 2017 et WHO, 2019)

Phase I	Phase II	Phase III
BTZ-043	Delpazolide	Bédaquiline
Contézolide (MRX-4/MRX-1)	SQ109	Délamanide
GSK-3036656	Sutézolide	Prétomanide
Macozinone	Lévofloxacine	Clofazimine
OPC-167832	Linézolide	Rifampicine (forte dose)
TBA-7371	Moxifloxacine	Rifapentine
TBI-166	Nitrazoxacide	
TBI-223		
SPR720		

Nouvelles molécules

Molécules reconduites

1.5.3. Nouvelles stratégies thérapeutiques antituberculeuses

Dans le but de diminuer le coût (le traitement d'une tuberculose MDR est estimée à environ £20.000 au Royaume-Uni) (Tiberi et al., 2017) et la durée des traitements et d'éviter les effets secondaires tout en ciblant les souches MDR et XDR, de nouvelles drogues et associations de molécules anti-tuberculeuses sont en cours de développement. Selon l'OMS, 23 molécules sont en cours d'essais cliniques. Parmi elles se comptent 13 nouvelles molécules, 3 déjà existantes et ayant été approuvées au niveau réglementaire et 7 composés déjà existants reconditionnés (Tableau 2).

Par exemple, la bédaquiline, qui inhibe la respiration des mycobactéries en ciblant l'ATP synthase, est active aussi bien sur les bactéries en multiplication active que sur les cellules en état physiologique de dormance. Elle a une action bactéricide et possède la même concentration minimale inhibitrice (CMI) que l'INH et la RIF (Pontali et al., 2016). La bédaquiline fait partie d'études cliniques de phase III dont les stratégies de traitement sont écourtées et destinées au traitement des souches MDR et XDR (Guglielmetti et al., 2017). En revanche, des souches résistantes à ce composé ont déjà été identifiées (Nguyen et al., 2018; Veziris et al., 2017). Une autre molécule, la délamanide, inhibe la synthèse des acides mycoliques et possède un potentiel intéressant pour le traitement des patients porteurs du VIH car elle n'interfère pas avec les traitements antirétroviraux. Elle est également sans danger pour les enfants (Tadolini et al., 2016). D'autres molécules, encore au stade d'étude *in vitro*, donnent des résultats prometteurs. La méfloquine a l'avantage d'être très bien tolérée et une très bonne facilité de pénétration des tissus. En effet, il est aussi envisagé de substituer, notamment pour les traitements longs, des molécules de thérapie actuelle (linézolide) par des drogues mieux tolérées (sutézolide ou AZD5847).

Toutefois, l'utilisation de ces molécules seules n'est pas envisagée. Des essais cliniques se concentrent sur l'amélioration des régimes thérapeutiques actuels avec l'incorporation des nouveaux agents. Par exemple, l'acide clavulanique permet l'inhibition de la carbapénèmase bactérienne BlaC (enzyme générant des résistances en dégradant le carbapénème). Ainsi, son association à un carbapénème (méropénème, ertapénème) rend Mtb sensible au méropénème. Dans des cohortes à grande échelle où les carbapénèmes ont été utilisés pour traiter les patients MDR et XDR, le taux de succès des thérapies varie entre 57,3 et 80,3 % et les taux de conversion des cultures entre 60 à 95 % (Sotgiu et al., 2016). Un autre régime thérapeutique en cours d'essai clinique, nommé « NIX-TB », associe plusieurs molécules (BPaL : Bédaquiline, Prétomanide et Linézolide) administrées par voie orale uniquement (exempt d'injection) pour une durée de traitement des tuberculoses MDR et XDR de 6 mois.

27



Figure 9. HDT ciblant le macrophage dans la tuberculose.

(d'après Kaufmann et al., 2018)

Malgré le faible nombre de patients enrôlés dans cette étude, les derniers chiffres parus en mars 2020 ont montré que 92 % des patients atteints de tuberculose MDR et 89 % des patients atteints de tuberculose XDR ont terminé le traitement avec des résultats favorables (avec toutefois quelques effets toxiques « gérables » selon les cliniciens) (Conradie et al., 2020). Ce traitement a montré autant d'efficacité (90 %) que le traitement prescrit pour les tuberculoses ne présentant pas de résistance aux antibiotiques et ce, pour une même durée.

Les antibiotiques qui agissent sur les bactéries pathogènes ne sont pas les seuls moyens de lutte à être développés. D'autres stratégies, appelée « HDT » (pour host-directed therapy), recherchent une action directement dirigée sur l'hôte afin de renforcer l'immunité et la protection contre le pathogène (AlMatar et al., 2017). Ces stratégies ont pour but d'augmenter les performances des mécanismes immunitaires contre Mtb (par exemple la phagocytose, l'autophagie), de réduire l'inflammation locale afin de mieux contrôler les dommages tissulaires (via l'induction d'une réponse anti-inflammatoire), d'améliorer la réponse de type cellulaire (cellules T) ou de structures caractéristiques (granulomes) lors du développement de la maladie (Kolloli & Subbian, 2017) (Figure 9). Cibler ces protéines hôtes apporte une alternative très intéressante, avec une faible probabilité que la bactérie mute et génère des résistances. Parmi les exemples en cours d'étude, on peut citer l'utilisation de la vitamine D, qui exerce un effet stimulant sur l'autophagie (Paik et al., 2019). Elle déclenche une voie de signalisation permettant la production d'un peptide antimicrobien, la cathélicidine, et améliore l'effet mycobactéricide. En accord avec cette approche, la déficience en vitamine D est un facteur de risque pour les patients tuberculeux (Nielsen et al., 2010). La géfinitibe provoque l'inhibition du récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) et in fine active l'autophagie (Stanley et al., 2014) résultant en une réduction de la croissance intracellulaire de Mtb chez les macrophages et les souris. Les corticostéroïdes, tels que les déxaméthasone et prednisone, réduisent la migration des cellules inflammatoires et la libération de facteurs proinflammatoires, comme le TNF (tumor necrosis factor). Ils contribuent à la diminution de l'inflammation locale. Le déxaméthaxone est en essai clinique avancé (phase III et IV) et est prescrit pour des cas sévères d'inflammation, et notamment pour traiter les tuberculoses méningées ou les patients atteints de péricardite tuberculeuse (Kaufmann et al., 2018; K. Prasad et al., 2016).



Figure 10. Anatomie des voies respiratoires.

2. Cycle infectieux et interactions de Mtb avec son hôte

2.1. Reconnaissance et phagocyte / immunité innée

La porte d'entrée unique de Mtb est le tractus respiratoire. Les corps étrangers inhalés, comme les microgouttelettes contenant Mtb, sont transportés par le flux de l'air inspiré tout le long de l'arbre respiratoire (nez, sinus, pharynx, larynx, trachée, bronches, bronchioles) pour arriver jusqu'aux poumons (Figure 10). Au niveau des voies supérieures (trachée, bronches), les cellules épithéliales ciliées sont recouvertes par du mucus, sécrété par des glandes spécifiques, qui protège l'épithélium et empêche les particules étrangères d'atteindre les parties plus profondes des poumons. Il contient des composés à activité antibactérienne, contribuant à l'immunité innée : des enzymes (tel que le lysozyme), des immunoglobulines, des peptides antimicrobiens (défensines) (Nicod, 2005). L'activité ciliaire des cellules de l'épithélium génère un mouvement du mucus, qui est rejeté dans le tractus intestinal tout en étant constamment renouvelé. Cette élimination est appelée « clairance mucociliaire ». Presque 90 % des corps étrangers et micro-organismes inhalés sont éliminés grâce aux muqueuses et barrières physiques. Seules les plus petites gouttelettes contenant une à quelques cellules de Mtb peuvent atteindre les voies respiratoires basses (Chai et al., 2020). Les bronches se divisent en bronchioles dont les extrémités ressemblent à des grappes de raisin appelées « sacs alvéolaires ». Cette structure est elle-même composée de petits compartiments globulaires creux, les alvéoles pulmonaires caractérisées par un épithelium très fin et entourées d'un réseau capillaire dense permettant les échanges gazeux entre l'air dans les alvéoles et les cellules sanguines transitant dans les capillaires.



Figure 11. Initiation de la défense immunitaire dans les alvéoles pulmonaires.

Une fois dans les alvéoles, Mtb se retrouve dans le liquide de la muqueuse alvéolaire (ALF) qui recouvre et protège les cellules épithéliales alvéolaires de type I et de type II (respectivement ATI et ATII). Les bactéries sont phagocytées par les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques (DC). (d'après Chai et al., 2020)

L'espace alvéolaire est un point d'interaction majeur dans le développement de la tuberculose (Figure 11). L'épithélium alvéolaire, constitué de cellules de type I et II, AT-I et AT-II (*alveolar epithelial cells type I and* II), est recouvert par le fluide alvéolaire (ALF, *alveolar lining fluid*) (Mason, 2006). Situé à l'interface entre l'air et les tissus pulmonaires, l'ALF recouvre et protège les AT. De plus, il contient des composés antimicrobiens (Moliva et al., 2014) et il héberge des cellules phagocytaires professionnelles telles que les macrophages alvéolaires (AMs) qui vont alors phagocyter les cellules de Mtb.

La réponse immunitaire innée nécessite la détection et la reconnaissance des pathogènes. Pour cela, les phagocytes possèdent une large gamme de récepteurs, appelés PRRs (pattern recognition receptors) (Takeuchi & Akira, 2010), capables de fixer des motifs microbiens de différentes natures (protéique, glucidique, lipidique, nucléique) des agents pathogènes (pathogen-associated molecular patterns). Les PRRs inhalés, appelés PAMPs transmembranaires permettent la fixation d'un PAMP donné (du côté extracellulaire) qui active des voies de signalisation pour répondre à la présence du pathogène. Par exemple, les TLRs (toll-like receptors), qui sont capables de lier un panel de ligands mycobactériens (glycolipides, lipoprotéines, carbohydrates) (Jo et al., 2007), jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse immunitaire innée inflammatoire et antimicrobienne. Les TLR2, -4 et -9 activent la voie de signalisation MyD88 (myeloid differenciation primary response protein 88) puis le facteur de transcription NF-kB responsable de l'expression des gènes codant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 1 et 12 (IL-1 et IL-12), du TNF α (tumor *necrosis factor* α) ou les enzymes produisant de l'oxyde nitrique (NO) (Jo, 2008). En effet, des souris déficientes pour le MyD88 sont beaucoup plus sensibles et incapables de contrôler l'infection par Mtb (Drennan et al., 2004; Fremond et al., 2004). D'autres PPRs interviennent également dans le dialogue moléculaire entre les pathogènes et le système immunitaire, comme les lectines de type C (CLRs, C-type lectins receptors) comprenant le récepteur du mannose (MR, mannose receptor), Dectin-1, Mincle ou encore DC-SIGN (Marakalala & Ndlovu, 2017; Tallieux et al., 2003); et des membres de la famille des NLRs (Nod-like receptors). En outre, les cellules phagocytaires sont en mesure d'internaliser Mtb grâce au récepteur du complément CR3 (Ferguson et al., 2004; Schlesinger et al., 1990), les récepteurs « scavengers » (SRs), le MR des macrophages et DC-SIGN exprimées chez les DCs. MR et DC-SIGN fixent des sucres de l'enveloppe de Mtb dont le ManLAM (mannose-capped lipoarabinomannan) et d'autres lipomannanes (Jo, 2008; Kang et al., 2005; Turner & Torrelles, 2018).

Les AM phagocytent les cellules de Mtb et sont considérés comme les premiers effecteurs de l'immunité innée rencontrant Mtb, représentant ainsi le principal réservoir de Mtb (Cohen et al., 2018; Russell et al., 2010). D'autres phagocytes comme les cellules dendritiques (DCs) et les neutrophiles interviennent dans la réponse innée de l'hôte (Liu et al., 2017; Torrelles & Schlesinger, 2017).

Une fois que Mtb est internalisé dans les macrophages, ceux-ci vont migrer hors de l'alvéole pulmonaire et atteindre le tissu interstitiel des poumons et, comme nous le discuterons plus loin, Mtb est capable de survivre et se multiplier dans les macrophages (voir partie 1 - 3). Dans le même temps, les médiateurs inflammatoires tels que les cytokines sécrétées (TNF α , les cytokines chimiotactives ou chimiokines CCL5, CCL9, CXCL10 et CCL2) (Domingo-Gonzalez et al., 2016) attirent au site d'infection les cellules immunitaires monocytaires et les neutrophiles provenant des vaisseaux sanguins. Cette agrégation engage l'étape suivante de l'infection : la formation d'un granulome, structure pathologique caractéristique de la maladie. Parallèlement, la reconnaissance de Mtb ou de corps vésiculaires de neutrophiles ou macrophages infectés effectuée par les DCs induit la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques locaux et marque donc l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.

2.2. Réponse immunitaire adaptative : formation du granulome

Au site infectieux, le contrôle des agents pathogènes par le système immunitaire inné s'accompagne de la mise en place de la deuxième phase de la réponse immunitaire, dite adaptative. Le recrutement des cellules présentatrices d'antigènes mycobactériens (les DCs) aux ganglions lymphatiques permet l'activation des lymphocytes T (LT), notamment les LT CD4 via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Wolf et al., 2008). La coopération entre les deux types cellulaires est déterminante pour l'expansion de LT CD4⁺ et CD8⁺ effecteurs qui, une fois différenciés en cellules effectrices, migrent au site infectieux. Sur place, les LT CD4⁺ activent rapidement une réponse immunitaire adaptative de type Th1 marquée par la production d'IFN γ (de Martino et al., 2019). Cette cytokine stimule les propriétés bactéricides des macrophages infectés (comme par exemple l'enzyme iNOS générant des radicaux azotés) (Kwon, 1997) et des LT CD8 aux propriétés cytotoxiques (action des protéines perforines et granzymes) (Lazarevic & Flynn, 2002; Stenger et al., 1998; Woodworth & Behar, 2006). Le rôle des LT dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative et dans le contrôle de l'infection est essentiel (Chackerian et al., 2002). Ainsi les malades co-infectées VIH/Mtb, présentant un déficit en LT CD4+ (conséquence du VIH) sont nettement plus susceptibles à Mtb (taux de progression de la forme latente à la



Figure 12. Organisation multi-cellulaire du granulome tuberculeux.

Schéma d'un granulome tuberculeux actif avec nécrose centrale. De multiples populations de leucocytes sont présentes : des macrophages infectés (apoptotiques et nécrotiques) et non infectés, des macrophages épithélioïdes, des macrophages spumeux, des cellules géantes, des NK et des lymphocytes T et B. (d'après Ramakrishnan, 2012)

forme active multipliée par 5 à 10) (Kwan & Ernst, 2011). En outre, des études avec des souris déficientes pour les LT CD4+, le CMH-II ou l'IFN γ ont montré que l'infection était moins bien contrôlée (charge bactérienne augmentée) et que la mortalité des souris était accélérée (Mogues et al., 2001; Philips & Ernst, 2012).

La production d'autres cytokines comme le TNF α , qui stimule notamment la production des chimiokines, est importante dans la maturation du granulome. Autour du site infectieux constitué de macrophages infectés, de macrophages différenciés (macrophages épithéloïdes, macrophages spumeux riches en lipides) et de cellules géantes multi-nucléées, l'afflux de neutrophiles, cellules NK et lymphocytes T amplifie la cascade inflammatoire et complète la formation du granulome. En son centre, la réaction inflammatoire mène à la nécrose des macrophages infectés formant le caséum constitué de débris cellulaires riches en lipides (Figure 12). Enfin, le granulome mature est scellé par l'action du TNF α et la lymphotoxine- α qui génère la formation par des fibroblastes d'une pellicule fibreuse faite de collagène et de matrice extracellulaire. Cette coque fibreuse entoure les macrophages et autres cellules infectées. Ainsi, à défaut d'éliminer les bactéries pathogènes, la structure compacte qu'est le granulome permet dans environ 90% des cas de circonscrire l'infection. Le patient est asymptomatique et non contagieux, mais reste porteur de la bactérie, et cet état, appelé tuberculose latente, peut durer plusieurs années. Le système immunitaire maintient localement un équilibre des propriétés pro- et anti-inflammatoires. L'environnement central du granulome est strictement pro-inflammatoire tandis que les cellules hôtes en périphérie forment une surface anti-inflammatoire assurant la protection des tissus pulmonaires environnants (Ndlovu & Marakalala, 2016).

2.3. Dormance / réactivation

L'environnement du granulome est acide, hypoxique et pauvre en nutriments (Via et al., 2008). Ces contraintes diminuent fortement les activités métaboliques de Mtb qui ne se divise plus ou extrêmement lentement, et reste dans un état de dormance (Gengenbacher & Kaufmann, 2012). Mtb peut persister et rester quasi-silencieux dans ces conditions pendant plusieurs années. Dans ces conditions défavorables à la réplication, Mtb induit des gènes adaptés à un environnement hypoxique, permettant sa survie dans le granulome, comme par exemple des gènes permettant à la bactérie d'effectuer une respiration alternative dont l'accepteur final d'électrons est le nitrate (NO₃) au lieu de l'oxygène (Levillain et al., 2017). L'entrée de Mtb en état de dormance est contrôlée par un régulateur transcriptionnel majeur, nommé DosR (Rv3133c) (dormancy survival regulator), membre du système à deux composants DosR-DosS. Son analyse transcriptomique a montré qu'il contrôle plus de 50 gènes formant ensemble le régulon DosR. Des stimuli externes comme la diminution en oxygène ou des molécules agressives produites par l'hôte, telles que l'oxyde nitrique et le monoxyde de carbone sont percus par des protéines kinases senseurs (DosS ou DosT) qui phosphorylent la protéine régulatrice DosR (Boon & Dick, 2012; Voskuil et al., 2003). La délétion de dosR $(\Delta dos R)$ empêche cette induction et diminue la viabilité de Mtb en condition de stress. Ces expériences in vitro ont démontré le rôle essentiel du régulon DosR dans le passage d'un fonctionnement aérobie à un fonctionnement hypoxique lors de l'adaptation et la survie de Mtb à l'état de dormance. In vivo, l'implication de DosR a longtemps été controversée. De fortes variations phénotypiques ont été observées entre les modèles animaux utilisés : souris, lapins, ou cochons d'Inde (Converse et al., 2009). Celles-ci peuvent être en partie expliquées par l'établissement de lésions et de pathologies bien distinctes entre l'homme et ces modèles animaux. En particulier, les lignées de souris utilisées comme modèles ne forment pas toujours des granulomes bien organisés et hypoxiques. Ces études témoignent de la complexité des interactions hôte/pathogène et de l'importance du choix du modèle animal utilisé pour chaque étude.

Si les étapes précoces de l'infection sont à ce jour relativement bien comprises, il n'en est pas de même pour les interactions entre le système immunitaire et le pathogène lors de l'infection chronique. De manière générale, dans 5 à 10 % des cas d'infection, l'intégrité du granulome n'est pas maintenue et sa structure est rompue. Ceci peut provenir de déficits immunitaires, comme par exemple le défaut des LT CD4⁺ chez les personnes atteintes du VIH, d'un âge avancé, ou bien atteintes de problèmes rénaux ou de diabète. La perméabilité du granulome est alors diminuée et son contenu est libéré. L'oxygène est de nouveau accessible, permettant la réactivation des bacilles tuberculeux. Des bactéries libres disséminent et peuvent atteindre l'arbre respiratoire. L'inflammation associée génère la nécrose des tissus pulmonaires, et le malade développe une pathologie active, symptomatique et contagieuse où les bactéries sont propagées par la toux.

En plus des changements de leur métabolisme, les bactéries dormantes possèdent une paroi cellulaire apparaissant plus dense, leur conférant une résistance accrue aux molécules bactéricides. Lorsque l'oxygène est de nouveau accessible, des protéines Rpf (*resuscitation-promotin factors*) sont impliquées dans la sortie de dormance de Mtb (Rosser et al., 2017). Cinq gènes *rpf* (A à E) codent des enzymes d'hydrolyse d'éléments de la paroi cellulaire, étape essentielle pour le rétablissement des activités métaboliques et réplicatives lors de la réactivation (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Hett et al., 2010). L'action de ces protéines Rpf semble cumulative. En effet, le taux de réplication diminue en fonction du nombre de délétions de gènes *rpf* : \Box ; le double mutant $\Delta rfpAB$ montre une morphologie différente et une déficience dans la réactivation (Russell-Goldman et al., 2008), les triples mutants $\Delta rpfABC$ ou $\Delta rpfACD$ s'accompagnent d'un arrêt quasi total de réplication et de la réactivation, et ce, même en cas de suppression immunitaire de l'hôte (Biketov et al., 2007).

Les protéases Clp, qui dégradent les protéines intracellulaires mal repliées, sont elles aussi importantes lors de la réactivation. Les deux Clp de Mtb (Clp1 et Clp2) sont codées par deux gènes, membres du même opéron, et régulés par le régulateur Rv2745c, ClgR (*Clp protease gene regulator*). McGillivray et coll. ont montré que l'absence d'expression des protéases Clp1 et 2 conduit à la mort des bactéries dans des conditions de ré-aération (McGillivray et al., 2015; Peddireddy et al., 2017).

La formation du granulome est une stratégie déployée par l'hôte pour piéger le pathogène et contrôler l'infection. Toutefois, pour la bactérie, les macrophages infectés au sein desquels elle se maintient en se répliquant très lentement, représentent une niche écologique majeure, ce qui en fait le principal réservoir de Mtb (Cohen et al., 2018; Russell et al., 2010).

3. Interactions de Mtb avec les macrophages

Parallèlement à la mise en place du granulome et des différents types cellulaires qui le composent, les macrophages sont en interaction directe avec Mtb. Ces phagocytes professionnels, spécialisés dans l'élimination des corps étrangers, possèdent tout un arsenal de mécanismes moléculaires bactéricides mis en œuvre suite à la phagocytose. La particularité des bactéries pathogènes intracellulaires comme Mtb est leur capacité d'adaptation face aux agressions de l'hôte. Evoluant dans cette niche particulière, Mtb s'est adapté à sa cellule hôte, le macrophage humain, afin d'échapper aux mécanismes bactéricides.

41



Extracellulaire | Intracellulaire

Figure 13. Maturation du phagosome.

Après sa reconnaissance par les récepteurs membranaires du macrophage, la bactérie est phagocytée et internalisée dans un phagosome. La maturation phagosomale se fait en plusieurs étapes. Le phagosome fusionne avec l'endosome précoce et forme le phagosome précoce, marqué par la présence des protéines Rab5, EEA1 et hVps34. Le phagosome précoce devient légèrement acide (pH 6,1–6,5) par l'action de la V-ATPase qui s'accumule sur sa membrane. Après fusion avec l'endosome tardif, le phagosome tardif est marqué par la présence de Rab7 et LAMP2. Le lumen du phagosome tardif devient plus acide (pH 5,5–6,0), en raison de l'action d'un plus grand nombre de molécules de V-ATPase sur la membrane. Enfin, le phagosome tardif fusionne avec le lysosome. Le phagolysosome ainsi formé possède un pH intra-vésiculaire acide (pH 4,5–5,5) et contient de nombreuses enzymes lytiques, dont diverses cathepsines, protéases, lysozymes et lipases. Un autre composant microbicide du phagosome est la NADPH oxydase qui génère des espèces réactives de l'oxygène. (d'après Uribe-Quero and Rosales, 2017)

3.1. Maturation du phagosome et inhibition de la fusion phagosome/lysosome

Après l'internalisation, les agents pathogènes sont piégés dans une vacuole appelée « phagosome ». Cet espace subit des événements de fusion séquentielle avec des endosomes (précoces puis tardifs) et des lysosomes pour acquérir des propriétés microbicides et exposer les pathogènes à un environnement toxique. Ce processus de maturation est gouverné par de petites protéines, les GTPases Rab. Ancrées aux membranes, elles participent au recrutement d'effecteurs et favorisent la fusion avec les vésicules endosomales et lysosomales. D'un point de vue expérimental, elles servent de marqueurs de développement phagosomal : par exemple, Rab5 est recruté lors de la formation du phagosome précoce ; le phagosome tardif est quant à lui défini par l'acquisition de la GTPase Rab7 (Gutierrez, 2013; Via et al., 1997; Vieira et al., 2003). La maturation phagosomale se conclut par la formation du phagolysosome (fusion phagosome-lysosome) caractérisé par une chute importante du pH. Celle-ci est causée par l'accumulation d'une pompe à protons, appelée V-ATPase (ATPase vacuolaire), sur les membranes vésiculaires. La valeur du pH passe ainsi de 7 (milieu extracellulaire) à environ 4,5 (phagolysosome mature). L'acidité phagosomale limite directement la croissance microbienne et stimule l'action de dizaines d'hydrolases (protéases, lipases, nucléases, glycosidases, phosphatases), une classe d'enzymes catalysant la dégradation de divers composés biologiques (Flannagan et al., 2012) (Figure 13).

Une des principales particularités de Mtb est sa capacité à inhiber la maturation des phagosomes en empêchant la fusion avec les lysosomes (Goren et al., 1976). Les propriétés du phagosome mycobactérien correspondent à celles d'un phagosome immature dont la formation reste bloquée à l'étape précoce. Ce phagosome immature présente la protéine Rab5 à sa périphérie, une acidification incomplète (pH entre 6,3 et 6,5) et en conséquence l'absence d'hydrolases lysosomales (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Plusieurs éléments montrent que cet arrêt s'effectue avant la fusion entre le phagosome et l'endosome tardif (Via et al., 1997). Le recrutement des protéines effectrices hVps34 (*host vacuolar protein-sorting 34*), une phosphoinositide 3-kinase (PI3K), et EEA1 (*early endosome antigen 1*), qui interagissent avec Rab5 et sont habituellement nécessaires à la poursuite de la maturation phagosomale (Lawe et al., 2002), est perturbé ou ne se fait pas (Fratti et al., 2001). La kinase hVPS34 génère du phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), un lipide régulateur impliqué dans le trafic membranaire et notamment utilisé par EEA1 pour l'acquisition des constituants endosomaux tardifs.

Une des stratégies principales de Mtb est de retirer, de manière directe (SapM) ou indirecte (ManLAM), les PI3P des membranes. La phosphatase lipidique SapM, un facteur de virulence sécrété par Mtb (Zulauf et al., 2018), déphosphoryle le PI3P et interfère avec le recrutement et l'attachement d'EEA1. Le mutant $\Delta sapM$ de Mtb entraine une infection très atténuée et une capacité réduite à se développer dans des macrophages THP-1 et *in vivo* dans les tissus de cochons d'Inde (poumons, foie, rate) (Puri et al., 2013). Le composé de surface ManLAM de Mtb semble avoir des effets pléïotropes. Il provoque d'une part la diminution du flux calcique intracellulaire (Ca²⁺), indispensable pour l'activité d'une enzyme permettant le recrutement de hVPS34 (Vergne et al., 2003, 2005). D'autre part, la fixation du ManLAM sur les récepteurs à mannose (MR) des macrophages humains inhiberait la fusion membranaire phagosome-lysosome (Kang et al., 2005).

L'étude de Welin et coll. a montré que des LAM étaient insérés au niveau de plateformes membranaires spécialisées dans les voies de signalisation (*lipid rafts*) (Welin et al., 2008) créant des désorganisations membranaires et l'inhibition de la maturation phagosomale (Vergne et al., 2014; Zhou et al., 2019). La sérine/thréonine kinase G (PknG) de Mtb a un rôle essentiel dans l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome (P-L). PknG est une protéine sécrétée dans le phagosome qui confère un avantage de survie aux mycobactéries. En utilisant une protéine marqueur du lysosome, LAMP (lysosomal-associated membrane protein), Walburger et coll. ont montré que l'inactivation de PknG localise Mtb et *M. bovis* BCG dans des phagosomes LAMP-positif (autrement dit, des phagolysosomes), par rapport aux souches contrôles sauvages (phagosomes LAMP-négatif). En outre, la production de PknG par une souche recombinante de la mycobactérie non-pathogène *M. smegmatis* améliore considérablement sa survie à l'intérieur des macrophages (Walburger et al., 2004). Le mécanisme d'action par lequel PknG empêche la fusion P-L est dépendant d'une protéine Rab7 et semblerait inhiber la conversion Rab7L1-GDP/GTP (Pradhan et al., 2018).

3.2. Mécanismes bactéricides du macrophage et résistance de Mtb

3.2.1. Résistance à l'acidité du phagosome

L'acidification du phagosome est un mécanisme bactéricide car l'excès de protons peut endommager l'ADN, les protéines, les lipides et perturber les réactions chimiques (Vandal, Nathan, et al., 2009). Dès la fusion avec l'endosome précoce, le compartiment phagosomal voit son acidité augmenter (son pH diminue) (Figure 13). Au fur et à mesure du processus de maturation du phagosome, celui-ci acquiert sur ses membranes des pompes à protons, les V-ATPases (*vacuolar* H^+ -*ATPases*) qui, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, font traverser les protons (H^+) à travers la membrane, acidifiant le phagosome. Le blocage de la fusion P-L a, entre autre, pour conséquence d'inhiber l'accumulation des V-ATPases aux membranes phagosomales. L'absence de ces pompes stabilise le pH du phagosome précoce mycobactérien entre 6,1 et 6,5 (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Néanmoins, Mtb dispose d'autres mécanismes pour contrer l'acidité environnante car, après activation des macrophages (par exemple, suite à l'exposition à l'IFN γ), la fusion P-L s'effectue et le compartiment final s'acidifie pour atteindre un pH de 4,5 à 5 (Uribe-Quero & Rosales, 2017).

Mtb peut résister dans un milieu de culture à pH 4,5 tout en maintenant son pH intracellulaire à 7 (Zhang et al., 1999). Son enveloppe particulière joue un rôle important dans ce maintien. Effectivement, plusieurs études montrent l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de lipides et d'éléments de la paroi (Rohde et al., 2007), et également des mutants de Mtb et *M. smegmatis* sensibles à l'acidité possèdent des mutations dans des gènes impliqués dans les composants de la paroi (Tran et al., 2005; Vandal, Roberts, et al., 2009). Par exemple, des mutants des protéines OmpA (outer-membrane protein A) ou Rv3671c (protéine membranaire) ont toutes deux des phénotypes de croissance réduite en macrophages et dans des souris infectées par Mtb (Raynaud et al., 2002; Vandal, Nathan, et al., 2009). Mtb possède d'autres mécanismes pour lutter face à l'acidification du milieu. Il sécrète par exemple une tyrosine phosphatase, PtpA, capable d'empêcher l'assemblage de la V-ATPase en interagissant directement avec la sous-unité H de ce complexe, entrainant la déphosphorylation d'une protéine de l'hôte impliquée dans le trafic vésiculaire, VPS33B (Bach et al., 2008; D. Wong et al., 2011). Notre équipe a démontré que Mtb est en mesure d'hydrolyser l'asparagine, via l'action de l'asparaginase AnsA, générant de l'ammoniaque (Gouzy et al., 2014). Celui-ci neutralise le pH acide du cytosol bactérien et aussi de l'espace phagosomal après avoir été exporté, via OmpA (Song et al., 2011), dans le milieu phagosomal. Le relargage de composés basiques est un mécanisme d'alcalinisation du milieu aussi utilisé chez d'autres pathogènes (H. pylori, S. typhimurium, Campylobacter jejuni) chez qui des asparaginases ont également été mises en évidence (Hofreuter et al., 2008; Kullas et al., 2012; Shibayama et al., 2011).

Les phagocytes utilisent tout un arsenal de molécules microbicides auquel Mtb doit faire face. L'environnement acide favorise l'activité de nombreux composés et enzymes acidodépendantes.

3.2.2. Résistance aux espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Le phagocyte produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) et de l'azote (RNS, *reactive nitrogen species*). La formation de ROS est médiée par l'enzyme NOX2, une NADPH oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) située à la membrane des phagosomes. Cette enzyme génère, du côté phagosomal, des ions superoxyde O_2^- , qui réagissent au pH acide et forment du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 puis des radicaux hydroxyles OH⁻ (Bedard & Krause, 2007). L'enzyme iNOS (*inducible nitric oxyde synthase*), ou NOS2, produit quant à elle des radicaux de monoxyde d'azote NO et du dioxide d'azote NO₂ (Nathan & Shiloh, 2000). O₂⁻ et NO peuvent aussi réagir ensemble et former un autre composé très toxique, l'ion peroxynitrite HNO₃⁻ (Beckman et al., 1990). Ces molécules hautement réactives interagissent et déstabilisent par oxydation de multiples composants biologiques (acides nucléiques, lipides, protéines) conduisant à leur destruction.

Du côté mycobactérien, Mtb produit des enzymes de détoxification pour résister contre le pouvoir oxydant de ces molécules. Par exemple, l'action synergique d'oxydoréductases permet de reverser la formation des ions O_2^- . Les deux superoxides dismutases SodA et SodC catalysent la conversion des ions O_2^- en H_2O_2 puis, la catalase/peroxydase KatG décompose l' H_2O_2 en oxygène et molécules d'eau. Les délétions de *katG* et *sodC* provoquent respectivement une hypersensibilité au peroxyde d'hydrogène et à l'ion superoxyde (Ng et al., 2004; Piddington et al., 2001). D'autres enzymes interviennent dans la détoxification à la fois des ROS et RNS telles que AhpC (*alkylhydroperoxide reductase subunit C*), AhpD (*thioredoxin-related oxidoreductase*), DlaT (*dihydrolipoamide acyltransferase*) et Lpd (*lipoamide dehydrogenase*) (Ehrt & Schnappinger, 2009).

La plupart des bactéries et cellules eucaryotes synthétisent des peptides organiques, appelés thiols, spécialisés dans le maintien de l'état redox. Mtb produit des mycothiols (MSH), des antioxydants pouvant maintenir le cytoplasme à un état réduit (Newton et al., 2008). Aussi, l'inactivation de l'enzyme réductase CysH chez Mtb, importante pour l'assimilation du soufre et la production de mycothiols, atténue la virulence par rapport à celle d'une souche sauvage (Senaratne et al., 2006).

3.2.3. Echappement du compartiment phagosomal

Il a été admis, pendant de nombreuses années, que Mtb résidait exclusivement dans l'espace phagosomal à l'intérieur des macrophages. Néanmoins ce dogme a été controversé. Il est maintenant clair que les mycobactéries pathogènes comme M. marinum, M. leprae et Mtb peuvent accéder au cytosol des phagocytes (Stamm et al., 2003; van der Wel et al., 2007). Ce mécanisme est donc une échappatoire face aux différents stress rencontrés dans le phagosome. Le mécanisme par lequel Mtb parvient à rejoindre le cytosol fait intervenir le système de sécrétion de type VII (T7SS), ESX-1 (ESAT-6 secretion system-1) (K.-W. Wong, 2017). In vitro, ESX-1 n'est pas essentiel à la croissance de Mtb, en revanche, il l'est in vivo (Hsu et al., 2003). En effet, l'étude de van der Wel et coll. a montré que Mtb et M. leprae sont capables de rejoindre le cytosol des macrophages après deux jours d'infection alors que la souche vaccinale *M. bovis* BCG avant perdu RD-1 reste internalisée (van der Wel et al., 2007). ESX-1 permet la sécrétion de protéines très immunogènes telles que CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein) co-sécrétée avec ESAT-6 (6 kDa early secreted antigenic target) (J. Smith et al., 2008). Cette dernière a une activité lytique sur les membranes biologiques et serait, en partie, responsable de la rupture de la membrane phagosomale. Des travaux plus récents ont mis en évidence que l'accès au cytosol est dépendant de composés lipidiques de l'enveloppe mycobactérienne, comme le PDIM (phthiocerol dimycocerosates), un rôle en synergie avec ESX-1 (Augenstreich et al., 2017; Quigley et al., 2017).

3.2.4. Induction et contrôle de la mort cellulaire

Les macrophages infectés peuvent entrer dans un processus de mort cellulaire, de type apoptose ou nécrose (Bussi & Gutierrez, 2019; Queval et al., 2017).

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme qui restreint la dissémination du pathogène et contribue à sa destruction. La mort de la cellule est un phénomène contrôlé dans lequel le cytoplasme et autres composants cellulaires ne quittent pas la cellule mourante. Celle-ci reste immunologiquement silencieuse (non-inflammatoire). L'apoptose est dépendante des protéines caspases et induit une mort par fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Ceux-ci, contenant le pathogène, sont ensuite éliminés par d'autres cellules phagocytaires. Ce processus d'élimination de fragments de cellules apoptotiques a été nommé « efferocytose » (Vandivier et al., 2006). Plusieurs composants de Mtb sont capables d'induire ou d'inhiber l'apoptose par Mtb est essentielle pour survivre et se multiplier dans les macrophages (Mohareer et al., 2018). En effet, les processus apoptotiques activent les

51
réponses immunitaires innées et adaptatives, qui seraient défavorables pour Mtb. La serine/théronine kinase PknE altère la réponse immunitaire en inhibant la voie de signalisation intrinsèque de l'apoptose, facilitant ainsi la survie de Mtb (Kumar et al., 2011; Molle et al., 2003). L'opéron *Rv3361c-Rv3365c* de Mtb est surexprimé en condition d'infection. Rv3364c a une action suppressive de l'apoptose *via* l'inhibition de la voie d'activation de la caspase-1 (Danelishvili et al., 2012).

L'inhibition de l'apoptose favorise l'induction de la nécrose des macrophages infectés par Mtb. La nécrose engendre des dommages irréversibles de la membrane plasmique détruisant l'intégralité de la cellule. Cette mort cellulaire incontrôlée est indépendante des caspases. La nécrose est un mécanisme déclenché par Mtb pour échapper au système immunitaire et pour se disséminer. L'activation de la mort cellulaire est en partie régulée par des composés lipidiques appelés écosanoïdes tels que la prostaglandine E2 (PGE2) et la lipoxine A₄ (LXA₄). La première a des propriétés pro-apoptotiques et la deuxième pro-nécrotiques, respectivement (Behar et al., 2011; M. Chen et al., 2008). La balance entre ces lipides est altérée lors d'infection de macrophages par Mtb. En effet, Mtb H37Rv induit la production de LXA₄ ayant pour conséquence l'inhibition de COX-2 (enzyme générant PEG2). Ce phénomène serait dépendant de la sécrétion de phospholipases C par Mtb. Egalement, Rv3903c ou CpnT (*channel protein with necrosis-inducing toxin*) est une protéine de la membrane externe de Mtb dont la partie C-terminale peut être clivée. Libérée dans le milieu de culture, cette protéine est toxique et induit la mort cellulaire par nécrose (Danilchanka et al., 2014).

3.2.5. Immunité et virulence nutritionnelles

Le phagosome est un environnement inhospitalier où les ressources sont restreintes. Les bactéries nécessitent des nutriments pour se répliquer et alimenter leurs besoins métaboliques. Une stratégie pour limiter la croissance des pathogènes est de réduire les ressources disponibles. La modulation de la disponibilité en nutriments affectant la croissance des pathogènes a été nommée « immunité nutritionnelle » (Hood & Skaar, 2012; Weinberg, 1978). La dérégulation de l'équilibre métallique par l'hôte est un des éléments de cette immunité nutritionnelle. Ainsi, des patients atteints de malnutrition ou carencés en métaux présentent des déficiences immunitaires, avec pour conséquence une mauvaise élimination des agents pathogènes (A. S. Prasad, 2012; A. S. Prasad et al., 2007; Solomons, 2007). De plus, les cellules immunitaires sont capables soit de carencer les pathogènes intracellulaires en métaux essentiels, soit, au contraire, de les intoxiquer *via* l'accumulation de concentrations élevées en métaux de transition. Le cuivre, le fer, le manganèse et le zinc sont les quatre

éléments de transition essentiels aux bactéries qui sont, à l'heure actuelle, bien décrits pour participer à l'immunité nutritionnelle.

3.2.5.1. Immunité nutritionnelle : limitation de l'apport en fer et manganèse

L'immunité nutritionnelle a initialement été mise en évidence avec le fer, puis pour le manganèse (Kochan, 1973). Au niveau de la membrane phagosomale, le transporteur NRAMP1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) et la ferroportine retirent les ions Fe²⁺ du compartiment où se trouvent les bactéries, limitant ainsi l'apport en ions nécessaires à sa survie. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi, bien avant ces études, Armand Trousseau avait montré que des compléments alimentaires riches en fer augmentaient la fréquence des rechutes chez des patients se remettant d'une tuberculose active (Skaar & Raffatellu, 2015). Le manganèse est également un métal indispensable aux pathogènes comme *Streptococcus pneumoniae* (Dintilhac et al., 1997) *Yersinia pestis* (Bearden & Perry, 1999), *Streptococcus aureus* (Kehl-Fie & Skaar, 2010). Le transporteur NRAMP1 peut aussi faire sortir les ions manganèse du compartiment phagosomal et les macrophages produisent une protéine, la calprotectine (CP), qui agit comme arme antimicrobienne en chélatant le manganèse (Corbin et al., 2008; Damo et al., 2013).

Pour répondre à ces carences en fer ou manganèse, les bactéries intracellulaires produisent des transporteurs capables de récupérer et stocker des métaux. Ainsi, de nombreux pathogènes produisent des sidérophores capables de piéger le fer déjà lié par des protéines de l'hôte comme la transferrine. Les deux pathogènes respiratoires *Acinetobacter baumannii* et *Neisseria meningitidis* ont adapté des systèmes « de piratage » spécialisés dans la récupération du manganèse directement liés aux chélateurs de l'hôte en exprimant des récepteurs à leur surface capable de reconnaître le complexe calprotectine-métal pour substituer ensuite le métal et se l'approprier (Hood et al., 2012; Stork et al., 2013). Des études sur les régulateurs transcriptionnels centraux de l'homéostasie du manganèse MntH et MntABC chez *M. tuberculosis* (Pandey et al., 2015) et MumT chez *A. baumannii* (Green et al., 2020), respectivement. De puissants mécanismes de capture du fer et de l'hème, par exemple, sont mis en place par Mtb. Certains de ces acteurs sont décrits dans la deuxième partie (voir partie 2 - 2.4.1).

3.2.5.2. Immunité nutritionnelle : intoxication par le zinc ou le cuivre

Le concept d'immunité nutritionnelle a plus récemment été étendu à l'utilisation de métaux comme armes d'intoxication. Ainsi, les cellules phagocytaires peuvent accumuler rapidement des quantités importantes d'ions métalliques dans les vésicules d'endocytose. Un tel « burst » d'ions métalliques a été établi pour le cuivre (Neyrolles et al., 2015; Shafeeq et al., 2011; Ward et al., 2010) et le zinc (Botella et al., 2011) suite à l'infection par *M. tuberculosis* mais aussi H. pylori (Waidner et al., 2005), S. typhimurium (Achard et al., 2010; Osman et al., 2010), E. coli ou encore le pathogène fongique Aspergillus fumigatus (Cai et al., 2018). Les concentrations de ces métaux ont été mesurées dans les vacuoles d'endocytose de macrophages infectés par *M. tuberculosis*. Elles sont multipliées par dix et atteignent 400 à 500 μM (Wagner et al., 2005). Par ailleurs, les deux cations ne semblent pas être injectés dans le phagosome dans les mêmes fenêtres de temps d'infection. Le pic massif d'ions cupriques se fait très rapidement (déjà présent après 1h d'infection), alors que le pic des ions zinc est mesuré à 24h post-infection. Deux protéines sont nécessaires pour la détoxification du cuivre dans la virulence de Mtb : CtpV, une Cu-ATPase (voir partie 2 - 4), et MctB (mycobacterial copper transport proteins B). Intégrée dans la membrane plasmique, CtpV permettrait de faire sortir le Cu du cytosol vers le périplasme, ensuite pris en charge par MctB trouvée dans la membrane externe. Les simples mutants $\triangle ctpV$ et $\triangle mctB$ accumulent tous deux du cuivre. La présence de MctB est requise pour la pleine virulence chez le cochon d'Inde (Ward et al., 2010; Wolschendorf et al., 2011). Notre équipe a mis en évidence une autre P-ATPase, CtpC, impliquée dans la résistance au zinc de Mtb (Botella et al., 2011). L'expression de ctpC est induite par le zinc et dans les macrophages. Le mutant $\Delta ctpC$ accumule du zinc tandis que sa

survie est altérée en conditions d'infection de macrophages humains.

1																	2
н																	He
Hydrogen					1	Nu	méro at	omique									Holium Noble Gas
3	4				ы.	C						5	6	7	8	9	10
Li	Be				п	Э	ymi	0016	n			В	С	Ν	0	F	Ne
Lithium Alkeli Metel	Beryllium Atkaline Earth Metal			Hy	drogène	No	m					Boron	Carbon	Nitrogen	Oxygen	Fluorine	Neon Noble Gas
11	12			N	lon-Métal	Grou	upe chimiqu	ie				13	14	15	16	17	18
Na	Ma											AI	Si	P	S	CI	Ar
Sodium	Magnesium	Aluminum Silicon Phosphorus Sulfur Chlorine Argon							Argon								
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	Δc	Se	Br	Kr
Potassium	Calcium	Scandium	Titanium	Vanadium	Chromium	Manganese	Iron	Cobalt	Nickel	Copper	Zinc	Gallium	Germanium	Arsenic	Selenium	Bromine	Krypton
Alkali Metal	Alkaline Earth Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Post-Transition Wetal	Metalloid 50	Metalloid	Normetal 52	Halogen	Nobie Gas
Dh	Cr.	V	7.	Nib	Mo	To	Du	Dh	Dd	Aa	Cd	49	6n	Ch	To	55	Va
Rubidium	Strontium	Yttrium	Zirconium	Niebium	Melvbdenum	Technetium	Ruthenium	Rhodium	Palladium	Ag	Cadmium	Indium	311	SD	Tellurium	lodine	Xenon
Alkali Metal	Alkaline Earth Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Transition Metal	Post-Transition Metal	Post-Transition Metal	Metalloid	Metaltoid	Halogen	Noble Gas
55	56		72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
CS	ва	•	Hī	Ia	vv	ке	US	Ir	Pt	Au	Hg	11	PD	BI	PO	At	RN
Cesium Alkali Metal	Barium Alkaline Earth Metal		Hafnium Transition Metal	Tantalum Transition Metal	Tungsten Trensition Metal	Rhenium Transition Metal	Osmium Transition Metal	Iridium Transition Metal	Platinum Transition Metal	Gold Transition Metal	Mercury Transition Metal	Thailium Post-Transition Metal	Lead Post-Transition Metal	Bismuth Post-Transition Metal	Polonium Meta?oid	Astatine	Radon Noble Gas
87	88		104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
Fr	Ra	**	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	FI	Mc	Lv	Ts	Og
Francium Alkali Metal	Radium Alkaline Earth Metal		Rutherfordium Transition Metal	Dubnium Transition Metal	Seaborgium Transition Metal	Bohrium Transition Metal	Hassium Transition Metal	Meitnerium Transition Metal	Darmstadtium Transition Metal	Roentgenium Transition Metal	Copernicium Transition Metal	Nihonium Post-Transition Metal	Flerovium Post-Transition Metal	Moscovium Post-Transition Metal	Livermorium Post-Transition Metal	Tennessine Halogen	Oganesson Noble Gas
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
			L'a	Co	Dr	Nd	Dm	Sm	Eu	Gd	Th	Dv	Ho	Er	Tm	Vh	Lin
			Lanthanum	Cerium	Praseodymium	Neodymium	Promethium	Samarium	Europlum	Gadolinium	Terbium	Dysprosium	Holmium	Erbium	Thulium	Ytterbium	Lutetium
			Lanthanide	Lanthanide	Lanthanide	Lanthanide	Lanthanide	Lanthanide	Lanthanide	Larotanide	Lanthanide	Lattharide	Lanthanide	Lanthanide	Lasthanide	Lanthanide	Latituaride
			89	The	De	92	93	94 Dur	A 100	000	DL	98	99	F ine	Mal	No	103
			AC	In	Pa	U	Ир	Pu	AM	Cm	BK	CT	ES	F.M	IVID	NO	Lr
			Actinium	Actinide	Activide	Actinide	Actinide	Activide	Americium	Actinide	Actinide	Activide	Activide	Activide	Actinide	Actinide	Actinide

Non-métal et Halogènes	Métal alcalin	Métal alcalino-terreux	Métal de transition	Métal de post-transition
Métalloïde	Halogènes	Gaz noble	Lanthanide	Actinide

Figure 14. Tableau périodique des éléments

(d'après National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Periodic Table of Elements, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/periodic-table/ (accessed on July 17, 2020))

Partie 2 : METALLOBIOLOGIE ET INFECTIONS BACTERIENNES

1. Métal et monde vivant

Présents à l'origine de la terre, les métaux sont des composés naturels de la croute terrestre et sont trouvés dans de nombreux types de roches. Ces éléments sont omniprésents au sein de toute la biosphère jouant un rôle prépondérant à la vie sur terre. Ils forment la classe la plus nombreuse du tableau périodique des éléments (Figure 14). Celui-ci est divisé en trois grandes classes : les métaux, les métalloïdes et les non-métaux. Sur les 110 éléments, 86 appartiennent aux métaux, 7 aux métalloïdes et 17 aux non-métaux. La classe des métaux est elle-même sous-divisée en six groupes : les métaux alcalins, métaux alcalino-terreux, métaux de transition, métaux pauvres ainsi que les lanthanides et les actinides.

Bien que présents dans tous les compartiments de l'environnement, tous ces métaux dits « lourds » pour leur densité supérieure à 5 g/cm³ sont trouvés en quantité très faibles dans la matière vivante et sont aussi appelés « éléments traces métalliques » (ETM) (Leland et al., 1977). Ils partagent des propriétés communes permettant de les distinguer d'autres entités chimiques.

Une première caractéristique, conséquence de leur faible état volatil et de leur caractère nonbiodégradable, est leur capacité d'accumulation. Au-delà d'un seuil critique (variable selon le métal, l'organisme ou le compartiment considéré) les métaux lourds deviennent toxiques pour les êtres vivants s'ils ne sont pas pris en charge et/ou évacués hors des cellules. Cette toxicité peut être observée même à des concentrations relativement faibles (de guelgues µg/kg à quelques mg/kg en fonction du métal) (WHO, 2017). En effet, la toxicité de chacun des métaux lourds ne dépend pas seulement de sa concentration mais également de sa biodisponibilité dans un environnement donné, de la spéciation du métal, c'est-à-dire l'état chimique sous lequel il est trouvé dans cet environnement, de son état d'oxydation et des liaisons qu'il va former avec les ligands. Les organismes vivants présentent une sensibilité à chacun des métaux lourds qui leur est propre. Toutefois, tous les êtres vivants, aussi bien procaryotes qu'eucaryotes, sont sensibles aux métaux si ceux-ci se retrouvent en trop forte concentration. Par exemple, chez l'homme, des catastrophes écologiques ayant entraîné l'accumulation de métal sont à l'origine de pathologies spécifiques. L'une des plus connues est l'intoxication par le plomb, communément appelée « saturnisme » provoquant de sévères effets, en particulier sur le cerveau pendant le développement du fœtus et du jeune enfant, conduisant à des altérations des capacités cognitives et à un retard mental. D'autres évènements marquants d'intoxications métalliques ont été recensés comme la maladie de Minamata au Japon (1956),

une intoxication par le mercure provoquant également des séquelles neurologiques graves, ou encore la maladie du pied noir à Taïwan (1960), conséquence d'empoisonnement de l'eau par l'arsenic, avec des effets sur les vaisseaux sanguins des membres inférieurs entrainant une gangrène progressive. L'exposition à l'arsenic à long terme des personnes vivant dans cette région fait l'objet de nombreuses études actuelles suite à l'observation d'une forte incidence de cancers dans la population exposée (C. J. Chen et al., 1985; Lan et al., 2011).

L'ensemble des métaux lourds est hétérogène et ils ne peuvent pas être classés uniquement selon leur densité. Mis à part le fait qu'ils soient extrêmement toxiques pour les organismes vivants, certains métaux comme le cadmium, le mercure ou le plomb n'ont aucune fonction biologique essentielle. En revanche, d'autres sont indispensables à tout organisme pour le bon déroulement des processus biologiques. On distingue d'une part des métaux biologiques majeurs (Ca, K, Mg, Na), qui sont les plus abondants et font partie des macronutriments, et d'autre part des oligoéléments essentiels bien que présents à des concentrations nettement plus faibles (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, W, Zn) (Outten & O'Halloran, 2001).

La classification des métaux la plus pertinente se base sur leurs propriétés chimiques ainsi que sur leur tendance à former des complexes métal-ligand. Suggérée en 1958 par Sten Ahrland et introduite par Ralph Pearson dans les années 1960, elle prend en compte la stabilité des métaux complexés avec des biomolécules (Ahrland et al., 1958). En effet, dans ces complexes les métaux jouent un rôle d'acide (« de Lewis ») tandis que le ligand sert de base dans le cadre des équilibres ou réactions d'oxydo-réductions. Un acide dit de Lewis possède une lacune électronique rendant l'entité chimique susceptible d'accepter un doublet d'électrons (donné par une base de Lewis) et de créer des liaisons. Trois catégories de ces acides ont été établies et sont regroupés selon leur rayon atomique, état d'oxydation, polarisabilité et électronégativité (Nieboer & Richardson, 1980) :

- Les métaux définis comme « acides/métaux durs » ont un état d'oxydation élevé, une polarisabilité faible et une forte électronégativité favorisant les interactions électrostatiques. Ils sont généralement peu volumineux, très chargés et ont une préférence pour les ligands dont l'atome donneur est l'oxygène (OH⁻, CH₃COO⁻, CO₃²).
- Les métaux dits « acides/métaux mous » qui, a contrario, ont un état d'oxydation faible, une faible électronégativité mais sont fortement polarisables. Beaucoup plus large, l'interaction avec des bases molles se fait par liaison de covalence. Ces interactions très stables et souvent irréversibles sont favorisées par l'affinité des acides mous envers les biomolécules contenantes des atomes d'azote et de soufre (CN⁻, S²⁻, RS⁻, R₂S).

 Enfin, il existe une catégorie dite « intermédiaire ». Les éléments qui la composent ont des propriétés ambivalentes qui leur permettent de réagir et former des complexes stables avec des ligands de toutes catégories, aussi bien composé d'oxygène que d'azote ou de soufre. Cette propriété les rend difficile à distinguer entre métaux durs ou mous. Ces métaux sont souvent appelés « métaux de transition » (Irving & Williams, 1953).

2. Les métaux de transition

En biologie, ce sont les « métaux de transition » qui jouent un rôle significatif. Ces éléments sont au nombre de 38 (colonnes 3 à 12 du tableau périodique des éléments) hormis quelques exceptions (lawrencium et lutécium). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a dressé la liste des métaux essentiels pour l'homme. Les éléments en faisant partie sont le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le magnésium (Mg), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le sélénium (Se) et le zinc (Zn) (FAO; WHO, 1996).

De manière générale, ces éléments sont essentiels pour toute forme de vie et apparaissent dans la première ligne des métaux de transitions sur le tableau périodique. Ils présentent une sous-couche électronique incomplète (excepté le zinc) pouvant former des cations et établir de nombreux types de liaisons puis, à terme, de former des complexes moléculaires de structures variables. Cette propriété de perte et gain d'électrons très commune dans la nature, leur confère une activité très importante dans le potentiel d'oxydo-réduction. Ils ont la capacité à échanger des électrons lors d'un grand nombre de réactions métaboliques (réplication et transcription de l'ADN, production d'énergie, hydrolyse, respiration, photosynthèse, etc.). Leurs multiples interactions potentielles guidées par une grande versatilité aux niveaux atomique, moléculaire, l'assemblage de complexe macromoléculaire, la spéciation propre à chaque métal ainsi que leur implication biologique leur confèrent des caractéristiques uniques et rendent ces éléments essentiels à la vie. Ainsi le cuivre joue un rôle important comme cofacteur d'enzymes antioxydantes (superoxide dismutase) ou impliquées dans la respiration (oxydases du cytochrome c), ainsi que pour de nombreuses enzymes périplasmiques chez les bactéries (Hodgkinson & Petris, 2012). Le magnésium stabilise de nombreux complexes protéigues et transporteurs ainsi que les membranes (Groisman et al., 2013). Le nickel est essentiel à des enzymes telles que les uréases, les hydrogénases (Boer et al., 2014). Le manganèse est impliqué dans des oxydases, nitrogénases et réductases de nitrate. Le molybdène est un cofacteur enzymatique essentiel (lobbi-Nivol & Leimkühler, 2013). Retrouvé sous deux formes d'oxydation (Fe²⁺ et Fe³⁺), le fer est un co-facteur très utilisé dans les chaines de transfert d'électrons et le métabolisme de l'oxygène.

A contrario, le zinc disponible sous un seul état d'oxydation n'est pas utilisé pour le transfert d'électron, mais tient un rôle structural essentiel pour un grand nombre d'enzymes et protéines (Nordberg & Nordberg, 2016).

Dans la suite, nous focaliserons notre attention sur les métaux de transitions dont l'essentialité est certaine. A cause de la dualité essentialité-toxicité, les quantités de ces métaux dans les cellules vivantes doivent être strictement contrôlées et régulées pour éviter soit une carence, aux concentrations trop faibles, soit une intoxication par ces ions métalliques, si leur concentration dépasse le seuil de toxicité.

2.1. « Métallomique » : un terme nouveau

La science des éléments métalliques est un facteur commun de nombreux domaines scientifiques appliqués tels que la biochimie, la chimie (bio)organique, en nutrition, pharmacie, toxicologie, agriculture, écologie, océanographie, plus largement l'environnement et bien d'autres. Pour autant, les travaux de ces différents champs scientifiques ont été menés indépendamment les uns des autres par le passé et ce n'est que récemment qu'une tentative d'unification des connaissances du domaine a émergé (Haraguchi, 2004). En 2001, s'appuyant sur le rôle central des métaux communs à toutes ces études, Williams propose le terme de « métallome ». Il est défini comme étant l'ensemble des molécules biologiques liées à un ou plusieurs ions métalliques et se présente comme un parallèle aux autres « omes » déjà décrits dans la littérature (génome, transcriptome, protéome et métabolome). Le métallome établit une connexion entre ces différents champs scientifiques. De ce fait, le terme de « métallomique » n'a pas tardé à apparaître en tant que domaine de la science dédiée aux métaux (Haraguchi, 2004). Le fonctionnement des réactions biologiques est régi par l'activité catalytique d'enzymes dont un très grand nombre dépend des métaux. Ces protéines sont appelées « métallo-enzymes », plusieurs rôles sont attribués aux métaux contribuant aux mécanismes catalytiques. Ils interviennent notamment grâce à leur pouvoir redox, ou encore jouent le rôle de stimulants, d'aide à la catalyse. De plus, au-delà de la catalyse, ils interviennent également dans la formation d'états intermédiaires des protéines ou encore ils peuvent servir de stabilisateurs électrostatiques permettant d'adopter une conformation adéquate. En regroupant les six grandes classes enzymatiques (oxidoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases), il a été évalué qu'environ 40 % de ces enzymes requièrent un métal pour leur fonctionnement optimal (Andreini et al., 2008). Le magnésium est l'ion métallique le plus fréquemment impliqué dans le fonctionnement de ces protéines, suivi par le zinc et le fer. Il joue notamment un rôle crucial chez les phosphatases

et kinases pour la formation d'état transitoire adopté par l'enzyme mais aussi pour la liaison d'ATP (Vandenheede et al., 1986).

En plus de rôle sur l'activité des enzymes, les métaux entrent aussi dans des interactions avec les acides nucléiques qui requièrent des structures stables pour l'ADN et l'ARN (Sigel & Sigel, 2013). Ils interviennent dans la structure et les changements conformationnels de l'ADN notamment dans la capacité à se plier et se dérouler. Le Mg²⁺ est le cofacteur métallique le plus retrouvé avec les acides nucléiques. L'ADN est un polymère surenroulé chargé négativement pour qui le Mg²⁺ stabilise la double hélice en interagissant avec les phosphates des acides nucléiques et maintient un état compact de la chromatine (hétérochromatine) (Anastassopoulou, 2003; Hartwig, 2001). Certaines protéines portent un motif structural dit « à doigt de zinc » qui permet une interaction spécifique de liaison à l'ADN (Schwabe & Klug, 1994). Le rôle catalytique des éléments métalliques est aussi retrouvé pour le fonctionnement de ribozymes, des ARN possédant la capacité de catalyser une réaction chimique.

2.2. Homéostasie métallique: limitation/privation et empoisonnement/intoxication

L'activité des métallo-protéines dépend directement du taux de métal dans les cellules. L'homéostasie est un terme utilisé pour désigner un processus physiologique permettant de maintenir l'équilibre d'une concentration autour d'une valeur bénéfique pour l'organisme. Dans le cas des métaux on parle de « métallostasie ». Les métaux ne sont ni synthétisés, ni dégradés par les organismes vivants. De plus, ils ne peuvent pas librement traverser la barrière physique formée par les bicouches lipidiques des membranes qui séparent le milieu intérieur des cellules de leur milieu extérieur. En conséquence, la métallostasie nécessite de contrôler l'entrée et/ou la sortie des métaux, afin de les maintenir à une concentration optimale dans les cellules. De plus, comme à la fois les carences et les trop fortes concentrations en métaux peuvent être délétères, il est nécessaire de capturer davantage de métaux en cas de carence, ou bien de pouvoir neutraliser ou évacuer les métaux en excès. Historiquement, l'activité bactéricide naturelle des métaux sur le vivant a été utilisée pendant longtemps comme moyen de lutte antimicrobien et ce bien avant la mise en évidence du premier antibiotique par Alexander Fleming, qui lui valut le prix Nobel en 1945. Plusieurs anecdotes d'utilisation de métaux durant l'ère pré-antibiotique ont été rapportées. En effet, l'argent et le cuivre ont beaucoup été utilisés pour leur effet antimicrobien notamment pour la confection de vaisselle. Au cours de la seconde guerre mondiale, les soldats, aux conditions de vie spartiates, jetaient des pièces métalliques dans les récipients contenant des liquides consommables afin d'éviter leurs contaminations et *in fine* des maladies telles que les épidémies de dysenterie qui furent omniprésentes. Dans le domaine phytosanitaire, le botaniste français Alexis Millardet a mis au point à la fin du XIXème siècle le sulfate cuprocalcique, un composé bactéricide autrement connu comme « bouillie bordelaise » longtemps utilisé avec l'oxychlorure et l'hydroxyde de cuivre pour traiter les contaminations (parasites, champignons) des vignes et autres grandes cultures.

L'augmentation de la prévalence des infections par des souches bactériennes MDR- et XDR-TB rend les traitements antibiotiques très complexes et de plus en plus limités par les antibiotiques existants. Qui plus est, le traitement de base de la tuberculose est très lourd et la présence de souches responsable de tuberculoses quasi-incurables est indéniable (voir partie 1 – 1.5.2). De ce fait, l'utilisation des métaux comme alternatives ou éléments complémentaires dans le traitement antibiotique est de nouveau envisagée. Avec les progrès techniques et la compréhension des propriétés intrinsèques métalliques des dernières années, des stratégies antimicrobiennes sont développées pour renforcer l'ère postantibiotique. Par exemple, des composés imitant la structure physique du fer sont utilisés pour duper les bactéries. Ces éléments, délivrés par des sidérophores (exemples des desferrioxamine (DFO) ou entérobactine), imitent le fer mais ne le remplacent pas fonctionnellement et contribuent à l'arrêt des chaines respiratoires et autres disfonctionnements physiologiques (Banin et al., 2008). De plus, la synthèse de nanoparticules chargées en métaux permet de délivrer des métaux directement dans les bactéries. Cette libération mène à une entrée massive et toxique de cations métalliques dans le cytosol des bactéries (Fayaz et al., 2010; Losasso et al., 2014; Saeed et al., 2020; Sánchez-López et al., 2020). En effet, des oxydes de cuivre et zinc délivrés par des nanoparticules inhibent la formation de biofilms de souches bactériennes multirésistantes telles qu'Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus, espèces bactériennes majeures à l'origine des infections nosocomiales (Manoharan et al., 2020). De plus, différentes bactéries (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus et Deinococcus radiodurans) sont tuées en contact de surfaces cuivrées (Noyce et al., 2006; Santo et al., 2011).

2.2.1. Toxicité des ions cuivre

Les cations métalliques tels que le cuivre et le zinc ne sont pas libres dans le cytoplasme. L'affinité électronique du cuivre, trouvé sous ses deux états d'oxydation Cu(I)/Cu(II), fait de lui le cation le plus efficace pour établir des liaisons avec les molécules organiques. Son potentiel redox est proche de celui du cytoplasme et s'il n'est pas lié, il peut effectuer un cycle redox entre ses états d'oxydation (I) et (II) et engager des réactions chimiques de type Fenton et Haber-Weiss. Celles-ci, respectivement la réaction du Cu(I) avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou la réduction du Cu(II) par un ion superoxyde (O₂-), produisent des radicaux hydroxyles (HO[•]) très réactifs avec les molécules biologiques entrainant des dommages aux lipides membranaires, aux protéines et aux acides nucléigues (Halliwell & Gutteridge, 1984; Mello Filho et al., 1984; Nies & Herzberg, 2013). La liaison du cuivre aux acides aminés, soufrés notamment, est considérée comme la cause majeure de la cytotoxicité du cuivre. Ces liaisons provoquent des dégradations de structures protéiques. Elles ont été particulièrement mises en évidence avec des protéines contenant des clusters fer-soufre (Fe-S) de fonctions très diverses (Chillappagari et al., 2010; Djoko & McEwan, 2013; Macomber & Imlay, 2009). Cette toxicité explique pourquoi le cuivre est très majoritairement lié à des protéines affines et la concentration cytoplasmique en cuivre libre est extrêmement faible (Rae et al., 1999).

2.2.2. Toxicité des ions Zinc

En conditions physiologiques le zinc n'a qu'un état d'oxydation ce qui ne lui permet pas de participer à des réactions d'oxydo-réduction. La majeure partie du zinc est complexée aux cofacteurs enzymatiques et aux protéines pour lesquelles il joue des rôles catalytiques et structuraux (Maret & Li, 2009). Son accumulation dans la cellule entraine des compétitions avec d'autres métaux co-facteurs d'enzymes clés. Ces mauvaises métallisations inhibent la croissance bactérienne en inactivant des enzymes essentielles. Par exemple, la surcharge de zinc inhibe des enzymes clés du catabolisme du glucose (phosphofructokinase et glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase) de *Streptococcus pyogenes* (Ong et al., 2015). Chez *S. pneumoniae*, le stress par le zinc engendre une déficience de Mn²⁺ via l'inactivation de PsaA, un transporteur d'import de Mn²⁺ (Jacobsen et al., 2011). Chez *E. coli*, l'homologue de la topoisomérase I YrdD est aussi inactivée par la présence massive d'ions zinc dans le milieu (Cheng et al., 2014). Les protéines à clusters Fe-S sont impliquées dans divers processus physiologiques allant du métabolisme énergétique à la réparation et à la réplication de l'ADN. La surcharge de zinc chez *E. coli* provoque l'inactivation de protéines à clusters Fe-S telles que les fumarases A et B, la NADH dehydrogenase I, endonuclease III (Li et al, 2019).

Le maintien de l'homéostasie métallique est orchestré par un grand nombre de protéines participant soit à l'import soit à l'efflux des métaux. De manière générale, les mécanismes de régulation mis en œuvre assurent que des systèmes d'acquisition soient exprimés quand un métal se trouve en concentration limitante à la viabilité de l'organisme ou bien que des protéines de stockage et/ou des systèmes d'expulsion soient produits quand le métal se trouve en excès, permettant ainsi soit sa neutralisation soit son export hors des cellules.

2.3. Systèmes de régulation bactériens

Face au manque ou à l'excès de composés métalliques, les bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation très efficaces (Lemire et al., 2010). Les systèmes bactériens impliqués dans l'homéostasie métallique doivent être réquisitionnés très rapidement et des protéines de perception (protéines dites « métallo-régulatrices », ou encore « métallo-senseurs ») permettent de sonder la concentration d'un métal dans le cytoplasme initiant la « métallo-régulation ».

2.3.1. Métallo-capteurs/senseurs

La disponibilité en métaux contrôle l'expression transcriptionnelle des gènes codant (i) des protéines impliquées dans la capture et l'import d'ions métalliques ou, (ii) des protéines de stockage et transporteurs. Ces régulations sont assurées par des protéines dites métallo-régulatrices ou métallo-senseurs qui modulent la transcription en se fixant à des sites opérateurs au voisinage de leurs promoteurs cibles. La fixation d'un ion métallique aux métallo-senseurs modifie (positivement ou négativement) l'affinité pour leurs sites de fixation sur l'ADN. La disponibilité des métaux de transition varie d'un métal à l'autre et dicte la force des affinités entre un métal et son ligand. La série d'Irving-Williams : [Mn] < [Fe] < [Co] < [Ni] < [Cu] > [Zn], illustre la force des complexes d'ions métalliques divalents les uns par rapport aux autres.

Competitiveness								
Mn	Fe	Co	Ni	Cu ^I	Zn			

De ce fait, la sensibilité et l'affinité (mesurées en K_D) d'une protéine régulatrice envers son métal apparenté est ordonnée de la façon suivante : $K_{Cu} > K_{Zn} > K_{Ni} > K_{Co} > K_{Fe} > K_{Mn}$. Les taux d'ions Cu et Zn sont les plus bas par rapport aux autres métaux de transition, ce qui impose de réguler étroitement leur biodisponibilité dans les cellules.

Le cuivre, pour exemple, est le métal le moins retrouvé à l'état libre dans le cytoplasme. Chez *E. coli*, la sensibilité du régulateur transcriptionnel CueR pour l'ion Cu⁺ est de l'ordre du zeptomolaire (10^{-21} molaire) (Changela et al., 2003). CueR régule des gènes d'efflux du cuivre, tandis que ZntR régule ceux de l'efflux du zinc et l'expression de la Zn²⁺-ATPase ZntA. L'affinité de ZntR pour le zinc a d'abord été évaluée de l'ordre du femtomolaire (10^{-15}) *in vitro* (Reyes-Caballero et al., 2011), puis de l'ordre du nanomolaire *in vivo* (Braymer & Giedroc, 2014; D. Wang et al., 2012).

2.3.2. Mécanismes de régulation par les métallo-capteurs/senseurs

Les métallorégulateurs sont divisés en deux sous-groupes en fonction de la réponse déclenchée par la liaison de leur ligand métallique. Le premier contient les régulateurs pour lesquels le métal stimule l'expression génique. Ce sous-groupe régule les systèmes de résistance aux métaux. Pour le second, qui concerne les systèmes d'acquisition des métaux, la fixation du métal sur le régulateur réprime l'expression génique (Capdevila et al., 2017).

Activité transcriptonnelle :	Activation	Répression	Dé-répression
			AsR-SmtB,
Efflux	MerR		CsoR-RcnR,
			СорҮ
Import		Fur, DtxR,	
		NikR	

Exemples de protéines régulatrices impliquées dans différents types de régulation :

L'activation transcriptionnelle : l'exemple de ce type de régulation est celui du régulateur MerR, responsable de la régulation des gènes permettant la résistance au mercure. En absence de mercure dans le cytoplasme, MerR est lié à l'opérateur des gènes cibles où il réprime la transcription. L'ARN polymérase peut se lier sur MerR, mais le complexe ADN-MerR-ARN polymérase est maintenu dans une conformation qui empêche le démarrage de la transcription. Lorsque le taux d'ions mercure augmente dans la bactérie, le mercure se lie à MerR induisant un changement allostérique. Ceci réorganise le complexe et l'ARN polymérase peut initier la transcription des gènes de résistance au mercure (Brown et al., 2003; O'Halloran et al., 1989).

La répression transcriptionnelle : le régulateur IdeR (*iron-dependent regulator*) de *M. tuberculosis* régule l'import du fer. En condition normo-ferrémique, IdeR est complexé au fer. Sous cet état allostérique, IdeR-Fe est en interaction avec l'ADN et réprime la transcription. Si la concentration en fer chute, la liaison Ide-Fe ne se fait plus, la conformation d'IdeR change et la protéine se détache de l'ADN. La répression est levée et les gènes codant les systèmes d'acquisition du fer sont transcrits (Benjamin Gold et al., 2001; Pohl et al., 1999).

La dé-repression transcriptionnelle : à l'inverse du cas précédent, le régulateur transcriptionnel de la réponse au cadmium, CmtR, de *M. tuberculosis* est lié à l'ADN où il réprime le promoteur en absence de métal. L'entrée des ions cadmium dans le cytoplasme et leur fixation sur le régulateur va changer la conformation de CmtR, le décrocher de l'opérateur et ainsi lever la répression. Le métal induit donc l'expre**ssi**on des gènes cibles par un mécanisme de dé-répression (Chauhan et al., 2009).

2.3.3. Régulation post-transcriptionnelle : stabilité et traduction des ARNm

D'autres mécanismes de régulation agissent *via* la modulation de la dégradation des ARNm ou leur traduction. Par exemple, RyhB, un ARN de 90 nucléotides dont la découverte et la majorité des études ont été réalisées chez *E. coli*, affecte la stabilité d'ARNm (régulation post-transcriptionnelle) et est impliqué dans l'adaptation à la carence en fer. Directement régulé par le répresseur ferrique Fur, l'ARN RyhB est transcrit lors de la levée de répression de Fur en condition de carence en fer. Consécutivement, l'expression de RyhB stimule la dégradation des ARNm de protéines consommatrices de fer comme les protéines de stockage du fer (FtnA et Bfr) et différentes enzymes dont la superoxide dismutase, SodB (Hoe et al., 2013; Massé et al., 2005; Massé & Gottesman, 2002). De nombreux homologues de RyhB ont été retrouvés



Figure 15. Mécanisme d'import des complexes Fer-mycobactine ou Fer-carboxymycobactine à travers la membrane plasmique *via* le transporteur IrtAB de *M. tuberculosis*.

Le fer lié à la mycobactine (MBT) ou à la carboxy-mycobactine (cMBT) traverse la membrane *via* le complexe IrtAB puis est relargué sous forme réduite Fe²⁺ dans le cytoplasme. Le relargage par Fe-MBT nécessite la présence du domaine d'interaction avec le sidérophore (SID) en N-terminal de IrtA. Ce domaine n'est pas nécessaire au relargage du fer par cMBT. Ronds rouges : Fe-MBT et Fe-cMBT.

Ronds blancs : MBT ou cMBT non liées au fer. (d'après Arnold et al., 2020) dans des bactéries pathogènes (Oglesby-Sherrouse & Murphy, 2013) et chez *P. aeruginosa* les ARNs PrrF1 et PrrF2 sont requis pour la croissance de la bactérie lors d'infection de poumons de souris (Oglesby et al., 2008; Reinhart et al., 2017). De même, chez *S. aureus* l'ARN RsaC limite la synthèse de l'enzyme dépendante du manganèse SodA (superoxide dismutase A) lors de carences en manganèse (Lalaouna et al., 2019).

En plus de son rôle dans la déstabilisation d'ARNm, RyhB agit aussi à un second niveau. En effet, RyhB est capable d'activer la traduction de certains ARNm comme *shiA* (codant une perméase pour l'acquisition du shikimate, un précurseur de la synthèse de sidérophores) (Prévost et al., 2007) ou *cirA* (codant un transporteur impliqué dans l'absorption du fer complexé avec des sidérophores) (Salvail et al., 2013), deux effets qui contribuent à l'adaptation aux conditions d'appauvrissement en fer. Ces ARNm possèdent dans leur région 5' non traduite une structure secondaire bloquant l'initiation de la traduction. Lorsque RyhB est exprimé, il s'apparie avec la région 5'UTR et empêche la formation de cette structure inhibitrice. Ce mécanisme de régulation agit sur la stimulation ou l'inhibition de la traduction de l'ARNm en masquant ou démasquant les sites de liaison des ribosomes (RBS, *ribosome binding sites*).

Au niveau leurs régions 5', certains ARNm présentent des structures secondaires alternatives modulant soit l'élongation de la trancription soit la traduction. Ces structures, nommées « riboswitchs », permettent de réguler l'expression génique en fonction de paramètres régulateurs qui font basculer vers l'une ou l'autre des structures secondaires. Ce type de régulation a notamment été mis en évidence dans l'homéostasie du manganèse. Le motif *yybP-ykoP* est un riboswitch fixant l'ion manganèse (Dambach et al., 2015; Price et al., 2015) qui participe à la résistance face aux fortes concentrations de ce métal. La liaison du Mn conduit à la libération du RBS et favorise la transcription de gènes codant des protéines membranaires comme les exportateurs, de la famille des CDF (voir partie 2 - 2.4.3.2), MneP et MneS de *B. subtilis* (Huang et al., 2017), ou encore MntP d'*E. coli* (Dambach et al., 2015; Martin et al., 2015).

2.4. Réponses physiologiques aux carences ou excès de métaux

Dans le cas de privation nutritionnelle médiée par l'hôte, les bactéries expriment des systèmes de séquestration et d'import des métaux afin de récupérer les traces de métaux environnants.

2.4.1. Capture et séquestration des métaux

Afin de capturer les traces de fer présent dans leur environnement, de nombreuses bactéries produisent des molécules, les sidérophores, capables de chélater le Fe³⁺ avec une très forte affinité. Par exemple, Mtb possède deux sidérophores : la carboxymycobactine (cMBT), hydrophile et exportée dans le milieu extérieur, et la mycobactine (MBT), hydrophobe et ancrée dans la mycomembrane (Luo et al., 2005). Ces sidérophores sont capables de récupérer le Fe³⁺ lié aux protéines de stockage eucaryotes, comme la transferrine ou la lactoferrine. Ensuite, Mtb transporte les complexes Fe³⁺-cMBT via le transporteur IrtA/IrtB, le fer est alors réduit en Fe²⁺ et internalisé, puis la cMBT est exportée dans le milieu grâce aux pompes d'efflux MmpL4/MmpS4 et MmpL5/MmpS5 pour un nouveau cycle de capture du fer (Arnold et al., 2020; Wells et al., 2013) (Figure 15). La pyoverdine, pigment donnant la couleur caractéristique des bactéries P. aeruginosa, est également un sidérophore. P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable notamment de maladies respiratoires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose. La pyoverdine est impliquée dans la capture du fer indispensable à la croissance du pathogène au niveau des voies respiratoires (Gi et al., 2015). Des sidérophores jouent aussi un rôle primordial dans la virulence, comme par exemple les staphyloferretines A et B de S. aureus ou l'entérobactine d'E. coli et S. typhimurium (W. J. Perry et al., 2019). Ce genre de chélateurs n'existe pas uniquement pour le fer. Certains chélateurs de zinc (ou « zincophores ») ont été mis en évidence comme la protéine Pra1 de la levure Candida albicans (Łoboda & Rowińska-Zyrek, 2018), ou encore la pseudopaline de P. aeruginosa (Lhospice et al., 2017) ou la versiniabactine produite par les pathogènes à Gram négatif comme Y. pestis ou E. coli. Ces molécules sont capables de fixer plusieurs métaux (Zn, Cu, Fe, Ni, Co), d'où la généralisation du concept de « métallophores ». En effet la yersiniabactine est impliquée dans l'acquisition du zinc chez Y. pestis et elle est aussi utilisée par les souches uropathogènes d'E. coli (UPEC) comme méthode de prévention face à la toxicité engendrée par les ions cuivre (Chaturvedi et al., 2013; Perry et al., 2015) Un mutant des gènes codant les enzymes de synthèse de la staphylopine chez S. aureus présente un défaut dans l'acquisition de plusieurs métaux : fer, zinc, nickel et cobalt (Ghssein et al., 2016).

Presque 70 % du fer des vertébrés est complexé à l'hème et contenu dans l'hémomoglobine. Un second moyen de se procurer du fer est de produire des molécules, appelées hémophores, capables de fixer l'hème et de l'extraire de l'hémoglobine. Le complexe hémophore-hème fixe ensuite des récepteurs spécifiques à la surface des bactéries pour leur importation, leur dégradation et la libération du fer (Izadi et al., 1997; Létoffé et al., 1994; A. Mitra et al., 2019). Deux transporteurs, MmpL3 (Rv0206c) et MmpL11 (Rv0202c), permettent à Mtb d'importer directement le complexe Fe-hème (Chao et al., 2019). Un troisième moyen de capter le fer existe chez *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* qui ne produisent pas de sidérophores mais possèdent des récepteurs (TbpA et TbpB) capables de fixer la transferrine de l'hôte pour en extraire le fer (Noinaj et al., 2012). Elles utilisent aussi ce principe pour fixer le chélateur majeur du zinc, la calprotectine (Loomans et al., 1998; Sohnle et al., 2000), *via* le récepteur de la membrane externe CbpA (Palmer & Skaar, 2016; Stork et al., 2013; Yadav et al., 2020).

Afin de séquestrer le surplus de métal libre et « tamponner » le milieu intracellulaire pour éviter les réactions néfastes et non spécifiques (mauvaises métallisations), plusieurs familles de molécules ont la capacité de fixer les métaux.

Les ferritines forment une grande famille de protéines capables de fixer le fer. Elles sont retrouvées chez les cellules eucaryotes, les archées ou les bactéries, et permettent de stocker le fer dans le cytoplasme et diminuer ainsi les réactions d'oxydation de type Fenton (Zeth et al., 2019).

Dans le cytoplasme des bactéries, les fonctions thiols sont répandues au sein de polypeptides de faible poids moléculaires (5-10 kDa) ayant des fonctions de chélateurs de métaux. Un exemple est le bacillithiol (BSH), un thiol dont les rôles touchent l'homéostasie du zinc, du cuivre ou encore du fer (Chandrangsu et al., 2018). Il est considéré comme le principal tampon des ions Zn^{2+} libre présent chez les firmicutes (Ma et al., 2014). Ce peptide est aussi un facteur de virulence important de *S. aureus* (Perera et al., 2015).

Chez des souches d'*E. coli* altérées dans l'export des ions cuivre et zinc (mutations de *copA* et *zntA*, gènes codant respectivement les ATPases de type P conférant la résistance au cuivre et au zinc), Helbig et coll. ont montré que l'absence du glutathion (GSH) accentue les effets toxiques de ces deux métaux (Helbig et al., 2008). Les métallothionéines (MTs) sont des polypeptides riches en résidus Cys jouant un rôle dans la résistance aux ions zinc et cuivre (Blindauer, 2011; Capdevila et al., 2016; Maret & Kręzel, 2007). MymT (*mycobacterial MT*) de Mtb a été la première MT décrite dans la résistance au cuivre chez les procaryotes (Capdevila et al., 2017; Ben Gold et al., 2008).

Enfin, d'autres protéines sont également directement impliquées dans la capture des métaux libres dans le milieu intracellulaire ou périplasmique.

La protéine HspA (*heat shock protein A*) retrouvée chez *H. pylori* possède une extrémité Cterminale riche en résidus histidine et cystéine. Elle est impliquée dans la séquestration du nickel (Kansau et al., 1996; Schauer et al., 2010). Une étude récente d'HspA montre qu'en plus du nickel, elle est aussi capable de lier d'autres métaux dont le zinc, le cobalt et le cuivre, et pourrait servir comme réservoir métallique à large spectre (Wang et al., 2015). Du même organisme, Hpn et Hpn-2 peuvent fixer jusqu'à 5 ions Ni²⁺ et permettent de stocker ce métal indispensable pour l'activité d'hydrogénases et uréases requises pour la virulence du pathogène (Vinella et al., 2015). En absence de Hpn, le Ni2+ n'est plus présenté à l'uréase ce qui conduit à une diminuation de son activité enzymatique. De plus, Ge et coll. ont montré que la surexpression de Hpn, chez *H. pylori* et *E. coli*, octroie une meilleure protection contre le Ni²⁺ (Ge et al., 2006). Ces protéines interviennent notamment dans la maturation de protéines et le trafic des ions métalliques dans les cellules et sont, pour ça, appelées « métallochaperons » (voir partie 2 – 3.5).

2.4.2. Systèmes d'import des métaux

Chez les bactéries à Gram négatif, la traversée de la membrane externe (OM, outer *membrane*), se fait *via* des protéines appelées porines. Ces protéines, dites à « β -barrel » parce qu'elles sont composées de 8 à 22 feuillets β formant une structure en tonneau, sont ancrées dans l'OM et assurent la diffusion des métabolites. Néanmoins, celle-ci nécessite une concentration extracellulaire suffisamment élevée. De plus, lorsque les métaux sont complexés à des métallophores sécrétés dans le milieu extérieur, les complexes sont trop larges pour diffuser à travers le canal des porines. Ces complexes nécessitent donc des systèmes de transport dédiés. Appelés TBDT (TonB-dependent transporters), ils sont composés d'un récepteur spécifique en « β-barrel » ancré dans de la membrane externe, et de protéines de la membrane cytoplasmique, TonB, ExbB et ExbD. La force proton motrice nécessaire pour le transport actif est fournie par TonB, une protéine allongée pouvant traverser le périplasme et entrer en contact avec le récepteur de la membrane externe (Schauer et al., 2008). Le récepteur FepA (ferric enterobactin transporter A) d'E. coli permet par exemple l'importation du milieu extérieur vers le périplasme du complexe formé par l'ion ferrique et l'entérobactine (Fe-Ent) (Chu et al., 2010; Noinaj et al., 2010) ou encore le complexe ferpyoverdine (Fe-Pvd) transporté par FpvA/B de P. aeruginosa (Adams et al., 2006; Bonneau et al., 2020).

D'autres études ont identifié différents ligands métalliques : le zinc libre peut être reconnu par le récepteur ZnuD (*zinc uptake component D*) (Calmettes et al., 2015; Stork et al., 2010) ; chez *H. pylori* et *H. mustelae*, le nickel est pris en charge par respectivement les récepteurs FrpB4 (Schauer et al., 2007) et NikH (Stoof et al., 2010). Chez *Methylosinus trichosporium (*une bactérie méthanotrophe), l'acquisition du cuivre est réalisée, en partie, grâce à la production d'une molécule chélatrice du cuivre, la méthanobactine (Mb). Ainsi, le complexe Cu-Mb est reconnu et importé par le transporteur MbnT (Balasubramanian et al., 2011; Gu et al., 2016).

Le métal doit ensuite franchir la membrane cytoplasmique et à ce stade, les bactéries à Gram positif et Gram négatif utilisent les mêmes types d'importateurs de métaux. La majorité se fait par les systèmes de transport de type ABC (ATP-binding cassette). Ces transporteurs sont composés de trois sous-unités : i) la sous-unité A, protéine de liaison au substrat nommée SBP (substrate binding protein). Chez les bactéries à Gram - la sous unité A est une protéine périplasmique, chez les Gram + elle reste associée à l'enveloppe, du côté extracellulaire ; ii) la sous-unité B, protéine transmembranaire, formant le canal assurant la traversée de la membrane. La sous-unité A présente et délivre le substrat à cette sous-unité ; et iii) la sousunité C, ATPase cytoplasmique, responsable de l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire à l'importation du métal à travers la membrane plasmique, associée à un remodelage de la sous-unité B qui ouvre le canal soit du côté externe soit du côté interne de la membrane (Hollenstein et al., 2007; Rees et al., 2009) (Figure 16). Par exemple, l'acquisition du zinc est assurée respectivement par les systèmes ZnuABC et AdcABC chez les bactéries à Gram - et Gram + (Bayle et al., 2011; Brett Moreau et al., 2018; Kandari et al., 2019; R. D. Perry et al., 2015). Paracoccus denitrificans possède deux systèmes ABC (ZnuABC et AztABCD) impliqués dans l'import du zinc (Durga P. Neupane et al., 2017; Durga Prasad Neupane et al., 2019).

Contrairement aux ABC-transporteurs, les transporteurs de type ZIP (*ZRT, IRT-like Protein*), retrouvés chez de nombreuses espèces, ont une faible affinité pour leurs substrats, mais ils présentent un spectre plus large dans le transport des métaux (zinc, fer, cadmium manganèse) (Guerinot, 2000). De nombreuses évidences montrent une action de concert du transporteur de type ZIP, ZupT, et du système ZnuABC pour le transport du zinc. En effet, tandis que les simples mutants de ces systèmes sont légèrement affectés, la double mutation $\Delta zupT$ - $\Delta znuABC$ a un impact sévère chez *E. coli* et *S. enterica* en milieu carencé de zinc (Cerasi et al., 2014; Gregor Grass et al., 2002). Chez *C. difficile,* la transcription de *zupT* est induite en présence de calprotectine et cet importateur confère un avantage lors de l'infection de souris (Zackular et al., 2020).


Figure 16. Organisation schématique et mécanisme d'import des métaux par les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*).

Ils sont composés de deux domaines transmembranaires (TMD – sous-unité B) et deux domaines ABC (fixation des nucléotides – sous-unité C). Deux conformations sont représentées.

- A gauche, une conformation ouverte vers l'extérieur, permettant de charger le substrat sur la face externe de la membrane, lorsque le nucléotide fixé est l'ATP. Une protéine de liaison du substrat (sous-unité A), soluble dans le périplasme chez les bactéries à Gram ou lipoprotéine liée à la membrane sur sa face externe chez les Gram +, fixe le substrat et le présente au transporteur.
- A droite une conformation ouverte vers l'intérieur, lorsque le nucléotide fixé est l'ADP, suite à l'hydrolyse de l'ATP. Cette conformation permet de délivrer le substrat dans le cytoplasme. La libération de l'ADP et la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP permettent de revenir à la première conformation et de recommencer un cycle d'import du substrat.

(d'après Rees et al., 2009)

Chez Mtb, une autre famille de transporteur de métaux a été identifiée. En effet, le gène *mntH* (*Rv0924c*) code une protéine de la famille Nramp1 (*natural resistance–associated macrophage protein 1*) capable de transporter divers métaux (Agranoff et al., 1999). Cependant, si la mutation de *mntH* affecte la croissance à faible concentration en Fer, elle n'affecte pas la virulence dans les macrophages ou chez la souris (Boechat et al., 2002; Domenech et al., 2002) et le rôle de ce transporteur n'est pas définitivement établi.

Des systèmes de transport secondaires de la famille NiCoT (*Nickel/Cobalt Transporter*), utilisant l'énergie de la force proton motrice, participent à l'importation des ions Ni²⁺ et Co²⁺. Les gènes codant ces perméases sont souvent trouvés en cluster avec des gènes impliqués dans le métabolisme du nickel ou du cobalt. HoxN de *Ralstonia eutropha* et NixA de *H. pylori* agissent comme des perméases sélectives de Ni²⁺, tandis que NhIF de *Rhodococcus rhodochrous* importe préférentiellement le Co²⁺ par rapport au Ni²⁺(Degen & Eitinger, 2002; Ma et al., 2009).



Figure 17. Modélisation de l'efflux du cuivre à travers l'enveloppe d'*E. coli* via le système de type « RND » CusABC.

Un trimère de CusA (protéine de type RND ; en orange) permet le passage du substrat à travers la membrane plasmique et l'énergisation par import d'un proton. Un trimère de protéine CusC (Outer Membrane Factor ; en vert) dans la membrane externe permet l'efflux du substrat à travers la membrane externe. La Membrane Fusion Protéine CusC (MFP ; en jaune) assure la liaison entre les composants RND et OMP. En bleu, le cuivre. (d'après Kim et al., 2011)

2.4.3. Systèmes d'export des métaux

Plusieurs familles de transporteurs sont capables d'assurer l'efflux des métaux hors du cytoplasme, afin de lutter contre leur toxicité à trop forte concentration.

2.4.3.1. Systèmes RND

Les transporteurs de type RND (*resistance nodulation cell division*) permettent l'efflux d'une large gamme de substrats (substances organiques, drogues, xénobiotiques, métaux, polypeptides). Deux sous-classes assurent respectivement l'efflux des composés hydrophobes et amphiphiles (HAE-RND) et le transport des métaux lourds (HME-RND, *heavy metal efflux RND*). De nombreux travaux sont publiés sur ces exportateurs et leur contribution dans la résistance aux antibiotiques des bactéries. Par exemple, *E. coli* possède cinq HAE-RND et une HME-RND (Anes et al., 2015). Les systèmes HME-RND dédiés à l'efflux d'ions monovalents ont été nommés Cus chez *E. coli* (assurant l'efflux de Cu⁺ et Ag⁺) (Franke et al., 2003) et ceux responsables de l'efflux d'ions divalents Czc chez *Cupriavidus metallidurans* (pour le Co²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺), ou encore Czn chez *H. pylori* (Cd²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺) (Stähler et al., 2006). Ces transporteurs sont des systèmes tripartites. Les protéines qui les composent sont notées CBA (CusCBA, CzcCBA) et s'organisent en un pore traversant l'enveloppe bactérienne (Figure 17).

La **partie A** (ou RND) est une pompe membranaire intégrée dans la membrane plasmique qui possède une partie hydrophile du côté périplasmique. Cette protéine possède 12 segments transmembranaires et s'assemble en trimères dans la membrane. Le transport médié par la pompe est de type « antiport » activé par la force protomotrice, consommant les protons du périplasme pour effluer les cations métalliques. La **partie C**, facteur de la membrane externe (ou OMF, *outer membrane factor*) est aussi une protéine trimérique. Elle est connectée à la pompe formant un canal à travers la membrane externe. Enfin, le dernier composant de ce système est une **protéine périplasmique B** (ou MFP, *membrane fusion protein*) qui vient stabiliser et maintenir le contact entre le complexe A-C (E. H. Kim et al., 2011). Les gènes de ces systèmes se trouvent en opéron, parfois associés à un quatrième gène. Ainsi, chez *E. coli*, CusF est une protéine chaperon périplasmique de 10 kDa fixant le cuivre. Son interaction avec CusB et CusC a été démontrée, en faisant un système tétrapartite (CusFCBA). Cette étude démontre que la détoxification du métal de la bactérie peut être effectué à la fois du (i) cytoplasme au milieu extérieur, mais aussi du (ii) périplasme vers le milieu extérieur

91

(Delmar & Yu, 2018; Long et al., 2010, 2012). Un système analogue permettant l'efflux du zinc a récemment été identifié chez le pathogène humain *A. baumannii* (Alquethamy et al., 2020).

2.4.3.2. Systèmes CDF

Ubiquitaire dans les trois règnes du vivant (bactéries, archées et eucaryotes), les CDF ou « *cation difusion facilitator* » forment une grande famille de transporteurs, plus précisément exportateurs de métaux divalents (Cd²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ et potentiellement Cu²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺) qui sont impliqués dans la tolérance et l'homéostasie métallique (Cubillas et al., 2014; Gregor Grass et al., 2005; Nies & Silver, 1995; Raimunda & Elso-Berberián, 2014; Rosch et al., 2009). Le premier de ces transporteurs décrits dans la résistance aux métaux fut CzcD chez *Cupriavidus metallidurans* (Paulsen & Saier, 1997). Comme pour les RND, les CDF fonctionnent en tant qu'antiporteurs grâce au couplage avec la force proton motrice. Ils sont composés d'un segment N-terminal, de six domaines transmembranaires et d'un long segment C-terminal de fonction encore inconnue. L'analyse de données phylogénétiques montre que ce segment C-terminal est absent chez certaines espèces bactériennes (Kolaj-Robin et al., 2015).

E. coli possède deux CDF, respectivement *zitB* et *yiiP*. YiiP est une protéine dimérique. Initialement nommée FieF pour son activité d'efflux de fer (*ferrous iron efflux*), YiiP permet également la tolérance aux ions zinc et cadmium. Pour sa part, ZitB permet l'efflux de zinc (G. Grass et al., 2001; Gregor Grass et al., 2005; Wei & Fu, 2005). Les délétions de *yiiP* et *zitB* n'affectent pas *E. coli* chez qui c'est la délétion du gène *zntA* (gène codant une ATPase de type P) qui confère une sensibilité au zinc. Toutefois, la double mutation de *zntA* et *zitB* exacerbe le phénotype de sensibilité au zinc, montrant la participation de cet exportateur à l'efflux de zinc (G. Grass et al., 2001). Ces résultats concordent avec une étude plus récente effectuée chez *S. typhimurium*. Les mutants $\Delta fieF$, $\Delta zitB$ et la souche WT poussent de manière comparable en présence de zinc dans le milieu. En revanche, le mutant $\Delta zntA$ devient sensible au zinc et le double mutant $\Delta zntA\Delta zitB$ l'est encore plus (K. Huang et al., 2018).



Figure 18. Topologie schématique d'une ATPase de type P_{1B}.

Les deux premiers segments transmembranaires (TM), pas conservés dans toute la famille sont notes A et B. Les six autres, conservés dans toute la sous-famille sont notés TM1 à TM6. Le substrat métallique interagit avec des résidus de TM4 et il est coordonné par interaction avec des résidus des TM5 et TM6. Des domaines de fixation du métal (HMBD) peuvent être retrouvés en N- et C-terminal.

A : domaine « actuator », avec le motif conservé TGE.

N : domaine de fixation de l'ATP (ATPBD).

P : domaine de phosphorylation. Le motif DKTGTXT, contenant l'acide aspartique phosphorylé (D) et universellement conservé dans ce domaine, est indiqué.

(d'après Sitsel et al., 2015)

2.4.3.3. Systèmes ATPases de type P

Une dernière famille de transporteurs sont impliqués dans l'efflux des métaux chez les bactéries, les ATPases de type P. Vu leur rôle majeur chez *M. tuberculosis*, et le fait qu'une d'entre elles soit l'objet de cette thèse, nous allons traiter ces transporteurs de manière plus approfondie dans la section suivante.

3. ATPases de type P

Ubiquitaires dans le monde vivant (des bactéries aux mammifères), les « ATPases de type P » (abrégées dans la suite en P-ATPases) forment une superfamille de protéines membranaires ayant une importance vitale dans l'homéostasie de divers composés. Les P-ATPase sont des protéines intrinsèques de la membrane, présentant 6 à 8 segments transmembranaires (TMA-B et TM1 à TM6) et un domaine de fixation et d'hydrolyse de l'ATP (ATPBD) fournissant l'énergie nécessaire au transport de leur substrat (Palmgren & Nissen, 2011). Même si elles ne présentent pas de fortes similarités au niveau de leurs séquences primaires, les P-ATPases se caractérisent par leur grande conservation topologique (Figure 18).

3.1. Organisation topologique des P-ATPases

Les queues N- et C-terminales sont tournées du côté cytoplasmique, excepté pour KdpB dont la partie C-terminale se trouve du côté extérieur de la membrane plasmique. Toutes les P-ATPases ont deux boucles cytoplasmiques : une petite (formant un domaine appelé A, pour *« Actuator »*) située entre les segments transmembranaires TM2 et TM3, et une plus grande entre les segments TM5 et TM6 (formant les domaines N et P, de liaison et hydrolyse de l'ATP). La partie cytoplasmique est plus imposante que la partie membranaire ce qui leur donne un aspect plus allongé. Cette structure de base est divisée en domaines fonctionnels et structurellement distincts : trois domaines cytoplasmiques (domaines A, N et P), et la partie intégrée dans la membrane plasmique (domaine T).

Le domaine A est connecté aux régions TM2-3 par des liaisons flexibles lui conférant une grande mobilité rotatoire. Il possède un motif consensus « TGE » (Thr-Gly-Glu) et une activité phosphatase.

Le domaine N de liaison nucléotidique prend en charge la liaison de l'ATP. Il a une activité kinase et permet la phosphorylation d'un résidu Asp du domaine P.

Le domaine P de phosphorylation, agit comme substrat pour les domaines A et P. On y trouve un motif conservé universel « DKTGT » (Asp-Lys-Thr-Gly-Thr) ou le résidu Asp (D) est phosphorylé au cours du mécanisme catalytique. Deux autres séquences sont également conservées dans ce domaine « TGDN » et « GDGXND ». Elles sont impliquées dans la coordination d'ions Mg²⁺ en même temps que la liaison de l'ATP.

Le domaine membranaire T de base est composé d'au minimum six segments transmembranaires (TMs). Il renferme le site de liaison du substrat transporté.

Chez certaines pompes, on trouve des segments TM supplémentaires dits accessoires, par exemple les P_{1B}-ATPases ont 8 TM, ou encore SERCA1a humaine possède 10 TM.

3.2. Classification des P-ATPases

Les P-ATPases sont réparties en sept grandes classes P₁-P₅ en fonction de leurs similarités de structure primaire, et sous-divisées en 11 sous-familles : 1A, 1B, 2A-2D, 3A, 3B, 4, 5 et les atypiques (Axelsen & Palmgren, 1998). Elles se différencient selon les motifs conservés au sein des hélices transmembranaires, eux-mêmes associés aux substrats qu'elles transportent.

P-ATPases de type 1 : la classe est divisée en deux sous-classes, les pompes de type IA et IB.

Les P_{1A}-ATPases sont des transporteurs de potassium K⁺ appelés KdpB, spécifiques des bactéries (Laimins et al., 1978). Elles font partie d'un système de plusieurs gènes *kdp*. Ils englobent deux opérons : *kdpDE* codent les protéines de régulation du système et *kdpFABC* codent les protéines du complexe de transport (Polarek et al., 1988). Parmi elles, KdpB catalyse l'hydrolyse de l'ATP et joue le rôle de P-ATPase tandis que KdpA forme le canal par lequel diffuse le cation potassium (C. S. Huang et al., 2017; Pedersen et al., 2019).

Les P_{1B}-ATPases sont retrouvés dans tous les domaines du vivant avec une forte prévalence chez les archées et bactéries. Chez les eucaryotes, elles sont impliquées dans l'adsorption, distribution et clairance des métaux. Les P_{1B}- bactériennes ont deux rôles principaux : fournir l'espace périplasmique en métaux (souvent Cu et Zn) pour la maturation des métalloenzymes et faire sortir les métaux cationiques monovalents (Cu⁺, Ag⁺) et divalents (Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Co²⁺) en cas d'intoxication (Palmgren & Nissen, 2011). Ces ATPases sont caractérisées par un ou plusieurs motifs riches en résidus Cys et/ou His impliqués dans la liaison des métaux lourds (HMBD, *heavy metal binding domain*) localisés en N- et C-terminal (J. M. Argüello, 2003).



Figure 19. Organisation schématique des sous-classes d'ATPases de type P_{1B}.

Les segments transmembranaires (TM) sont représentés par des cylindres. Les motifs strictement conservés dans le TM4 importants pour la reconnaissance et la fixation du métal sont indiqués. Le motif DKTGT strictement conservé dans le domaine de fixation de l'ATP (ATPBD, situé entre les TM4 et TM5) est indiqué. Des rectangles en N- ou C-terminal indiquent les domaines MBD retrouvés dans les sous-classes.

(d'après Smith et al., 2014)

Les sous-divisions de ce groupe sont basées sur la conservation de résidus des segments TM4, 5 et 6 conférant la sélectivité du métal et le lieu où se produit le transfert de métal (A. T. Smith et al., 2014) (Figure 19).

Les P_{1B-1}-ATPases transportent le Cu⁺ et également l'élément non-physiologique Ag⁺ (DiDonato & Sarkar, 1997; Fan & Rosen, 2002; Rensing et al., 2000). Les P_{1B-2} pompent le Zn²⁺ et les cations non-physiologiques Cd²⁺ et Pb²⁺ possédant des propriétés chimiques homologues (Banci et al., 2002, 2006; Eren & Argüello, 2004; Sharma et al., 2000; Yoon & Silver, 1991). Ces deux sous-groupes sont les plus étudiés. En revanche, d'autres tendent à émerger : les P_{1B-3} transportent le Cu²⁺ (Mana-Capelli et al., 2003; Schurig-Briccio & Gennis, 2012) ; les P_{1B-4}, le Co²⁺, Fe²⁺ et Ni²⁺ (Guan et al., 2015; Raimunda et al., 2012, 2014; Zielazinski et al., 2012). Les P_{1B-5} seraient des pompes de Ni²⁺ et Fe²⁺ dont la seule représentante a été identifiée chez S. meliloti et dénommée Nia (Traverso et al., 2010; Zielazinski et al., 2013). Il a été proposé que les P_{1B-6} seraient des importateurs de fer, d'une part par similarités de l'organisation de leur opéron avec ceux codant des systèmes d'import déjà connus (FeoABC) et d'autre part parce que des sites de liaison du régulateur Fur (ferric uptake regulator) ont été retrouvés au voisinage des promoteurs des gènes codant certaines de ces P-ATPases (Cartron et al., 2006; H. Kim et al., 2012). Un nouveau motif CSC dans le TM4 de l'espèce S. epidermitis formerait la signature du sous-groupe P_{1B-7}-ATPases. Enfin, il reste des pompes encore non-classées, qui doivent être mieux étudiées pour affiner leur classification.

P-ATPases de type 2 et 3 : elles permettent le transport des cations H⁺ et des métaux alcalins et alcalino-terreux Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺.

Le Ca²⁺ est le substrat des P_{2A}- et P_{2B}-ATPases (dont SERCA1a) retrouvées sur les membranes du réticulum sarcoplasmique et de la membrane plasmique, respectivement. Le potentiel membranaire des cellules animales (Na⁺/K⁺ et H⁺/K⁺) est maintenu par les pompes P_{2C}- et celui des plantes et champignons par le sous-groupe des H⁺-P_{3A}-ATPases. Enfin, le Mg²⁺ est pris en charge par des pompes de type P_{3B}-ATPases.

P-ATPases de type 4 et 5 : ces pompes, mises en évidence chez les organismes eucaryotes, semblent être impliquées dans le transport de composés plus complexes.

Les P₄-ATPases plus communément retrouvées sous le nom de flippases prennent en charge le transport de lipides, comme par exemple la phosphatidylserine et la phosphatidylcholine, au sein des cellules eucaryotes (Daleke, 2007; Lenoir et al., 2007).

Les P₅-ATPases sont uniquement retrouvées dans les membranes des eucaryotes et leurs substrats sont longtemps restés inconnus. La P_{5A}-ATPases Spf1p de *S. cereviae* et son



Figure 20. Cycle réactionnel de type Post-Albers des P1_B-ATPase.

Le cycle réactionnel passe par deux conformations de l'ATPase (E1 et E2).

- Etat E1 : le canal de transport du substrat est ouvert vers la face cytoplasmique de la membrane plasmique. L'ion métallique (vert) cytoplasmique atteint un site de forte affinité enfoui au sein de la membrane et la protéine fixe l'ATP sur son domaine de fixation de l'ATP (N, rouge), formant E1-ATP. L'hydrolyse de l'ATP transfert un phosphate de l'ATP sur un acide aspartique conservé du domaine de phosphorylation (P, bleu), formant l'état E1P-ADP. La libération de l'ADP s'accompagne d'un changement de conformation ouvrant le site de transit du métal vers la face extérieure de la membrane, l'état E2
- Etat E2 : le métal est libéré vers l'extérieur, et la déphosphorylation de l'acide aspartique donne l'état transitoire E2-Pi. La libération du phosphate inorganique (Pi) donne l'état E2. Enfin, l'isomérisation en état E1 permet de reprendre le cycle d'export du substrat.
 (Sitsel et al., 2015)

homologue humaine ATP13A1 sont localisées au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, tandis que les P_{5B}-ATPases Ypk9p (*S. cereviae*) et ATP13A2 (homologue humaine) ont respectivement une localisation vacuolaire et lysosomale. ATP13A1 interagit avec le cholestérol (Hulce et al., 2013) et ATP13A2 est activé par le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) (Sørensen et al., 2019). Le groupe des P₅-ATPases semble être impliqué dans l'homéostasie et le transport des stérols (Sørensen et al., 2010, 2015, 2019).

Chez l'homme, des mutations dans les gènes codant des P-ATPases sont à l'origine de maladies. En effet, elles provoquent des dérégulations notamment des P_{1B} -ATPases ATP7A et ATP7B responsables des maladies de Menkes et Wilson, respectivement. La maladie de Menkes est due à l'inactivation de ATP7A. Celle-ci, ubiquitaire, n'assure plus sa fonction et n'exporte plus correctement le cuivre, vital aux métalloprotéines. Elle est caractérisée par une déficience généralisée en cuivre et notamment au niveau du cerveau entrainant des dégénérescences neurologiques et retards de développement (Agertt et al., 2007). La localisation principalement hépatique d'ATP7B, impliquée dans la maladie de Wilson, engendre une surcharge de cuivre dans le foie (normalement évacué dans la bile par ce transporteur). Les conséquences sont d'abord hépatiques avec l'évolution d'hépatite chronique vers le stade de cirrhose, puis le cerveau est susceptible d'être atteint provoquant des démences. Des mutations dans la P_{5B} -ATPase ATP13A2 sont retrouvées chez des patients atteints d'une forme de maladie de Parkinson juvénile génétique (PARK9) ou autrement nommée syndrome de Kufor-Rakeb (Ramirez et al., 2006).

3.3. Mécanisme catalytique des P-ATPases

Les « ATPases de type P » utilisent l'énergie de l'ATP pour le transport de cations, métaux de transition et lipides (Skou, 1957). L'hydrolyse de l'ATP est couplée à la phosphorylation transitoire d'un acide aminé aspartate (Asp) conservé. Le cycle réactionnel met en œuvre deux états conformationnels principaux (E1 et E2) entre lesquels la protéine bascule en fonction de la liaison du substrat et de la liaison/hydrolyse de l'ATP (Figure 20).

Les structures et mécanismes sont de mieux en mieux compris grâce aux résolutions de structures cristallographiques de ces pompes. La première fut celle de la Ca²⁺-ATPase de type P2 humaine, SERCA1a (« sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 1a ») (Toyoshima et al., 2000). De plus, les structures cristallographiques à hautes résolutions des Cu⁺- et Zn²⁺-ATPases, mises en évidence chez les bactéries *Legionella pneumophila* et *Shigella sonnei* respectivement, ont aussi contribué à la compréhension du cycle catalytique



Figure 21. Structure tridimensionnelle de la P-ATPase à cuivre CopA de *Legionella pneumophila.*

Les domaines de fixation de l'ATP (N, rouge) d'hydrolyse de l'ATP et transfert du phosphate sur un acide aspartique conserve (P, bleu foncé) et de déphosphorylation/activation ("Actuator", A, jaune) ainsi que les segments transmembranaires (T, bleu clair) sont montrés. La position approximative du domaine de liaison au métal (H) est schématisée par une sphère bleu [PDB ID <u>3RFU]</u>.

(d'après Mattle et al., 2013)

des ATPases de type 1B (Gourdon et al., 2011; K. Wang et al., 2014) (Figure 21).

Deux états conformationnels (E1 et E2) différents sont impliqués dans le cycle catalytique ou cycle « Post-Albers » (Figure 20). Sous la forme E1, le site de liaison de l'ion est ouvert face au cytosol. Les liaisons des ions Mg²⁺ et de l'ATP provoquent une topologie E1-ATP plus compacte et un déplacement du domaine N ; parallèlement, l'ion à transporter se fixe dans son site de liaison du domaine T. Ce déplacement va amener l'ATP au contact du domaine P et plus précisément au niveau de l'Asp qui s'auto-phosphoryle (E1-ATP \rightarrow E1P-ADP). L'énergie libérée par l'autophosphorylation du résidu aspartate déclenche un réarrangement conformationnel majeur de la protéine et le passage de la forme E1P vers E2P (E2P-ADP). Ce changement se traduit par une rotation de 90° du domaine A ayant pour conséquence l'ouverture d'un canal de sortie de l'ion, de l'autre côté de la membrane. Consécutivement, l'ADP se détache de E2P et l'ion transporté est libéré au niveau extracellulaire. Une fois le cation libéré, l'occlusion du canal s'effectue ainsi que la déphosphorylation. Le phosphate inorganique (Pi) est libéré et l'état entièrement déphosphorylé (E2) entraine le relâchement de la protéine, les domaines A et P se détachent : la protéine retrouve son état E1 est peut recommencer un nouveau cycle(José M. Argüello et al., 2012, 2016; Dyla et al., 2019; Mattle et al., 2013; Novoa-Aponte et al., 2012; Palmgren & Nissen, 2011; K. Wang et al., 2014).

3.4. Domaine de liaison des métaux

Typiquement, les P_{IB}-ATPases impliquées dans l'homéostasie métallique possèdent des domaines de fixation de métaux (MBDs, *metal binding domains*) de 60 à 70 acides aminés situés généralement aux extrémités N- et/ou C-terminales des transporteurs. Ces domaines présentent des organisations de motifs similaires aux ferredoxines ou à la cupredoxine de *S. pneumoniae* (Fu et al., 2013). D'après les structures cristallographiques, les Cu⁺- et Zn²⁺- P-ATPases partagent une architecture similaire pour lesquelles un ou des MBDs sont situés du côté N-terminal. Un repliement caractéristique des ferredoxines en motifs « $\beta \alpha \beta \beta \alpha \beta$ » et une signature consensus CXXC (ou X désigne tout résidu acide aminé) de liaison du métal y sont retrouvés. Le motif CXXC est prépondérant dans la sous-classe P_{IB-1} (liaison du Cu⁺). Chez les P_{IB2}- on peut retrouver ce même motif, ou bien des répétitions de résidus susceptibles d'être impliqués dans la fixation de métal comme His, Cys, Met, Asp, Glu. La Zn²⁺-ATPase d'*E. coli* ZntA (EcZntA) suggère que la coordination du Zn²⁺ est renforcée par la présence d'un Asp (D) juste avant cette séquence (DCXXC) (José M. Argüello et al., 2007; Banci et al., 2002; Eren et al., 2007).

S'ils sont requis pour une activité optimale des transporteurs, ces domaines ne sont toutefois pas strictement essentiels à leur fonction. Par exemple, la fonctionnalité des Cu⁺- et Zn²⁺-ATPases est conservée malgré des changements dans leur N-MBD (González-Guerrero & Argüello, 2008; Gourdon et al., 2011). Le changement CXXC → SXXS de la partie N-MBD d'EcZntA diminue sans l'abolir l'activité de l'enzyme. L'étape de phosphorylation est affaiblie tandis que la déphosphorylation est accélérée dans le mutant SXXS révélant une déstabilisation de l'enzyme (B. Mitra & Sharma, 2001; Okkeri & Haltia, 2006). De même, la P_{1B-3}-ATPase d'Archeoglobus fulgidus CopB (AfCopB) transportant le Cu²⁺ voit son activité diminuée mais pas abolie lorsque son extension N-terminale riche en résidus His (His-N-MBD) est tronquée. Dans ce cas, c'est la cinétique de déphosphorylation de la P-ATPase qui est ralentie (Mana-Capelli et al., 2003). La P_{1B-1}-ATPase CopA du même organisme (AfCopA) possède un N- et un C-MBD. En tronquant ces deux domaines (AN,C-AfCopA), Gonzàles-Guerrero et coll. ont montré que (i) l'activité Cu⁺ATPasique de Δ N,C-AfCopA est conservée par rapport à AfCopA ; et par un modèle « indirect » que (ii) les ions cuivre fixés aux N- et C-MBD d'AfCopA ne permettent pas d'activer le transport et ne sont pas transférés au site de liaison du cuivre de la partie transmembranaire (TM-MBD) (González-Guerrero & Argüello, 2008).

3.5. Concept de métallochaperons

Vers la fin des années 90s, de nouveaux acteurs du trafic intracellulaire des cations métalliques ont été identifiés. Ces protéines sont capables de fixer des ions métalliques mais, à la différence des protéines de stockage de métaux, elles peuvent présenter le métal qu'elles ont fixé à d'autres protéines qui vont soit l'incorporer dans leur structure soit le transporter. Elles ont été appelées « métallochaperons » par analogie avec les chaperons moléculaires aidant au repliement des protéines. Considérées comme protéines « navettes » ou « bergers », elles lient le métal ou cofacteur métallique, l'amènent et le délivrent à une apoenzyme spécifique. Leur fonction première est d'assurer et favoriser la maturation de ces protéines et donc stimuler leur activité. Par ailleurs, un sous-ensemble de métallochaperons semble être dédié à la circulation des cations métalliques dans les cellules. On différenciera l'implication de ces protéines dans leur rôle de maturation protéique d'une part, et dans le trafic métallique, d'autre part.

3.5.1. Métallochaperons et maturation protéique

Une sous famille de métallochaperons est nécessaire à la maturation des métalloenzymes en délivrant le métal directement dans le site actif de l'enzyme. Une partie de ces protéines utilisent l'énergie du cofacteur nucléotidique GTP pour faciliter le transfert du métal lors d'interactions protéine-protéine (Nim & Wong, 2019). Par exemple, de tels métallochaperons énergie-dépendants sont impliqués dans la maturation des enzymes à Fe, Co, Ni (Capdevila et al., 2017). C'est le cas de HypB et UreG, deux chaperons appartenant à la famille des GTPases G3E à boucle P. HypB délivre des ions nickel aux hydrogénases et UreG aux uréases (Higgins, 2019). Le métallochaperon HypB d'E. coli contribue à la maturation de la [NiFe]-hydrogénases impliquées dans le métabolisme de l'hydrogène, essentiel à la physiologie anaérobie. En plus d'HypB et de son activité GTPase, deux autres chaperons sont nécessaires pour l'insertion du nickel dans le site actif enzymatique : HypA et SlyD (Chan Chung & Zamble, 2011; Lacasse & Zamble, 2016; Sargent, 2016). Le pathogène gastrique Helicobacter pylori est responsable d'ulcères et est à l'origine de cancers de l'estomac. Au cours de l'infection par H. pylori, la maturation des hydrogénases et uréases à Ni²⁺ est essentielle pour la pathogénicité (McGee et al., 1999; Nim & Wong, 2019). HpHypA et HpHypB stimulent la maturation des [NiFe]-hydrogénases, requises pour la colonisation de l'estomac. Quatre protéines accessoires dont UreG délivrent les ions nickel au site actif de l'uréase, une enzyme indispensable pour contrer l'acidité gastrique. UreG possède un domaine GTPase nécessaire à l'insertion du nickel (Soriano & Hausinger, 1999). De manière intéressante, il a été montré qu'HpHypAB interviennent (indirectement) dans la maturation de l'uréase par transfert d'ions nickel entre les protéines HypA et UreE (Benoit et al., 2007; Nim & Wong, 2019; Olson et al., 2001; Sargent, 2016).

Le chaperon CueP, fixant le cuivre périplasmique chez *S. enterica*, participe à la résistance face au stress oxydatif en alimentant l'enzyme SodC par l'apport d'ions cuivre (Osman et al., 2010, 2013)

3.5.2. Métallochaperons et trafic métallique

Un sous-ensemble de métallochaperons bactériens est impliqué dans le transport des ions métalliques. Leur rôle a été mis en évidence dans le trafic du cuivre. Des homologues bactériens des métallochaperons eucaryotes ont d'abord été identifiés chez *B. subtilis* et *Enteroccus hirae*. Ce sont des polypeptides d'environ 70 acides aminés possédant des motifs de liaison du métal de type ferrédoxine ou cupredoxine, similaires à ceux retrouvés dans les



Figure 22. Modélisation de l'organisation d'un transporteur de cuivre à travers la membrane cytoplasmique.

Les structures cristallines des protéines CopZ d'*Enterococcus hirae* (PDB entry 1CPZ ; orange) et CopA de *Legionella pneumophila* (PDB entry 3RFU) sont représentées, en association à la membrane plasmique. Les domaines « actuator » (A, jaune), de fixation de l'ATP (N, rouge) et de phosphorylation (P, bleu) de CopA sont indiqués. Les segments transmembranaires A et B (gris clair) et TM1-TM6 (gris foncé) de CopA sont indiqués. La plateforme de liaison de la métallochaperon formée à la base du TM B est indiquée en orange. (d'après Argüello et al., 2016)

MBD des P_{1B}-ATPases. Différents rôles dans le métabolisme du cuivre ont pu être assignés à ces protéines.

- (I) Dès l'entrée du Cu⁺ dans les bactéries, le métal est lié par les chaperons qui limitent sa toxicité en diminuant la concentration de Cu⁺ libre. Ainsi, ils jouent le rôle de protéines « tampon » dans le cytoplasme et/ou le périplasme quand les niveaux de cuivre sont faibles.
- Une fois le métal fixé, ces protéines spécialisées le présentent à d'autres protéines, qui peuvent être soit des exportateurs soit des régulateurs transcriptionnels dépendants du métal (Multhaup et al., 2001; Radford et al., 2003).

Les gènes codant ces protéines chaperons sont souvent retrouvés en opéron avec ceux des régulateurs transcriptionnels et des systèmes de transport. L'interaction entre chaperons et transporteurs a été mise en évidence pour de nombreux systèmes. Le chaperon CusF d'*E. coli* fixe le Cu⁺ périplasmique, extrudé du cytoplasme par CopA (Padilla-Benavides et al., 2014), puis interagit avec CusB, du système CusCBA, qui l'expulse vers le milieu extérieur (Franke et al., 2003; Loftin et al., 2005).

Des métallochaperons ont également été retrouvés associés à des P_{1B}-ATPases.

3.6. Interactions métallochaperons/P_{1B}-ATPases

Les études de protéines chaperons CopZ et des Cu⁺-ATPases CopA de B. subtilis (BsCopZ), L. pneumophila (LpCopA), et A. fulgidus (AfCopZ et AfCopA) ont confirmé l'interaction entre ces protéines. En utilisant une technique de double-hybride bactérien, Radford et coll. ont montré que BsCopZ est capable d'interagir in vivo avec la partie N-terminale de BsCopA (Radford et al., 2003). Plus tard, la structure tridimensionnelle de LpCopA a précisé la nature des interactions. Gourdon et coll. ont mis en lumière la formation d'une plateforme générée par la partie N-terminale de l'hélice transmembranaire B (TMB) (Figure 22). Deux résidus Glycine (Gly¹²⁹ et Gly¹³⁰) permettent un pli de l'hélice transmembranaire, l'exposant au cytosol où elle sert de plateforme d'amarrage pour une protéine chaperon chargée de cuivre, Cu⁺-CopZ (Gourdon et al., 2011). Cette hypothèse a ensuite été confirmée par l'étude du système AfCopZ-AfCopA. Le transfert du cuivre de CopZ vers CopA a été démontré, et l'interaction entre ces deux protéines n'est possible qu'avec CopZ préalablement chargée de cuivre (Cu⁺-CopZ) (González-Guerrero & Argüello, 2008). La protéine chaperon seule, apo-CopZ, n'interagit pas avec CopA, suggérant une complémentarité conformationnelle particulière obtenue après fixation d'ions Cu⁺ (Banci et al., 2003). Les surfaces engagées dans l'interaction entre transporteur et chaperon possèdent des affinités électrostatiques avec des résidus



Figure 23. Modélisation des interactions entre une P-ATPase à cuivre et un métallochaperon soluble.

A. Potentiels électrostatiques de surface de AfCopA (*Archeoglobus fulgidus*) déduit de la modélisation de structure obtenue en prenant LpCopA (*Legionella pneumophila*) comme matrice. Les acides aminés chargés positivement et négativement sont indiqués respectivement en bleu et rouge. Une plateforme de fixation potentielles d'un métallochaperon est indiquée. (d'arpès Padilla-Benavides et al., 2013)

B. Interaction entre un métallochaperon et une P-ATPase à Cu. Potentiels électrostatiques de surface de prédits pour le métallochaperon AfCopZ et la P-ATPase AfCopA d'*Archeoglobus fulgidus*. Les acides aminés chargés positivement et négativement sont indiqués respectivement en bleu et rouge. (d'après Argüello et al., 2012)

électropositifs sur CopA et électronégatifs sur CopZ (Arnesano et al., 2002; Banci et al., 2009) (Figure 23). La substitution en Alanine de ces acides aminés sur CopA (K145A/S149A/R152A/R153A/R154A) ou sur CopZ, altère le fonctionnement du système Cu⁺-AfCopZ/AfCopA (Padilla-Benavides, McCann, et al., 2013).

Les travaux décrits ci-dessus portaient sur des chaperons à cuivre cytosoliques, pouvant librement diffuser dans le cytoplasme et interagir avec une Cu-ATPase au niveau membranaire. Récemment, une étude de la Cu-ATPase CopA et sa chaperon associée CupA, formant un système de résistance au cuivre du pathogène respiratoire *Streptococcus pneumoniae*, a mis en évidence un nouveau type de protéine chaperon (Fu et al., 2013). En effet, SpCupA diffère des métallochaperons cytosoliques décrits précédemment car elle possède un motif de liaison à la membrane dans sa partie N-terminale. Fu et coll. ont donc identifié une protéine métallochaperon à cuivre ancrée dans la membrane capable de transférer le métal vers le MBD de SpCopA. De manière intéressante, ce dernier n'est pas essentiel à la fonction de SpCopA et suggère que SpCupA, comme CopZ, pourrait transférer le métal aussi directement vers les TM4-6 (*metal-binding site*). De plus, ils ont observé 1) que le mutant $\Delta copA$ et 2) que la localisation membranaire de SpCupA est indispensable à la résistance au cuivre. Ces résultats suggèrent un rôle particulier pour la protéine SpCupA, qui n'est pas partagé avec les chaperons solubles.

En plus des métallochaperon à cuivre, des chaperons à zinc ont aussi été mis en évidence. Par exemple, AztD est une protéine soluble dans le périplasme de *Paracoccus denitrificans*, capable de fixer plusieurs ions Zn²⁺ et de les transférer à AztC, une sous-unité du complexe AztABC, importateur de zinc (Handali et al., 2015). De même, les protéines ZinT retrouvées chez les pathogènes humains *E. coli* O157:H7 (Gabbianelli et al., 2011), *S. enterica* (Ilari et al., 2014; Petrarca et al., 2010) et des végétaux *Agrobacterium tumefaciens* (Chaoprasid et al., 2016) participent à l'acquisition du zinc en interagissant avec la sous-unité ZnuA du système ZnuABC.

A ce jour, aucun métallochaperon à zinc impliqué dans sa circulation cytoplasmique ou son efflux en condition d'intoxication n'a été identifié.

4. Mtb et P-ATPases

Le génome de *M. tuberculosis* contient 12 gènes codant des P-ATPases : les 11 gènes *ctp* (*cation transporting protein*), *ctpA-J* et *ctpV*, et *kdpB* (Novoa-Aponte & Soto Ospina, 2014). Ces ATPases permettent le transport de nombreux substrats métalliques.

- KdpB (Rv1030) appartient à la famille IA et transporte l'ion K⁺ (Cholo et al., 2006).
- Comme pour d'autres bactéries pathogènes, plusieurs P_{IB-1}-ATPases seraient dédiées au transport du cuivre. La pompe CtpV est codée par *Rv0969*, membre de l'opéron *csoR*-(*Rv0967-Rv0970*) dont l'expression est contrôlée par le répresseur transcriptionnel CsoR et dé-réprimée en présence de cuivre (T. Liu et al., 2007). La perte de CtpV rend Mtb plus sensible à une très forte concentration en cuivre et diminue la virulence de Mtb chez le cochon d'Inde (Ward et al., 2010). Par homologie de séquences, deux autres gènes sont prédits pour coder des transporteurs du cuivre : *Rv0092/ctpA* et *Rv0103c/ctpB*. Alors que les activités Cu⁺-ATPasique de CtpA et CtpB ont été démontrées, le mutant ∆*ctpB* n'est pas sensible et n'accumule pas de cuivre (Kumar et al., 2011; León-torres et al., 2020; León-Torres et al., 2015; Ward et al., 2010).
- CtpC/Rv3270 est produit en présence de zinc, son inactivation rend Mtb sensible au zinc (Botella et al., 2011). Bien que CtpC soit associé au type IB et porte un motif de liaison au métal CPC caractéristique sur le TM4, on ne retrouve pas les signatures des TM des ATPases de type P_{IB-1} et P_{IB-2}. De manière atypique, les résidus conservés des TM6 et 7 ne sont pas retrouvés et CtpC ne possède pas non plus de MBD typique en N- ou C-terminal (Novoa-Aponte et al., 2012).
- Le régulateur CmtR contrôle l'expression de l'opéron *cmtR-Rv1993c-Rv1992c* (Chauhan et al., 2009; Yun Wang et al., 2005). Parmi ces gènes, *Rv1992c* code CtpG une pompe d'efflux à large spectre, dont principalement le Cd²⁺ (M. López et al., 2018).
- Initialement étudiées dans le transport du Co²⁺ et Ni²⁺ (Raimunda et al., 2012, 2014), les pompes CtpD et CtpJ (respectivement Rv1469 et Rv3743c) semblent nécessaires pour la détoxification du Co²⁺ et du Fe²⁺ (Patel et al., 2016).
- Des données obtenues chez *M. smegmatis* indiquent que CtpE fait partie des P-ATPases de type 2 à Ca²⁺ (Gupta et al., 2017). De même, le mutant ∆*ctpF* chez Mtb indique que CtpF (Rv1997) est associé au transport du Ca²⁺ (Maya-Hoyos et al., 2019; Santos et al., 2019). CtpF est impliqué dans la virulence de Mtb et l'adaptation en condition hypoxique. En effet, il est régulé par DosR, régulateur principal de l'adaptation de Mtb aux conditions pauvres en O₂.
- Les gènes *Rv0425c* et *Rv0107c* codent CtpH et CtpI, deux P-ATPases atypiques, car de plus grande taille que les autres, dont les substrats n'ont pas été identifiés.

Les gènes de trois P-ATPases, CtpV, CtpG et CtpC sont organisés en opéron avec un gène codant une protéine de petite taille (environ 93 acide aminés), présentant une faible similarité avec des protéines chaperons. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la suite de la découverte du rôle du zinc dans le dialogue moléculaire entre Mtb et son hôte, afin de mieux comprendre le fonctionnement de la P-ATPase CtpC et en particulier le rôle de la protéine Rv3269, codée en opéron avec CtpC.

RESULTATS

<u>Chapitre 1 :</u> Développement d'un outil génétique pour la construction de mutants stables et non marqués chez les mycobactéries

La construction de mutants bien définis est une étape essentielle pour les études génétiques des microorganismes. En particulier, des délétions précises et stables permettent d'étudier l'effet de la perte de fonction de gènes d'intérêt. Au laboratoire, pour construire des mutants nous utilisons en routine une technique dite de recombineering, qui permet de remplacer la séquence d'un gène d'intérêt par une cassette de résistance à un antibiotique (van Kessel et al., 2008). Toutefois, le nombre de cassettes de résistance utilisables chez les mycobactéries reste limité, ce qui peut poser problème lorsqu'on désire construire des mutations multiples dans une même souche. De plus, pour des raisons de biosécurité, les souches recombinantes de bactéries pathogènes ne doivent pas porter de résistances aux antibiotiques lorsqu'on les utilise pour tester de nouveaux produits thérapeutiques. L'utilisation de cassette de résistance excisables, c'est-à-dire entourées de sites de recombinaison permettant leur délétion contrôlée, est un moyen de résoudre ce problème. Parmi les différents types de cassettes excisables, celles flangués de sites nommés dif, naturellement présents sur les chromosomes bactériens et reconnus par des recombinases spécifiques, appelées XerC et XerD chez Escherichia coli (Castillo et al., 2017), sont des outils simples et efficaces, capables de fonctionner chez de nombreuses espèces bactériennes. En effet, les recombinases XerC et XerD, naturellement présentes dans les cellules, peuvent spontanément exciser du chromosome une cassette de résistance flanquée de deux sites dif en répétition directe. Cette technologie génétique a été nommée Xer-cise (Bloor & Cranenburgh, 2006). Les mycobactéries possèdent un site dif sur leur chromosome reconnu par des recombinases XerC et XerD homologues à celles d'E. coli (Cascioferro et al., 2010).

Nous avons adapté la technologie Xer-cise, afin de l'utiliser chez les mycobactéries. De plus, dans le but de construire des mutants multiples les plus stables possible, il faut éviter d'installer plusieurs sites *dif* sur un même chromosome bactérien car la recombinaison dépendante de XerC et XerD entre ces sites pourrait générer des remaniements chromosomiques. Pour cela, nous avons mis à profit les connaissances détaillées obtenues sur le mécanisme de recombinaison par XerC et XerD (Grindley et al., 2006). Nous avons construit une série de cassettes de résistance à la zéocine, flanquées de variants du site *dif* de *M. tuberculosis*. Ces variants ont été conçus de telle manière qu'ils soient toujours capables de recombiner avec

117

un site identique, afin de réaliser l'excision de la cassette, mais qu'ils ne puissent plus recombiner, ni avec le site sauvage (toujours présent sur le chromosome des mutants) ni avec les autres variants, si on construisait des mutants multiples. Nous avons pu valider ces adaptations de la technologie Xer-cise chez les mycobactéries *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, en construisant des mutants multiples. Le design des cassettes excisables que nous avons construites permet en outre de générer des mutantos non-polaires, afin de déléter un gène dans un opéron sans perturber l'expression des gènes en aval. Cette propriété nous a en particulier permis de construire une mutation du gène *Rv3269* qui n'abolit pas l'expression du gène *ctpC*, situé plus en aval dans le même opéron (voir chapitre 2.1 ; Figure 24).

Ces travaux ont été décrits dans une publication dans la revue *Biotechniques*, formant la suite de ce chapitre : Boudehen Y-M, Wallat M, Rousseau P, Neyrolles O, Gutierrez C. (2020) An improved Xer-cise technology for the generation of multiple unmarked mutants in Mycobacteria. *Biotechniques* **68**(2):106-110. doi:10.2144/btn-2019-0119.

Benchmarks

BioTechniques[®]

An improved Xer-cise technology for the generation of multiple unmarked mutants in Mycobacteria

Yves-Marie Boudehen¹, Maximilian Wallat¹, Philippe Rousseau², Olivier Neyrolles¹ & Claude Gutierrez^{*1}

ABSTRACT

Xer-cise is a technique using antibiotic resistance cassettes flanked by dif sites allowing spontaneous and accurate excision from bacterial chromosomes with a high frequency through the action of the cellular recombinase XerCD. Here, we report a significant improvement of Xer-cise in Mycobacteria. Zeocin resistance cassettes flanked by variants of the natural Mycobacterium tuberculosis dif site were constructed and shown to be effective tools to construct multiple unmarked mutations in M. tuberculosis and in the model species Mycobacterium smegmatis. The dif site variants harbor mutations in the central region and can therefore not recombine with the wild-type or other variants, resulting in mutants of increased genetic stability. The herein described method should be generalizable to virtually any transformable bacterial species.

METHOD SUMMARY

*dif-*Zeo^R-*dif* cassettes are used to replace non-essential genes in mycobacterial genome through recombineering. Spontaneous excision of the cassette is carried out under the action of the recombinase XerCD, resulting in unmarked deletions. Subsequent rounds of mutagenesis using cassettes flanked by a range of *dif* site variants allow construction of multiple mutants in which the different *dif* sites cannot recombine with each other, yielding stable genetic constructs.

KEYWORDS

dif site • excisable cassette • mutagenesis • *Mycobacterium* • recombineering • unmarked deletions • Xer-cise

¹Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 205 route de Narbonne, F-31400 Toulouse, France; ²Centre de Biologie Intégrative de Toulouse (CBI-Toulouse), Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires (LMGM), Université de Toulouse, CNRS, UPS, F-31400 Toulouse, France; *Author for correspondence: claude.qutierrez@ipbs.fr

BioTechniques 68: 00-00 (February 2020) 10.2144/ btn-2019-0119 Genetic studies of bacterial evolution and physiology require efficient and reliable tools for the construction of specific gene deletion mutants. A range of tools are available to manipulate Mycobacteria, such as Mycobacterium tuberculosis, the etiologic agent of tuberculosis. In particular, the development of recombineering has been a considerable improvement over previous methods [1]. This technique allows replacement of a specific gene by an antibiotic resistance cassette through homologous recombination between linear DNA fragments, so-called allelic exchange substrates (AES) and chromosomal DNA catalyzed by RecET-like mycobacteriophage proteins gp60 and gp61 (Figure 1D). However, only a limited number of selectable marker genes are available for mycobacteria [2] and, for safety reasons, strains used for medical studies must not carry resistance to multiple antibiotics.

One way to overcome these problems is to use excisable cassettes that can be removed by recombination between two specific sites repeated at both sides of the cassette. The so-called Xer-cise technique is a convenient way to achieve auto-excision, because the recombination between two deletion-induced filamentation (dif) sites is catalyzed by the XerCD recombinase present and active in most bacterial species, as it is required for chromosome maintenance [3]. Xer-cise has been adapted to Mycobacteria and shown to be efficient both in M. tuberculosis and in the fastgrowing model species Mycobacterium smegmatis [2,4,5]. However, these studies used the wild-type dif sequence of Mycobacteria [4,6], leading to two possible drawbacks. First, XerCDmediated recombination may occur between the dif sites on the AES and the endogenous chromosomal dif site, which

may generate false positives during the selection of antibiotic resistant recombinant clones. Second, after completion of the recombination events, the presence of several copies of the *dif* site on the bacterial chromosome may be deleterious because recombination between these sites may generate deletions or inversions on the chromosome, depending on the relative orientation of the *dif* sites [7].

Here, we report an improvement of the Xer-cise technique in Mycobacteria. We designed and validated a set of variants of the natural *M. tuberculosis dif* site (Table 1) that can recombine with another copy of the same sequence, prompting excision of the antibiotic resistance cassette, but should recombine neither with the wild-type nor with the other variant *dif* sites, yielding stable, unmarked multiple mutants.

DIF SITE VARIANTS

dif sites have been identified in M. tuberculosis and M. smegmatis [4,6]. The minimal site is 28-bp long, with a XerCbinding left arm, a XerD-binding right arm and a 6-bp central region (Table 1). The mechanism of XerCD-mediated recombination has been well described in Escherichia coli [8,9]. It involves the formation of a synaptic complex gathering two dif sites in a head-to-tail conformation inside a XerCD hetero-tetramer. The two XerD protomers create single-strand cleavage on each dif site, at the border of the central region, then promote strand transfer at the equivalent positions of the other site, leading to a Holliday junctioncontaining intermediate. By analogy with other site-specific recombinases of the Y-recombinase family [8], efficient strand transfer requires that the first two to three nucleotides of the central region can pair. Indeed, recombination between sites with heterologous central region is inefficient [10,11]. After isomerization of the

Benchmarks



intermediate, XerC protomers cleave both dif partners on the other side of the central region and transfer the second pair of strands by the same mechanism, allowing resolution of the intermediate and completion of the reaction. Both steps of reciprocal strand transfer require complementary sequences in the two recombination partners. Therefore, concerted modifications of the first two nucleotides on both sides of the central region result in dif site variants that are still able to recombine with an identical site, because complementarity is conserved, but not with the wild-type sequence with which base pairing at the border of the central region is no longer possible. Four variants, named dif4 to dif7, were designed following this rationale (Table 1). These variants should not be able to recombine with each other, allowing construction of stable strains carrying multiple variants in their genome. Using specific oligonucleotides (Table 2) and plasmid pGET-Zeo^R as a template, we amplified by PCR a set of Zeocin-resistance cassettes [12] flanked by the four variants of the *dif* site (Figure 1A).

STRATEGY TO CONSTRUCT UNMARKED DELETED MUTANTS

To delete a gene of interest, ~500-bp-long regions of homology corresponding to the flanking upstream and downstream sequences were amplified by PCR using oligonucleotides that introduce sequences overlapping the right or left end of the *dif*-Zeo^R-*dif* cassettes, outside the *dif* sites (Figure 1B, Table 2, Supplementary Tables 1 & 2). Next, these fragments were mixed with one of the dif-Zeo^R-dif cassettes for a threefragment PCR, allowing amplification of an ~1700-bp AES (Figure 1B & C). The purified AES were used to transform M. tuberculosis (strain H37Rv, ATCC27294) or M. smegmatis (strain mc² 155, ATCC700084) carrying the plasmid pJV53H, a derivative of pJV53 [1], which expresses a mycobacteriophage

Table 1. Sequence of wild-type and variant dif sites ⁺ .	
<i>dif</i> site	Sequence
M. smegmatis dif ⁺	AGTACCGATAA GCTACA TTATGTCAACT
M. tuberculosis dif ⁺	TAAGCCGATAA GCGACA TTATGTCAAGT
M. tuberculosis dif4	TAAGCCGATAA ATGATG TTATGTCAAGT
M. tuberculosis dif5	TAAGCCGATAA TAGAGT TTATGTCAAGT
M. tuberculosis dif6	TAAGCCGATAA CGGAAC TTATGTCAAGT
M. tuberculosis dif7	TAAGCCGATAA CTGATC TTATGTCAAGT

⁺Left and right arm of the 28-bp *dif* sites are shown in black. The 6-bp central sequence is shown in red. Nucleotides modified in each variant are in bold letters.

Figure 1. Construction of unmarked deletions in Mycobacteria by recombineering using zeocinresistance cassettes flanked by dif site variants. (A) PCR amplification of Zeo^R cassettes with oligonucleotides introducing dif site variants on each side (red arrows). (B) PCR amplification of DNA fragments flanking the gene to be deleted. Blue boxes show sequence extensions identical to the left or right ends of the Zeo^R cassette. (C) Three-fragment PCR amplification yielding the AES. (D) Recombineering in Mycobacteria carrying plasmid pJV53H yields Zeo^R recombinant clones. (E) Spontaneous XerCD-dependent recombination between the tandem dif site variants generates unmarked deletion with a 78-bp scar replacing the deleted sequences.

AES: Allelic exchange substrate.

recombinase and confers resistance to hygromycin (Figure 1D & E). Transformation protocol was performed as described [1], performed with 100 ng of AES DNA, as recommended. Transformants were plated on Middlebrook 7H11 agar (Difco, Detroit, MI) supplemented with 10% oleic acidalbumin-dextrose-catalase (Difco) (complete 7H11 medium) and zeocin (25 µg ml-1; Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Zeocin-resistant (Zeo^R) clones were restreaked on the same medium, and single Zeo^R colonies were inoculated in Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 10% albumin-dextrose-catalase (Difco) and 0.05% Tween 80 (complete 7H9 medium) without antibiotic for growth, DNA extraction and verification by PCR. Zeo^R clones exhibited replacement of the band corresponding to the wild-type sequence by bands of the expected size for the dif-Zeo^R-dif cassette insertion. Several of these clones were streaked on complete 7H11 agar without antibiotic and grown at 37°C. Fifty single colonies were then phenotypically tested in grids on complete 7H11 agar, with or without zeocin, to screen for spontaneous excision of the cassette. At this stage, the number of Zeo^s colonies appeared variable from clone to clone with the same dif variant, presumably depending on how early excision events had occurred during the preculture of the candidates. However, we systematically observed Zeo^s among the 50 clones tested, regardless of the dif variant used, demonstrating that all of the variants are functional and can recombine with efficiencies falling into the same range. Zeo^s clones were inoculated

Table 2. Oligonucleotides used to amplify Zeocin resistance cassette flanked by variant <i>dif</i> sites [†] .	
Primers	Sequence (5' to 3')
Zeo-Dif4-Fw	CTCCACGTGGATCGACTGCCAGGCACTTGACATAACATCATTTATCGGCTTAATCAAATAAAACGAAAGGCTC
Zeo-Dif4-Rv	GAGCACGTGGGTCTGACGCTCAGTGG TAAGCCGATAAATGATGTTATGTCAAGT AACGAAAACTCACGTTAAGGG
Zeo-Dif5-Fw	CTCCACGTGGATCGACTGCCAGGCACTTGACATAA ACTCTATTATCGGCTTAATCAAATAAAACGAAAGGCTC
Zeo-Dif5-Rv	GAGCACGTGGGTCTGACGCTCAGTGGTAAGCCGATAATAGAGTTTATGTCAAGTAACGAAAACTCACGTTAAGGG
Zeo-Dif6-Fw	CTCCACGTGGATCGACTGCCAGGCACTTGACATAA GTTCCGTTATCGGCTTAATCAAATAAAACGAAAGGCTC
Zeo-Dif6-Rv	GAGCACGTGGGTCTGACGCTCAGTGGTAAGCCGATAACGGAACTTATGTCAAGTAACGAAAACTCACGTTAAGGG
Zeo-Dif7-Fw	CTCCACGTGGATCGACTGCCAGGCACTTGACATAA GATCAGTTATCGGCTTAATCAAATAAAACGAAAGGCTC
Zeo-Dif7-Rv	GAGCACGTGGGTCTGACGCTCAGTGGTAAGCCGATAACTGATCTTATGTCAAGTAACGAAAACTCACGTTAAGGG
[†] Sequence corresponding to the <i>dif</i> site are shown in hold letters. Bed letters show the nucleotides modified in each variant of <i>dif</i>	

in complete 7H9 medium for growth, DNA extraction and PCR verification. For construction of multiple mutants, the verified Zeo^S Hyg^R clones were submitted to a subsequent round of mutagenesis, using a *dif*-Zeo^R-*dif* cassette with a different *dif* site variant. Finally, clones verified to carry the expected mutation(s) were streaked on complete 7H11 agar without antibiotic, and single colonies were pheno-

Figure 2. Verification of the quadruple mutant of *M. smegmatis* mc² 155 △MSMEG_3155::*dif6* △MSMEG_1517::*dif4* △MSMEG_4576::*dif5* △MSMEG_6059-6058::*dif7*. (A) Schematics of the primers (arrowheads) and PCR products used to verify the four deletions. Brown arrowheads indicate primers internal to the sequences to be deleted. Red numbers in front of each pair of primers refer to the lanes in (B). (B) Agarose gel analysis of the amplified fragments. PCR was performed using DNA from wild-type mc² 155 (odd numbers) or the triple mutant strain (even numbers). M: 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, MD.

M: 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, MD, USA), bands of higher intensity correspond to 1, 3 and 6 kbp. typically tested in grids on complete 7H11 agar, with or without hygromycin, to screen for spontaneous loss of the pJV53H plasmid (Hyg^s). The efficiency of this step could be improved by the use of a counterselection marker or a visual phenotype screening associated to plasmid pJV53H, as described [5]. A final DNA extraction and PCR verification of each mutant was performed on the Zeo^s Hyg^s clones

3

(Figures 2 & 3).

CONSTRUCTION OF MULTIPLE UNMARKED DELETIONS IN *M. SMEGMATIS*

To validate the functionality of this system, we constructed deletion mutants in *M. smegmatis* mc² 155. Successive rounds of recombineering, using AES constructed with appropriate primers (Supple-►


Benchmarks



Figure 3. Construction and verification of H37Rv \(\Delta Rv0968::\dif5\(\Delta Rv1993c::\dif6\) ∧Rv3269::*dif4*, a triple in-frame deletion mutant of M. tuberculosis. (A) Translation of the 78-bp dif4 scar left after cassette excision. Nucleotides in bold indicate the dif site central region. Nucleotides in red correspond to the dif4 modifications. Stop codons in ORF 0 and +2 are underlined. (B) In-frame deletion resulting from fusion of the 5' and 3' ends of the gene of interest (blue nucleotides) to the +1 ORF of the dif-scar (black nucleotides and bracket). (C) Genetic organization of the operons encoding ctpC, ctpG and ctpV. (D) Schematics of the primers (arrowheads) and PCR products used to verify the three deletions. Brown arrowheads indicate primers internal to the sequences to be deleted. Red numbers in front of each pair of primers refer to the lanes in 3E. (E) Agarose gel analysis of the amplified fragments. PCR were performed using DNA from wild-type H37Rv (odd numbers) or the triple mutant strain (even numbers).

M: 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific), bands of higher intensity correspond to 1, 3 and 6 kbp.

mentary Table 1), and a different *dif* variant for each gene to be deleted allowed construction of multiple deletions. For example, we constructed a quadruple mutant, mc² 155 Δ MSMEG_1517::*dif4* Δ MSMEG_4576::*dif5* Δ MSMEG_3155::*dif6* Δ MSMEG_6059-6058::*dif7*. DNA extracted from this mutant was amplified in PCR reactions with pairs of external primers or with an external primer and a second one internal to the deleted sequence (Figure 2A & Supplementary Table 1). Analysis of the PCR products confirmed the genetic structure of the mutant (Figure 2B).

CONSTRUCTION OF MULTIPLE UNMARKED IN-FRAME DELETIONS IN *M. TUBERCULOSIS*

Deletion of genes embedded within operons often results in polar effects on the downstream genes, and an interesting advantage of excisable cassettes is the possibility to construct in-frame deletions, which circumvent such effect [4,13]. After excision, the dif-Zeo^R-dif cassettes used here leave a 78-bp scar with no stop codon in the +1 translation frame (Figure 1E & 3A). Therefore, provided that internal deletions of the target gene were designed in-frame with this +1 frame, the final construction fuses the translation start to the 26 aa translated from this frame and the last codons of the deleted gene (Figure 3B), which should not affect expression of the downstream genes. For example, the genes ctpC, ctpG and ctpV, encoding P-type ATPases involved in efflux of heavy metal ions in M. tuberculosis [14-16], are organized in operons containing an upstream gene, encoding a small protein of unknown function, Rv3269, Rv1993c or Rv0968, respectively (Figure 3C). A triple mutant of M. tuberculosis deleted of Rv0968, Rv1993c and Rv3269, namely H37Rv ∆Rv0968::dif5

 Δ Rv1993c::*dif6* Δ Rv3269::*dif4*, was constructed in three rounds of recombineering with appropriate AES (Supplementary Table 2). The PCR verification of this triple mutant is shown in Figure 3E. Sequencing of the PCR fragments encompassing the variant *dif* sites confirmed the in-frame nature of the three deletions and complementation experiments (data not shown) confirmed that the CtpC efflux pump is still expressed in the Δ Rv3269::*dif4* mutant.

In conclusion, we believe that the improvement of the Xer-cise technique described here can be useful to construct mutants in all mycobacterial species prone to recombineering. Our approach is applicable to any antibiotic resistance cassette by adapting the primers used to amplify the cassette (Table 2). It can also be extended to the many bacterial species in which XerCD, or the functionally equivalent XerS or XerH systems are present, and to archaeal species in which a Xer-like system operates [17,18].

SUPPLEMENTARY DATA

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.future-science. com/doi/suppl/10.2144/btn-2019-0119

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y-M Boudehen, M Wallat and C Gutierrez performed experiments. O Neyrolles acquired funding. C Gutierrez and Y-M Boudehen wrote the manuscript; O Neyrolles and P Rousseau edited the manuscript. All the authors contributed to conception and design, analysis and interpretation of data.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V Malaga and S Jamet for the gift of plasmids pJV53H and pGET-Zeo^R, respectively, and F-X Barre and F Cornet for helpful discussions.

FINANCIAL & COMPETING INTERESTS DISCLOSURE

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique; Université Paul Sabatier; Agence Nationale de la Recherche (ANR14-CE14-0024), Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ2016 0334902); Y-M Boudehen is supported by FRM. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

OPEN ACCESS

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/ by-nc-nd/4.0/

REFERENCES

Papers of special note have been highlighted as: •• of considerable interest

- van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in Mycobacterium tuberculosis. Nature Meth. 4, 147–152 (2007).
- Describes recombineering, a phage recombinase-dependent technique allowing allelic exchange in Mycobacteria.
- Mugweru J, Makafe G, Cao Y et al. A cassette containing thiostrepton, gentamicin resistance genes, and dif sequences is effective in construction of recombinant Mycobacteria. Front. Microbiol. 8, 468 (2017).
- Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2520–2525 (2006).
- Describes the Xer-cise technique, using naturally present recombinases XerCD to excise antibiotic resistance cassettes flanked by tandem *dif* sites.
- Cascioferro A, Boldrin F, Serafini A, Provvedi R, Manganelli R. Xer site-specific recombination, an efficient tool to introduce unmarked deletions into mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5312–5316 (2010).
- Mao XJ, Yan MY, Zhu H, Guo XP, Sun YC. Efficient and simple generation of multiple unmarked gene deletions in *Mycobacterium smegmatis*. Sci. Rep. 6, 22922 (2016).
- 6. Hendrickson H, Lawrence JG. Mutational bias suggests

that replication termination occurs near the *dif* site, not at *Ter* sites. *Mol. Microbiol.* 64, 42–56 (2007).

- Crozat E, Fournes F, Cornet F, Hallet B, Rousseau P. Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes. *Microbiol. Spectr.* 2, PLAS–0025 (2014).
- Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of site-specific recombination. Ann. Rev. Biochem. 75, 567–605 (2006).
- •• A thorough review on the mechanisms of site-specific recombinases.
- Val ME, Kennedy SP, El Karoui M, Bonné L, Chevalier F, Barre FX. FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen Vibrio cholerae. PLoS Genet. 4, e1000201 (2008).
- Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn JM. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif. J. Bacteriol.* 176, 3188–3195 (1994).
- Summers DK. Derivatives of ColE1 cer show altered topological specificity in site-specific recombination. *EMBO J.* 8, 309–315 (1989).
- Jamet S, Slama N, Domingues J et al. The non-essential mycolic acid biosynthesis genes hadA and hadC contribute to the physiology and fitness of Mycobacterium smegmatis. PloS ONE 10, e0145883 (2015).
- Marcus SA, Sidiropoulos SW, Steinberg H, Talaat AM. CsoR is essential for maintaining copper homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One*. 11, e0151816 (2016).
- Botella H, Peyron P, Levillain F et al. Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe*. 10, 248–259 (2011).
- Botella H, Stadthagen G, Lugo-Villarino G, de Chastellier C, Neyrolles O. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol.* 20, 106–112 (2012).
- Ward SK, Abomoelak B, Hoye EA, Steinberg H, Talaat AM. CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. 77, 1096–1110 (2010).
- Castillo F, Benmohamed A, Szatmari G. Xer Site Specific Recombination: Double and Single Recombinase Systems. Front. Microbiol. 8, 453 (2017).
- An up-to-date review on the Xer and Xer-like systems in bacteria and archaea.
- Debowski AW, Gauntlett JC, Li H et al. Xer-cise in Helicobacter pylori: one-step transformation for the construction of markerless gene deletions. Helicobacter. 17, 435–443 (2012).



Figure 24. Construction et validation des mutants $\Delta(Rv3269-ctpC)::zeo^R$ (gauche) et $\Delta Rv3269::dif4$ (droite).

A. Schéma montrant la stratégie utilisée pour la construction des différents mutants.

B. Confirmation des délétions du mutant $\triangle(Rv3269-ctpC)::zeo^R$: amplification du fragment sauvage de 3,6 kb (1), et un fragment de 1,9 kb pour une délétion complète de l'opéron (2). Le fragment de 1,9 kb a été vérifié par séquençage. La délétion a également été confirmée par l'absence d'amplification en PCR en utilisant une amorce interne s'hybridant dans le fragment à déléter. Un fragment sauvage de 1,9 kb est produit (3) alors qu'aucune amplification n'est attendue dans la souche mutante (4).

Confirmation du mutant $\triangle Rv3269:: dif4$: amplification du fragment sauvage de 1,4 kb (5), et un fragment de 1,2 kb pour une délétion complète de l'opéron (6). Le fragment de 1,2 kb a été vérifié par séquençage. La délétion a également été confirmée par l'absence d'amplification en PCR en utilisant une amorce interne s'hybridant dans le fragment à déléter. Un fragment de 0,8 kb est produit à partir d'ADN de la souche sauvage (7) alors qu'aucune amplification n'est attendue avec l'ADN de la souche délétée (8).

C. Valeurs de Ct pour les amplifications obtenues par RT-qPCR avec des amorces spécifiques des gènes *Rv3269*, *ctpC* et *rpoB* (gène de ménage). Chaque point représente un réplica de l'expérience.

<u>Chapitre 2 :</u> Etude du rôle du métallochaperon à zinc putatif Rv3269 associé à la P-ATPase CtpC de *Mycobacterium tuberculosis*

1. CtpC et Rv3269 sont toutes les deux nécessaires pour assurer la résistance au zinc chez *Mycobacterium tuberculosis*

Les travaux d'Hélène Botella, au sein de l'équipe, ont montré que l'inactivation de *ctpC* rend Mtb sensible à la présence de zinc dans son milieu de culture (Botella et al., 2011). Afin de tester le rôle de Rv3269, nous avons dans un premier temps construit $\Delta(Rv3269-ctpC)$::zeo^R, une délétion de tout l'opéron, remplacé par une cassette de résistance à la zéocine dans le génome de la souche sauvage de Mtb H37Rv. Nous avons aussi voulu construire une délétion du gène *Rv3269* seul. *Rv3269* étant en opéron avec *ctpC* et situé en amont, nous avons pour cela utilisé la technologie de Xer-cise décrite au chapitre 1 afin de générer une délétion en phase de *Rv3269* sans inactiver *ctpC* (Figure 24A et B). Une analyse en RT-qPCR des ARNm produits dans ces souches mutantes de Mtb a confirmé l'absence d'expression de *Rv3269* dans les deux souches alors que l'expression de *ctpC* restait équivalente à celle d'une souche sauvage dans le mutant $\Delta Rv3269$::*dif*4 (Figure 24C).

Des souches complémentées ont été construites en installant dans les mutants des plasmides pGMCS-P_{Rv3269}- *Rv3269* ou pGMCS-P_{Rv3269}- *Rv3269-ctpC*. Ces plasmides sont intégratifs et s'insèrent dans le chromosome des mycobactéries au locus *att* L5, dans la séquence du gène de l'ARNt *glyV*. Ils portent le gène *Rv3269* ou l'opéron *Rv3269-ctpC* exprimés sous le contrôle de leur promoteur naturel (P_{Rv3269}). Une souche contrôle a été construite en installant le plasmide vecteur pGMCS vide dans les souches mutantes. Nous avons alors testé la croissance de ces différentes souches dans du milieu 7H9 supplémenté en ADC et Tween 80 ou dans le même milieu supplémenté avec 100 µM de ZnSO₄. Tout d'abord, nous avons retrouvé dans la souche H37Rv le phénotype de sensibilité au zinc du mutant *ctpC* décrit précédemment dans la souche GC1237 (Botella et al., 2011). De plus, la croissance du mutant *Rv3269*-KO est totalement inhibée en présence de zinc et est restaurée dans la souche complémentée (Figure 25A). Nous avons ensuite testé la croissance des souches mutantes avec une gamme de concentrations en zinc plus basse. Dans ces conditions, nous avons noté un retard de croissance dès 10 µM de zinc et une sensibilité légèrement plus forte à 20 et 30 µM pour le mutant $\Delta(Rv3269-ctpC)$ que pour le mutant $\Delta Rv3269$ (Figure 25B).





A. Tests de croissance en présence de zinc. Les souches sauvage ou délétées de *Rv3269* ou de l'opéron *Rv3269-ctpC* transformées par un plasmide vecteur vide (0x0x) ou bien exprimant *Rv3269* seul ou *Rv3269-ctpC* ont été cultivées en milieu 7H9 ADC Tween 80. Au temps 0, les cultures sont diluées dans le même milieu supplémenté ou non avec 100 μ M de ZnSO₄. La croissance est suivie au cours du temps (mesure de turbidité exprimée en unités McFarland). **B.** Tests de sensibilité à une gamme de concentration en zinc. Les souches sauvages ou mutées sont cultivées comme en A. Au temps 0 les dilutions sont réalisées dans du milieu 7H9 ADC Tween 80 contenant les concentrations en zinc indiquées. **C.** Tests de survie à forte concentration en zinc. Les souches sauvages ou délétées de *Rv3269-ctpC* (panneau de droite) complémentées par les plasmides indiqués ont été cultivées en milieu 7H9 ADC Tween 80. Au temps 0, du ZnSO₄ est ajouté, à la concentration finale de 500 μ M. Des échantillons de chaque culture sont prélevés au temps 0, après 7 ou 14 jours, puis dilués, étalés sur des boites de milieu 7H11 OADC et mis en culture à 37°C. Les colonies (CFUs) sont comptées après 21 jours d'incubation.

Alignement de CtpC et MSMG_6058

CtpC	3	LEVVSDAAGRMRVKVDWVRCDSRRAVAVEEAVAKQNGVRVVHAYPRTGSVVVWYSPRRAD	62
6058	4	LTVVSDAAGRMRVHAPWFRGDAVRAVAIEQAVDQVPGVRAVHAYPRTGSVVVWYSPRRCD	63
CtpC	63	RAAVLAAIKGAAHVAAELIPARAPHSAEIRNTDVLRMVIGGVALALLGVRRYVFARPPLL R AV +A+ AA VA L+P R+P SA++ N D++RM IG VAL LLG+RRY FARPPLL	122
6058	64	RDAVRSAMTAAAGVARHLVPGRSPRSADVHNADIVRMAIGAVALILLGIRRYGFARPPLL	123
CtpC	123	GTTGRTVATGVTIFTGYPFLRGALRSLRSGK-AGTDALVSAATVASLILRENVVALTVLW G+T RT+ATG TI TGYPFLRGALR+L + AGTD LVSAATVASL+LRENVVALTVLW	181
6058	124	GSTSRTLATGATIITGYPFLRGALRTLTGNRSAGTDVLVSAATVASLVLRENVVALTVLW	183
CtpC	182	LLNIGEYLQDLTLRRTRRAISELLRGNQDTAWVRLTDPSAGSDAATEIQVPIDTVQIGDE LLNIGEYLQDLTLRRTRRAI+ LL+G QDT W+RL D TEI+V +D V++GD+	241
6058	184	LLNIGEYLQDLTLRRTRRAIANLLQGTQDTVWLRLADRTEIEVAVDGVRVGDQ	236
CtpC	242	VVVHEHVAIPVDGEVVDGEAIVNQSAITGENLPVSVVVGTRVHAGSVVVRGRVVVRAHAV VV+HE VAI VDG V DGEAIV+QSAITGENLPV+V G++V+AGSVVVRGR+VV A AV	301
6058	237	VVIHEQVAIVVDGVVCDGEAIVDQSAITGENLPVAVGPGSKVYAGSVVVRGRLVVTAEAV	296
CtpC	302	GNQTTIGRIISRVEEAQLDRAPIQTVGENFSRRFVPTSFIVSAIALLITGDVRRAMTMLL G+ TTIGRII+RVEEAQ RAPIQTVGENFSRRFVP SF++SA L++T DVRRAMTMLL	361
6058	297	GSHTTIGRIITRVEEAQQHRAPIQTVGENFSRRFVPASFLLSAATLVVTRDVRRAMTMLL	356
CtpC	362	IACPCAVGLSTPTAISAAIGNGARRGILIKGGSHLEQAGRVDAIVFDKTGTLTVGRPVVT +ACPCAVGL+TPT ISAAIGNGARRGILIKGGSHLEQAGRVDA+VFDKTGTLT+GRP+VT	421
6058	357	VACPCAVGLATPTVISAAIGNGARRGILIKGGSHLEQAGRVDAMVFDKTGTLTLGRPIVT	416
CtpC	422	NIVAMHKDWEPEQVLAYAASSEIHSRHPLAEAVIRSTEERRISIPPHEECEVLVGLGMRT N+VA HKDWEPEQVLAYAASSEIH+RHPLAEAVIRST ER I IPPHEECEVLVGLGMRT	481
6058	417	NVVAFHKDWEPEQVLAYAASSEIHARHPLAEAVIRSTRERHIVIPPHEECEVLVGLGMRT	476
CtpC	482	WADGRTLLLGSPSLLRAEKVRVSKKASEWVDKLRRQAETPLLLAVDGTLVGLISLRDEVR ADGRTLLLGSPSLLR EKVRV+ +A+ WVDKLR++AETPLLLAVDG LVGLISLRDEVR	541
6058	477	RADGRTLLLGSPSLLRQEKVRVTSRAAAWVDKLRKRAETPLLLAVDGKLVGLISLRDEVR	536
CtpC	542	PEAAQVLTKLRANGIRRIVMLTGDHPEIAQVVADELGIDEWRAEVMPEDKLAAVRELQDD PEAA+VL LR G+RR+VMLTGDHP+ A VADELGI EWRAEV+PEDKLA VR L +	601
6058	537	PEAAEVLRALRTAGVRRMVMLTGDHPDAAAAVADELGITEWRAEVLPEDKLAVVRRLHAE	596
CtpC	602	GYVVGMVGDGINDAPALAAADIGIAMGLAGTDVAVETADVALANDDLHRLLDVGDLGERA G+ V ++GDG+NDAPALAAADIGIAMGL GTDVAVETADVALA+DDL RLLDV DLG RA	661
6058	597	GHTVAVIGDGVNDAPALAAADIGIAMGLGGTDVAVETADVALASDDLRRLLDVRDLGARA	656
CtpC	662	VDVIRQNYGMSIAVNAAGLLIGAGGALSPVLAAILHNASSVAVVANSSRLIRYRLD 717 VDVI+QNY MSIAVNA GL +GAGGALSPVLAA+LHNASSVAVVANS+RLIRY +D	7
6058	657	VDVIQQNYAMSIAVNAIGLAVGAGGALSPVLAAVLHNASSVAVVANSARLIRYEID 712	2

Alignement de Rv3269 et SMEG_6059

3269	1	MAIQVFLAKATTTVITGLAGVTAYEILKKAAAKAPLRQTAVSAAALGLRGTRKAEEAAES	60
		M L KA TTV+TG GV AYE L+KA AKAP+R+ AV+ AL LRG RKAE AES	
6059	1	MVWHGLLVKAATTVVTGAVGVAAYEGLRKAVAKAPVREAAVATTALALRGARKAEVGAES	60
3269	61	ARLKVADVMAEARERIGEESPTPAISDL-HDHDH 93	
		ARLKVADVMAEARERIGEE P PA D HDHDH	
6059	61	ARLKVADVMAEARERIGEEVPPPAAGDAGHDHDH 94	

Figure 26. Le génome de *M. smegmatis* **code des protéines similaires à CtpC et Rv3269.** Alignement par BLAST des séquences de CtpC/MSMEG_6058 (en haut) et Rv3269/MSMEG_6059 (en bas). Rouge : protéines de *M. tuberculosis* ; Bleu : protéines de *M. smegmatis*.



Figure 27. Développement d'un modèle chez *M. smegmatis* pour étudier le rôle de Rv3269 et CtpC dans la résistance au zinc.

A. Vérification des mutations AMSMEG 0755:: dif4 et AMSMEG 6059-6058:: dif5. Des amorces flanquant les délétions (pistes 1 et 2, 5 et 6), ou bien une amorce flanquant et l'autre interne (pistes 2 et 3, 7 et 8) ont été utilisées pour des PCR avec l'ADN d'une souche sauvage (pistes 1 et 3, 5 et 7) ou d'un mutant (2 et 4, 6 et 8). Les fragments amplifiés confirment la présence des délétions recherchées. Un double mutant (noté $\Delta 2$) a aussi été construit et testé. Il donne les profils observés ici pour chacun des simple mutant. B. Les souches sauvages et mutantes de *M. smegmatis* ont été testées pour leur croissance en milieu 7H9 en présence de différentes concentrations en ZnSO₄. Les densités optiques des cultures sont exprimées pour chaque souche en pourcentage de celle obtenue sans zinc. C. Valeurs de Ct pour les amplifications obtenues par RT-qPCR avec des amorces spécifiques des gènes MSMEG_6059 MSMEG_6058 et sigA (gène « de ménage »). Chaque point représente un réplica de l'expérience. D. AACt obtenus en RT-gPCR pour les gènes MSMEG 6059 ou MSMEG_6058 en comparant les ARN totaux extraits de mc²155 après croissance en 7H9 ADC Tween 80 supplémenté ou non avec 50 µM de ZnSO₄. E. Les souches mc²155/pGMCS-P1-mCherry et mc²155/pGMCS-P1-mCherry-P_{Rv3269}-GFP ont été cultivées en milieu 7H9 ADC Tween 80 supplémenté avec les concentrations indiquées de ZnSO₄, MnSO₄ ou CuSO₄, et la fluorescence en rouge ou en vert a été mesurée par cytométrie en flux. Les intensités moyennes de fluorescences (MFI) mesurées sont rapportées à celles obtenues en 7H9.

Enfin, des tests se survie des différentes souches exposées à 500 μ M de ZnSO₄ ont montré que les mutants Δ (*Rv3269-ctpC*)::zeo^R et Δ *Rv3269::dif*4 ne survivent pas à cette dose de zinc, alors que les souches complémentées survivent de manière comparable à la souche sauvage H37Rv (Figure 25C).

Ces résultats démontrent qu'en plus de la P-ATPase CtpC, la protéine Rv3269 est nécessaire à la résistance au zinc. Nous avons voulu analyser plus avant le mécanisme par lequel Rv3269 affecte le fonctionnement de CtpC.

2. Développement d'un modèle d'étude de la résistance au zinc chez *M. smegmatis*

Le génome de *Mycobacterium smegmatis*, une mycobactérie non pathogène et à croissance rapide, contient un gène, *MSMEG_6058*, dont le produit est annoté *Cadmium transporting P-type ATPase* et présentant 77 % d'identité de séquence avec CtpC. Ce gène est en opéron avec *MSMEG_6059* codant une protéine de 94 acides aminés, présentant 68 % d'identité de séquence avec Rv3269 (Figure 26). Par ailleurs, une étude antérieure de Grover et Sharma avait montré que la mutation du gène *MSMEG_0755*, codant une protéine de la famille des CDF (*cation diffusion facilitator*) aussi nommée ZitA (pour *zinc ion tolerance*), rendait *M. smegmatis* sensible au zinc (Grover & Sharma, 2006). Afin de clarifier le rôle de ces différents produits, nous avons construit dans la souche sauvage de *M. smegmatis* mc²155 des mutations inactivant soit *MSMEG_0755* soit *MSMEG_6058-6059* ou bien les deux à la fois (Figure 27A), puis nous avons testé l'effet du zinc sur la croissance de ces mutants en milieu 7H9 supplémenté en ADC et Tween 80 (Figure 27B). En accord avec Grover et Sharma, nous avons observé que la mutation *MSMEG_0755*-KO rend sensible au zinc. En revanche, la mutation inactivant *MSMEG_6058-6059* n'a aucun effet sur cette sensibilité, ni seule ni en présence de *MSMEG_0755*-KO.

Nous nous sommes alors demandé si l'opéron *MSMEG_6058-6059* était bien exprimé. Nous avons extrait les ARN totaux produits par la souche mc²155 cultivée en milieu 7H9 ADC Tween 80 en absence ou en présence de 50 µM de ZnSO₄ et analysé ces ARN par RT-qPCR avec des couples d'amorces spécifiques de *MSMEG_6058 ou MSMEG_6059*. Les valeurs de Ct obtenues indiquent : i) que l'opéron *MSMEG_6058-6059* est exprimé (Figure 27C), mais que ii) cette expression est diminuée d'un facteur environ 2,5 suite à l'addition de zinc dans le milieu (Figure 27D). Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui a montré que l'expression de *MSMEG_6059-6058* est induite non pas par un excès mais par une carence en zinc, contrairement à celle de *MSMEG_0755* qui est induit en présence d'un excès de zinc (Goethe et al., 2020).



Figure 28. Rv3269 et CtpC confèrent la résistance au zinc chez *M. smegmatis*.

A. Sensibilité au zinc des souches de *M. smegmatis* mc²155 sauvage (WT), du double mutant $\Delta MSMEG_0755 \Delta MSMEG_6058-6059$ ou du simple mutant $\Delta MSMEG_0755$ (respectivement $\Delta 2$ ou $\Delta 0755$), sans plasmide complémentant ou complémentées par *Rv3269* seul, *ctpC* seul ou bien par l'opéron *Rv3269-ctpC* entier. **B**. Sensibilité au zinc de la souche $\Delta 2$ complémentée par *Rv3269-ctpC* ou par *MSMEG_6058-6059* exprimés sous le contrôle du promoteur P_{*Rv3269*}.

Afin de valider l'utilisation de *M. smegmatis* comme modèle pour étudier Rv3269 et/ou CtpC, nous avons dans un premier temps analysé l'expression du promoteur P_{Rv3269} chez *M. smegmatis*. En utilisant une technologie de type Gateway et des outils génétiques mis au point au laboratoire (Ariyachaokun et al., 2020), nous avons construit des plasmides intégratifs exprimant deux protéines reportrices fluorescentes. Un gène codant la protéine fluorescente mCherry est placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif (P1), et un gène codant la GFP sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt, ici le promoteur P_{Rv3269} . Ce plasmide rapporteur a été introduit dans la souche sauvage mc²155, et les transformants ont été cultivés en milieu 7H9 ADC Tween 80, en présence de différentes concentrations en zinc, manganèse ou cuivre. Les mesures de fluorescence en rouge et en vert, effectuées par cytométrie en flux, ont montré que le promoteur P_{Rv3269} est stimulé par la présence de zinc chez *M. smegmatis*. En revanche, ni le cuivre ni le manganèse ne stimulent la transcription à partir de P_{Rv3269} (Figure 27E). La régulation de P_{Rv3269} est donc comparable chez *M. smegmatis* à ce qui avait été observé chez Mtb (Botella et al., 2011).

L'ensemble de ces données indique que malgré leurs fortes similarités avec les produits de l'opéron *Rv3269-ctpC*, MSMEG-6059 et MSMEG_6058 ne sont pas induites par la présence de zinc dans le milieu et ne participent pas à la résistance au zinc chez *M. smegmatis*. Ainsi, au cours de leur évolution, les deux espèces de mycobactéries Mtb et *M. smegmatis* ont développé des mécanismes de résistance au zinc différents.

3. Utilisation de *M. smegmatis* pour l'analyse structure/fonction de Rv3269

Nous avons ensuite testé la fonctionnalité du système Rv3269-CtpC chez le double mutant de *M. smegmatis* MC²155 Δ *MSMEG_0755* Δ *MSMEG_6059-6058* (abrégé en Δ 2 dans la suite). Nous avons introduit chez cette souche les variants du plasmide intégratif pGMCS exprimant soit *Rv3269*, soit *ctpC*, soit les deux gène *Rv3269-ctpC* sous le contrôle du promoteur sauvage de l'opéron de Mtb. Nous avons ainsi pu montrer que l'expression de Rv3269 et CtpC chez *M. smegmatis* Δ 2 restaure la résistance au zinc, alors que l'expression de Rv3269 ou de CtpC seules ne le fait pas (Figure 28A), confirmant la nécessité des deux protéines pour effluer efficacement le zinc et assurer la résistance au métal.

Nous avons aussi installé les différents plasmides pGMCS dans le simple mutant *M. smegmatis* $\Delta MSMEG0755$ et les phénotypes obtenus se sont révélés identiques à ceux obtenus dans le double mutant $\Delta 2$ (Figure 28A), démontrant qu'en dépit des très fortes

133

similarités entre les protéines de Mtb et de *M. smegmatis*, il n'y a pas d'interaction croisée entre *MSMEG_6059-6058* d'une part et *Rv3269* et *ctpC* d'autre part.

De plus, nous avons remplacé l'opéron Rv3269-ctpC par $MSMEG_6059$ -6058 sur le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269-ctpC, générant pGMCS-P_{Rv3269}- $MSMEG_6059$ -6058. Ce plasmide ne restaure que partiellement la croissance du mutant $\Delta 2$ en présence de zinc, indiquant à nouveau que les produits de $MSMEG_6058$ -6059 ne sont pas capables d'effluer efficacement le zinc (Figure 28B).



Figure 29. Prédiction de l'organisation topologique de la protéine Rv3269

La structure de la protéine Rv3269 a été modélisée sur le site Raptor (<u>http://raptorx.uchicago.edu/StructPredV2/myjobs/10033999_539068/</u>) et représentée sur PDB viewer. En bleu : hélice transmembranaire putative (Ala10 à Leu27). En rose : chaines latérales des acides aminés des motifs Ala-Glu (AE) et Ala-Glu-Ala (AEA). En rouge : chaines latérales des acides aminés du motif HDHDH en C-terminal de Rv3269.

4. Analyses biochimique et biophysique de Rv3269, une protéine liant le zinc

Une partie des résultats présentés dans ce paragraphe a été obtenue par nos collaborateurs, au sein de l'équipe de Patrice Catty, au Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux du CEA à Grenoble ou par Olivier Saurel, dans l'équipe d'Alain Milon, à l'IPBS.

4.1. L'extrémité C-terminale de Rv3269 porte un motif de liaison du zinc

La protéine Rv3269 est prédite pour posséder un segment transmembranaire du côté Nterminal qui pourrait l'ancrer à la membrane (Figure 29 ; voir aussi partie 3). L'équipe de P. Catty a cloné une partie du gène Rv3269 exprimant la partie C-terminale (de Ala³⁰ à His⁹³) dans un vecteur d'expression chez *E. coli*, sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG. La protéine recombinante porte une étiquette His₆ en N-terminal qui peut être clivée sous l'action de la protéase TEV. Cette protéine, nommée ^{SOL}Rv3269 a été produite et purifiée, puis utilisée pour une expérience de dialyse à l'équilibre. Les résultats ont établi que ^{SOL}Rv3269 fixe le zinc, avec une stœchiométrie de 1 atome de zinc par protéine (Figure 30A). En revanche, ^{SOL}Rv3269 ne fixe pas le manganèse. Un variant de la protéine délété des trois derniers acides aminés du coté C-terminal (H⁹¹D⁹²H⁹³), appelé ^{SOL}Rv3269 (Δ C3), a aussi été produit et purifié. Cette protéine tronquée a perdu la capacité de liaison du zinc (Figure 30A).

4.2. ^{SOL}Rv3269 est une protéine de liaison au zinc, non-structurée

L'interaction du Zinc(II) avec le domaine ^{SOL}Rv3269 a également été étudiée par spectroscopie RMN du proton à pH 6,0 et 7,0 dans du tampon MES 20 mM, NaCL 150 mM à 7°C. Préalablement à l'étude d'interaction, l'attribution des signaux RMN a été réalisée par une approche homonucléaire (Wüthrich, 1991) à partir de spectres 2D TOCSY et NOESY avec un temps de mélange de 80 ms et 120 ms respectivement, 70% des résidus ont ainsi pu être attribués (44 résidus sur 67, dont 63 attribuables). Les résidus non attribués ont été représentés en gris sur la figure 30B (G27 à P35 et R52 à L63) et correspondent à des régions riches en alanine avec un fort recouvrement spectral limitant l'identification non ambigüe des résidus.

L'identification des structures secondaire a été réalisée par l'analyse des déplacements chimiques (CSI, *chemical shift index*) en absence de zinc (Figure 30B) et en présence de zinc de 1 à 3 équivalents molaires. L'analyse de CSI a été complétée par une recherche minutieuse



Figure 30. Analyse biochimique de la partie soluble de Rv3269 (^{SOL}Rv3269).

A. Dialyse à l'équilibre déterminant la stœchiométrie de liaison des métaux indiqués avec $^{SOL}Rv3269$ (en bleu) et $^{SOL}Rv3269(\Delta C3)$.

B. Distribution et tendance des acides aminés de ^{SOL}Rv3269 à adopter une structure secondaire. La ligne bleue médiane délimite la partie haute, caractéristique des feuillets β , de la partie basse ou sont retrouvés les résidus disposés en hélice α . La propension des résidus de ^{SOL}Rv3269 en verts superpose la ligne médiane traduisant l'adoption d'aucune des deux structures secondaires. En gris, les résidus non attribués.

C. Mise en évidence de l'interaction entre ^{SOL}Rv3269 et le zinc par RMN. En vert, les résidus sans effet significatif suite à l'ajout d'un équivalent molaire d'acétate de zinc ; en gris, les résidus non-attribués. Les étoiles rouges représentées sur la queue C-terminale DLHDHDH indiquent un fort échange chimique en dessous de la limite de détection.

des taches de corrélations NOEs caractéristiques de structures secondaires (Wüthrich, 1991). L'absence de variations significatives des CSI et l'absence de corrélations NOEs caractéristiques ont démontré que ^{SOL}Rv3269 est non structurée quelles que soient les conditions.

L'interaction du zinc a été suivie par l'analyse de la variation des déplacements chimiques (CSP, *chemical shift perturbation*) des protons amides sur la chaîne polypeptidique induits par la liaison du zinc (Wishart et al., 1992). En effet, l'interaction du zinc crée une perturbation de l'environnement électronique des atomes voisins et donc de leur déplacement chimique. L'amplitude de cette variation consécutive à l'addition d'un équivalent de zinc a été représentée en fonction de la séquence primaire de ^{SOL}Rv3269 dans la Figure 30C. Cette analyse a montré un effet perturbateur décroissant de l'extrémité C-terminale (H93) jusqu'à la valine 65 (V65), l'effet maximal est observé pour le domaine putatif de liaison au zinc (H⁸⁹DHDHD⁹³) indiqué par des astérisques (*) pour lequel on a observé une disparition des signaux du spectre dès l'addition d'un équivalent molaire de zinc. Cet effet est probablement dû à un échange conformationnel à une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde à la microseconde. A noter que la décroissance assez régulière de l'effet de la liaison du zinc de l'extrémité C-terminale jusqu'à V65 est en accord avec la nature intrinsèquement désordonnée de ^{SOL}Rv3269.



Figure 31. Impact de la délétion du motif C-terminal de liaison du zinc de Rv3269 sur le phénotype de résistance au zinc.

Tests de sensibilité de la souche sauvage et de la souche H37Rv $\Delta Rv3269$::*dif*4 complémentée par le vecteur vide (0x0x) ou exprimant soit *Rv3269* pleine taille, soit les variants Δ C3, Δ C7. Les cultures sont réalisées dans le milieu 7H9 ADC Tween 80 supplémenté par (A) 250 ou (B) 100 μ M de ZnSO₄.

4.3. La délétion du domaine de fixation du zinc abolit partiellement la fonction de Rv3269

A partir du plasmide pGMCS-P_{*Rv3269*}-*Rv3269*, nous avons construit deux variants dans lesquels le gène *Rv3269* est délété des trois ou des sept derniers codons du côté 3'. Ces deux variants produisent donc des formes tronquées, nommées respectivement Δ C3 et Δ C7. Les plasmides ont été transformés dans la souche de Mtb H37Rv Δ *Rv3269::dif*4 et les transformants ont été testés pour leur sensibilité au zinc. A une forte concentration en zinc (250 µM), alors que la protéine intacte restaure la croissance du mutant, les formes tronquées n'en sont pas capables (Figure 31A). En revanche, à 100 µM de zinc, les formes de Rv3269 incapables de fixer le zinc restaurent la croissance du mutant Δ *Rv3269::dif*4 presqu'aussi efficacement que la protéine pleine taille (Figure 31B).

Ces résultats suggèrent que la protéine Rv3269 a deux activités séparables : l'une nécessite la présence du domaine de fixation du zinc, et est indispensable pour résister à de fortes concentrations en métal ; l'autre est conservée même en absence de fixation du zinc, et est suffisante pour conférer la résistance à de plus faibles concentrations en zinc (Figure 31B).



Figure 32. Les protéines CtpC et Rv3269 co-localisent dans des patchs au niveau des membranes.

A. Analyse par western-blot du fractionnement subcellulaire de la souche *M. smegmatis* $\Delta 2$ exprimant les protéines Rv3269 et CtpC natives (contrôle) ou marquées avec respectivement des étiquettes Flag et His₆ (panneau de gauche) ou, avec des molécules fluorescentes, respectivement, mTurquoise2 et mVenus (panneau de droite). Trois fractions sont obtenues et analysées : l'enveloppe « cw », la membrane plasmique « mb » et le cytosol « cyt ». Les protéines sont révélées par l'utilisation des anticorps anti-Flag, anti-His₆ ou anti-eGFP.

B. Co-localisation des patchs $Rv3269_{mT}$ (bleu) et $CtpC_{mV}$ (jaune). La souche H37Rv Δ (*Rv3269-ctpC*)::*zeoR* a été transformée avec un plasmide exprimant les protéines fluorescentes hybrides. Les bactéries ont été fixées par de la PFA (4 %) puis visualisées par microscopie à fluorescence. Un trait blanc est tracé sur chaque cellule et les spectres des deux fluorochromes mesurés le long de ce trait sont montrés à droite des images. Le coefficient de Pearson (r, en rouge) mesurant la superposition des pixels bleus et jaunes, calculé par l'application du plugin JACoP sur l'ensemble de l'image, confirme la co-localisation des deux protéines d'intérêt.

C. Coefficient de Pearson moyen (ligne rouge) obtenu sur l'étude de 413 cellules de *M. smegmatis* $\Delta 2$ portant le plasmide pGMCS-P_{*Rv3269-*}*Rv3269_{mT}-ctpC_{mV}*. Chaque point représente une cellule.

<u>Chapitre 3 :</u> Les protéines Rv3269 et CtpC co-localisent au sein de patchs dynamiques à la membrane plasmique de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis*

1. Localisation membranaire de Rv3269 et CtpC

La séquence en acides aminés de Rv3269 contient un domaine transmembranaire potentiel dans la partie N-terminale (Figure 29), aussi nous avons voulu confirmer la localisation membranaire de cette protéine.

Nous avons tout d'abord construit par mutagénèse dirigée, le plasmide pGMCS- P_{Rv3269} -*Rv3269*_{Flag}-*ctpC*_{His}, un variant de pGMCS- P_{Rv3269} -*Rv3269*-*ctpC*. Ce plasmide exprime Rv3269_{Flag}, une forme de Rv3269 portant une étiquette Flag (Asp-Tyr-Arg-Asp-Asp-Asp-Asp-Arg) insérée en C-terminal. Il exprime aussi CtpC_{His}, portant 6 histidines ajoutées à l'extrémité C-terminale de CtpC.

En parallèle, nous avons inséré sur pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269-ctpC la séquence codant la protéine reportrice fluoresçant en bleu mTurquoise2, générant une fusion Rv3269-mTurquoise2 (Rv3269_{mT}), dans laquelle la protéine fluorescente est attachée à l'extrémité C-terminale de Rv3269 par un linker (Leu-Glu-Gly-Ser-Gly). De même, nous avons construit une fusion CtpC-mVenus (CtpC_{mV}), exprimant une protéine reportrice fluoresçant en jaune (construction schématisée sur la Figure 32B).

Les souches de *M. smegmatis* $\Delta 2$ transformées par les plasmides pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269*ctpC* et pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269_{Flag}-*ctpC*_{His} ont été cultivées et les culots de cellules obtenus ont été soumis à un fractionnement, séparant une fraction dite d'enveloppe (*cell wall*, cw), une fraction dite de membrane (mb) et une fraction contenant les protéines cytoplasmiques solubles (cyt) (Lucas et al., 2015). Les protéines des différentes fractions ont été analysées par western-blot en utilisant un anticorps dirigé soit contre l'étiquette Flag soit contre l'étiquette His₆. Comme attendu, la protéine CtpC_{His} (masse moléculaire théorique de 77,3 kDa) a été trouvée essentiellement dans la fraction membranaire « mb », validant le protocole de fractionnement utilisé. Pour sa part, la protéine Rv3269_{Flag} (10,8 kDa) donne un signal fort dans la fraction membrane, mais aussi dans la fraction « cw » (Figure 32A panneau de gauche).

Les cellules de la souche $\Delta 2$ transformées par les plasmides pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269_{mT}-ctpC_{mV} ont été fractionnées par la même approche et les protéines des fractions obtenues ont été

143

analysées par western-blot. L'hybridation avec un anticorps anti-GFP, révélant à la fois la mTurquoise2 et la mVenus, confirme les résultats des fractionnements précédents. CtpC_{mV} (103,7 kDa) est essentiellement trouvée dans la fraction mb alors que Rv3269_{mT} (36,9 kDa) est retrouvée dans la fraction mb et aussi dans la fraction cw (Figure 32A panneau de droite). D'autre part, le plasmide pGMCS- P_{Rv3269} - $Rv3269_{mT}$ - $ctpC_{mV}$ a été introduit dans la souche H37Rv $\Delta(Rv3269-ctpC)$::zeo^R de Mtb et les cellules de la souche transformée ont été inactivées par un agent fixateur (PFA) et observées en microscopie à fluorescence. Ces observations ont montré que CtpC_{mV} et Rv3269_{mT} forment toutes les deux des patchs de fluorescence au niveau des membranes (Figure 32B). L'analyse des images obtenues a montré que les patchs de CtpC_{mV} et ceux de Rv3269_{mT} co-localisent. La co-localisation peut être visualisée grâce aux spectres des fluorescences bleu et jaune tracés sur les cellules individuelles sur les images de microscopie. De plus, la superposition a été quantifiée par le calcul via le plugin JACoP (Image J) d'un coefficient de Pearson (r; en rouge) mesurant la superposition des pixels dans le bleu et le jaune sur l'ensemble d'une image. Ce coefficient varie entre une valeur de 1 pour une co-localisation parfaite entre deux pixels et 0 pour une absence totale de co-localisation. Il a une valeur moyenne de 0,95 ou 0,96 pour les images montrées Figure 32B.

Le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269_{mT}-ctpC_{mV} a aussi été introduit dans la souche de *M. smegmatis* mc²155 Δ 2 et les observations en microscopie à fluorescence sur les cellules fixées à la PFA ont donné des résultats équivalents à ceux obtenus avec Mtb (résultats non montrés). La mesure de la co-localisation par calcul du coefficient de Pearson a été automatisée grâce à une macro-commande développée par Brice Ronsin, de la plateforme de microscopie du Centre de Biologie Intégrative (CBI), à Toulouse, permettant d'analyser un grand nombre de cellules sur les clichés de microscopie. Le coefficient de Pearson moyen obtenu sur 413 cellules individuelles est de 0,80 (Figure 32C), confirmant la co-localisation et suggérant que les deux protéines Rv3269 et CtpC s'agrègent dans des complexes multiprotéiques communs.

L'utilisation de *M. smegmatis* mc²155 $\Delta 2$ a aussi permis d'observer en microscopie à fluorescence des cellules non fixées. Avec ces cellules vivantes, nous avons observé que les patchs de Rv3269_{mT} et de CtpC_{mV} sont dynamiques. En effet, des prises de vue en *time-lapse*, toutes les 200 ms ont permis de réaliser des vidéos montrant le déplacement des patchs entre chaque image. Les deux types de patch ont ce comportement. La dynamique de ces patchs

Α



Figure 33. Quantification des patchs de Rv3269_{mT}.

A. Production de $Rv3269_{mT}$ sous le contrôle des promoteurs P_{Rv3269} sauvage ou $P_{sub.}$. Les extraits totaux non-lysés (NL) ou fractionnés sont analysés par western-blots avec un anticorps anti-eGFP.

B. Observation en microscopie à fluorescence de cellules *M. smegmatis* $\Delta 2$ exprimant $Rv3269_{mT}$ sous le contrôle du promoteur sauvage (P_{Rv3269}) ou muté ($P_{sub.}$).

C. Distribution des nombres moyens de patchs $Rv3269_{mT}$ obtenus après l'analyse de 173 bactéries de la souche *M. smegmatis* $\Delta 2$ portant le plasmide pGMCS-P_{sub}-*Rv3269_{mT}-ctpC*.

est trop rapide pour que nous puissions suivre un patch donné d'une image à la suivante, ce qui ne nous a pas permis de mesurer des trajectoires ou des vitesses de déplacement.

La détection de Rv3269_{mT} a également dévoilé des patchs très intenses et immobiles aux pôles. L'intensité de la fluorescence émise par ces patchs est tellement forte que, dans beaucoup de cellules, les réglages de prise de vue en microscopie rendent difficile la détection des autres zones fluorescentes, pouvant masquer les patchs sur les membranes (Figure 33B). Nous avons fait l'hypothèse que ces patchs intenses et immobiles pourraient correspondre à des corps d'inclusion, c'est-à-dire des agrégats de protéines en excès, qui n'auraient pas pu atteindre leur localisation membranaire physiologique. Afin de résoudre ce problème, nous avons muté le promoteur P_{Rv3269} dans l'optique de diminuer son expression, et de réduire la quantité de protéines en excès. P_{Rv3269} sauvage présente une région -10 étendue, de séquence TGTTAATGT (nucléotides consensus en gras). Nous avons modifié cette séquence en CCTTAATGT, afin d'introduire une mutation down-promoter. Une analyse en western-blot a tout d'abord confirmé que la substitution introduite, générant le variant du promoteur appelé P_{sub.}, diminue significativement la production de Rv3269_{mT}, avec une baisse de la proportion de la protéine retrouvée dans la fraction cw (Figure 33A). Même s'ils n'en apportent pas la preuve définitive, ces résultats suggèrent que la production de Rv3269_{mT} sous le contrôle du promoteur natif P_{Rv3269} génère des agrégats polaires de protéines, qui se retrouvent dans le culot de centrifugation définissant la fraction cw. Ainsi, la détection de Rv3269 dans cette fraction pourrait être un artéfact, mais des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Ensuite, l'observation en microscopie à fluorescence a montré une forte atténuation des spots polaires, révélant beaucoup mieux les spots bleus répartis sur la membrane (Figure 33B). L'abolition des spots polaires nous a alors permis de quantifier le nombre moyen de patchs par bactérie. Pour prendre en compte la dynamique des protéines au sein de la bactérie, 13 clichés ont été enregistrés à différents temps (toutes les 10 sec) et le nombre de patchs a été déterminé sur chacun des clichés. Le nombre moyen de patchs sur les 13 clichés a été calculé pour 173 cellules bactériennes. La distribution est centrée sur un nombre moyen de 7 patchs de Rv3269_{mT} par bactérie (Figure 33C).

2. Rôle du domaine N-terminal de Rv3269

Nous avons voulu confirmer que le motif transmembranaire prédit dans la région N-terminale de Rv3269 est bien responsable de sa localisation membranaire (Figure 34A). Pour cela, les acides aminés 8 à 27 de Rv3269 ont été délétés (Δ TM), sur les plasmides pGMCS-P_{Rv3269}-*Rv3269-ctpC*, pGMCS-P_{Rv3269}-*Rv3269_{Flag}-ctpC_{HIs}* et pGMCS-P_{Rv3269}-*Rv3269_{mT}-ctpC*.



Figure 34. La délétion des acides aminés 8 à 27 abolit la localisation membranaire de Rv3269 et le phénotype de résistance au zinc.

A. Le domaine putatif de liaison à la membrane est représenté en vert dans la région Nterminale de Rv3269. La délétion des résidus 8 à 27 a été effectuée et nommée Rv3269(Δ TM). **B.** Les souches indiquées ont été cultivées en absence ou en présence de 100 μ M de ZnSO₄. La croissance a été suivie au cours du temps (McFarland).

C. Visualisation en microscopie à fluorescence des constructions exprimant Rv3269_{mT} et Rv3269(Δ TM)_{mT} chez *M. smegmatis* Δ 2.

D. Analyse en western-blot des protéines Rv3269_{Flag} et Rv3269(Δ TM)_{Flag}.

Le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-*Rv3269*(Δ TM)-*ctpC* a été introduit dans la souche H37Rv $\Delta Rv3269$::*dif*4 et des tests de sensibilité ont montré que la délétion empêche de restaurer le phénotype de résistance à 100 µM de zinc (Figure 34B). En microscopie à fluorescence, nous avons observé qu'une souche porteuse du plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269(Δ TM)_{mT}-*ctpC* présente une perte complète des spots bleus (Figure 34C). Toutefois, une analyse en westernblot montre une très forte diminution du signal de la protéine Rv3269(Δ TM)_{Flag} (8,8 kDa) avec un extrait d'une souche portant le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269(Δ TM)_{Flag}-*ctpC_{Hls}*, indiquant que la délétion du domaine 8-27 de Rv3269 rend la protéine tronquée très instable (Figure 34D). Le fait qu'on n'observe aucun signal dans les fractions cw et mb et un faible signal dans la fraction cyt est en accord avec l'hypothèse que le domaine 8-27 de Rv3269 est effectivement le domaine transmembranaire qui ancre la protéine à la membrane plasmique. Cependant, la très forte instabilité de la protéine tronquée empêche de conclure définitivement avec ces seules informations. De même, nous ne pouvons pas conclure quant à la nécessité de la localisation membranaire pour assurer la fonction de Rv3269.



Figure 35. Organisation schématique des membranes biologiques.

A. Représentation schématique d'un lipide, constituant majeur des membranes.B. Structure schématique d'une bicouche lipidique.

<u>Chapitre 4 :</u> Des microdomaines membranaires fonctionnels liés à l'efflux des métaux ?

Les observations sur la co-localisation de Rv3269 et CtpC dans des « patchs » au niveau de la membrane plasmique nous ont amené à nous demander si le système d'efflux de métaux dépendant de la P-ATPase CtpC ne serait pas organisé dans des regroupements de protéines, en microdomaines membranaires fonctionnels (MMF). Avant de décrire les données expérimentales pour tester cette hypothèse, nous allons rappeler ce que sont les MMF et ce qu'on sait de leur organisation.

1. Membranes, microdomaines fonctionnels et protéines d'échafaudage

1.1. Organisation et hétérogénéité membranaire

Les membranes biologiques sont des barrières semi-perméables constituées d'une bicouche de lipides présentant une tête polaire et deux queues hydrophobes (Figure 35A). Ces lipides s'associent spontanément en deux feuillets, formant une partie centrale hydrophobe et deux surfaces hydrophiles qui interagissent avec l'environnement aqueux (Figure 35B). Toutes les cellules vivantes sont entourées d'une membrane plasmique qui sépare les constituants internes des cellules (cytoplasme) du milieu extérieur. Chez les organismes eucaryotes, des membranes délimitent aussi d'autres compartiments appelés organites ou organelles dans le cytoplasme (noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vacuole, endosome). Entre les membranes plasmiques et les membranes de ces organites, la composition en lipides peut être différente (Van Meer et al., 2008).

Trois grandes classes de lipides amphipatiques constituent les membranes : les phospholipides, les glycolipides et les stérols. Chez les cellules eucaryotes, les représentants respectifs de ces classes sont les glycérophospholipides, les sphingolipides et les cholestérols. Les glycérophospholipides et sphingolipides structurent de manière stable la membrane. Les propriétés physico-chimiques de ces lipides dépendent du niveau d'insaturation des acides gras (AG). Alors que les AG saturés (AGS) sont organisés les uns à côté des autres et ont tendance à former une membrane dense et rigide, les AG insaturés (AGI, présentant une ou plusieurs double liaison C=C) ont pour conséquence la formation de « coude(s) » qui, en augmentant l'espace entre les phospholipides adjacents, rendent la

151



Phase liquide désordonnée, Ld



Phase liquide ordonnée, Lo



Phase de gel, So



Cholestérol

Phospholipides saturés

Figure 36. Différents états des bicouches lipidiques.

La composition lipidique confère des propriétés physico-chimiques particulières aux membranes. Des régions riches en phospholipides insaturés sont caractérisées par un état fluide désorganisé (Ld). Des régions riches en phospholipides saturés sont plus rigides et forment un état gélifié (So). La présence de certains lipides comme le cholestérol dans les régions riches en phospholipides saturés fluidifie la membrane qui prend alors un état fluide et ordonné (Lo).

(d'après Harder, 2003 et Zalba and ten Hagen, 2017)

membrane plus fluide et plus fines que les bicouches exclusivement composées de lipides saturés.

En fonction de paramètres physiques, comme la température, mais aussi de la nature des lipides qui la composent, la membrane peut se trouver sous différents états de fluidité (Figure 36), allant d'un état solide ordonné (So), ou gel, à un état liquide désordonné (Ld). L'état So est enrichi en glycérophospholipides saturés, tandis que l'état Ld est enrichi en glycérophospholipides insaturés. Il existe aussi un troisième état de fluidité des membranes, lorsqu'elles contiennent des (sphingo-)lipides saturés et du cholesthérol : l'état liquide ordonné (Lo). Transitoire entre les deux états cités précédemment, cet état a un caractère solide ordonné tout en conservant un caractère fluide ou la diffusion latérale des lipides est libre, bien qu'avec une mobilité réduite. Le passage de l'état Ld (désordonné, fluidité importante, mobilité lipidique) à Lo est dû notamment à la présence de molécules de cholestérols (Hancock, 2006) (Figure 36). En 1982, Karnovsky et coll. ont introduit le concept de domaines lipidiques présentant des états physico-chimiques différents, associés à la présence de cholesterol (Karnovsky et al., 1982). En effet, le cholestérol en s'insérant entre les phospholipides agit comme un agent ordonnateur et empêche les grands mouvements des chaines acyles, rendant ainsi les membranes moins fluides.

1.2. Notion de radeaux lipidiques

L'interaction préférentielle entre stérols et certains lipides peut induire la formation de domaines membranaires denses avec des compositions lipidiques distinctes. En 1988 les travaux pionniers de Simons et van Meer démontraient que la distribution des espèces lipidiques était asymétrique au sein d'un même type cellulaire épithélial (Simons & Van Meer, 1988). Les ratios de glyocosphingolipides, phospholipides et cholestérol de la membrane plasmique étaient différents entre les faces apicale et basale de ces cellules. Ces observations ont aussi montré la formation d'amas de glycosphingolipides dans la partie exoplasmique de la membrane du Golgi. Ces regroupements de lipides forment une structure dense en microdomaine et il a initialement été proposé que ces domaines serviraient de plateformes pour la génération de vésicules de transport vers la membrane plasmique apicale.

Le concept d'assemblage lipidique en microdomaines a été énoncé en 1997 par Simons et Ikonen (Simons & Ikonen, 1997) et décrit comme des « radeaux lipidiques » (*lipid rafts*) impliqués dans la dynamique des compartiments membranaires ou dans l'élaboration de plateformes de signalisation cellulaire. Enrichis en sphingolipides et cholestérols, ces radeaux

153



Figure 37. L'état des membranes interfère avec la conformation des protéines membranaires.

Les membranes dans l'état Lo (à droite) paraissent épaissies et affectent l'organisation des protéines membranaires (en gris). En orange : cholestérol. (d'après Harder, 2003)

sont denses, ordonnés et apparaissent épaissis par rapport aux parties désordonnées et plus fluides de la membrane (Figure 37). Ceci leur confère une propriété caractéristique d'insolubilité dans le détergent Triton X-100 à 4°C qui leur vaut le nom de « DRM » (membranes résistantes aux détergents). De tels microdomaines sont présents dans les membranes au niveau des cavéoles (invaginations de la membrane plasmique) et desmosomes (région d'adhérence entre les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes) qui sont enrichis en sphingolipides et en stérols (Kurzchalia & Parton, 1999).

1.3. Protéines associées aux radeaux lipidiques

Les propriétés structurales et chimiques des radeaux lipidiques permettent aussi soit le regroupement soit l'exclusion de protéines membranaires spécifiques. Des analyses protéomiques ont révélé des protéines enrichies au sein des DRM telles que certaines protéines dites à ancre GPI (pour glycosylphosphatidylinositol) et des protéines de liaison au cholestérol. Ainsi, les radeaux ont pu être visualisés et confirmés par immunofluorescence et par transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET), en utilisant des protéines associées (Harder et al., 1998; Varma & Mayor, 1998; Zacharias et al., 2002).

Certaines modifications post-traductionnelles des protéines favorisent leur association avec les lipides. Par exemple, les myristylation et palmitylation augmentent l'hydrophobicité des protéines, ce qui accroit leur affinité pour la phase Lo et contribue à les recruter dans les microdomaines (Levental et al., 2010). Certaines protéines associées aux radeaux lipidiques peuvent s'oligomériser et contribuent ainsi à l'assemblage des complexes multimoléculaires. En effet, ces protéines dites d'« échafaudage » (*scaffold proteins*) permettent le recrutement d'autres protéines et favorisent leurs interactions, jouant ainsi le rôle d'organisateurs des microdomaines. Par exemple, les cavéolines sont des protéines oligomériques fortement associées au cholestérol qui contribuent à la formation des cavéoles (Lajoie et al., 2009; Murata et al., 1995; Smart et al., 1996). Bickel et coll. ont identifié dans les cavéoles purifiées à partir de tissu de poumons un type de protéine clé ubiquitaire et considéré maintenant comme marqueurs universels des radeaux lipidiques : les flotillines (Bickel et al., 1997).

1.4. Les flotillines

Le nom de flotilline provient de l'association de ces protéines avec les radeaux lipidiques, permettant de les retrouver dans une fraction insoluble « flottante » après centrifugation sur

155



Figure 38. Représentation topologique potentielle des flotillines eucaryotes.

Le domaine PHB (en rouge) caractéristique des protéines de type flotilline, est associé au feuillet interne de la membrane plasmique par deux régions hydrophobes (en vert). L'association membranaire est renforcée par des myristylation (orange) et palmitylation (bleu). Les flotillines 1 et 2 contiennent un domaine conservé (violet), propre aux flotillines, contenant des régions en hélices α qui pourraient être impliquées dans l'oligomérisation des flotillines assurant la formation de microdomaines membranaires.

(d'après Otto and Nichols, 2011)

gradient de sucrose (Bickel et al., 1997). Le génome humain code deux flotillines : flotilline-1 et flotilline-2. Elles sont également décrites sous les noms de Reggie-2 et Reggie-1 respectivement, pour leur rôle dans la régénération neuronale chez les poissons rouges (Schulte et al., 1997). Ce sont des protéines membranaires associées avec les microdomaines par liaison aux molécules de cholestérols, acylation (dont les palmitylations) et oligomérisation. Les flotillines marquées et visualisées par microscopie à fluorescence montrent des amas fluorescents dans les membranes cellulaires.

La flotilline-1 humaine est composée de 427 acides aminés pour une masse moléculaire de 47 kDa tandis que la flotilline-2 possède 428 résidus pour 48 kDa. De manière générale, les membres de la famille des flotillines partagent des homologies et motifs conservés dans les parties N- et C-terminales. La partie N-terminale contient un domaine SPFH (stomatine, prohibitine, flotillin, HflK/C) (Browman et al., 2007), aussi connu sous le nom de domaine PHB (prohibitine). A l'origine, la prohibitine est une protéine chaperon mitochondriale requise pour la stabilisation d'autres protéines. Le motif PHB est répandu chez de nombreuses protéines eucaryotes et procaryotes. La partie N-terminale des flotillines porte des sites d'acylation, contribuant à leur insertion dans la membrane. Les modifications post-traductionnelles des flotillines sont effectuées sur des résidus déterminés : la cystéine 34 de la flotilline-1 est palmitylée, comme la cystéine 4 de la flotilline-2. L'acide aminé Gly2 de la flotilline-2 est aussi myristylé (Neumann-Giesen et al., 2004). Les flotillines portent également un motif d'association à la membrane en N-terminal. Ce motif hydrophobe ne traverse pas la membrane mais il est inséré en épingles à cheveux dans le feuillet interne des membranes (Morrow & Parton, 2005; Otto & Nichols, 2011) (Figure 38).

La partie C-terminale porte le domaine « flotilline » à proprement parler, spécifique de cette famille de protéines. Cette région est enroulée en hélice (dite *coil-coiled*) et contient des répétitions de motifs Acide Glutamique-Alanine (EA) importants pour la fonction d'oligomérisation des flotillines (Figure 38). Les études de Soli et coll. ont démontré en effet que la partie C-terminale, qui présente 5 répétitions EA, est à l'origine de la formation d'homoet hétéro-tétramères formés par les flotillines-1 et -2. De plus, la délétion par mutagénèse de la région des acides aminés 239 à 320 abolit la formation de ces tétramères (Solis et al., 2007).

Les flotillines ont des fonctions de protéines chaperons liées aux membranes en formant un noyau autour duquel se concentrent les protéines retrouvées dans les radeaux lipidiques. De telles plateformes sont importantes pour le trafic membranaire (endocytose), l'adhésion cellulaire (recrutement, stabilisation des cadhérines pour le maintien des jonctions entre cellule ainsi que la formation de desmosomes) (Bodin et al., 2014). De plus, ces

domaines fournissent un environnement favorable pour le fonctionnement de récepteurs des voies de signalisation et la transmission de messages à travers les membranes. Par exemple, Baumann et coll. ont identifié l'activation indépendante de la PI3 kinase de la voie de signalisation de l'insuline *via* les flotillines (Baumann et al., 2000). Les flotillines participent aussi à l'endocytose induite par la protéine kinase C (PKC) (Cremona et al., 2011), ainsi qu'à l'activation/polarisation de cellules immunitaires (Langhorst et al., 2006; Ludwig et al., 2010; Rajendran et al., 2009).

Les flotillines sont des protéines conservées dans le règne du vivant ou elles sont ubiquitaires. Des orthologues ont été décrits chez les plantes (Borner et al., 2005), champignons (Rivera-Milla et al., 2006), ainsi que dans tous les types cellulaires de mammifères. La découverte des flotillines chez les bactéries date de 1999 ou Tavernarakis et coll. ont rapporté l'identification d'un grand nombre de protéines bactériennes appartenant à la famille SPFH (Tavernarakis et al., 1999).

1.5. Microdomaines membranaires fonctionnels (MMF) chez les bactéries

Du fait de l'absence de leurs constituants lipidiques majeurs (sphingolipides et cholestérol) dans la plupart des membranes des bactéries et archées, l'existence de microdomaines dans ces organismes a pendant longtemps été négligée. Cependant, la découverte de protéines bactériennes à domaine SPFH a remis cette idée en question. Des **microdomaines membranaires fonctionnels (MMF)** ont été mis en évidence chez la bactérie *B. subtilis*. A l'origine de cette étude, Lopez et coll. se sont aperçu que la protéine kinase C (KinC), liée à la membrane et nécessaire pour la formation de biofilm, perd sa fonctionnalité dans le mutant $\Delta yisP$, déficient pour une protéine nécessaire à la production de lipides polyisoprénoïdes. Par la suite, leur hypothèse suggérant l'existence de tels microdomaines chez *B. subtilis* s'est confirmée par l'analyse protéomique de fractions membranaires résistantes aux détergents ou de nombreuses protéines associées aux systèmes de sécrétion, de signalisation ainsi que deux flotillines putatives : FloA et FloT, ont été rapportées (D. López & Kolter, 2010).

Malgré l'absence de certains constituants originellement identifiés comme « formateurs » des microdomaines eucaryotes, les membranes bactériennes possèdent des lipides polyisoprénoïdes, cycliques ou non, présentant des propriétés structurales similaires. Parmi eux, les caroténoïdes, non-cycliques, à longue chaine carbonée (environ 40 atomes de C), sont les plus abondants. Ils augmentent la rigidité au niveau membranaire et sont à l'origine


Figure 39. Représentation schématique des domaines protéiques des deux flotillines FloA et FloT de *Bacillus subtilis*.

Le domaine MAD (*membrane-anchoring domain*) représente une région d'ancrage membranaire ; le domaine SPFH est un domaine protéique typique des protéines des flotillines ; et CC (pour *coiled-coil region*) représente une région enroulée en spirale qui se localise aux régions C-terminales de ces protéines (d'après Bramkamp and Lopez, 2015).



Figure 40. Implication des flotillines dans différents processus cellulaires chez *B. subtilis.*

Illustration de la membrane plasmique de *B. subtilis* dans laquelle s'organisent des MMF (représentés en vert). Les protéines nécessaires aux fonctions biologiques telles que la transduction des signaux cellulaires, la protéolyse ou l'export de protéines *via* les systèmes de sécrétion sont recrutées par l'action des flotillines FloA et FloT. (d'après Bramkamp and Lopez, 2015)

de la pigmentation des cellules bactériennes. Un type de caroténoïdes particulier, la staphyloxanthine, est trouvé chez *S. aureus* à qui il donne sa couleur dorée caractéristique, justifiant son nom. Contrairement au cholestérol, les hopanoïdes, lipides pentacycliques dérivé de l'hopane, ne sont pas présents chez les eucaryotes mais ils possèdent des cyclisations similaires et agissent comme substituts au cholestérol apportant de la rigidité aux membranes. Leur structure moléculaire est en effet similaire et module la fluidité membranaire (plus leur concentration augmente dans un espace donné, plus les lipides sont ordonnés, état Lo). L'enrichissement en ces différents lipides aux propriétés hydrophobes dans des espaces spécifiques créé des environnements compacts réduisant la diffusion des protéines membranaires, comme chez les eucaryotes. L'acide zaragocique est un inhibiteur ciblant la synthèse du squalène, précurseur des isoprénoïdes. Des cultures de *S. aureus* traitées par cet inhibiteur perdent leur pigmentation et voient la formation des MMF inhibée (Pelz et al., 2005).

Les flotillines bactériennes possèdent des répétitions caractéristiques de motifs Alanine-Acide Glutamique (AE), précédemment décrit pour les eucaryotes. En revanche, leur domaine de fixation à la membrane (MAD, *membrane-anchored domain*) apparaît simplifié, avec seulement la région hydrophobe d'ancrage à la membrane et l'absence de modifications post-traductionnelles (Figure 39).

B. subtilis est l'organisme modèle dans lequel les études sur les flotillines sont les plus complètes. Le génome de *B. subtilis* code deux flotillines : YuaG et YqfA, nommées respectivement FloT et FloA. YuaG/FloT et YqfA/FloA présentent une sub-localisation membranaire nette et caractéristique de microdomaines (Donovan & Bramkamp, 2009; D. López & Kolter, 2010). De plus, un traitement par l'acide zaragocique fait progressivement disparaitre les foci observés avec FloT marqué, comme attendu pour une organisation en MMF.

L'assemblage dans des MMF stabilise les complexes multimériques et favorise les interactions entre protéines. Cette organisation en plateformes dépendant des flotillines est nécessaire pour plusieurs processus biologiques majeurs chez les bactéries tels que la transduction de signaux, le renouvellement des parois bactériennes ou encore la résistance aux antibiotiques (Figure 40). Ainsi, Lopez et coll. ont montré que la protéine de liaison à la pénicilline (PBP2) est retrouvée au sein des MMF chez une souche de *S. aureus* multirésistante aux antibiotiques (SARM). PBP2 forme des hétéro-oligomères dépendants de l'activité de la flotilline FloA. En inhibant la formation de ces MMF, les auteurs ont démontré que PBP2 est dissociée en monomère et n'est plus capable de conférer la résistance aux β -lactames

161

(García-Fernández et al., 2017). Ce même groupe a également démontré que FloA intérragit physiquement au niveau de la membrane avec Rny, une protéine du dégradosome (complexe multiprotéique intervenant dans le traitement de l'ARN ribosomique et la dégradation des ARNm), afin de favoriser l'oligomérisation de Rny nécessaire à son bon fonctionnement (Koch et al., 2017).

D'autres travaux ont établi l'importance des MMF dans la transduction de signaux. Des protéines transmembranaires captent des signaux extracellulaires et doivent se dimériser pour lier leur ligand et transmettre le signal du côté interne de la membrane. C'est le cas pour les systèmes à deux composants. Une protéine kinase membranaire perçoit un ligand extérieur, se dimérise et s'auto-phosphoryle, puis transfert le groupement phosphate à un régulateur intracellulaire qui va déclencher une réponse transcriptionnelle. L'oligomérisation des protéines et la diminution de la diffusion des protéines dans les MMF augmente la probabilité d'interactions entre les protéines kinase/régulateur. Par exemple, KinC est une protéine cargo des MMF, responsable du passage de la forme planctonique à la formation de biofilm chez *B. subtilis*, qui interagit avec les deux flotillines FIoT et FIoA.

De manière intéressante, Schneider et coll. ont montré que le confinement spatial des MMF pouvait être distinct entre ceux organisés par FloT et ceux organisés par FloA (Schneider et al., 2015). Ils se sont intéressés à deux systèmes à deux composants : PhoPR et ResDE respectivement impliqués dans le renouvellement du peptidoglycane et la régulation génique en anaérobiose. Par microscopie à fluorescence et des techniques de double-hybride bactérien, ils ont pu déterminer que PhoR co-localisait et interagissait uniquement avec FloA tandis que ResE ne le faisait qu'avec FloT. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister des familles de microdomaines distincts, régulés par des flotillines différentes. En effet, d'après Wagner et coll. les MMF dépendant uniquement de FloA semblent être impliqués dans la réorganisation des parois alors que des MMF dépendants de FloT et FloA seraient liés aux adaptations métabolique/de survie (R. M. Wagner et al., 2017). Un recrutement de protéines cargo spécifique à chaque famille de MMF permettrait de réguler des fonctions spécifiques pour chaque type de MMF.

Du point de vue phylogénétique, on note une hétérogénéité de la répartition des flotillines. Ainsi, certaines espèces possèdent deux gènes codant des flotillines (*B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa*) tandis que d'autres n'en ont qu'un seul (par exemple *L. monocytogenes, S. aureus*, Mtb), pouvant être un homologue de FloA, comme chez *L. monocytogenes* et *S. aureus*, ou bien de FloT, comme *E. coli* et Mtb. Ces données alimentent l'importance de l'organisation en MMF par les flotillines pour plusieurs fonctions. Seul le pathogène *Mycoplasma pneumoniae*, au génome très petit et dépourvu de système de transduction de

163

signal, n'a révélé aucun gène codant une flotilline dans son génome (Bramkamp & Lopez, 2015; Padilla-Vaca et al., 2019).

La conservation de microdomaines membranaires apparaît comme une propriété générale à travers les domaines de la vie. En outre, l'étude par microscopie à fluorescence de la localisation de plus de 200 protéines membranaires de *B. subtilis* a révélé que la majorité d'entre elles présentent des sub-localisation au niveau de la membrane, qui peuvent être de plusieurs type : polaire, ponctuelle ou encore en patchs. Ces données suggèrent que différents types de micromodaines peuvent être établis, et que des protéines « échafaudage » spécialisées pourraient être à l'origine de l'organisation de chacun de ces types de MMF. Avec le développement de technologie de pointe et des méthodes d'analyse de biophysique, Dempwolff et coll. ont récemment proposé une évolution du concept de protéine échafaudage. Ils ont observé que les flotillines pouvaient co-localiser de manière transitoire avec les protéines membranaires FtsH, KinC ou SecA mais qu'elles ne restaient pas associées aux MMF contenant ces protéines (Dempwolff et al., 2016). Le modèle proposé est que les flotillines bactériennes agiraient comme des aides à l'insertion de certaines protéines membranaires dans des environnements lipidiques particuliers, mais qu'une fois ces protéines regroupées, les flotillines ne resteraient pas en interaction avec elles dans les MMF.



Figure 41. La flotilline de Mtb Rv1488 ne co-localise pas avec Rv3269 et CtpC.

Les constructions plasmidiques utilisées sont schématisées et ont été installées dans la souche *M. smegmatis* $\Delta 2$. **A.** L'analyse de la localisation de Rv1488mV a été réalisée par western-blot (à gauche) et par microscopie à fluorescence (à droite). **B.** Observation en microscopie à fluorescence d'une bactérie produisant les trois protéines hybrides fluorescentes Rv1488mC, Rv3269mT et CtpCmV. Les patchs communs entre Rv3269mT et CtpCmV sont marquées d'une flèche blanche ; les patchs rouges formés par Rv1488 sont marqués d'une flèche rouge. **C.** Observation en microcoscpie à fluorescence de bactéries exprimant Rv3269mT et Rv1488mV. Le coefficient de Pearson (r, en rouge) calculé pour l'image est de 0,35. **D.** Coefficient de Pearson moyen (ligne rouge) obtenu sur l'étude de 756 cellules de *M. smegmatis* $\Delta 2$ portant le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269_{mT}-Rv1488_{mV}. Chaque point représente une cellule.

2. Les microdomaines contenant Rv3269 et CtpC sont indépendants de la flotilline Rv1488

La co-localisation de Rv3269 et de CtpC dans des foyers membranaires suggère une organisation en microdomaines membranaires fonctionnels (MMF). Une première question qui s'est posée est de savoir si le regroupement en patchs de Rv3269 et CtpC est dépendant de la flotilline.

Une recherche par BLAST avec les séquences des flotillines FloA et FloT de *B. subtilis* n'identifie aucune protéine similaire à FloA, ni chez Mtb ni chez *M. smegmatis*. En revanche, une recherche avec la séquence de FloT identifie une protéine présentant 27% d'identité avec FloT, sur un segment de 92 acides aminés chez Mtb. Cette protéine, Rv1488, fait 381 acides aminés et elle est de fonction inconnue. Elle porte un segment transmembranaire hypothétique dans sa région N-terminale, qui lui permettrait d'adopter une topologie du même type que FLoT, et plusieurs répétitions de motifs EA ou AEA dans ce qui serait son domaine cytoplasmique. Rv1488 a donc des caractéristiques typiques de flotilline, et sa forte similarité avec FloT en fait le meilleur candidat pour être une flotilline de Mtb. Une recherche dans la base de données Pfam (https://pfam.xfam.org/) identifie deux protéines de Mtb qui portent un motif PHB : Rv1488, renforçant l'hypothèse que c'est bien une flotilline, et Rv3090, une protéine membranaire de 295 acides aminés et de fonction inconnue. Rv3090 présente deux segments transmembranaires dans sa partie N-terminale, ce qui serait atypique pour une flotilline, mais elle porte par ailleurs des motifs AE et on manque d'informations pour savoir si c'est ou pas une protéine de type flotilline chez Mtb.

Nous avons, dans un premier temps, déterminé la localisation de la flotilline probable Rv1488. Nous avons d'abord remplacé les séquences de $Rv3269_{mT}$ -*ctpC* par celle de Rv1488 sur le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}- $Rv3269_{mT}$ -*ctpC_{mV}*, générant Rv1488_{mV}, une protéine reportrice fluoresçant en jaune, exprimée sous le contrôle du promoteur P_{Rv3269}. Une analyse en westernblots a tout d'abord montré que la protéine Rv1488_{mV} est retrouvée dans les fractions cw et mb (Figure 41A), de manière analogue à ce qui avait été observé pour Rv3269 (Figure 32A). La localisation membranaire a également été observée par microscopie à fluorescence, où Rv1488_{mV} forme des patchs membranaires dynamiques, là encore de manière analogue à Rv3269.

La question suivante était de savoir si les patchs de fluorescence formés par Rv1488 d'une part et Rv3269/CtpC d'autre part sont identiques. Pour répondre à cette question, nous avons construit un plasmide exprimant les trois protéines d'intérêt (Rv3269, CtpC et Rv1488)



Figure 42. Le mutant Rv1488-KO n'est pas sensible au zinc.

A. Schématisation (gauche) et vérification sur gel d'agarose (droite) de la délétion du gène *Rv1488*. Amplification du fragment sauvage de 2,4 kb (piste 1), et d'un fragment de 1,4 kb pour une délétion du gène *Rv1488* (piste 2). Le fragment de 1,4 kb a été vérifié par séquençage. La délétion a également été confirmée par l'absence d'amplification en PCR en utilisant une amorce interne s'hybridant dans le fragment à déléter. Un fragment sauvage de 1,05 kb est produit (piste 3) alors qu'aucune amplification n'est obtenue avec l'ADN de la souche mutante (piste 4).

B. La souche H37Rv sauvage (WT) et la souche mutée H37Rv $\Delta Rv1488$::*dif*6 ont été cultivées en absence ou en présence de 100 et 250 µM de ZnSO₄. La croissance a été suivie au cours du temps (McFarland).

fusionnés respectivement aux protéines fluorescentes reportrices mTurquoise2, mVenus et mCherry. L'observation en microscopie à fluorescence d'une souche de Mtb portant ce plasmide a montré des patchs de chacune des trois couleurs, avec une co-localisation de Rv3269_{mT} (bleu) et CtpC_{mV} (jaune) mais des patchs rouges formés par Rv1488_{mCherry} ne co-localisant pas avec les deux autres, et qui semblent même s'exclure mutuellement (Figure 41B). La fluorescence rouge n'étant pas optimale pour une localisation précise, car la longueur d'onde dans le rouge donne un signal moins bien résolu, nous avons construit un autre plasmide, pGMCS-P_{Rv3269}-Rv3269_{mT}-Rv1488_{mV}, n'exprimant que deux protéines reportrices fluorescentes. Les images obtenues par microscopie à fluorescence ont montré que les deux protéines donnent des patchs fluorescents, mais sans superposition, confirmant l'absence de co-localisation entre la probable flotilline Rv1488 et Rv3269 (Figure 41C). Le test de Pearson automatisé utilisé précédemment a permis d'analyser 756 bactéries, donnant un coefficient de Pearson moyen de 0,43 montrant que Rv3269-CtpC ne co-localisent pas avec Rv1488 (Figure 41D).

Parallèlement, nous avons inactivé le gène Rv1488 dans le chromosome de la souche H37Rv de Mtb, générant la mutation non marquée $\Delta Rv1488::dif$ 6 (Figure 42A). Un test de sensibilité au zinc a été réalisé avec ce mutant, et il s'est révélé aussi résistant au zinc que la souche sauvage (Figure 42B), démontrant que, contrairement à l'absence de la protéine Rv3269, l'absence de la flotilline hypothétique Rv1488 n'a pas d'impact mesurable sur l'efficacité de l'efflux du zinc par la P-ATPase CtpC.

Ces résultats ont permis d'affirmer que la localisation et l'activité de Rv3269-CtpC sont indépendantes de la flotilline de Mtb Rv1488. Au vu de l'organisation de Rv3269, rappelant celle des protéines flotillines bactériennes (petites protéines, liaison membranaire, répétitions de motifs AE), nous pensons avoir découvert un nouveau type de métallochaperon jouant le rôle de protéine "d'échafaudage", chez Mtb afin d'assembler des microdomaines membranaires dédiés à l'homéostasie des métaux. Dans un dernier chapitre de conclusions et perspectives, nous allons discuter de nos résultats, et décrire quelques expériences, dont certaines doivent être complétées, qui visent à tester ce modèle.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Essentiels à tous les organismes vivants, les métaux de transition sont aussi toxiques en trop forte concentration. Les organismes doivent ainsi réguler de manière fine et efficace à la fois l'influx et l'efflux des métaux pour leur survie. Elément de l'immunité nutritionnelle, l'utilisation du flux métallique par les cellules immunitaires est une stratégie microbicide élaborée visant à restreindre la biodisponibilité des métaux pour empêcher la multiplication des pathogènes. Depuis les années 2010, mon équipe d'accueil a contribué à la mise en évidence d'une autre modalité bactéricide utilisant les métaux de transition, tels que le zinc ou le cuivre, que les cellules phagocytaires accumulent dans les vésicules d'endocytose pour intoxiquer les pathogènes. Afin de résister à l'empoisonnement par les métaux, différents mécanismes assurant la résistance des bactéries ont été mis en place au cours de l'évolution, dont l'emploi de pompes d'efflux permettant de maintenir une concentration en métaux non toxique dans le cytoplasme. Mes travaux de thèse ont montré que la pompe à efflux CtpC a besoin pour conférer la résistance au zinc de la présence d'une petite protéine, Rv3269, et nous proposons que cette protéine pourrait avoir deux fonctions complémentaires, comme métallochaperon, pouvant présenter le zinc à la P-ATPase CtpC, et comme protéine d'échafaudage, servant de noyau et/ou d'aide au repliement protéique pour l'assemblage de plateformes de prise en charge des métaux.

1. CtpC, une pompe à efflux du zinc ?

Chez *M. tuberculosis*, le rôle de la P-ATPase CtpC a été controversé. Par des approches de génétique et de complémentation phénotypique, notre groupe a montré que CtpC était nécessaire à Mtb pour résister aux fortes concentrations en zinc dans le milieu de culture ou au sein des macrophages (Botella et al., 2011). Cependant, les travaux de Padilla-Benavides et coll. ont contesté cette conclusion (Padilla-Benavides, Long, et al., 2013). En analysant sa séquence en acides aminés, les auteurs ont montré que CtpC est particulière et qu'elle ne possède pas tous les attributs considérés comme caractéristiques des Zn-P_{1B-2}-ATPases. De plus, des tests d'activité ATPasique de CtpC, effectués avec une protéine purifiée, ont montré que le manganèse produisait une plus forte activité que le zinc. Enfin, si une mutation inactivant CtpC rendait bien Mtb sensible au zinc, l'inactivation du gène homologue de *ctpC* chez *M. smegmatis (MSMEG_6058)* n'avait pas cet effet. L'ensemble de leurs observations ont conduit les auteurs à proposer que CtpC serait un transporteur de Mn²⁺, et que la sensibilité

au zinc serait une conséquence de la sensibilité au stress oxydant observée chez le mutant délété de *ctpC*. Toutefois, il faut noter que les activités ATPasiques, et donc les efficacités de transport enregistrées au cours de ce travail sont étonnamment faibles pour une P-ATPase. En effet les résultats proposent une cinétique de transport par CtpC de 1,2 Mn²⁺/min, et 0,4 Zn²⁺/min ; en comparaison, l'ATPase ZntA d'*E. coli* transporte environ 20 Zn²⁺/min (Mitra & Sharma, 2001), et l'ATPase CopA de Thermotoga maritima transporte jusqu'à 143 Cu⁺/min (Hatori et al., 2008). En outre, nos observations pourraient expliquer certaines différences entre les résultats de Padilla-Benavides et coll. et les nôtres. Leurs résultats obtenus chez *M. smegmatis* sont expliqués par nos données (Figure 28), car *MSMEG* 6059-6058 n'est pas impliqué dans la résistance au zinc. De plus, les tests de sensibilité du simple mutant $\Delta Rv3269:: dif4$ et chez *M. smegmatis* ont montré que CtpC seule n'est pas capable de restaurer le phénotype de résistance au zinc (Figures 25 et 28). Or la protéine CtpC purifiée par Padilla-Benavides et coll. a été produite chez E. coli en absence de Rv3269, et l'activité ATPasique est donc mesurée sur CtpC seule. Afin d'identifier sans ambiguïté le substrat de CtpC, les deux protéines devraient être co-exprimées et co-purifiées et les activités ATPasiques devraient être mesurées en présence de Rv3269. Malgré l'absence de cette preuve directe, nous pensons que l'ensemble de nos résultats est en accord avec l'hypothèse que CtpC est bien une P-ATPase à zinc, mais avec un fonctionnement spécifique, lié à l'absence des motifs canoniques des P-ATPAses à zinc. Outre le fait que le mutant $\triangle ctpC$ (i) accumule du zinc et, (ii) soit sensible à de fortes concentrations en zinc, l'expression de CtpC est spécifiquement induite par le zinc, non seulement chez Mtb (Botella et al. 2011), mais aussi chez *M. smegmatis* (Figure 27E). L'expression des deux protéines Rv3269 et CtpC chez un mutant de *M. smegmatis* sensible au zinc permet de restaurer la résistance au métal (Figure 28). De plus, nous avons mis en évidence un domaine de liaison du métal situé dans la partie C-terminale de Rv3269 et les analyses biochimiques de ce motif DLHDHDH ont démontré que le zinc peut s'y fixer, mais pas le manganèse (Figure 30A).

2. Transport du zinc par CtpC ; Rv3269, un métallochaperon à zinc présumé

Nous avons établi, à la fois chez Mtb par des mutations perte de fonction et chez *M. smegmatis* par gain de fonction, que Rv3269 est nécessaire pour assurer la résistance au zinc, mais quel est son mécanisme d'action ?

Plusieurs ATPases à cuivre fonctionnent avec des métallochaperons, dont les gènes sont en opéron avec ceux des P-ATPases. Leur fonction de protéines métallochaperons, pour la plupart solubles, capables de fixer du cuivre et de le présenter aux Cu-ATPases a été établie.

Par exemple, l'activité ATPasique de la Cu-ATPase CopA d'*A. fulgidus* est significativement plus élevée lorsque CopZ, la métallochaperon associée, est présente (González-Guerrero & Argüello, 2008).

De manière intéressante, un métallochaperon atypique, CupA, a été identifié par Fu et coll. chez S. pneumoniae. CupA possède dans sa partie N-terminale un domaine d'ancrage à la membrane. La délétion de ce motif rend la bactérie incapable de résister au cuivre, démontrant un rôle important de la localisation membranaire. De manière comparable, Rv3269 possède un domaine de liaison à la membrane du côté N-terminal, et sa délétion abolit complètement la résistance au zinc (Figure 34). Sans ce domaine, la localisation membranaire de Rv3269 est perdue et la protéine produite $Rv3269(\Delta TM)$ semble être déstabilisée dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent l'existence d'un nouveau type de métallochaperons ancrés aux membranes. Il serait intéressant de fusionner SpCupA et SpCopA à des molécules fluorescentes et d'évaluer si elles co-localisent, comme le font Rv3269 et CtpC. En outre, la production du domaine soluble de SpCupA et du domaine N-terminal de liaison au métal (MBD) de CopA (CopA^{MBD}) a permis de mettre en évidence le transfert de cuivre entre ces deux fragments protéiques. Une suite nécessaire à notre travail sera de tester s'il en est de même pour Rv3269 et CtpC. Cependant il est important de noter que Rv3269 et ses homologues (voir ci-dessous, paragraphe 5) sont fondamentalement différentes de tous les métallochaperons identifiés à ce jour. En effet, ces métallochaperons (à cuivre) ont des structures de type ferredoxin, alors que Rv3269 et ses homologues possèdent une hélice alpha transmembranaire et une partie cytoplasmique prédite pour être intrinsèquement déstructurée.

Le rôle des domaines de liaison aux métaux des P_{1B}-ATPases est un sujet encore ouvert. Plusieurs études ont montré que la perte de ces domaines peut être responsables d'une diminution de l'activité de la P-ATPase mais qu'ils ne sont pas essentiels pour cette activité. Ils auraient des fonctions régulatrices de l'ATPase (Gourdon et al., 2011; A. T. Smith et al., 2014). Chez *A. fulgidus*, la délétion du MBD de CopA a permis de suggérer un transfert du cuivre du métallochaperon CopZ directement au site de liaison du métal situé dans le site catalytique du transport du métal, formés par les domaines transmembranaires TM6-TM8.



Figure 43. Le domaine N-terminal de liaison du métal est nécessaire à CtpC pour conférer la résistance au zinc.

Les souches indiquées ont été cultivées en absence ou en présence de 100 µM de ZnSO₄. La croissance a été suivie au cours du temps (mesure de turbidité, unités McFarland).

CtpC possède un domaine N-terminal atypique par rapport à ceux des Cu- et Zn-ATPases. Afin de tester le rôle de ce domaine ; la délétion des acides aminés 2 à 85 de CtpC a été réalisée sur le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-*Rv3269-ctpC*, formant le plasmide pGMCS-P_{Rv3269}-*Rv3269-*(Δ MBD)*ctpC*. Les tests de complémentation de la souche H37Rv Δ (*Rv3269ctpC*)::zeoR ont montré que le domaine N-terminal est requis pour conférer la résistance au zinc chez Mtb (Figure 43). Ce résultat suggère que ce domaine pourrait être un MBD atypique servant de relais entre le métallochaperon Rv3269 et le site catalytique du transport du métal à travers CtpC.

Pour tester cette hypothèse, nous envisageons de produire le domaine N-terminal de CtpC ainsi que la partie soluble de Rv3269 (^{SOL}Rv3269) afin de mesurer par dialyse à l'équilibre et par des approches de RMN la fixation du zinc sur le domaine N-terminal de CtpC et un éventuel transfert d'ions zinc entre les deux protéines. Le domaine N-terminal de CtpC ne porte pas de motif CXXC classique des MBD mais une seule cystéine (C²²) suivie d'un acide aspartique (D²³) qui pourraient coordonner un métal avec une histidine (H⁴⁴) située plus loin dans la séquence. Des substitutions de chacun de ces acides aminés seront construites et leur effet sera testé sur le fonctionnement de CtpC. Ces substitutions seront aussi introduites sur les protéines purifiées afin de les soumettre aux mêmes analyses biochimiques que les protéines natives.



Figure 44. La mutation des trois motifs EA de Rv3269 déstabilise CtpC et la résistance face au zinc chez *M. smegmatis*.

A. Organisation schématisée d'une flotilline. La région N-terminale de la flotilline permet l'ancrage (domaine MAD) et l'interaction (domaine PHB) aux lipides des MMF. La région C-terminale est responsable de l'oligomérisation de la flotilline. Les répétitions d'alanine et d'acide glutamique (EA) sont représentées en vert (d'après García-Fernández et al., 2017). **B.** Rv3269 possède trois répétitions de motif EA (en orange). Les acides glutamiques E substitués sont indiqués : ${}^{55}E \rightarrow A$, ${}^{59}E \rightarrow V$, ${}^{71}E \rightarrow A$. **C.** Tests de sensibilité au zinc des souches mc²155 sauvage, mc²155 $\Delta 2$ complémentée ou non par les plasmides exprimant *Rv3269-ctpC* ou des variants délétés de toute la région cytoplasmique (Rv3269₁₋₂₉) ou mutés pour les acides glutamiques des amorces spécifiques des gènes *Rv3269, ctpC* et *sigA* (gène de ménage) dans la souche *M. smegmatis* $\Delta 2$. Chaque point représente un réplica de l'expérience.

E. Analyse en western-blot de CtpC et Rv3269 native ou substituée. Rv3269 et CtpC sont respectivement marquées avec les étiquettes Flag et His (à gauche), ou fusionnées aux protéines mTurquoise2 et mVenus (à droite).

3. Rv3269, une protéine d'échafaudage organisant des MMF au niveau de la membrane

Rv3269 partage avec les flotillines une organisation générale commune, avec une région transmembranaire N-terminale, suivie d'une région exposée vers le cytoplasme, qui pourrait interagir avec d'autres protéines pour les regrouper en cluster au sein de MMF (Figure 44A). Nous avons construit une délétion de toute la partie cytoplasmique de Rv3269, n'exprimant que la région transmembranaire (Rv3269₁₋₂₉). Cette délétion entraine une perte de la capacité à résister au zinc (Figure 44C), démontrant que la partie cytoplasmique de Rv3269 est indispensable pour que l'efflux du zinc fonctionne. Une autre propriété partagée avec les flotillines est la présence de motifs répétés EA et AEA dans la queue intracytoplasmique (Figure 44A et B). Afin de tester le rôle de ces motifs pour Rv3269, nous avons construit des variants en substituant les acides glutamiques d'un seul ou bien des 3 motifs EA de Rv3269 (les résidus glutamiques E des positions 55, 59 et 71 ont été changés respectivement en alanine A, valine V et alanine A) et testé l'effet de ces substitutions sur la résistance au zinc dans la souche de *M. smegmatis* ∆2. Le changement d'un seul résidu E n'a montré aucune différence de sensibilité. Cependant, la substitution des trois E à la fois abolit complètement le phénotype de résistance au zinc (Figure 44C), et ce malgré un niveau d'expression des ARNm de Rv3269 muté et de ctpC (Figure 44D) et des protéines Rv3269 triple substituées (Figure 44E) comparables à ceux observés pour les allèles sauvages. En revanche, lorsque les trois E de Rv3269 sont modifiés, l'analyse en western-blot montre une disparition de CtpC au niveau des membranes, que ce soit pour la forme $CtpC_{His}$ ou pour $CtpC_{mV}$ (Figure 44D). Les motifs répétés EA de Rv3269 semblent donc indispensables pour que CtpC soit stable dans la membrane. Ceci pourrait s'expliquer si les motifs EA de Rv3269 étaient impliqués dans une interaction physique avec CtpC nécessaire pour son intégration au niveau membranaire. Une autre possibilité serait que la protéine CtpC puisse atteindre sa localisation membranaire, mais soit rapidement dégradée, sauf si une interaction Rv3269/CtpC la stabilisait en assurant son agrégation dans les MMF. Ces observations renforcent la conclusion que Rv3269 pourrait être une protéine d'échafaudage, recrutant CtpC au sein de clusters. Des expériences de biochimie montrant l'interaction physique entre les molécules de Rv3269, qui formeraient des complexes multiprotéiques et aussi l'interaction entre Rv3269 et CtpC sont nécessaires pour confirmer notre modèle. Nos premiers essais de co-précipitation n'ont pas été concluants, et il faudra optimiser ces expériences, notamment en faisant agir un agent pontant sur les fractions membranaires contenant Rv3269 et CtpC avant la précipitation. Les interactions entre métallochaperons et P-ATPases sont des phénomènes cycliques et transitoires pouvant être difficile à mettre en évidence in vitro. De nouvelles approches basées sur la reconstitution de la protéine fluorescente GFP (tripartite split-GFP) (Pedelacg et al., 2019) ont récemment



Figure 45. Rv0968 et Rv1993c co-localisent avec Rv3269.

A. Schéma de l'organisation des opérons *Rv3269-ctpC*, *cmtR-Rv1993c-ctpG* et *csoR-Rv0968-ctpV*. **B.** Alignement des protéines Rv3269, Rv1993c et Rv0968. **C.** Les plasmides représentés (gauche) ont été installé dans la souche *M. smegmatis* $\Delta 2$. Les bactéries ont été fixées par de la PFA (4%) puis visualisées par microscopie à fluorescence. Le coefficient de Pearson (r, en rouge) est calculé par l'application du plugin JACoP sur l'ensemble de l'image. Echelle = 2 µm. **D.** Coefficients de Pearson moyen (ligne rouge) obtenus sur l'étude de 346 (Rv3269-Rv0968) et 449 (Rv3269-Rv0968) cellules de *M. smegmatis* $\Delta 2$ exprimant les protéines fluorescentes hybrides. Chaque point représente une cellule.

permis de mettre en évidence l'interaction de protéines membranaires *in cellulo* (T. Y. Liu et al., 2018). L'assemblage de la GFP est irréversible et confère à cette technologie l'avantage de mettre en évidence de faibles interactions ou événements transitoires (Cabantous et al., 2013). De cette manière, la détection de la GFP dans les mycobactéries *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, exprimant les protéines Rv3269 et CtpC fusionnées à des fragments de la GFP, sera effectuée.

Une autre technologie, la microscopie corrélative, alliant la microscopie optique et la microscopie électronique permettra une visualisation plus fine de la collocalisation des protéines Rv3269 et CtpC ainsi que leur mise en relation avec la structure des membranes (obtenue par microscopie électronique).

Les protéines d'échafaudage telles que les flotillines génèrent des complexes multiprotéiques. La substitution des motifs EA perturbe cette propriété (García-Fernández et al., 2017). Des expériences de migration des protéines Rv3269 en conditions natives (Blue Native-PAGE) seront réalisées afin de mettre en évidence la formation de complexes multiprotéiques de grande taille dans la membrane plasmique. Dans cette optique et par comparaison avec la protéine sauvage, nous pensons que le variant Rv3269(3EA) montrera une perturbation dans la formation de complexes de haut poids moléculaire.

4. Des microdomaines dédiés à l'homéostasie des métaux organisés par une ou des protéines échafaudage ?

Mtb possède un grand nombre de P-ATPases et trois d'entre elles sont associées à des petites protéines, dont le gène est en opéron avec la P-ATPase : *Rv3269-ctpC*, *Rv1993c-ctpG* et *Rv0968-ctpV* (Figure 45A). L'alignement des séquences de Rv3269, Rv1993c et Rv0968 montre que les motifs répétés EA dans la partie cytoplasmique ainsi qu'un domaine de liaison à la membrane dans la partie N-terminale sont conservés dans ces trois métallochaperons (Figure 45B).

Une question qui se pose dans le cadre du modèle que nous proposons est de savoir 1) si les protéines Rv1993c et Rv0968 forment aussi des clusters dans la membrane, et 2) si c'est le cas, est-ce que ces clusters sont distincts de ceux de Rv3269 ?

Pour répondre à ces questions, nous avons installé sur le plasmide pGMCS- P_{Rv3269} - $Rv3269_{mT}$ $ctpC_{mV}$ les gènes Rv0968 ou Rv1993c à la place de ctpC. Les plasmides obtenus expriment ainsi des rapporteurs fluorescents permettant de visualiser Rv3269 et Rv0968 ou Rv1993c (Figure 45C). Des résultats préliminaires de microscopie de fluorescence ont indiqué que Rv1993c et Rv0968 co-localisent avec Rv3269, avec des coefficients de Pearson calculés pour la co-localisation entre Rv3269-Rv1993c (449 cellules) et Rv3269-Rv0968 (346 cellules) respectivement de 0,85 et 0,96 (Figure 45D). Ces résultats montrent que les trois protéines localisent dans les mêmes patchs membranaires. Les co-localisations de Rv1993c et CtpG ainsi que Rv0968 et CtpV devront être vérifiées. Nous envisageons également de regarder les localisations entre CtpC, CtpG et CtpV, et, en accord avec nos premiers résultats, nous espérons montrer que ces systèmes de résistance aux métaux sont rassemblés dans des microdomaines membranaires communs dédiés à l'homéostasie des métaux.

Les systèmes de microscopie à fluorescence à champ large ne pourront pas offrir de localisation des protéines à des résolutions plus élevées. De plus, l'étude de la dynamique de ces protéines devra être effectuée de manière rigoureuse par des analyses de biophysique. De ce fait, l'utilisation de technologies de pointe en microscopie seront nécessaires. Par exemple, les méthodes de super-résolution en microscopie comme le 3D-PALM (*photo-activated localization microscopy*) offriront une résolution nettement supérieure (Altinoglu et al., 2019; Foo et al., 2015). De plus, la dynamique de Rv3269 pourra être abordée grâce à la méthode sptPALM, définie par la combinaison du suivi de molécules uniques (spt, single particle tracking) et du PALM (Kapanidis et al., 2018). Plusieurs paramètres physiques pourront être déterminés comme la vélocité, les coefficients de diffusion, le regroupement des protéines au niveau des membranes.

Le plasmide exprimant Rv3269_{Flag} est en cours d'installation dans *M. tuberculosis*. Avec cette souche, nous envisageons de définir l'interactome de Rv3269 par des analyses d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse ; nous devrions retrouver CtpC et, dans le modèle proposé, d'autres métallochaperons et P-ATPases.

La composition en lipides des MMF dépendants des flotillines est particulière. Ceci leur confère une propriété de résistance face au détergent Triton X-100 et est utilisée pour leur purification. Les patchs membranaires retrouvés avec Rv3269 et CtpC sont distincts des MMF dépendants de Rv1488, de ce fait leur composition moléculaire pourrait être bien différente. L'environnement lipidique dans lequel se forment ces plateformes d'efflux métallique pourra être visualisé par l'utilisation de colorants membranaires fluorescents évaluant la fluidité des membranes (Wenzel et al., 2018). Des expériences de lipidomiques permettront d'identifier les lipides en interaction avec Rv3269 et/ou CtpC. La purification des fractions membranaires résistantes aux détergents (DRM) sera également effectuée et nous regarderons si Rv3269 et CtpC sont retrouvés dans des environnements physico-chimiques comparables à ceux des flotillines.

183



Figure 46. Distribution des protéines de type DUF1490 chez les bactéries et les archées.

5. La notion de MMF dédiés à l'homéostasie des métaux, un concept généralisable ?

Tout d'abord, l'analyse in silico de Rv3269 a mis en évidence que cette dernière contient un domaine de fonction inconnu DUF1490 (DUF, domain of unknown function). Les protéines contenant ce domaine sont prédites pour porter un domaine transmembranaire du côté Nterminal, une hélice cytoplasmique contenant fréquemment des motifs Glu-Ala (EA) et Ala-Glu-Ala (AEA), et une région intrinsèquement désordonnée à l'extrémité C-terminale. Le domaine DUF1490 est retrouvé chez des actinobactéries, et principalement chez les mycobactéries. Par analogie avec Rv3269, Rv1993c et Rv0968, nous pensons que ce domaine caractérise des protéines de type échafaudage. Nous nous sommes demandé si de telles protéines étaient restreintes aux actinobactéries, ou généralisable à une plus large gamme d'espèces bactériennes. Une recherche par BLAST a montré qu'on retrouve souvent en amont de gènes codant des P-ATPases des petits gènes codant de protéines faiblement similaires à Rv3269. Les P-ATPases concernées sont principalement, mais pas exclusivement, des membres de la sous famille P_{1B6}. On retrouve ces associations de protéines « DUF1490 »-like / P-ATPase chez les actinobactéries dont les mycobactéries, mais également dans d'autres genre bactériens, tels que les phyla des firmicutes, des protéobactéries et même chez les archées (Figure 46). Ces observations ouvrent de nouveaux champs d'investigation pour tester les fonctions et localisations des couples de protéines identifiées ici.

Finalement, nous proposons un nouveau concept dans le domaine de la métallobiologie bactérienne qui définit une nouvelle famille de petites protéines associées aux P-ATPases et qui seraient impliquées à la fois dans : (i) la liaison du métal et éventuellement le transfert du métal à leur P-ATPase associée, ce qui à notre connaissance n'a jamais été rapporté pour le zinc, et (ii) la stabilisation de la P-ATPase au sein de "plateformes d'efflux métallique" de type MMF, grâce à une fonction de protéine « échafaudage ». Le criblage et le développement de drogues ciblant ces petites protéines, uniquement retrouvées chez les procaryotes, pourrait être envisagé afin de fournir de nouvelles armes de lutte contre les maladies infectieuses et notamment, en combinaison avec les antibiotiques actuellement disponibles, une stratégie innovante pour détruire les bacilles de la tuberculose.

MATERIELS ET METHODES

Cultures bactériennes

Les souches sauvages de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 (ATCC700084) et *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC27294) et les mutants qui en sont dérivés ont été cultivés en aérobiose, à 37°C dans du milieu Middlebrook 7H9 (Difco) supplémenté par 10% d'albumine- dextrose-catalase (ADC, Difco) et 0,05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich) ou sur du milieu solide Middlebrook 7H11 (Difco) supplémenté avec 10% d'acide oléique-albumine-dextrose-catalase (OADC, Difco). Lorsque c'est nécessaire, de la streptomycine (25 µg/mL), de l'hygromycine (50 µg/mL) ou de la zéocine (25 µg/mL) ont été ajoutées à la culture. Toutes les expérimentations utilisant *M. tuberculosis* ont été réalisées dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3. La souche Stellar d'*Escherichia coli* (Takara) a été cultivée en aérobiose à 37°C en milieu LB (Difco) ou sur milieu solide LA (Difco), en présence de streptomycine (25 µg/mL).

Construction de mutants chez M. smegmatis et M. tuberculosis

La construction de mutations chez les mycobactéries a été réalisée selon la technique d'échange allélique par *recombineering* (van Kessel & Hatfull, 2007) avec les aménagements décrits dans le chapitre 1 des résultats. Des mutations marquées (zéocine^R) ont été construites par insertion d'une cassette de résistance à la zéocine (Jamet et al., 2015) en remplacement du segment d'ADN délété. Des mutations non marquées ont été construites par insertion de la même cassette flanquée de répétitions directes de site *dif* permettant l'excision spontanée de la cassette par recombinaison dépendante des recombinases XerCD (Boudehen et al., 2020).

Mutagénèse dirigée

L'introduction de mutations sur les plasmides recombinants est réalisée par amplification en PCR (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix, Thermo Scientific) avec des couples d'oligonucléotides introduisant la mutation et un chevauchement de 15 nucléotides à la bordure de la mutation à introduire. Le vecteur linéaire amplifié est purifié sur gel d'agarose et circularisé par traitement avec le kit In-Fusion HD Cloning (Takara) avant transformation de la souche Stellar *d'E. coli*, selon les préconisations du fournisseur. Les plasmides extraits, des clones streptomycine^R sont systématiquement vérifiés par séquençage.

Tableau 3. Liste des plasmides

pGMCS-0x0x			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269-ctpC			
pGMCS- P _{Rv3269} -ctpC			
pGMCS- P _{Rv3269} - MSMEG_6059-MSMEG_6058			
pGMCS- P _{Rv3269} - <i>Rv3269</i> (∆C3)			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(∆C7)			
pGMCS- P _{Rv3269} - <i>Rv3269</i> (∆TM)			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269-(∆MBD)ctpC			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269 ₁₋₂₉ -ctpC			
pGMCS- P _{Rv3269} - <i>Rv3269</i> (E ⁵⁵ A)- <i>ctpC</i>			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(E ⁵⁹ V)- <i>ctpC</i>			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(E ⁷¹ A)- <i>ctpC</i>			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(3EA)- <i>ctpC</i>			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269 _{Flag} -ctpC _{His}			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(ΔTM) _{Flag} -ctpC _{His}			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(3EA) _{Flag} -ctpC _{His}			
pGMCS-P1- <i>mCherry</i> -P _{Rv3269} -GFP			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269 _{mT} -ctpC _{mV}			
pGMCS-P _{sub.} - <i>Rv3269_{mT}-ctpC</i>			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(∆TM) _{mT} -ctpC			
pGMCS-P _{Rv3269} - <i>Rv1488_{mV}</i>			
pGMCS-P1- <i>Rv1488_{mC}-P_{Rv3269}-Rv3269_{mT}-ctpC_{mV}</i>			
pGMCS-P _{Rv3269} -Rv3269 _{mT} -Rv1488 _{mV}			
pGMCS- P _{Rv3269} -Rv3269(3EA) _{mT} -ctpC _{mV}			
pGMCS-P _{Rv3269} -Rv3269 _{mT} -Rv0968 _{mV}			
pGMCS-P _{Rv3269} -Rv3269 _{mT} -Rv1993c _{mV}			

Tableau 4. Souches et mutants

Mycobacterium tuberculosis			
H37Rv sauvage (WT)			
H37Rv ∆(<i>Rv</i> 3269-ctpC)::zeo ^R			
H37Rv ∆ <i>Rv3269∷dif</i> 4			
H37Rv ∆ <i>Rv1488∷dif</i> 6			
Mycobacterium smegmatis			
MC ² 155 sauvage (WT)			
MC ² 155 ∆ <i>MSMEG_0755::dif</i> 4			
MC ² 155 ∆ <i>MSMEG_6059-6058::dif</i> 5			
MC ² 155 ∆MSMEG_0755::dif4 ∆MSMEG_6059-6058::dif5			

Les plasmides sont installés dans les souches de mycobactéries par éléctroporation, selon les protocoles décrits par (van Kessel & Hatfull, 2007).

Construction de plasmides recombinants

Le plasmide **pGMCS-P1-***mCherry*-P_{*Rv3269*}-**GFP** a été construit par la technique de Gateway multi-site (Schnappinger & Ehrt, 2014). Un fragment d'ADN portant le promoteur P_{*Rv3269*} a été amplifié à partir d'ADN chromosomique de H37Rv en utilisant les oligonucléotides B2-PRv3269-Fw/PRv3269-GFP-Rev. Un second fragment portant la séquence du gène codant la GFP a été amplifié en utilisant les oligonucléotides PRv3269-GFP-Fw/B3-GFP-Rev et le plasmide pLAM12::GFP (Carel et al., 2014) comme matrice. Ces fragments d'ADN ont été fusionnés par une réaction de PCR avec les deux fragments comme matrice et les oligonucléotides externes B2-PRv3269-Fw/B3-GFP-Rev. Le fragment obtenu est flanqué de sites de recombinaison *attB2/attB3* et il a été inséré dans le vecteur pDO23A par une réaction de « BP cloning », selon les préconisations du fournisseur (Lifetechnologies), générant le plasmide pEN23A-P_{*Rv3269*}-GFP. Finalement, pGMCS-mCherry-P_{*Rv3269*}-GFP a été construit par une réaction de « LR cloning », selon les préconisations du fournisseur (Lifetechnologies), utilisant le plasmide pDE43-MCS comme vecteur de destination, et les plasmides pEN41A-P1-mCherry (Ariyachaokun et al., 2020), pEN12A-0x et pEN23A-P_{*Rv3269*}-GFP comme plasmides d'entrée.

Le plasmide pEN23A-P_{Rv3269}-Rv3269 a été construit par une réaction de « BP cloning » utilisant le vecteur pDO23A et un fragment d'ADN amplifié à partir d'ADN chromosomique de H37Rv avec les oligonucléotides B2-PRv3269-Fw/B3-Rv3269-Rev. Le plasmide **pGMCS-P**_{Rv3269}-**Rv3269** a été construit par une réaction de « LR cloning » utilisant le plasmide pDE43-MCS comme vecteur de destination, et les plasmides pEN41A-0x, pEN12A0x et pEN23A-P_{Rv3269}-**Rv3269** comme plasmides d'entrée.

Le plasmide pEN23A-P_{Rv3269}-*Rv3269-ctpC* a été construit par une réaction de « BP cloning » utilisant le vecteur pDO23A et un fragment d'ADN amplifié à partir d'ADN chromosomique de H37Rv avec les oligonucléotides B2-P_{Rv3269}-Fw/B3-ctpC-Rev. Le plasmide **pGMCS-P**_{*Rv3269*}-*Rv3269-ctpC* a été construit par une réaction de « LR cloning » utilisant le plasmide pDE43-MCS comme vecteur de destination, et les plasmides pEN41A-0x, pEN12A-0x et pEN23A-P_{Rv3269}-*Rv3269-Rv3269-ctpC* comme plasmides d'entrée.

Gène	Nom	Séquence 5' → 3'
Rv3269	RT 3269 Fw	TGGCGATACAAGTGTTCTTGGCG
	RT 3269 Rv	ACGTCGGCCACCTTTAGGCGG
ctpC	RT ctpC Fw	TCACCATTTTCACCGGGTAT
	RT ctpC Rv	GATGTTGAGCAACCACAGGA
SMEG_6059	RT 6059 Fw1	ATGGTGTGGCATGGACTTCT
	RT 6059 Rv1	CTTCCTCACCTATGCGTTCG
SMEG_6058	RT 6058 Fw2	CGACGATAATCACCGGCTAC
	RT 6058 Rv2	CTGGAGGTACTCGCCAATGT
RpoB	RT RpoB Fw	TCGTTCTCTGACCCTCGTTTC
	RT RpoB Rv	ACGTGCCCTTCTCGGTCATCA
sigA	RT sigA_2F	AAGACACCGACCTGGAACTC
	RT sigA_2R	CGGCATCAGCTTCTTCTTC

Tableau 5. Oligonucléotides utilisés pour les RT-qPCR.

Test de sensibilité au Zinc

Des cultures des souches mutantes et recombinantes de *M. tuberculosis* en milieu 7H9 ADC Tween 80 ont été diluées à une densité optique (DO) finale de 0,01 (correspondant à 0,1 McF) dans 3,5mL du même milieu supplémenté ou non par du ZnSO₄ (de 0 à 250 μ M) dans des tubes en verre à bouchon à vis. Les tubes ont été incubés sans agitation à 37°C et la densité cellulaire est suivie au cours du temps (densimètre MacFarland).

Des cultures des souches mutantes et recombinantes de *M. smegmatis* en milieu 7H9 ADC Tween 80 ont été diluées à une DO finale de 0,02 dans 2 mL de culture. Les cultures ont été incubées avec agitation à 37°C et la DO a été mesurée après de 24 h d'incubation.

Des tests de survie en présence de zinc ont aussi été réalisés avec, ou non, l'ajout de 500 μ M de ZnSO₄ à la culture. 100 μ L des cultures ont été prélevés, dilués puis étalés sur milieu solide 7H11 OADC après 0, 7 ou 14 jours d'incubation. Les CFUs (*colony forming units*) ont été dénombrées après 21 jours d'incubation.

Extraction d'ARN et RT-qPCR

Les ARN ont été extraits à partir de cultures de mycobactéries à une DO_{600nm} de 0,8. Le Kit RNeasy (Qiagen) a été utilisé, avec quelques modifications du protocole. Des cultures de 20 mL sont centrifugées 10 min à 4000 rpm, puis le culot est repris dans 750 µL de tampon de lyse RTL contenant 0,1 % de β-mercaptoéthanol. Des billes de verre (0,1 µm de diamètre) ont été ajoutées aux cellules. Les tubes ont été agités au « bead-beater » 4 cycles de 1 min, à puissance maximale. Une centrifugation de 2 min à 14000 rpm permet de récupérer le surnageant. Un volume d'éthanol absolu a été ajouté au lysat bactérien, puis les ARN ont été extraits en suivant la procédure du kit. Les ARN ont ensuite été traités à la DNasel (Turbo DNA *free* kit, Ambion) puis par une transcriptase inverse (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen ; Random Hexamer Primer, Thermo Scientific) qui permet d'obtenir les ADNc.

Les réactions de PCR en temps-réel ont été réalisées avec un mix contenant un intercalant de l'ADN (TB Green Premix Ex Taq, Tli RNase H Plus, Takara) en suivant les recommandations du fabriquant. Un appareil ABI Prism 7500 (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) a été utilisé pour les réactions de PCR en temps réel, et les données ont été analysées à l'aide du logiciel 7500 v2.0.6 (Applied Biosystems). Pour les ARN extraits de cultures de *M. tuberculosis, rpoB* a été utilisé comme gène de ménage ; pour *M. smegmatis, sigA* a été utilisé. Les valeurs de Ct (*Cycle threshold*) ont été directement représentées, ou le $\Delta\Delta$ Ct a été calculé pour comparer les conditions avec et sans zinc.

Fractionnement des cultures et western-blot

Les cultures de mycobactéries utilisées pour les western-blots ont été réalisées en milieux 7H9 Tween 80, sans ADC. Des cultures de 50 mL ont été centrifugées 10 min à 4000 rpm à 4°C. Les culots obtenus ont été lavés deux fois avec du Dulbecco Phosphate Saline Buffer (DPBS) 1X supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (PI) (cOmplete[™], EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche). Pour le fractionnement, les bactéries ont été lysées par ajout de billes de verre (0,1 µm de diamètre) et agitation au « bead-beater », 4 cycles de 1 min, à puissance maximale. Le lysat obtenu a été centrifugé 1 min à 13000 rpm à 4°C afin de récupérer le surnageant. Une centrifugation de 1 h à 13000 rpm à 4°C permet de récupérer la fraction insoluble (*cell wall*, cw) correspondant au culot. Le surnageant obtenu a été de nouveau centrifugé lors d'une ultra-centrifugation de 1 h à 45000 rpm à 4°C (Beckman, Rotor TLA 100.4), le surnageant obtenu correspond au cytosol (cyt) et le culot aux membranes bactérienne (mb). Les parois ont été reprises avec du SDS 5% et les membranes avec de l'urée 6M (adapté de Lucas et al., 2015).

Les protéines ont été séparées sur des gels de polyacrylamide pré-coulés (NuPAGE 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 12-well, Invitrogen), puis transférées sur des membranes de nitrocellulose (Trans-Blot Turbo RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit, Bio-Rad) à l'aide d'un système Trans-Blot Turbo (Bio-rad). Pour les saturer, les membranes sont incubées pendant 1 h avec de la BSA 3 %. Du Tampon TTBS (0,8% NaCl, 0,6% Tris-Hcl, 0,05% Tween 20, DPBS 1X, pH 7,5) a été utilisé pour les différents lavages. Les incubations des membranes avec les différents anticorps ont été réalisées 1 h à température ambiante ou 16 h à 4°C.

Les anticorps utilisés pour la révélation des protéines marquées par les étiquettes Flag, His6 ou les molécules fluorescentes mTurquoise et mVenus sont :

- L'anticorps anti-Flag (Monoclonal Anti-Flag M2-Peroxidase (HRP), Sigma). Dilution utilisée : 1/30000.
- L'anticorps anti-His (6x-His Tag Monoclonal Antibody (HIS.H8), HRP, Thermo Fisher).
 Dilution utilisée : 1/5000.
- L'anticorps anti-eGFP (eGFP Monoclonal Antibody, F56-6A1.2.3, Thermo Fisher), dilution utilisée: 1/1000, associé avec l'anticorps secondaire anti-souris (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Thermo Fisher). Dilution utilisée 1/10000.

Les révélations se font par détection de la HRP (WesternBright Quantum HRP Substrate for CCD, Diagomics) sur un appareil ChemiDoc (BioRad). Lorsque c'est nécessaire, les membranes sont déshybridées avec du tampon Glycine 1,5% ; SDS 0,1% ; Tween 20 1% ; pH2,2 pour pouvoir être incubées avec un second anticorps.

Microscopie à fluorescence

A partir de cultures de mycobactéries, des gouttes de 0,7 µL sont déposées à la surface d'une fine couche de milieu M9 à 1 % d'agarose (Diaz et al., 2015). Les bactéries sont observées en utilisant un microscope à épifluorescence à grand champ Eclipse TI-E/B avec un objectif à contraste de phase (CFI Plan APO LBDA 100X oil NA1.45) et des filtres Semrock YFP (Ex: 500BP24; DM: 520; Em: 542BP27) ou Cy3 (Ex: 531BP40; DM: 562; Em: 593BP40). Les images sont prises avec une caméra Andor Neo SCC-02124, avec une illumination à 80% d'une source led SpectraX (Lumencor) et exposé pendant 0,2 à 1 seconde. Le logiciel Nis-Elements AR (Nikon) est utilisé pour la capture et l'édition des images.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achard, M. E. S., Tree, J. J., Holden, J. A., Simpfendorfer, K. R., Wijburg, O. L. C., Strugnell, R. A., Schembri, M. A., Sweet, M. J., Jennings, M. P., & McEwan, A. G. (2010). The multi-copper-ion oxidase CueO of Salmonella enterica serovar typhimurium is required for systemic virulence. *Infection and Immunity*, *78*(5), 2312–2319. https://doi.org/10.1128/IAI.01208-09
- Adams, H., Zeder-Lutz, G., Schalk, I., Pattus, F., & Celia, H. (2006). Interaction of TonB with the outer membrane receptor FpvA of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, *188*(16), 5752–5761. https://doi.org/10.1128/JB.00435-06
- Agarwal, K. K., Behera, A., Kumar, R., & Bal, C. (2017). 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography in tuberculosis: Spectrum of manifestations. In *Indian Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 32, Issue 4, pp. 316–321). Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/ijnm.IJNM_29_17
- Agertt, F., Crippa, A. C. S., Lorenzoni, P. J., Scola, R. H., Bruck, I., De Paola, L., Silvado, C. E., & Werneck, L. C. (2007). Menkes' disease: Case report. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *65*(1), 157–160. https://doi.org/10.1590/S0004-282X2007000100032
- Agranoff, D., Monahan, I. M., Mangan, J. A., Butcher, P. D., & Krishna, S. (1999). Mycobacterium tuberculosis expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(5), 717–724. https://doi.org/10.1084/jem.190.5.717
- Ahrland, S., Chatt, J., & Davies, N. R. (1958). The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions. In *Quarterly Reviews, Chemical Society* (Vol. 12, Issue 3, pp. 265–276). The Chemical Society. https://doi.org/10.1039/QR9581200265
- AlMatar, M., AlMandeal, H., Var, I., Kayar, B., & Köksal, F. (2017). New drugs for the treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *91*, 546–558. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.105
- Alquethamy, S. F., Adams, F. G., Naidu, V., Khorvash, M., Pederick, V. G., Zang, M., Paton, J. C., Paulsen, I. T., Hassan, K. A., Cain, A. K., McDevitt, C. A., & Eijkelkamp, B. A. (2020). The Role of Zinc Efflux during Acinetobacter baumannii Infection. ACS Infectious Diseases, 6(1), 150–158. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00351
- Altinoglu, I., Merrifield, C. J., & Yamaichi, Y. (2019). Single molecule super-resolution imaging of bacterial cell pole proteins with high-throughput quantitative analysis pipeline. *Scientific Reports*, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-43051-7
- Anastassopoulou, J. (2003). Metal-DNA interactions. *Journal of Molecular Structure*, 651–653, 19–26. https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00625-7
- Andersen, P. (2001). TB vaccines: Progress and problems. *Trends in Immunology*, *22*(3), 160–168. https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01865-8
- Andersen, P., & Doherty, T. M. (2005). The success and failure of BCG Implications for a novel tuberculosis vaccine. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 8, pp. 656– 662). Nat Rev Microbiol. https://doi.org/10.1038/nrmicro1211
- Anderson, E. S., Paulley, J. T., Gaines, J. M., Valderas, M. W., Martin, D. W., Menscher, E., Brown, T. D., Burns, C. S., & Roop, R. M. (2009). The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for Brucella abortus 2308 in experimentally infected mice. *Infection and Immunity*, 77(8), 3466–3474. https://doi.org/10.1128/IAI.00444-09
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L., & Thornton, J. M. (2008). Metal ions in biological catalysis: From enzyme databases to general principles. *Journal of Biological*

Inorganic Chemistry, 13(8), 1205–1218. https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5

- Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JUN), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00587
- Ankrah, A. O., Glaudemans, A. W. J. M., Maes, A., Van de Wiele, C., Dierckx, R. A. J. O., Vorster, M., & Sathekge, M. M. (2018). Tuberculosis. In *Seminars in Nuclear Medicine* (Vol. 48, Issue 2, pp. 108–130). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2017.10.005
- Argüello, J. M. (2003). Identification of Ion-Selectivity Determinants in Heavy-Metal Transport P1B-type ATPases. *Journal of Membrane Biology*, *195*(2), 93–108. https://doi.org/10.1007/s00232-003-2048-2
- Argüello, José M., Eren, E., & González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals*, 20(3–4), 233–248. https://doi.org/10.1007/s10534-006-9055-6
- Argüello, José M., Patel, S. J., & Quintana, J. (2016). Bacterial Cu+-ATPases: Models for molecular structure-function studies. *Metallomics*, 8(9), 906–914. https://doi.org/10.1039/c6mt00089d
- Argüello, José M., Raimunda, D., & González-Guerrero, M. (2012). Metal transport across biomembranes: Emerging models for a distinct chemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13510–13517. https://doi.org/10.1074/jbc.R111.319343
- Ariyachaokun, K., Grabowska, A. D., Gutierrez, C., & Neyrolles, O. (2020). Multi-Stress Induction of the Mycobacterium tuberculosis MbcTA Bactertericidal Toxin-Antitoxin System. *Toxins*, 1–14.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Molteni, E., Huffman, D. L., & O'Halloran, T. V. (2002). Metallochaperones and metal-transporting ATPases: A comparative analysis of sequences and structures. *Genome Research*, *12*(2), 255–271. https://doi.org/10.1101/gr.196802
- Arnold, F. M., Weber, M. S., Gonda, I., Gallenito, M. J., Adenau, S., Egloff, P., Zimmermann, I., Hutter, C. A. J., Hürlimann, L. M., Peters, E. E., Piel, J., Meloni, G., Medalia, O., & Seeger, M. A. (2020). The ABC exporter IrtAB imports and reduces mycobacterial siderophores. *Nature*, *580*(7803), 413–417. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2136-9
- Augenstreich, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., Le Chevalier, F., Chalut, C., Malaga, W., Guilhot, C., Brosch, R., & Astarie-Dequeker, C. (2017). ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cellular Microbiology*, *19*(7), 1–19. https://doi.org/10.1111/cmi.12726
- Axelsen, K. B., & Palmgren, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, *46*(1), 84–101. https://doi.org/10.1007/PL00006286
- Ayelign, B., Negash, M., Genetu, M., Wondmagegn, T., & Shibabaw, T. (2019). Immunological Impacts of Diabetes on the Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology Research*, 2019. https://doi.org/10.1155/2019/6196532
- Bach, H., Papavinasasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2008). Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host and Microbe*, *3*(5), 316–322. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.008
- Balasubramanian, R., Kenney, G. E., & Rosenzweig, A. C. (2011). Dual pathways for copper uptake by methanotrophic bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(43), 37313–

37319. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284984

- Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Della-Malva, N., Felli, I. C., Neri, S., Pavelkova, A., & Rosato, A. (2009). Copper(I)-mediated protein-protein interactions result from suboptimal interaction surfaces. *Biochemical Journal*, *422*(1), 37–42. https://doi.org/10.1042/BJ20090422
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Finney, L. A., Outten, C. E., & O'Halloran, T. V. (2002). A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: Solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118). *Journal of Molecular Biology*, 323(5), 883– 897. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01007-0
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Su, X. C., Miras, R., Bal, N., Mintz, E., Catty, P., Shokes, J. E., & Scott, R. A. (2006). Structural basis for metal binding specificity: The Nterminal cadmium binding domain of the P1-type ATPase CadA. *Journal of Molecular Biology*, 356(3), 638–650. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.055
- Banci, L., Bertini, I., & Del Conte, R. (2003). Solution Structure of Apo CopZ from Bacillus subtilis: Further Analysis of the Changes Associated with the Presence of Copper. *Biochemistry*, 42(46), 13422–13428. https://doi.org/10.1021/bi0353326
- Banin, E., Lozinski, A., Brady, K. M., Berenshtein, E., Butterfield, P. W., Moshe, M., Chevion, M., Greenberg, E. P., & Banin, E. (2008). The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-Pseudomonas therapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16761–16766. https://doi.org/10.1073/pnas.0808608105
- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, *58*(1), E9–E12. https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.728
- Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E., & Saltiel, A. R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, 407(6801), 202–207. https://doi.org/10.1038/35025089
- Bayle, L., Chimalapati, S., Schoehn, G., Brown, J., Vernet, T., & Durmort, C. (2011). Zinc uptake by Streptococcus pneumoniae depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Molecular Microbiology*, *82*(4), 904–916. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07862.x
- Bearden, S. W., & Perry, R. D. (1999). The Yfe system of Yersinia pestis transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Molecular Microbiology*, 32(2), 403–414. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01360.x
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), 1620–1624. https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1620
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005
- Behar, S. M., Martin, C. J., Booty, M. G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H. X., Divangahi, M., & Remold, H. G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunology*, *4*(3), 279–287. https://doi.org/10.1038/mi.2011.3
- Benoit, S., Mehta, N., Weinberg, M., Maier, C., & Maier, R. (2007). Interaction between the Helicobacter pylori accessory proteins HypA and UreE is needed for urease maturation.

Microbiology (Reading, England), *153*(Pt 5). https://doi.org/10.1099/MIC.0.2006/003228-0

- Berthet, F. X., Rasmussen, P. B., Rosenkrands, I., Andersen, P., & Gicquel, B. (1998). A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*, *144*(11), 3195–3203. https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3195
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., & Lodish, H. F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae- associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13793–13802. https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13793
- Biketov, S., Potapov, V., Ganina, E., Downing, K., Kana, B. D., & Kaprelyants, A. (2007). The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of Mycobacterium tuberculosis during intra-peritoneal infection in mice. *BMC Infectious Diseases*, 7, 1–8. https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-146
- Blindauer, C. A. (2011). Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *16*(7), 1011–1024. https://doi.org/10.1007/s00775-011-0790-y
- Bloor, A. E., & Cranenburgh, R. M. (2006). An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Applied* and Environmental Microbiology, 72(4), 2520–2525. https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2520-2525.2006
- Bodin, S., Planchon, D., Morris, E. R., Comunale, F., & Gauthier-Rouviére, C. (2014). Flotillins in intercellular adhesion - From cellular physiology to human diseases. *Journal of Cell Science*, *127*(24), 5139–5147. https://doi.org/10.1242/jcs.159764
- Boechat, N., Lagier-Roger, B., Petit, S., Bordat, Y., Rauzier, J., Hance, A. J., Gicquel, B., & Reyrat, J. M. (2002). Disruption of the gene homologous to mammalian Nramp1 in Mycobacterium tuberculosis does not affect virulence in mice. *Infection and Immunity*, *70*(8), 4124–4131. https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4124-4131.2002
- Boer, J. L., Mulrooney, S. B., & Hausinger, R. P. (2014). Nickel-dependent metalloenzymes. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 544, pp. 142–152). NIH Public Access. https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.09.002
- Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x
- Boon, C., & Dick, T. (2012). How Mycobacterium tuberculosis goes to sleep: The dormancy survival regulator DosR a decade later. In *Future Microbiology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 513– 518). Future Microbiol. https://doi.org/10.2217/fmb.12.14
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V, Hawkins, N. D., Macaskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., & Dupree, P. (2005). Analysis of Detergentresistant membranes in Arabidopsis. Evidence for Plasma Membrane Lipid Rafts. 137(January), 104–116. https://doi.org/10.1104/pp.104.053041.surrounding
- Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrire, G. M., Waddell, S. J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P. D., Castagnoli, P. R., Gicquel, B., De Chastellier, C., & Neyrolles, O. (2011). Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host and Microbe*, *10*(3), 248–259. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.006

Boudehen, Y.-M., Wallat, M., Rousseau, P., Neyrolles, O., & Gutierrez, C. (2020). An

improved Xer-cise technology for the generation of multiple unmarked mutants in Mycobacteria. *BioTechniques*, 1–5. https://doi.org/10.2144/btn-2019-0119

- Bramkamp, M., & Lopez, D. (2015). Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 81–100. https://doi.org/10.1128/mmbr.00036-14
- Braymer, J. J., & Giedroc, D. P. (2014). Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens. *Current Opinion in Chemical Biology*, *19*(1), 59–66. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.021
- Brett Moreau, G., Qin, A., & Manna, B. J. (2018). Zinc acquisition mechanisms differ between environmental and virulent Francisella species. *Journal of Bacteriology*, *200*(4). https://doi.org/10.1128/JB.00587-17
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., & Robbins, S. M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in Cell Biology*, *17*(8), 394–402. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.005
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 145–163. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00051-2
- Bussi, C., & Gutierrez, M. G. (2019). Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(4), 341–361. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz006
- Cabantous, S., Nguyen, H. B., Pedelacq, J. D., Koraïchi, F., Chaudhary, A., Ganguly, K., Lockard, M. A., Favre, G., Terwilliger, T. C., & Waldo, G. S. (2013). A new proteinprotein interaction sensor based on tripartite split-GFP association. *Scientific Reports*, *3*. https://doi.org/10.1038/srep02854
- Cai, Z., Du, W., Zhang, Z., Guan, L., Zeng, Q., Chai, Y., Dai, C., & Lu, L. (2018). The Aspergillus fumigatus transcription factor AceA is involved not only in Cu but also in Zn detoxification through regulating transporters CrpA and ZrcA. *Cellular Microbiology*, *20*(10), 1–15. https://doi.org/10.1111/cmi.12864
- Calmettes, C., Ing, C., Buckwalter, C. M., El Bakkouri, M., Chieh-Lin Lai, C., Pogoutse, A., Gray-Owen, S. D., Pomès, R., & Moraes, T. F. (2015). The molecular mechanism of Zinc acquisition by the neisserial outer-membrane transporter ZnuD. *Nature Communications*, *6*(1), 1–11. https://doi.org/10.1038/ncomms8996
- Canetti, D., Riccardi, N., Martini, M., Villa, S., Di Biagio, A., Codecasa, L., Castagna, A., Barberis, I., Gazzaniga, V., & Besozzi, G. (2020). HIV and tuberculosis: The paradox of dual illnesses and the challenges of their fighting in the history. *Tuberculosis*, *122*(January), 18–21. https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101921
- Capdevila, D. A., Edmonds, K. A., & Giedroc, D. P. (2017). Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays in Biochemistry*, *61*(2), 177–200. https://doi.org/10.1042/EBC20160076
- Capdevila, D. A., Wang, J., & Giedroc, D. P. (2016). Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(40), 20858–20868. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742023
- Carel, C., Nukdee, K., Cantaloube, S., Bonne, M., Diagne, C. T., Laval, F., Daffé, M., & Zerbib, D. (2014). Mycobacterium tuberculosis proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. *PLoS ONE*, *9*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097148
- Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J., & Andrews, S. C. (2006). Feo -Transport of ferrous iron into bacteria. *BioMetals*, *19*(2), 143–157.

https://doi.org/10.1007/s10534-006-0003-2

- Cascioferro, A., Boldrin, F., Serafini, A., Provvedi, R., Palù, G., & Manganelli, R. (2010). Xer site-specific recombination, an efficient tool to introduce unmarked deletions into mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(15), 5312–5316. https://doi.org/10.1128/AEM.00382-10
- Castillo, F., Benmohamed, A., & Szatmari, G. (2017). Xer site specific recombination: Double and single recombinase systems. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAR), 1–18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00453
- Cerasi, M., Liu, J. Z., Ammendola, S., Poe, A. J., Petrarca, P., Pesciaroli, M., Pasquali, P., Raffatellu, M., & Battistoni, A. (2014). The ZupT transporter plays an important role in zinc homeostasis and contributes to Salmonella enterica virulence. *Metallomics*, *6*(4), 845–853. https://doi.org/10.1039/c3mt00352c
- Chackerian, A. A., Alt, J. M., Perera, T. V., Dascher, C. C., & Behar, S. M. (2002). Dissemination of Mycobacterium tuberculosis is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and Immunity*, *70*(8), 4501–4509. https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4501-4509.2002
- Chai, Q., Lu, Z., & Liu, C. H. (2020). Host defense mechanisms against Mycobacterium tuberculosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(10), 1859–1878. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03353-5
- Chan Chung, K. C., & Zamble, D. B. (2011). The Escherichia coli metal-binding chaperone SlyD interacts with the large subunit of [NiFe]-hydrogenase 3. *FEBS Letters*, 585(2), 291–294. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.024
- Chandrangsu, P., Loi, V. Van, Antelmann, H., & Helmann, J. D. (2018). *The Role of Bacillithiol in Gram-Positive Firmicutes*. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7057
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V., & Mondragón, A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science*, *301*(5638), 1383–1387. https://doi.org/10.1126/science.1085950
- Chao, A., Sieminski, P. J., Owens, C. P., & Goulding, C. W. (2019). Iron Acquisition in Mycobacterium tuberculosis. In *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 2, pp. 1193–1220). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00285
- Chaoprasid, P., Dokpikul, T., Johnrod, J., Sirirakphaisarn, S., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2016). Agrobacterium tumefaciens Zur regulates the high-affinity zinc uptake system TroCBA and the putative metal chaperone YciC, along with ZinT and ZnuABC, for survival under zinc-limiting conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3503–3514. https://doi.org/10.1128/AEM.00299-16
- Chaturvedi, Kaveri S.; Hung, Chia S.; Crowley Jan R.; Stapleton, Ann E.; Henderson, J. P. (2013). Pathogens During Infection. *Nature Chemical Biology*, *8*(8), 731–736. https://doi.org/10.1038/nchembio.1020.The
- Chauhan, S., Kumar, A., Singhal, A., Tyagi, J. S., & Prasad, H. K. (2009). CmtR, a cadmiumsensing ArsR-SmtB repressor, cooperatively interacts with multiple operator sites to autorepress its transcription in Mycobacterium tuberculosis. *FEBS Journal*, *276*(13), 3428–3439. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07066.x
- Chen, C. J., Chuang, Y. C., Lin, T. M., & Wu, H. Y. (1985). Malignant Neoplasms among Residents of a Blackfoot Disease-endemic Area in Taiwan: High-Arsenic Artesian Well Water and Cancers. *Cancer Research*, *45*(November), 5895–5899.
- Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D. S. J., Hong, S., Lee, D. M., Serhan, C. N., Behar, S. M., & Remold, H. G. (2008). Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis:

Opposing roles of PGE 2 and LXA 4 in the induction of macrophage death. *Journal of Experimental Medicine*, 205(12), 2791–2801. https://doi.org/10.1084/jem.20080767

- Cheng, Z., Tan, G., Wang, W., Su, X., Landry, A. P., Lu, J., & Ding, H. (2014). Iron and zinc binding activity of Escherichia coli topoisomerase I homolog YrdD. *BioMetals*, *27*(2), 229–236. https://doi.org/10.1007/s10534-013-9698-z
- Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O. P., Marahiel, M. A., & Miethke, M. (2010). Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *192*(10), 2512–2524. https://doi.org/10.1128/JB.00058-10
- Cholo, M. C., Boshoff, H. I., Steel, H. C., Cockeran, R., Matlola, N. M., Downing, K. J., Mizrahi, V., & Anderson, R. (2006). Effects of clofazimine on potassium uptake by a Trkdeletion mutant of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 79–84. https://doi.org/10.1093/jac/dki409
- Chu, B. C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., Slavinskaya, Z., & Vogel, H. J. (2010). Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. In *BioMetals* (Vol. 23, Issue 4, pp. 601–611). Springer. https://doi.org/10.1007/s10534-010-9361-x
- Churchyard, G., Kim, P., Shah, N. S., Rustomjee, R., Gandhi, N., Mathema, B., Dowdy, D., Kasmar, A., & Cardenas, V. (2017). What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *Journal of Infectious Diseases*, *216*(Suppl 6), S629–S635. https://doi.org/10.1093/infdis/jix362
- Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagnéris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C., & Keep, N. H. (2005). The structure of a resuscitation-promoting factor domain from Mycobacterium tuberculosis shows homology to lysozymes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *12*(3), 270–273. https://doi.org/10.1038/nsmb905
- Cohen, S. B., Gern, B. H., Delahaye, J. L., Adams, K. N., Plumlee, C. R., Winkler, J. K., Sherman, D. R., Gerner, M. Y., & Urdahl, K. B. (2018). Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination. *Cell Host and Microbe*, *24*(3), 439-446.e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.001
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., ... Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393(NOVEMBER), 537–544. https://doi.org/10.1038/29241
- Conradie, F., Diacon, A. H., Ngubane, N., Howell, P., Everitt, D., Crook, A. M., Mendel, C. M., Egizi, E., Moreira, J., Timm, J., McHugh, T. D., Wills, G. H., Bateson, A., Hunt, R., van Niekerk, C., Li, M., Olugbosi, M., & Spigelman, M. (2020). Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, *382*(10), 893–902. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1901814
- Converse, P. J., Karakousis, P. C., Klinkenberg, L. G., Kesavan, A. K., Ly, L. H., Allen, S. S., Grosset, J. H., Jain, S. K., Lamichhane, G., Manabe, Y. C., McMurray, D. N., Nuermberger, E. L., & Bishai, W. R. (2009). Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in Mycobacterium tuberculosis virulence in three animal models. *Infection and Immunity*, 77(3), 1230–1237. https://doi.org/10.1128/IAI.01117-08
- Corbin, B. D., Seeley, E. H., Raab, A., Feldmann, J., Miller, M. R., Torres, V. J., Anderson, K. L., Dattilo, B. M., Dunman, P. M., Gerads, R., Caprioli, R. M., Nacken, W., Chazin, W. J., & Skaar, E. P. (2008). Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*, *319*(5865), 962–965. https://doi.org/10.1126/science.1152449

Cremona, M. L., Matthies, H. J. G., Pau, K., Bowton, E., Speed, N., Lute, B. J., Anderson,

M., Sen, N., Robertson, S. D., Vaughan, R. A., Rothman, J. E., Galli, A., Javitch, J. A., & Yamamoto, A. (2011). Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 469–477. https://doi.org/10.1038/nn.2781

- Crubézy, E., Ludes, B., Poveda, J.-D., Clayton, J., Crouau-Roy, B., & Montagnon, D. (1998). Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de La Vie*, *321*(11), 941–951. https://doi.org/10.1016/s0764-4469(99)80009-2
- Cubillas, C., Vinuesa, P., Luisa Tabche, M., Dávalos, A., Vázquez, A., Hernández-Lucas, I., Romero, D., & García-De Los Santos, A. (2014). The cation diffusion facilitator protein EmfA of Rhizobium etli belongs to a novel subfamily of Mn2+/Fe2+ transporters conserved in α-proteobacteria. *Metallomics*, *6*(10), 1808–1815. https://doi.org/10.1039/c4mt00135d
- Daleke, D. L. (2007). Phospholipid flippases. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 282, Issue 2, pp. 821–825). J Biol Chem. https://doi.org/10.1074/jbc.R600035200
- Dambach, M., Sandoval, M., Waters, L. S., & Storz, G. (2015). The Ubiquitous yybP-ykoY Riboswitch Is a Manganese-Responsive Regulatory Element. *Molecular Cell*, *57*, 1099– 1109. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.035
- Damo, S. M., Kehl-Fie, T. E., Sugitani, N., Holt, M. E., Rathi, S., Murphy, W. J., Zhang, Y., Betz, C., Hench, L., Fritz, G., Skaar, E. P., & Chazin, W. J. (2013). Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 3841–3846. https://doi.org/10.1073/pnas.1220341110
- Danelishvili, L., Everman, J. L., McNamara, M. J., & Bermudez, L. E. (2012). Inhibition of the plasma-membrane-associated serine protease cathepsin G by Mycobacterium tuberculosis Rv3364c suppresses caspase-1 and pyroptosis in macrophages. *Frontiers in Microbiology*, *2*(JAN), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00281
- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, *100*(11), 1862–1870. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006
- Danilchanka, O., Sun, J., Pavlenok, M., Maueröder, C., Speer, A., Siroy, A., Marrero, J., Trujillo, C., Mayhew, D. L., Doornbos, K. S., Muñoz, L. E., Herrmann, M., Ehrt, S., Berens, C., & Niederweis, M. (2014). An outer membrane channel protein of Mycobacterium tuberculosis with exotoxin activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(18), 6750–6755. https://doi.org/10.1073/pnas.1400136111
- de Martino, M., Lodi, L., Galli, L., & Chiappini, E. (2019). Immune Response to Mycobacterium tuberculosis: A Narrative Review. *Frontiers in Pediatrics*, 7(August), 1– 8. https://doi.org/10.3389/fped.2019.00350
- Degen, O., & Eitinger, T. (2002). Substrate specificity of nickel/cobalt permeases: Insights from mutants altered in transmembrane domains I and II. *Journal of Bacteriology*, *184*(13), 3569–3577. https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3569-3577.2002
- Delmar, J. A., & Yu, E. W. (2018). Crystallographic analysis of the CusBA heavy-metal efflux complex of Escherichia coli. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1700, pp. 59–70). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7454-2_4
- Dempwolff, F., Schmidt, F. K., Hervás, A. B., Stroh, A., Rösch, T. C., Riese, C. N., Dersch, S., Heimerl, T., Lucena, D., Hülsbusch, N., Stuermer, C. A. O., Takeshita, N., Fischer, R., Eckhardt, B., & Graumann, P. L. (2016). Super Resolution Fluorescence Microscopy and Tracking of Bacterial Flotillin (Reggie) Paralogs Provide Evidence for Defined-Sized

Protein Microdomains within the Bacterial Membrane but Absence of Clusters Containing Detergent-Resistant Proteins. *PLoS Genetics*, *12*(6), 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006116

- Diaz, R., Rech, J., & Bouet, J. Y. (2015). Imaging centromere-based incompatibilities: Insights into the mechanism of incompatibility mediated by low-copy number plasmids. *Plasmid*, *80*, 54–62. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.03.007
- DiDonato, M., & Sarkar, B. (1997). Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, *1360*(1), 3–16. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(96)00064-6
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., & Claverys, J. (1997). Competence and virulence of Streptococcus pneumoniae : Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases . *Molecular Microbiology*, *25*(4), 727–739. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5111879.x
- Djoko, K. Y., & McEwan, A. G. (2013). Antimicrobial action of copper is amplified via inhibition of heme biosynthesis. *ACS Chemical Biology*, *8*(10), 2217–2223. https://doi.org/10.1021/cb4002443
- Dobbs, T. E., & Webb, R. M. (2017). Chemotherapy of Tuberculosis. *Microbiology Spectrum*, *5*(2). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0040-2017
- Domenech, P., Pym, A. S., Cellier, M., Barry, C. E., & Cole, S. T. (2002). Inactivation of the Mycobacterium tuberculosis Nramp orthologue (mntH) does not affect virulence in a mouse model of tuberculosis. *FEMS Microbiology Letters*, 207(1), 81–86. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00552-3
- Domingo-Gonzalez, R., Prince, O., Cooper, A., & Khader, S. A. (2016). Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. *Microbiology Spectrum*, *4*(5), 1– 37. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbtb2-0018-2016
- Donovan, C., & Bramkamp, M. (2009). Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology*, *155*(6), 1786–1799. https://doi.org/10.1099/mic.0.025312-0
- Drennan, M. B., Nicolle, D., Quesniaux, V. J. F., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J., Frémond, C., Wagner, H., Kirschning, C., & Ryffel, B. (2004). Toll-Like Receptor 2-Deficient Mice Succumb to Mycobacterium tuberculosis Infection. *American Journal of Pathology*, 164(1), 49–57. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63095-7
- Dulberger, C. L., Rubin, E. J., & Boutte, C. C. (2020). The mycobacterial cell envelope a moving target. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(1), 47–59. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7
- Dyla, M., Hansen, S. B., Nissen, P., & Kjaergaard, M. (2019). Structural dynamics of P-type ATPase ion pumps. *Biochemical Society Transactions*, *47*(5), 1247–1257. https://doi.org/10.1042/BST20190124
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defence against host stresses. *Cellular Microbiology*, *11*(8), 1170–1178. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x
- Eldholm, V., & Balloux, F. (2016). Antimicrobial Resistance in Mycobacterium tuberculosis: The Odd One Out. *Trends in Microbiology*, *24*(8), 637–648. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.007
- Eren, E., & Argüello, J. M. (2004). Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(IB)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn2+ homeostasis. *Plant Physiology*, *136*(3), 3712–3723. https://doi.org/10.1104/pp.104.046292
- Eren, E., González-Guerrero, M., Kaufman, B. M., & Argüello, J. M. (2007). Novel Zn2+

coordination by the regulatory N-terminus metal binding domain of Arabidopsis thaliana Zn2+-ATPase HMA2. *Biochemistry*, *46*(26), 7754–7764. https://doi.org/10.1021/bi7001345

- Fan, B., & Rosen, B. P. (2002). Biochemical characterization of CopA, the Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 46987– 46992. https://doi.org/10.1074/jbc.M208490200
- FAO; WHO. (1996). Trace elements in human nutrition and health World Health Organization. *World Health Organization*.
- Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., & Venketesan, R. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 103–109. https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006
- Ferguson, J. S., Weis, J. J., Martin, J. L., & Schlesinger, L. S. (2004). Complement Protein C3 Binding to Mycobacterium tuberculosis Is Initiated by the Classical Pathway in Human Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Infection and Immunity*, 72(5), 2564–2573. https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2564-2573.2004
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 61–98. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445
- Fletcher, H. A., & Schrager, L. (2016). TB vaccine development and the End TB Strategy: Importance and current status. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*(4), 212–218. https://doi.org/10.1093/trstmh/trw016
- Foo, Y. H., Spahn, C., Zhang, H., Heilemann, M., & Kenney, L. J. (2015). Single cell superresolution imaging of E. coli OmpR during environmental stress. *Integrative Biology* (*United Kingdom*), 7(10), 1297–1308. https://doi.org/10.1039/c5ib00077g
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., & Nies, D. H. (2003). Molecular analysis of the coppertransporting efflux system CusCFBA of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *185*(13), 3804–3812. https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3804-3812.2003
- Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S., & Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *Journal of Cell Biology*, *154*(3), 631–644. https://doi.org/10.1083/jcb.200106049
- Fremond, C. M., Yeremeev, V., Nicolle, D. M., Jacobs, M., Quesniaux, V. F., & Ryffel, B. (2004). Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(12), 1790–1799. https://doi.org/10.1172/JCI200421027
- Fu, Y., Tsui, H. C. T., Bruce, K. E., Sham, L. T., Higgins, K. A., Lisher, J. P., Kazmierczak, K. M., Maroney, M. J., Dann, C. E., Winkler, M. E., & Giedroc, D. P. (2013). A new structural paradigm in copper resistance in Streptococcus pneumoniae. *Nature Chemical Biology*, 9(3), 177–183. https://doi.org/10.1038/nchembio.1168
- Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L., & Battistoni, A. (2011). Role of ZnuABC and ZinT in Escherichia coli O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiology*, *11*(1), 36. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-36
- García-Fernández, E., Koch, G., Wagner, R. M., Fekete, A., Stengel, S. T., Schneider, J., Mielich-Süss, B., Geibel, S., Markert, S. M., Stigloher, C., & Lopez, D. (2017). Membrane Microdomain Disassembly Inhibits MRSA Antibiotic Resistance. *Cell*, *171*(6), 1354-1367.e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.012

- Ge, R., Watt, R. M., Sun, X., Tanner, J. A., He, Q. Y., Huang, J. D., & Sun, H. (2006). Expression and characterization of a histidine-rich protein, Hpn: Potential for Ni2+ storage in Helicobacter pylori. *Biochemical Journal*, *393*(1), 285–293. https://doi.org/10.1042/BJ20051160
- Gengenbacher, M., & Kaufmann, S. H. E. (2012). Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(3), 514–532. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x
- Ghssein, G., Brutesco, C., Ouerdane, L., Fojcik, C., Izaute, A., Wang, S., Hajjar, C., Lobinski, R., Lemaire, D., Richaud, P., Voulhoux, R., Espaillat, A., Cava, F., Pignol, D., Borezée-Durant, E., & Arnoux, P. (2016). Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in Staphylococcus aureus. *Science*, *352*(6289), 1105–1109. https://doi.org/10.1126/science.aaf1018
- Gi, M., Lee, K. M., Kim, S. C., Yoon, J. H., Yoon, S. S., & Choi, J. Y. (2015). A novel siderophore system is essential for the growth of Pseudomonas aeruginosa in airway mucus. *Scientific Reports*, *5*(October), 1–15. https://doi.org/10.1038/srep14644
- Goethe, E., Laarmann, K., Lührs, J., Jarek, M., Meens, J., Lewin, A., & Goethe, R. (2020). Critical Role of Zur and SmtB in Zinc Homeostasis of Mycobacterium smegmatis . *MSystems*, *5*(2). https://doi.org/10.1128/msystems.00880-19
- Gold, Ben, Deng, H., Bryk, R., Vargas, D., Eliezer, D., Roberts, J., Jiang, X., & Nathan, C. (2008). Identification of a Copper-Binding Metallothionein in Pathogenic Mycobacteria. *Nat Chem Biol*, *4*(10), 609–616. https://doi.org/10.1038/nchembio.109
- Gold, Benjamin, Marcela Rodriguez, G., Marras, S. A. E., Pentecost, M., & Smith, I. (2001). The Mycobacterium tuberculosis ideR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Molecular Microbiology*, *42*(3), 851–865. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02684.x
- Gong, W., Liang, Y., & Wu, X. (2018). The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *14*(7), 1697–1716. https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1458806
- González-Guerrero, M., & Argüello, J. M. (2008). Mechanism of Cu+-transporting ATPases: Soluble Cu+ chaperones directly transfer Cu+ to transmembrane transport sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(16), 5992–5997. https://doi.org/10.1073/pnas.0711446105
- Gonzalo-Asensio, J., Marinova, D., Martin, C., & Aguilo, N. (2017). MTBVAC: Attenuating the human pathogen of tuberculosis (TB) toward a promising vaccine against the TB epidemic. *Frontiers in Immunology*, *8*(DEC), 1–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01803
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R., & Armstrong, J. A. (1976). Prevention of phagosome lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(7), 2510–2514. https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2510
- Gourdon, P., Liu, X. Y., Skjorringe, T., Morth, J. P., Møller, L. B., Pedersen, B. P., & Nissen, P. (2011). Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature*, *475*(7354), 59–65. https://doi.org/10.1038/nature10191
- Gouzy, A., Larrouy-Maumus, G., Bottai, D., Levillain, F., Dumas, A., Wallach, J. B., Caire-Brandli, I., de Chastellier, C., Wu, T. Di, Poincloux, R., Brosch, R., Guerquin-Kern, J. L., Schnappinger, D., Sório de Carvalho, L. P., Poquet, Y., & Neyrolles, O. (2014).
 Mycobacterium tuberculosis Exploits Asparagine to Assimilate Nitrogen and Resist Acid Stress during Infection. *PLoS Pathogens*, *10*(2).

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003928

- Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H., & Rensing, C. (2001). ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *183*(15), 4664–4667. https://doi.org/10.1128/JB.183.15.4664-4667.2001
- Grass, Gregor, Otto, M., Fricke, B., Haney, C. J., Rensing, C., Nies, D. H., & Munkelt, D. (2005). FieF (YiiP) from Escherichia coli mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology*, *183*(1), 9–18. https://doi.org/10.1007/s00203-004-0739-4
- Grass, Gregor, Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L., & Rensing, C. (2002). *ZupT Is a Zn(II) Uptake System in.* 184(3), 864–866. https://doi.org/10.1128/JB.184.3.864
- Green, E. R., Juttukonda, L. J., & Skaar, E. P. (2020). The manganese-responsive transcriptional regulator MumR protects acinetobacter baumannii from oxidative stress. *Infection and Immunity*, *88*(3). https://doi.org/10.1128/IAI.00762-19
- Grindley, N. D. F., Whiteson, K. L., & Rice, P. A. (2006). Mechanisms of Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 567–605. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908
- Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Brinkmann, V., Eddine, A. N., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., Bancroft, G. J., Reyrat, J., Soolingen, D. Van, & Kaufmann, S. H. E. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant. *Journal* of *Clinical Investigation*, *115*(9), 2472–2479. https://doi.org/10.1172/JCl24617.2472
- Groisman, E. A., Hollands, K., Kriner, M. A., Lee, E.-J., Park, S.-Y., & Pontes, M. H. (2013). Bacterial Mg 2+ Homeostasis, Transport, and Virulence . *Annual Review of Genetics*, 47(1), 625–646. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051313-051025
- Grover, A., & Sharma, R. (2006). Identification and characterization of a major Zn(II) resistance determinant of Mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology*, *188*(19), 7026–7032. https://doi.org/10.1128/JB.00643-06
- Gu, W., Ul Haque, M. F., Baral, B. S., Turpin, E. A., Bandow, N. L., Kremmer, E., Flatley, A., Zischka, H., DiSpirito, A. A., & Semrau, J. D. (2016). A TonB-dependent transporter is responsible for methanobactin uptake by Methylosinus trichosporium OB3b. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(6), 1917–1923. https://doi.org/10.1128/AEM.03884-15
- Guan, G., Pinochet-Barros, A., Gaballa, A., Patel, S. J., Argüello, J. M., & Helmann, J. D. (2015). PfeT, a P1B4-type ATPase, effluxes ferrous iron and protects Bacillus subtilis against iron intoxication. *Molecular Microbiology*, *98*(4), 787–803. https://doi.org/10.1111/mmi.13158

Guerinot, M. Lou. (2000). The ZIP family of metal transporters. 1465, 190–198.

- Guglielmetti, L., Jaspard, M., Le Dû, D., Lachâtre, M., Marigot-Outtandy, D., Bernard, C., Veziris, N., Robert, J., Yazdanpanah, Y., Caumes, E., & Fréchet-Jachym, M. (2017). Long-term outcome and safety of prolonged bedaquiline treatment for multidrugresistant tuberculosis. *European Respiratory Journal*, *49*(3). https://doi.org/10.1183/13993003.01799-2016
- Guillet-Caruba, C., Martinez, V., & Doucet-Populaire, F. (2014). Les nouveaux outils de diagnostic microbiologique de la tuberculose maladie. *Revue de Medecine Interne*, *35*(12), 794–800. https://doi.org/10.1016/j.revmed.2014.05.001
- Gupta, H. K., Shrivastava, S., & Sharma, R. (2017). A novel calcium uptake transporter of uncharacterized P-type ATPase family supplies calcium for cell surface integrity in Mycobacterium smegmatis. *MBio*, 8(5), 1–14. https://doi.org/10.1128/mBio.01388-17

- Gutierrez, M. G. (2013). Functional role(s) of phagosomal Rab GTPases. *Small GTPases*, 4(3), 148–158. https://doi.org/10.4161/sgtp.25604
- Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: Mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 354–373. https://doi.org/10.1093/femsre/fux011
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, *219*(1), 1–14. https://doi.org/10.1042/bj2190001
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: Contentious only from simplistic standpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(6), 456–462. https://doi.org/10.1038/nrm1925
- Handali, M., Roychowdhury, H., Neupane, D. P., & Yukl, E. T. (2015). AztD, a periplasmic zinc metallochaperone to an ATP-binding cassette (ABC) transporter system in Paracoccus denitrificans. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(50), 29984–29992. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684506
- Haraguchi, H. (2004). Metallomics: Integrated biometal science. *Metallomics: Recent Analytical Techniques and Applications*, 3–39. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56463-8_1
- Harder, T. (2003). Formation of functional cell membrane domains: The interplay of lipid- and protein-mediated interactions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *358*(1433), 863–868. https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1274
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., & Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *Journal of Cell Biology*, *141*(4), 929–942. https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.929
- Hartwig, A. (2001). Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research -Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1–2), 113–121. https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00074-4
- Hatori, Y., Hirata, A., Toyoshima, C., Lewis, D., Pilankatta, R., & Inesi, G. (2008). Intermediate phosphorylation reactions in the mechanism of ATP utilization by the copper ATPase (CopA) of Thermotoga maritima. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33), 22541–22549. https://doi.org/10.1074/jbc.M802735200
- Hayden, J. A., Brophy, M. B., Cunden, L. S., & Nolan, E. M. (2013). High-affinity manganese coordination by human calprotectin is calcium-dependent and requires the histidine-rich site formed at the dimer interface. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(2), 775–787. https://doi.org/10.1021/ja3096416
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G. J., & Nies, D. H. (2008). Glutathione and transition-metal homeostasis in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *190*(15), 5431–5438. https://doi.org/10.1128/JB.00271-08
- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y. C., Gernaey, A. M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C. L., Lemma, E., Bar-Gal, G. K., & Spigelman, M. (2008). Detection and molecular characterization of 9000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a neolithic settlement in the Eastern mediterranean. *PLoS ONE*, *3*(10), 1–6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426
- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., May, H., Lee, O. Y. C., Feldman, M., Galili, E., Spigelman, M., Rothschild, B. M., & Bar-Gal, G. K. (2015). Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. *Tuberculosis*, *95*(S1), S122–S126. https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.021
- Hett, E. C., Chao, M. C., & Rubin, E. J. (2010). Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. *PLoS Pathogens*, *6*(7), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001020

- Higgins, K. (2019). Nickel metalloregulators and chaperones. *Inorganics*, 7(8), 1–44. https://doi.org/10.3390/inorganics7080104
- Hodgkinson, V., & Petris, M. J. (2012). Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(17), 13549–13555. https://doi.org/10.1074/jbc.R111.316406
- Hoe, C. H., Raabe, C. A., Rozhdestvensky, T. S., & Tang, T. H. (2013). Bacterial sRNAs: Regulation in stress. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 303, Issue 5, pp. 217–229). Elsevier GmbH. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.002
- Hofreuter, D., Novik, V., & Galán, J. E. (2008). Metabolic Diversity in Campylobacter jejuni Enhances Specific Tissue Colonization. *Cell Host and Microbe*, *4*(5), 425–433. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.002
- Hollenstein, K., Frei, D. C., & Locher, K. P. (2007). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, *446*(7132), 213–216. https://doi.org/10.1038/nature05626
- Hood, M. I., Mortensen, B. L., Moore, J. L., Zhang, Y., Kehl-Fie, T. E., Sugitani, N., Chazin, W. J., Caprioli, R. M., & Skaar, E. P. (2012). Identification of an Acinetobacter baumannii Zinc Acquisition System that Facilitates Resistance to Calprotectin-mediated Zinc Sequestration. *PLoS Pathogens*, *8*(12). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003068
- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: Transition metals at the pathogenhost interface. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 10, Issue 8, pp. 525–537). Nat Rev Microbiol. https://doi.org/10.1038/nrmicro2836
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., Marks, C. B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R. G., Derrick, S. C., Collins, F. M., Morris, S. L., King, C. H., & Jacobs, W. R. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(21), 12420–12425. https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100
- Huang, C. S., Pedersen, B. P., & Stokes, D. L. (2017). Crystal structure of the potassiumimporting KdpFABC membrane complex. *Nature*, *546*(7660), 681–685. https://doi.org/10.1038/nature22970
- Huang, C. Y., & Hsieh, W. Y. (2017). Efficacy of Mycobacterium vaccae immunotherapy for patients with tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *13*(9), 1960–1971. https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1335374
- Huang, K., Wang, D., Frederiksen, R. F., Rensing, C., Olsen, J. E., & Fresno, A. H. (2018). Investigation of the role of genes encoding zinc exporters zntA, zitB, and fieF during Salmonella typhimurium infection. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02656
- Huang, Shin, J.-H., Pinochet-Barros, A., Su, T. T., & Helmann, J. D. (2017). Bacillus subtilis MntR coordinates the transcriptional regulation of manganese uptake and efflux systems. *Molecular Microbiology*, *103*(2), 253–268. https://doi.org/10.1111/mmi.13554
- Hulce, J. J., Cognetta, A. B., Niphakis, M. J., Tully, S. E., & Cravatt, B. F. (2013). Proteomewide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells. *Nature Methods*, 10(3), 259–264. https://doi.org/10.1038/nmeth.2368
- Ilari, A., Alaleona, F., Tria, G., Petrarca, P., Battistoni, A., Zamparelli, C., Verzili, D., Falconi, M., & Chiancone, E. (2014). The Salmonella enterica ZinT structure, zinc affinity and interaction with the high-affinity uptake protein ZnuA provide insight into the

management of periplasmic zinc. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1840*(1), 535–544. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.010

- Iobbi-Nivol, C., & Leimkühler, S. (2013). Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in Escherichia coli. In *Biochimica et Biophysica Acta* - *Bioenergetics* (Vol. 1827, Issues 8–9, pp. 1086–1101). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.11.007
- Irving, H., & Williams, R. J. P. (1953). 637. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, *3245*(0), 3192. https://doi.org/10.1039/jr9530003192
- Izadi, N., Henry, Y., Haladjian, J., Goldberg, M. E., Wandersman, C., Delepierre, M., & Lecroisey, A. (1997). Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, involved in heme iron acquisition. *Biochemistry*, *36*(23), 7050–7057. https://doi.org/10.1021/bi962577s
- Jackson, M. (2014). The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(10). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021105
- Jacobsen, F. E., Kazmierczak, K. M., Lisher, J. P., Winkler, M. E., & Giedroc, D. P. (2011). Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen Streptococcus pneumoniae. *Metallomics*, *3*(1), 38–41. https://doi.org/10.1039/c0mt00050g
- Jamet, S., Slama, N., Domingues, J., Laval, F., Texier, P., Eynard, N., Quémard, A., Peixoto, A., Lemassu, A., Daffé, M., & Cam, K. (2015). The non-essential mycolic acid biosynthesis genes hadA and hadC contribute to the physiology and fitness of Mycobacterium smegmatis. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145883
- Janulczyk, R., Ricci, S., & Björck, L. (2003). MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of Streptococcus pyogenes. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2656–2664. https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2656-2664.2003
- Jarlier, V., & Nikaido, H. (1990). Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonei. *Journal of Bacteriology*, *172*(3), 1418–1423. https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1418-1423.1990
- Jay, S. J., Kirbiyik, U., Woods, J. R., Steele, G. A., Hoyt, G. R., Schwengber, R. B., & Gupta, P. (2018). Modern theory of tuberculosis: Culturomic analysis of its historical origin in Europe and North America. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 22(11), 1249–1257. https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0239
- Jo, E. K. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *21*(3), 279–286. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b5d
- Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H., & Harding, C. V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: Branching out from Toll-like receptors. *Cellular Microbiology*, *9*(5), 1087–1098. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x
- Kandari, D., Gopalani, M., Gupta, M., Joshi, H., Bhatnagar, S., & Bhatnagar, R. (2019). Identification, functional characterization, and regulon prediction of the zinc uptake regulator (zur) of bacillus anthracis - An insight into the zinc homeostasis of the pathogen. *Frontiers in Microbiology*, *10*(JAN). https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03314
- Kang, P. B., Azad, A. K., Torrelles, J. B., Kaufman, T. M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L. E., & Schlesinger, L. S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome

biogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), 987–999. https://doi.org/10.1084/jem.20051239

- Kansau, I., Guillain, F., Thiberge, J., & Labigne, A. (1996). Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Molecular Microbiology*, 22(5), 1013–1023. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.01536.x
- Kapanidis, A. N., Uphoff, S., & Stracy, M. (2018). Understanding Protein Mobility in Bacteria by Tracking Single Molecules. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 430, Issue 22, pp. 4443–4455). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.002
- Karnovsky, M. J., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L., Dawidowicz, E. A., McIntyre, D. E., Salzman, E. A., & Klausner, R. D. (1982). Lipid Domains in Membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 401(1), 61–74. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb25707.x
- Kaufmann, S. H. E., Dorhoi, A., Hotchkiss, R. S., & Bartenschlager, R. (2018). Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(1), 35– 56. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.162
- Kehl-Fie, T. E., & Skaar, E. P. (2010). Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 218–224. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008
- Kim, E. H., Nies, D. H., McEvoy, M. M., & Rensing, C. (2011). Switch or funnel: How RNDtype transport systems control periplasmic metal homeostasis. *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2381–2387. https://doi.org/10.1128/JB.01323-10
- Kim, H., Lee, H., & Shin, D. (2012). The FeoA protein is necessary for the FeoB transporter to import ferrous iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(4), 733–738. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.027
- Koch, G., Wermser, C., Acosta, I. C., Kricks, L., Stengel, S. T., Yepes, A., & Lopez, D. (2017). Attenuating Staphylococcus aureus Virulence by Targeting Flotillin Protein Scaffold Activity. *Cell Chemical Biology*, 24(7), 845-857.e6. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.027
- Kochan, I. (1973). The role of iron in bacterial infections, with special consideration of hosttubercle bacillus interaction. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *60*, 1–30. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65502-9_1
- Kochi, A., Vareldzis, B., & Styblo, K. (1993). Multidrug-resistant tuberculosis and its control. *Research in Microbiology*, *144*(2), 104–110. https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90023-U
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T., & Soulimane, T. (2015). Cation diffusion facilitator family: Structure and function. *FEBS Letters*, 589(12), 1283–1295. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.007
- Kolloli, A., & Subbian, S. (2017). Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis. *Frontiers in Medicine*, 4(OCT). https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00171
- Kullas, A. L., McClelland, M., Yang, H. J., Tam, J. W., Torres, A., Porwollik, S., Mena, P., McPhee, J. B., Bogomolnaya, L., Andrews-Polymenis, H., & Van Der Velden, A. W. M. (2012). L-asparaginase II produced by salmonella typhimurium inhibits t cell responses and mediates virulence. *Cell Host and Microbe*, *12*(6), 791–798. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.018
- Kumar, M., Khan, F. G., Sharma, S., Kumar, R., Faujdar, J., Sharma, R., Chauhan, D. S., Singh, R., Magotra, S. K., & Khan, I. A. (2011). Identification of Mycobacterium tuberculosis genes preferentially expressed during human infection. *Microbial*

Pathogenesis, 50(1), 31-38. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.10.003

- Kurzchalia, T. V., & Parton, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(4), 424–431. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80061-1
- Kwan, C., & Ernst, J. D. (2011). HIV and tuberculosis: A deadly human syndemic. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(2), 351–376. https://doi.org/10.1128/CMR.00042-10
- Kwon, B. E., Ahn, J. H., Min, S., Kim, H., Seo, J., Yeo, S. G., & Ko, H. J. (2018). Development of new preventive and therapeutic vaccines for tuberculosis. *Immune Network*, 18(2), 1–19. https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e17
- Kwon, O. J. (1997). The role of Nitric Oxide in the immune response of tuberculosis. In *Journal of Korean Medical Science* (Vol. 12, Issue 6, pp. 481–487). https://doi.org/10.3346/jkms.1997.12.6.481
- Lacasse, M. J., & Zamble, D. B. (2016). [NiFe]-Hydrogenase Maturation. *Biochemistry*, 55(12), 1689–1701. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01328
- Laimins, L. A., Rhoads, D. B., Altendorf, K., & Epstein, W. (1978). Identification of the structural proteins of an ATP-driven potassium transport system in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(7), 3216–3219. https://doi.org/10.1073/pnas.75.7.3216
- Lajoie, P., Goetz, J. G., Dennis, J. W., & Nabi, I. R. (2009). Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 185(3), 381–385. https://doi.org/10.1083/jcb.200811059
- Lalaouna, D., Baude, J., Wu, Z., Tomasini, A., Chicher, J., Marzi, S., Vandenesch, F., Romby, P., Caldelari, I., & Moreau, K. (2019). RsaC sRNA modulates the oxidative stress response of Staphylococcus aureus during manganese starvation. *Nucleic Acids Research*, *47*(18), 9871–9887. https://doi.org/10.1093/nar/gkz728
- Lan, C. C., Yu, H. S., & Ko, Y. C. (2011). Chronic arsenic exposure and its adverse health effects in Taiwan: A paradigm for management of a global environmental problem. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 27(9), 411–416. https://doi.org/10.1016/j.kjms.2011.05.009
- Langhorst, M. F., Reuter, A., Luxenhofer, G., Boneberg, E., Legler, D. F., Plattner, H., & Stuermer, C. A. O. (2006). Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells. *The FASEB Journal*, *20*(6), 711–713. https://doi.org/10.1096/fj.05-4760fje
- Lawe, D. C., Chawla, A., Merithew, E., Dumas, J., Carrington, W., Fogarty, K., Lifshitz, L., Tuft, R., Lambright, D., & Corvera, S. (2002). Sequential roles for phosphatidylinositol 3phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8611–8617. https://doi.org/10.1074/jbc.M109239200
- Lazarevic, V., & Flynn, J. (2002). CD8+ T cells in tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *166*(8), 1116–1121. https://doi.org/10.1164/rccm.2204027
- Leland, H. V, Luoma, S. N., & Wilkes, D. J. (1977). Heavy metals and related trace elements. *Journal - Water Pollution Control Federation*, *49*(6), 1340–1369. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/328945
- Lemassu, A., & Daffe, M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of Mycobacterium tuberculosis. *Biochemical Journal*, 297(2), 351–357. https://doi.org/10.1042/bj2970351
- Lemire, J., Mailloux, R., Auger, C., Whalen, D., & Appanna, V. D. (2010). Pseudomonas

fluorescens orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environmental Microbiology*, *12*(6), 1384–1390. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02200.x

- Lenoir, G., Williamson, P., & Holthuis, J. C. (2007). On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 11, Issue 6, pp. 654– 661). Curr Opin Chem Biol. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.09.008
- León-torres, A., Arango, E., Castillo, E., & Soto, C. Y. (2020). CtpB is a plasma membrane copper (1) transporting P - type ATPase of Mycobacterium tuberculosis. *Biological Research*, 1–13. https://doi.org/10.1186/s40659-020-00274-7
- León-Torres, A., Novoa-Aponte, L., & Soto, C. Y. (2015). CtpA, a putative Mycobacterium tuberculosis P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *BioMetals*, *28*(4), 713–724. https://doi.org/10.1007/s10534-015-9860-x
- Létoffé, S., Ghigo, J. M., & Wandersman, C. (1994). Iron acquisition from heme and hemoglobin by a Serratia marcescens extracellular protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(21), 9876–9880. https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9876
- Levental, I., Grzybek, M., & Simons, K. (2010). Greasing their way: Lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry*, *49*(30), 6305–6316. https://doi.org/10.1021/bi100882y
- Levillain, F., Poquet, Y., Mallet, L., Mazères, S., Marceau, M., Brosch, R., Bange, F. C., Supply, P., Magalon, A., & Neyrolles, O. (2017). Horizontal acquisition of a hypoxiaresponsive molybdenum cofactor biosynthesis pathway contributed to Mycobacterium tuberculosis pathoadaptation. *PLoS Pathogens*, *13*(11), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006752
- Lhospice, S., Gomez, N. O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghssein, G., Hajjar, C., Liratni, A., Wang, S., Richaud, P., Bleves, S., Ball, G., Borezée-Durant, E., Lobinski, R., Pignol, D., Arnoux, P., & Voulhoux, R. (2017). Pseudomonas aeruginosa zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16765-9
- Li et al. (2019). Zinc toxicity and iron-sulfur cluster biogenesis in Escherichia coli. 85(9), 1– 13.
- Ling, D. I., Zwerling, A. A., & Pai, M. (2008). Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: From evidence to policy. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2(5), 583–588. https://doi.org/10.1586/17476348.2.5.583
- Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cellular and Molecular Immunology*, *14*(12), 963–975. https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88
- Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S. K., Zhang, L., George, G. N., Talaat, A. M., Sacchettini, J. C., & Giedroc, D. P. (2007). CsoR is a novel Mycobacterium tuberculosis coppersensing transcriptional regulator. *Nature Chemical Biology*, *3*(1), 60–68. https://doi.org/10.1038/nchembio844
- Liu, T. Y., Chou, W. C., Chen, W. Y., Chu, C. Y., Dai, C. Y., & Wu, P. Y. (2018). Detection of membrane protein–protein interaction in planta based on dual-intein-coupled tripartite split-GFP association. *Plant Journal*, 94(3), 426–438. https://doi.org/10.1111/tpj.13874
- Łoboda, D., & Rowińska-Zyrek, M. (2018). Candida albicans zincophore and zinc transporter interactions with Zn(II) and Ni(II). *Dalton Transactions*, 47(8), 2646–2654. https://doi.org/10.1039/c7dt04403h
- Loftin, I. R., Franke, S., Roberts, S. A., Weichsel, A., Héroux, A., Montfort, W. R., Rensing,

C., & McEvoy, M. M. (2005). A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry*, *44*(31), 10533–10540. https://doi.org/10.1021/bi050827b

- Long, F., Su, C. C., Lei, H. T., Bolla, J. R., Do, S. V., & Yu, E. W. (2012). Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 367, Issue 1592, pp. 1047–1058). Royal Society. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0203
- Long, F., Su, C. C., Zimmermann, M. T., Boyken, S. E., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., & Yu, E. W. (2010). Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methioninemediated metal transport. *Nature*, 467(7314), 484–488. https://doi.org/10.1038/nature09395
- Loomans, H. J., Hahn, B. L., Li, Q., Phadnis, S. H., & Sohnle, P. G. (1998). Histidine-Based Zinc-Binding Sequences and the Antimicrobial Activity of Calprotectin. *The Journal of Infectious Diseases*, *177*(3), 812–814. https://doi.org/10.1086/517816
- López, D., & Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes and Development*, 24(17), 1893–1902. https://doi.org/10.1101/gad.1945010
- López, M., Quitian, L. V., Calderón, M. N., & Soto, C. Y. (2018). The P-type ATPase CtpG preferentially transports Cd2+ across the Mycobacterium tuberculosis plasma membrane. *Archives of Microbiology*, *200*(3), 483–492. https://doi.org/10.1007/s00203-017-1465-z
- Losasso, C., Belluco, S., Cibin, V., Zavagnin, P., Mičetić, I., Gallocchio, F., Zanella, M., Bregoli, L., Biancotto, G., & Ricci, A. (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles: Sensitivity of different Salmonella serovars. *Frontiers in Microbiology*, *5*(MAY), 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00227
- Lucas, M. C., Wolfe, L. M., Hazenfield, R. M., Kurihara, J., Kruh-Garcia, N. A., Belisle, J., & Dobos, K. M. (2015). Mycobacteria protocols: Third edition. *Mycobacteria Protocols: Third Edition*, *1285*, 1–416. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2450-9
- Ludwig, A., Otto, G. P., Riento, K., Hams, E., Fallon, P. G., & Nichols, B. J. (2010). Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment. *Journal of Cell Biology*, *191*(4), 771–781. https://doi.org/10.1083/jcb.201005140
- Luo, M., Fadeev, E. A., & Groves, J. T. (2005). Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. *Nature Chemical Biology*, 1(3), 149–153. https://doi.org/10.1038/nchembio717
- Ma, Z., Chandrangsu, P., Helmann, T. C., Romsang, A., Gaballa, A., & Helmann, J. D. (2014). Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in Bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, 94(4), 756–770. https://doi.org/10.1111/mmi.12794
- Ma, Z., Jacobsen, F. E., & Giedroc, D. P. (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chemical Reviews*, *109*(10), 4644–4681. https://doi.org/10.1021/cr900077w
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(20), 8344–8349. https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., & Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. *Journal of Bacteriology*, *178*(5), 1274–1282. https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1274-1282.1996

- Mana-Capelli, S., Mandal, A. K., & Argüello, J. M. (2003). Archaeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu2+-ATPase: Functional role of its histidine-rich N-terminal metal binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40534–40541. https://doi.org/10.1074/jbc.M306907200
- Manoharan, R. K., Mahalingam, S., Gangadaran, P., & Ahn, Y. H. (2020). Antibacterial and photocatalytic activities of 5-nitroindole capped bimetal nanoparticles against multidrug resistant bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 188*(January), 110825. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110825
- Marakalala, M. J., & Ndlovu, H. (2017). Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. *PLoS Pathogens*, *13*(6), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006333
- Maret, W., & Kręzel, A. (2007). Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Molecular Medicine*, *13*(7–8), 371–375. https://doi.org/10.2119/2007-00036.Maret
- Maret, W., & Li, Y. (2009). Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chemical Reviews*, *109*(10), 4682–4707. https://doi.org/10.1021/cr800556u
- Martin, J. E., Waters, L. S., Storz, G., & Imlay, J. A. (2015). The Escherichia coli Small Protein MntS and Exporter MntP Optimize the Intracellular Concentration of Manganese. *PLOS Genetics*, *11*(3), e1004977. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004977
- Masjedi, M. R., Farnia, P., Sorooch, S., Pooramiri, M. V., Mansoori, S. D., Zarifi, A. Z., AkbarVelayati, A., & Hoffner, S. (2006). Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: 2 Years of Surveillance in Iran. *Clinical Infectious Diseases*, *43*(7), 841–847. https://doi.org/10.1086/507542
- Mason, R. J. (2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, *11*(SUPPL. 1), 12–15. https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x
- Massé, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(7), 4620–4625. https://doi.org/10.1073/pnas.032066599
- Massé, E., Vanderpool, C. K., & Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *187*(20), 6962–6971. https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6962-6971.2005
- Mattle, D., Sitsel, O., Autzen, H. E., Meloni, G., Gourdon, P., & Nissen, P. (2013). On allosteric modulation of P-type Cu+-ATPases. *Journal of Molecular Biology*, *425*(13), 2299–2308. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.008
- Maya-Hoyos, M., Rosales, C., Novoa-Aponte, L., Castillo, E., & Soto, C. Y. (2019). The Ptype ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in Mycobacterium tuberculosis cells. *Heliyon*, *5*(11), e02852. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02852
- McGee, D. J., May, C. A., Garner, R. M., Himpsl, J. M., & Mobley, H. L. T. (1999). Isolation of Helicobacter pylori genes that modulate urease activity. *Journal of Bacteriology*, *181*(8), 2477–2484. https://doi.org/10.1128/jb.181.8.2477-2484.1999
- McGillivray, A., Golden, N. A., & Kaushal, D. (2015). The Mycobacterium tuberculosis Clp gene regulator is required for in vitro reactivation from hypoxia-induced dormancy. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(4), 2351–2367. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.615534
- Mearns, H., Geldenhuys, H. D., Kagina, B. M., Musvosvi, M., Little, F., Ratangee, F., Mahomed, H., Hanekom, W. A., Hoff, S. T., Ruhwald, M., Kromann, I., Bang, P.,

Hatherill, M., Andersen, P., Scriba, T. J., Rozot, V., Abrahams, D. A., Mauff, K., Smit, E., ... Steyn, M. (2017). H1:IC31 vaccination is safe and induces long-lived TNF-α+IL-2+CD4 T cell responses in M. tuberculosis infected and uninfected adolescents: A randomized trial. *Vaccine*, *35*(1), 132–141. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.023

- Mello Filho, A. C., Hoffmann, M. E., & Meneghini, R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemical Journal*, *218*(1), 273–275. https://doi.org/10.1042/bj2180273
- Mitra, A., Ko, Y. H., Cingolani, G., & Niederweis, M. (2019). Heme and hemoglobin utilization by Mycobacterium tuberculosis. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-12109-5
- Mitra, B., & Sharma, R. (2001). The cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-translocating ATPase from Escherichia coli, is not essential for its function. *Biochemistry*, *40*(25), 7694–7699. https://doi.org/10.1021/bi010576g
- Mogues, T., Goodrich, M. E., Ryan, L., LaCourse, R., & North, R. J. (2001). The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *193*(3), 271–280. https://doi.org/10.1084/jem.193.3.271
- Mohareer, K., Asalla, S., & Banerjee, S. (2018). Cell death at the cross roads of hostpathogen interaction in Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, *113*(September), 99–121. https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.09.007
- Moliva, J. I., Rajaram, M. V. S., Sidiki, S., Sasindran, S. J., Guirado, E., Pan, X. J., Wang, S. H., Ross, P., Lafuse, W. P., Schlesinger, L. S., Turner, J., & Torrelles, J. B. (2014).
 Molecular composition of the alveolar lining fluid in the aging lung. *Age*, *36*(3), 1187–1199. https://doi.org/10.1007/s11357-014-9633-4
- Molle, V., Girard-Blanc, C., Kremer, L., Doublet, P., Cozzone, A. J., & Prost, J. F. (2003). Protein PknE, a novel transmembrane eukaryotic-like serine/threonine kinase from Mycobacterium tuberculosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *308*(4), 820–825. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01476-1
- Morrow, I. C., & Parton, R. G. (2005). Flotillins and the PHB domain protein family: Rafts worms and anaesthetics. *Traffic*, *6*(9), 725–740. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00318.x
- Multhaup, G., Strausak, D., Bissig, K. D., & Solioz, M. (2001). Interaction of the CopZ copper chaperone with the CopA copper ATPase of Enterococcus hirae assessed by surface plasmon resonance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *288*(1), 172–177. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5757
- Murata, M., Peranen, J., Schreinert, R., Wielandt, F., Kurzchalia, T. V, & Simons, K. A. I. (1995). *VIP21 / caveolin is a cholesterol-binding protein*. *92*(October), 10339–10343.
- Nathan, C., & Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8841–8848. https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841
- Ndlovu, H., & Marakalala, M. J. (2016). Granulomas and inflammation: Host-directed therapies for tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 7(OCT). https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00434
- Neumann-Giesen, C., Falkenbach, B., Beicht, P., Claasen, S., Lüers, G., Stuermer, C. A. O., Herzog, V., & Tikkanen, R. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: Role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochemical Journal*, 378(2), 509–518.

https://doi.org/10.1042/BJ20031100

- Neupane, Durga P., Avalos, D., Fullam, S., Roychowdhury, H., & Yukl, E. T. (2017). Mechanisms of zinc binding to the solute-binding protein AztC and transfer from the metallochaperone AztD. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(42), 17496–17505. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.804799
- Neupane, Durga Prasad, Fullam, S. H., Chacón, K. N., & Yukl, E. T. (2019). Crystal structures of AztD provide mechanistic insights into direct zinc transfer between proteins. *Communications Biology*, *2*(1). https://doi.org/10.1038/s42003-019-0542-z
- Newton, G. L., Buchmeier, N., & Fahey, R. C. (2008). Biosynthesis and Functions of Mycothiol, the Unique Protective Thiol of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 471–494. https://doi.org/10.1128/mmbr.00008-08
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., & Niederweis, M. (2015). Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunological Reviews*, *264*(1), 249–263. https://doi.org/10.1111/imr.12265
- Ng, V. H., Cox, J. S., Sousa, A. O., MacMicking, J. D., & McKinney, J. D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenisis: Countering the phagocyte oxidative burst. *Molecular Microbiology*, *52*(5), 1291–1302. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04078.x
- Nguyen, T. V. A., Anthony, R. M., Bañuls, A. L., Vu, D. H., & Alffenaar, J. W. C. (2018). Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clinical Infectious Diseases*, *66*(10), 1625–1630. https://doi.org/10.1093/cid/cix992
- Nicod, L. P. (2005). Lung defences: An overview. *European Respiratory Review*, *14*(95), 45– 50. https://doi.org/10.1183/09059180.05.00009501
- Nieboer, E., & Richardson, D. H. S. (1980). Heavy Metals By a Biologically a N D Chemically Significant Classification of Metal Ions. *Environmental Pollution*, *1*, 3–26.
- Nielsen, N. O., Skifte, T., Andersson, M., Wohlfahrt, J., Sborg, B., Koch, A., Melbye, M., & Ladefoged, K. (2010). Both high and low serum vitamin D concentrations are associated with tuberculosis: A case-control study in Greenland. *British Journal of Nutrition*, 104(10), 1487–1491. https://doi.org/10.1017/S0007114510002333
- Nies, D. H., & Herzberg, M. (2013). A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria. *Molecular Microbiology*, *87*(3), 447–454. https://doi.org/10.1111/mmi.12123
- Nies, D. H., & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, *14*(2), 186–199. https://doi.org/10.1007/BF01569902
- Nieuwenhuizen, N. E., Kulkarni, P. S., Shaligram, U., Cotton, M. F., Rentsch, C. A., Eisele, B., Grode, L., & Kaufmann, S. H. E. (2017). The recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine VPM1002: Ready for clinical efficacy testing. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 1–9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01147
- Nim, Y. S., & Wong, K. B. (2019). The maturation pathway of nickel urease. *Inorganics*, 7(7). https://doi.org/10.3390/inorganics7070085
- Noinaj, N., Buchanan, S. K., & Cornelissen, C. N. (2012). The transferrin-iron import system from pathogenic Neisseria species. In *Molecular Microbiology* (Vol. 86, Issue 2, pp. 246–257). Mol Microbiol. https://doi.org/10.1111/mmi.12002
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 64, pp. 43–60). NIH Public Access. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247

- Nordberg, M., & Nordberg, G. F. (2016). Trace element research-historical and future aspects. In *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (Vol. 38, pp. 46–52). Elsevier GmbH. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.04.006
- Novoa-Aponte, L., León-Torres, A., Patiño-Ruiz, M., Cuesta-Bernal, J., Salazar, L. M., Landsman, D., Mariño-Ramírez, L., & Soto, C. Y. (2012). In silico identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the Mycobacterium tuberculosis complex. *BMC Structural Biology*, *12*. https://doi.org/10.1186/1472-6807-12-25
- Novoa-Aponte, L., & Soto Ospina, C. Y. (2014). Mycobacterium tuberculosis p-type atpases: Possible targets for drug or vaccine development. *BioMed Research International*, 2014. https://doi.org/10.1155/2014/296986
- Noyce, J. O., Michels, H., & Keevil, C. W. (2006). Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant Staphylococcus aureus in the healthcare environment. *Journal of Hospital Infection*, *63*(3), 289–297. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.12.008
- O'Halloran, T. V., Frantz, B., Shin, M. K., Ralston, D. M., & Wright, J. G. (1989). The MerR heavy metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. *Cell*, *56*(1), 119–129. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90990-2
- Oglesby-Sherrouse, A. G., & Murphy, E. R. (2013). Iron-responsive bacterial small RNAs: Variations on a theme. In *Metallomics* (Vol. 5, Issue 4, pp. 276–286). The Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/c3mt20224k
- Oglesby, A. G., Farrow, J. M., Lee, J. H., Tomaras, A. P., Greenberg, E. P., Pesci, E. C., & Vasil, M. L. (2008). The influence of iron on Pseudomonas aeruginosa physiology: A regulatory link between iron and quorum sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15558–15567. https://doi.org/10.1074/jbc.M707840200
- Okkeri, J., & Haltia, T. (2006). The metal-binding sites of the zinc-transporting P-type ATPase of Escherichia coli. Lys693 and Asp714 in the seventh and eighth transmembrane segments of ZntA contribute to the coupling of metal binding and ATPase activity. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, *1757*(11), 1485–1495. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.06.008
- Olson, J. W., Mehta, N. S., & Maier, R. J. (2001). Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in Helicobacter pylori. *Molecular Microbiology*, *39*(1), 176–182. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02244.x
- Ong, C. L. Y., Walker, M. J., & McEwan, A. G. (2015). Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in Streptococcus pyogenes. *Scientific Reports*, 5(April), 1–10. https://doi.org/10.1038/srep10799
- Ortalo-Magne, A., Dupont, M. A., Lemassu, A., Andersen, A. B., Gounon, P., & Daffe, M. (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*, *141*(7), 1609–1620. https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1609
- Osman, D., Patterson, C. J., Bailey, K., Fisher, K., Robinson, N. J., Rigby, S. E. J., & Cavet, J. S. (2013). The copper supply pathway to a Salmonella Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P1B-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Molecular Microbiology*, *87*(3), 466–477. https://doi.org/10.1111/mmi.12107
- Osman, D., Waldron, K. J., Denton, H., Taylor, C. M., Grant, A. J., Mastroeni, P., Robinson, N. J., & Cavet, J. S. (2010). Copper homeostasis in Salmonella is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(33), 25259–25268. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145953

- Otto, G. P., & Nichols, B. J. (2011). The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond. *Journal of Cell Science*, *124*(23), 3933–3940. https://doi.org/10.1242/jcs.092015
- Outten, C. E., & O'Halloran, T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, *292*(5526), 2488–2492. https://doi.org/10.1126/science.1060331
- Padilla-Benavides, T., Long, J. E., Raimunda, D., Sassetti, C. M., & Argüello, J. M. (2013). A novel P1B-type Mn2+-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(16), 11334–11347. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448175
- Padilla-Benavides, T., McCann, C. J., & Argüello, J. M. (2013). The mechanism of Cu+ transport ATPases: Interaction with CU + chaperones and the role of transient metalbinding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 69–78. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420810
- Padilla-Benavides, T., Thompson, A. M. G., McEvoy, M. M., & Argüello, J. M. (2014). Mechanism of ATPase-mediated Cu+ export and delivery to periplasmic chaperones: The interaction of Escherichia coli CopA and CusF. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20492–20501. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577668
- Padilla-Vaca, F., Naurú, , Vargas-Maya, I., Narciso, , Elizarrarás-Vargas, U., Rangel-Serrano, Á., Luis, , Cardoso-Reyes, R., Razo-Soria, T., Membrillo-Hernández, J., & Franco, Bernardo. (2019). *Flotillin homologue is involved in the swimming behavior of Escherichia coli. 201*, 999–1008. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01670-8
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76
- Paik, S., Kim, J. K., Chung, C., & Jo, E. K. (2019). Autophagy: A new strategy for hostdirected therapy of tuberculosis. *Virulence*, *10*(1), 448–459. https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1536598
- Palmer, L. D., & Skaar, E. P. (2016). Transition Metals and Virulence in Bacteria. *Annual Review of Genetics*, *50*(1), 67–91. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035146
- Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2011). P-Type ATPases. *Annual Review of Biophysics*, 40(1), 243–266. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131331
- Pandey, R., Russo, R., Ghanny, S., Huang, X., Helmann, J., & Rodriguez, G. M. (2015). MntR(Rv2788): A transcriptional regulator that controls manganese homeostasis in Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, *98*(6), 1168–1183. https://doi.org/10.1111/mmi.13207
- Patel, S. J., Lewis, B. E., Long, J. E., Nambi, S., Sassetti, C. M., Stemmler, T. L., & Argüello, J. M. (2016). Fine-tuning of substrate affinity leads to alternative roles of mycobacterium tuberculosis Fe2+-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(22), 11529–11539. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718239
- Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *Journal of Membrane Biology*, *156*(2), 99–103. https://doi.org/10.1007/s002329900192
- Paulson, T. (2013). A mortal foe. *Nature*, *502*(7470), 2010–2011. https://doi.org/10.1038/502S2a
- Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M. E., & Källenius, G. (2012). Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens*, *8*(2).

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002464

- Peddireddy, V., Doddam, S. N., & Ahmed, N. (2017). Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 8(FEB), 1–19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00084
- Pedelacq, J.-D., Waldo, G. S., & Cabantous, S. (2019). High-Throughput Protein–Protein Interaction Assays Using Tripartite Split-GFP Complementation. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2025, pp. 423–437). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9624-7_20
- Pedersen, B. P., Stokes, D. L., & Apell, H. J. (2019). The KdpFABC complex K+ transport against all odds. *Molecular Membrane Biology*, *35*(1), 21–38. https://doi.org/10.1080/09687688.2019.1638977
- Pelz, A., Wieland, K. P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K., & Götz, F. (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from Staphylococcus aureus. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(37), 32493–32498. https://doi.org/10.1074/jbc.M505070200
- Perera, V. R., Newton, G. L., & Pogliano, K. (2015). Bacillithiol: A key protective thiol in Staphylococcus aureus. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 13, Issue 9, pp. 1089–1107). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1064309
- Perry, R. D., Bobrov, A. G., & Fetherston, J. D. (2015). The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of Yersinia pestis. *Metallomics*, 7(6), 965–978. https://doi.org/10.1039/c4mt00332b
- Perry, W. J., Spraggins, J. M., Sheldon, J. R., Grunenwald, C. M., Heinrichs, D. E., Cassat, J. E., Skaar, E. P., & Caprioli, R. M. (2019). Staphylococcus aureus exhibits heterogeneous siderophore production within the vertebrate host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(44), 21980–21982. https://doi.org/10.1073/pnas.1913991116
- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., & Battistoni, A. (2010). The zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *Journal of Bacteriology*, *192*(6), 1553–1564. https://doi.org/10.1128/JB.01310-09
- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 353–384. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458
- Piddington, D. L., Fang, F. C., Laessig, T., Cooper, A. M., Orme, I. M., & Buchmeier, N. A. (2001). Cu,Zn superoxide dismutase of Mycobacterium tuberculosis contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infection and Immunity*, 69(8), 4980–4987. https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4980-4987.2001
- Pohl, E., Holmes, R. K., & Hol, W. G. J. (1999). Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from Mycobacterium tuberculosis shows both metal binding sites fully occupied. *Journal of Molecular Biology*, *285*(3), 1145–1156. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2339
- Polarek, J. W., Walderhaug, M. O., & Epstein, W. (1988). Genetics of Kdp, the K+-transport ATPase of Escherichia coli. *Methods in Enzymology*, *157*(C), 655–667. https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)57113-6
- Pontali, E., Sotgiu, G., D'Ambrosio, L., Centis, R., & Migliori, G. B. (2016). Bedaquiline and multidrug-resistant tuberculosis: A systematic and critical analysis of the evidence. *European Respiratory Journal*, *47*(2), 394–402. https://doi.org/10.1183/13993003.01891-2015

Pradhan, G., Shrivastva, R., & Mukhopadhyay, S. (2018). Mycobacterial PknG Targets the

Rab7I1 Signaling Pathway To Inhibit Phagosome–Lysosome Fusion. *The Journal of Immunology*, 201(5), 1421–1433. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800530

- Prasad, A. S. (2012). Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *26*(2–3), 66–69. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.004
- Prasad, A. S., Beck, F. W. J., Bao, B., Fitzgerald, J. T., Snell, D. C., Steinberg, J. D., & Cardozo, L. J. (2007). Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: Effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(3), 837–844. https://doi.org/10.1093/ajcn/85.3.837
- Prasad, K., Mb, S., & Ryan, H. (2016). Corticosteroids for managing tuberculous meningitis (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *4*, 2008–2010. https://doi.org/10.1002/14651858.CD002244.pub4.www.cochranelibrary.com
- Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J. F., Phaneuf, É., & Massé, E. (2007). The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology*, *64*(5), 1260–1273. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05733.x
- Price, I. R., Gaballa, A., Ding, F., Helmann, J. D., & Ke, A. (2015). Mn2+-Sensing Mechanisms of yybP-ykoY Orphan Riboswitches. *Molecular Cell*, *57*(6), 1110–1123. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.016
- Puri, R. V., Reddy, P. V., & Tyagi, A. K. (2013). Secreted Acid Phosphatase (SapM) of Mycobacterium tuberculosis Is Indispensable for Arresting Phagosomal Maturation and Growth of the Pathogen in Guinea Pig Tissues. *PLoS ONE*, 8(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070514
- Queval, C. J., Brosch, R., & Simeone, R. (2017). The macrophage: A disputed fortress in the battle against Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Microbiology*, *8*(NOV), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02284
- Quigley, J., Hughitt, V. K., Velikovsky, C. A., Mariuzza, R. A., El-Sayed, N. M., & Briken, V. (2017). The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of Mycobacterium tuberculosis. *MBio*, 8(2), 1–12. https://doi.org/10.1128/mBio.00148-17
- Radford, D. S., Kihlken, M. A., Borrelly, G. P. M., Harwood, C. R., Le Brun, N. E., & Cavet, J. S. (2003). CopZ from Bacillus subtilis interacts in vivo with a copper exporting CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiology Letters*, 220(1), 105–112. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00095-8
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., & O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, *284*(5415), 805–808. https://doi.org/10.1126/science.284.5415.805
- Raimunda, D., & Elso-Berberián, G. (2014). Functional characterization of the CDF transporter SMc02724 (SmYiiP) in Sinorhizobium meliloti: Roles in manganese homeostasis and nodulation. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, *1838*(12), 3203–3211. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.09.005
- Raimunda, D., Long, J. E., Padilla-Benavides, T., Sassetti, C. M., & Argüello, J. M. (2014). Differential roles for the Co2+/Ni2+ transporting ATPases, CtpD and CtpJ, in Mycobacterium tuberculosis virulence. *Molecular Microbiology*, *91*(1), 185–197. https://doi.org/10.1111/mmi.12454
- Raimunda, D., Long, J. E., Sassetti, C. M., & Argüello, J. M. (2012). Role in metal homeostasis of CtpD, a Co 2+ transporting P1B4-ATPase of Mycobacterium smegmatis. *Molecular Microbiology*, *84*(6), 1139–1149. https://doi.org/10.1111/j.1365-

2958.2012.08082.x

- Rajendran, L., Beckmann, J., Magenau, A., Boneberg, E. M., Gaus, K., Viola, A., Giebel, B., & Illges, H. (2009). Flotillins are involved in the polarization of primitive and mature hematopoietic cells. *PLoS ONE*, *4*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008290
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, *12*(5), 352–366. https://doi.org/10.1038/nri3211
- Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Goebel, I., Mubaidin, A. F., Wriekat, A. L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A. M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C. G., Behrens, M. I., & Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics*, *38*(10), 1184–1191. https://doi.org/10.1038/ng1884
- Raynaud, C., Papavinasasundaram, K. G., Speight, R. A., Springer, B., Sander, P., Böttger, E. C., Colston, M. J., & Draper, P. (2002). The functions of OmpATb, a pore-forming protein of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, *46*(1), 191–201. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03152.x
- Rees, D. C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(3), 218–227. https://doi.org/10.1038/nrm2646
- Reinhart, A. A., Nguyen, A. T., Brewer, L. K., Bevere, J., Jones, J. W., Kane, M. A., Damron, F. H., Barbier, M., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2017). *The Pseudomonas aeruginosa PrrF Small RNAs Regulate Iron Homeostasis during Acute Murine Lung Infection*. https://doi.org/10.1128/IAI.00764-16
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., & Rosen, B. P. (2000). CopA: An Escherichia coli Cu (1) -translocating P-type ATPase. 97(2), 652–656.
- Reyes-Caballero, H., Campanello, G. C., & Giedroc, D. P. (2011). Metalloregulatory proteins: Metal selectivity and allosteric switching. *Biophysical Chemistry*, *156*(2–3), 103–114. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2011.03.010
- Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O., & Málaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: Convergent evolution of the SPFH domain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(3), 343–357. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5434-3
- Rohde, K. H., Abramovitch, R. B., & Russell, D. G. (2007). Mycobacterium tuberculosis Invasion of Macrophages: Linking Bacterial Gene Expression to Environmental Cues. *Cell Host and Microbe*, 2(5), 352–364. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.006
- Rosch, J. W., Gao, G., Ridout, G., Wang, Y. D., & Tuomanen, E. I. (2009). Role of the manganese efflux system mntE for signalling and pathogenesis in Streptococcus pneumoniae. *Molecular Microbiology*, *72*(1), 12–25. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06638.x
- Rosser, A., Stover, C., Pareek, M., & Mukamolova, G. V. (2017). Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in Mycobacterium tuberculosis infection. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(5), 621–630. https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1283485
- Roy, A., Eisenhut, M., Harris, R. J., Rodrigues, L. C., Sridhar, S., Habermann, S., Snell, L., Mangtani, P., Adetifa, I., Lalvani, A., & Abubakar, I. (2014). Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: Systematic review and metaanalysis. *BMJ (Online)*, 349(August), 1–11. https://doi.org/10.1136/bmj.g4643
- Russell-Goldman, E., Xu, J., Wang, X., Chan, J., & Tufariello, J. A. M. (2008). A Mycobacterium tuberculosis Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in

reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. *Infection and Immunity*, 76(9), 4269–4281. https://doi.org/10.1128/IAI.01735-07

- Russell, D. G., Barry, C. E., & Flynn, J. L. (2010). Tuberculosis : What We Don 't Know. *Science*, 328(5980), 852–856. https://doi.org/10.1126/science.1184784
- Saeed, S., Iqbal, A., & Ashraf, M. A. (2020). Bacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their significant effect against pathogens. *Environmental Science and Pollution Research*. https://doi.org/10.1007/s11356-020-07610-0
- Salvail, H., Caron, M.-P., Bélanger, J., & Massé, E. (2013). Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin. *The EMBO Journal*, 32(20), 2764–2778. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.205
- Sánchez-López, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M. L., & Souto, E. B. (2020). Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview. *Nanomaterials*, *10*(2), 1–39. https://doi.org/10.3390/nano10020292
- Santo, C. E., Lam, E. W., Elowsky, C. G., Quaranta, D., Domaille, D. W., Chang, C. J., & Grass, G. (2011). Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 794–802. https://doi.org/10.1128/AEM.01599-10
- Santos, P., Lopez-vallejo, F., Ramírez, D., Caballero, J., Espinosa, M., Hernández-pando, R., & Soto, C. Y. (2019). Identification of Mycobacterium tuberculosis CtpF as a target for designing new antituberculous compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *December*, 115256. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115256
- Sargent, F. (2016). The Model [NiFe]-Hydrogenases of Escherichia coli. In *Advances in Microbial Physiology* (1st ed., Vol. 68). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.008
- Schauer, K., Gouget, B., Carrière, M., Labigne, A., & De Reuse, H. (2007). Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Molecular Microbiology*, *63*(4), 1054–1068. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05578.x
- Schauer, K., Muller, C., Carrière, M., Labigne, A., Cavazza, C., & De Reuse, H. (2010). The Helicobacter pylori GroES cochaperonin HspA functions as a specialized nickel chaperone and sequestration protein through its unique C-terminal extension. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1231–1237. https://doi.org/10.1128/JB.01216-09
- Schauer, K., Rodionov, D. A., & de Reuse, H. (2008). New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the "tip of the iceberg"? In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 33, Issue 7, pp. 330–338). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.012
- Schlesinger, L. S., Bellinger-Kawahara, C. G., Payne, N. R., & Horwitz, M. A. (1990). Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *Journal of Immunology* (*Baltimore, Md. : 1950*), *144*(7), 2771–2780. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2108212
- Schnappinger, D., & Ehrt, S. (2014). Regulated Expression Systems for Mycobacteria and Their Applications. *Microbiology Spectrum*, *2*(1), 1–13. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mgm2-0018-2013
- Schneider, J., Klein, T., Mielich-Süss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O. P., Kovács, Á. T., Sauer, M., & Lopez, D. (2015). Spatio-temporal Remodeling of Functional Membrane Microdomains Organizes the Signaling Networks of a Bacterium. *PLoS Genetics*, *11*(4), 1–32. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005140

- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., & Stuermer, C. A. O. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*, 124(2), 577–587.
- Schurig-Briccio, L. A., & Gennis, R. B. (2012). Characterization of the PIB-Type ATPases present in Thermus thermophilus. *Journal of Bacteriology*, *194*(15), 4107–4113. https://doi.org/10.1128/JB.00849-12

Schwabe, J. W. R., & Klug, A. (1994). Zinc mining for protein domains. 345–349.

- Senaratne, R. H., De Silva, A. D., Williams, S. J., Mougous, J. D., Reader, J. R., Zhang, T., Chan, S., Sidders, B., Lee, D. H., Chan, J., Bertozzi, C. R., & Riley, L. W. (2006). 5'-Adenosinephosphosulphate reductase (CysH) protects Mycobacterium tuberculosis against free radicals during chronic infection phase in mice. *Molecular Microbiology*, 59(6), 1744–1753. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05075.x
- Shafeeq, S., Yesilkaya, H., Kloosterman, T. G., Narayanan, G., Wandel, M., Andrew, P. W., Kuipers, O. P., & Morrissey, J. A. (2011). The cop operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in Streptococcus pneumoniae. *Molecular Microbiology*, *81*(5), 1255–1270. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07758.x
- Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B. P., & Mitra, B. (2000). The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)- translocating ATPase from Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3873–3878. https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.3873
- Shibayama, K., Takeuchi, H., Wachino, J. ichi, Mori, S., & Arakawa, Y. (2011). Biochemical and pathophysiological characterization of Helicobacter pylori asparaginase. *Microbiology and Immunology*, *55*(6), 408–417. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00333.x
- Sigel, R. K. O., & Sigel, H. (2013). Metal-Ion Interactions with Nucleic Acids and Their Constituents. In Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications (Vol. 3). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097774-4.00317-X
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, *387*(6633), 569–572. https://doi.org/10.1038/42408
- Simons, K., & Van Meer, G. (1988). Lipid Sorting in Epithelial Cells. *Biochemistry*, 27(17), 6197–6202. https://doi.org/10.1021/bi00417a001
- Sitsel, O., Grønberg, C., Autzen, H. E., Wang, K., Meloni, G., Nissen, P., & Gourdon, P. (2015). Structure and Function of Cu(I)- and Zn(II)-ATPases. *Biochemistry*, *54*(37), 5673–5683. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00512
- Skaar, E. P., & Raffatellu, M. (2015). Metals in infectious diseases and nutritional immunity. *Metallomics*, 7(6), 926–928. https://doi.org/10.1039/c5mt90021b
- Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *BBA Biochimica et Biophysica Acta*, *23*(C), 394–401. https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90343-8
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Donzell, W. C., & Anderson, R. G. W. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29427–29435. https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29427
- Smith, A. T., Smith, K. P., & Rosenzweig, A. C. (2014). Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *19*(6), 947–960. https://doi.org/10.1007/s00775-014-1129-2
- Smith, J., Manoranjan, J., Pan, M., Bohsali, A., Xu, J., Liu, J., McDonald, K. L., Szyk, A., LaRonde-LeBlanc, N., & Gao, L. Y. (2008). Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in Mycobacterium marinum escape

from the vacuole. *Infection and Immunity*, 76(12), 5478–5487. https://doi.org/10.1128/IAI.00614-08

- Sohnle, P. G., Hunter, M. J., Hahn, B., & Chazin, W. J. (2000). Zinc-Reversible Antimicrobial Activity of Recombinant Calprotectin (Migration Inhibitory Factor–Related Proteins 8 and 14). *The Journal of Infectious Diseases*, *182*(4), 1272–1275. https://doi.org/10.1086/315810
- Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., & Stuermer, C. A. O. (2007). Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. *Biochemical Journal*, 403(2), 313–322. https://doi.org/10.1042/BJ20061686
- Solomons, N. W. (2007). Malnutrition and infection: An update. *British Journal of Nutrition*, *98*(SUPPL. 1). https://doi.org/10.1017/S0007114507832879
- Song, H., Huff, J., Janik, K., Walter, K., Keller, C., Ehlers, S., Bossmann, S. H., & Niederweis, M. (2011). Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to acidic environments. *Molecular Microbiology*, *80*(4), 900–918. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07619.x
- Sørensen, D. M., Buch-Pedersen, M. J., & Palmgren, M. G. (2010). Structural divergence between the two subgroups of P5 ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics*, *1797*(6–7), 846–855. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.04.010
- Sørensen, D. M., Holen, H. W., Holemans, T., Vangheluwe, P., & Palmgren, M. G. (2015). Towards defining the substrate of orphan P5A-ATPases. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1850, Issue 3, pp. 524–535). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.008
- Sørensen, D. M., Holen, H. W., Pedersen, J. T., Martens, H. J., Silvestro, D., Stanchev, L. D., Costa, S. R., Pomorski, T. G., López-Marqués, R. L., & Palmgren, M. (2019). The P5A ATPase Spf1p is stimulated by phosphatidylinositol 4-phosphate and influences cellular sterol homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 30(9), 1069–1084. https://doi.org/10.1091/mbc.E18-06-0365
- Soriano, A., & Hausinger, R. P. (1999). GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(20), 11140–11144. https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11140
- Sotgiu, G., D'Ambrosio, L., Centis, R., Tiberi, S., Esposito, S., Dore, S., Spanevello, A., & Migliori, G. B. (2016). Carbapenems to treat multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 1–10. https://doi.org/10.3390/ijms17030373
- Stähler, F. N., Odenbreit, S., Haas, R., Wilrich, J., Van Vliet, A. H. M., Kusters, J. G., Kist, M., & Bereswill, S. (2006). The novel Helicobacter pylori CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infection and Immunity*, 74(7), 3845–3852. https://doi.org/10.1128/IAI.02025-05
- Stamm, L. M., Morisaki, J. H., Gao, L. Y., Jeng, R. L., McDonald, K. L., Roth, R., Takeshita, S., Heuser, J., Welch, M. D., & Brown, E. J. (2003). Mycobacterium marinum Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(9), 1361–1368. https://doi.org/10.1084/jem.20031072
- Stanley, S. A., Barczak, A. K., Silvis, M. R., Luo, S. S., Sogi, K., Vokes, M., Bray, M. A., Carpenter, A. E., Moore, C. B., Siddiqi, N., Rubin, E. J., & Hung, D. T. (2014). Identification of Host-Targeted Small Molecules That Restrict Intracellular

Mycobacterium tuberculosis Growth. *PLoS Pathogens*, *10*(2). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003946

- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melián, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M., & Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, *282*(5386), 121–125. https://doi.org/10.1126/science.282.5386.121
- Stewart, E., Triccas, J. A., & Petrovsky, N. (2019). Adjuvant strategies for more effective tuberculosis vaccine immunity. *Microorganisms*, 7(8), 1–16. https://doi.org/10.3390/microorganisms7080255
- Stoof, J., Kuipers, E. J., Klaver, G., & Van Vliet, A. H. M. (2010). An ABC Transporter and a TonB Ortholog Contribute to Helicobacter mustelae Nickel and Cobalt Acquisition †. *INFECTION AND IMMUNITY*, *78*(10), 4261–4267. https://doi.org/10.1128/IAI.00365-10
- Stork, M., Bos, M. P., Jongerius, I., de Kok, N., Schilders, I., Weynants, V. E., Poolman, J. T., & Tommassen, J. (2010). An Outer Membrane Receptor of Neisseria meningitidis Involved in Zinc Acquisition with Vaccine Potential. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1000969. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000969
- Stork, M., Grijpstra, J., Bos, M. P., Mañas Torres, C., Devos, N., Poolman, J. T., Chazin, W. J., & Tommassen, J. (2013). Zinc Piracy as a Mechanism of Neisseria meningitidis for Evasion of Nutritional Immunity. *PLoS Pathogens*, *9*(10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003733
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J., & Russell, D. G. (1994). Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, 263(5147), 678–681. https://doi.org/10.1126/science.8303277
- Tadolini, M., Garcia-Prats, A. J., D'Ambrosio, L., Hewison, C., Centis, R., Schaaf, H. S., Marais, B. J., Ferreira, H., Caminero, J. A., Jonckheere, S., Sinha, A., Herboczek, K., Khaidarkhanova, Z., Hayrapetyan, A., Khachatryan, N., Urtkmelidze, I., Loreti, C., Esposito, S., Matteelli, A., ... Migliori, G. B. (2016). Compassionate use of new drugs in children and adolescents with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: Early experiences and challenges. *European Respiratory Journal*, *48*(3), 938–943. https://doi.org/10.1183/13993003.00705-2016
- Tait, D. R., Hatherill, M., Der Meeren, O. Van, Ginsberg, A. M., Van Brakel, E., Salaun, B., Scriba, T. J., Akite, E. J., Ayles, H. M., Bollaerts, A., Demoitié, M. A., Diacon, A., Evans, T. G., Gillard, P., Hellström, E., Innes, J. C., Lempicki, M., Malahleha, M., Martinson, N., ... Roman, F. (2019). Final analysis of a trial of M72/AS01E vaccine to prevent tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, *381*(25), 2429–2439. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1909953
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6), 805–820. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022
- Tallieux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., Lagrange, P. H., Gicquel, B., & Neyrolles, O. (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, *197*(1), 121–127. https://doi.org/10.1084/jem.20021468
- Tavernarakis, N., Driscoll, M., & Kyrpides, N. C. (1999). The SPFH domain: Implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(11), 425–427. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01467-X

Theron, G., Peter, J., Meldau, R., Khalfey, H., Gina, P., Matinyena, B., Lenders, L., Calligaro,

G., Allwood, B., Symons, G., Govender, U., Setshedi, M., & Dheda, K. (2013). Accuracy and impact of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of smear-negative or sputum-scarce tuberculosis using bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax*, *68*(11), 1037–1042. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-203485

- Tiberi, S., Buchanan, R., Caminero, J. A., Centis, R., Arbex, M. A., Salazar, M., Potter, J., & Migliori, G. B. (2017). The challenge of the new tuberculosis drugs. *Presse Medicale*, *46*(2), e41–e51. https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.016
- Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. (2017). Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. *Trends in Microbiology*, *25*(8), 688–697. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.007
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, *405*(6787), 647–655. https://doi.org/10.1038/35015017
- Tran, S. L., Rao, M., Simmers, C., Gebhard, S., Olsson, K., & Cook, G. M. (2005). Mutants of Mycobacterium smegmatis unable to grow at acidic pH in the presence of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *Microbiology*, 151(3), 665– 672. https://doi.org/10.1099/mic.0.27624-0
- Traverso, M. E., Subramanian, P., Davydov, R., Hoffman, B. M., Stemmler, T. L., & Rosenzweig, A. C. (2010). Identification of a hemerythrin-like domain in a P1B-type transport ATPase. *Biochemistry*, *49*(33), 7060–7068. https://doi.org/10.1021/bi100866b
- Trunz, B. B., Fine, P., & Dye, C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of costeffectiveness. *Lancet*, 367(9517), 1173–1180. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68507-3
- Turner, J., & Torrelles, J. B. (2018). Mannose-capped lipoarabinomannan in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. *Pathogens and Disease*, *76*(4), 1–15. https://doi.org/10.1093/femspd/fty026
- Uribe-Quero, E., & Rosales, C. (2017). Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), 1–23. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01368
- Van Der Meeren, O., Hatherill, M., Nduba, V., Wilkinson, R. J., Muyoyeta, M., Van Brakel, E., Ayles, H. M., Henostroza, G., Thienemann, F., Scriba, T. J., Diacon, A., Blatner, G. L., Demoitie, M. A., Tameris, M., Malahleha, M., Innes, J. C., Hellstrom, E., Martinson, N., Singh, T., ... Tait, D. R. (2018). Phase 2b controlled trial of M72/AS01E vaccine to prevent tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 379(17), 1621–1634. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1803484
- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., & Peters, P. J. (2007). M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell*, *129*(7), 1287–1298. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.059
- van Kessel, J. C., & Hatfull, G. F. (2007). Recombineering in Mycobacterium tuberculosis. *Nature Methods*, *4*(2), 147–152. https://doi.org/10.1038/nmeth996
- van Kessel, J. C., Marinelli, L. J., & Hatfull, G. F. (2008). Recombineering mycobacteria and their phages. *Nature Reviews Microbiology*, 6(11), 851–857. https://doi.org/10.1038/nrmicro2014
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(2), 112–124. https://doi.org/10.1038/nrm2330
- van Zyl-Smit, R. N., Binder, A., Meldau, R., Mishra, H., Semple, P. L., Theron, G., Peter, J.,

Whitelaw, A., Sharma, S. K., Warren, R., Bateman, E. D., & Dheda, K. (2011). Comparison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden. *PLoS ONE*, *6*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028815

- Vandal, O. H., Nathan, C. F., & Ehrt, S. (2009). Acid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, *191*(15), 4714–4721. https://doi.org/10.1128/JB.00305-09
- Vandal, O. H., Roberts, J. A., Odaira, T., Schnappinger, D., Nathan, C. F., & Ehrt, S. (2009). Acid-susceptible mutants of mycobacterium tuberculosis share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment. *Journal of Bacteriology*, 191(2), 625–631. https://doi.org/10.1128/JB.00932-08
- Vandenheede, J. R., Vanden Abeele, C. C., & Merlevede, W. (1986). The ATP,Mg-DEPENDENT PHOSPHATASE: ROLE OF Mg IONS IN THE EXPRESSION OF THE PHOPSHORYLASE PHOSPHATASE ACTIVITY. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9), 1689–1699. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004
- Vandivier, R. W., Henson, P. M., & Douglas, I. S. (2006). Burying the dead: The impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*, 129(6), 1673–1682. https://doi.org/10.1378/chest.129.6.1673
- Varma, R., & Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, *394*(6695), 798–801. https://doi.org/10.1038/29563
- Velayati, A. A., Masjedi, M. R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., ZiaZarifi, A. H., & Hoffner, S. E. (2009). Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: Super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*, 136(2), 420–425. https://doi.org/10.1378/chest.08-2427
- Vergne, I., Chua, J., & Deretic, V. (2003). Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca 2+/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *Journal of Experimental Medicine*, 198(4), 653–659. https://doi.org/10.1084/jem.20030527
- Vergne, I., Chua, J., Lee, H. H., Lucas, M., Belisle, J., & Deretic, V. (2005). Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(11), 4033– 4038. https://doi.org/10.1073/pnas.0409716102
- Vergne, I., Gilleron, M., & Nigou, J. (2014). Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*(DEC), 1–9. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00187
- Veziris, N., Bernard, C., Guglielmetti, L., Le Du, D., Marigot-Outtandy, D., Jaspard, M., Caumes, E., Lerat, I., Rioux, C., Yazdanpanah, Y., Tiotiu, A., Lemaitre, N., Brossier, F., Jarlier, V., Robert, J., Sougakoff, W., & Aubry, A. (2017). Rapid emergence of Mycobacterium tuberculosis bedaquiline resistance: Lessons to avoid repeating past errors. *European Respiratory Journal*, *49*(3). https://doi.org/10.1183/13993003.01719-2016
- Via, L. E., Deretic, D., Ulmer, R. J., Hibler, N. S., Huber, L. A., & Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13326– 13331. https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13326
- Via, L. E., Lin, P. L., Ray, S. M., Carrillo, J., Allen, S. S., Seok, Y. E., Taylor, K., Klein, E., Manjunatha, U., Gonzales, J., Eun, G. L., Seung, K. P., Raleigh, J. A., Sang, N. C., McMurray, D. N., Flynn, J. A. L., & Barry, C. E. (2008). Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. *Infection and Immunity*, 76(6), 2333–2340. https://doi.org/10.1128/IAI.01515-07

- Vieira, O. V., Bucci, C., Harrison, R. E., Trimble, W. S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A. D., Stahl, P. D., & Grinstein, S. (2003). Modulation of Rab5 and Rab7 Recruitment to Phagosomes by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2501–2514. https://doi.org/10.1128/mcb.23.7.2501-2514.2003
- Vinella, D., Fischer, F., Vorontsov, E., Gallaud, J., Malosse, C., Michel, V., Cavazza, C., Robbe-Saule, M., Richaud, P., Chamot-Rooke, J., Brochier-Armanet, C., & De Reuse, H. (2015). Evolution of Helicobacter: Acquisition by Gastric Species of Two Histidine-Rich Proteins Essential for Colonization. *PLOS Pathogens*, *11*(12), e1005312. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005312
- Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Visconti, K. C., Harrell, M. I., Dolganov, G. M., Sherman, D. R., & Schoolnik, G. K. (2003). Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *Journal of Experimental Medicine*, 198(5), 705–713. https://doi.org/10.1084/jem.20030205
- Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C. E., Höner zu Bentrup, K., Russell, D. G., & Bermudez, L. E. (2005). Elemental Analysis of Mycobacterium avium -, Mycobacterium tuberculosis -, and Mycobacterium smegmatis -Containing Phagosomes Indicates Pathogen-Induced Microenvironments within the Host Cell's Endosomal System . *The Journal of Immunology*, *174*(3), 1491–1500. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1491
- Wagner, R. M., Kricks, L., & Lopez, D. (2017). Functional Membrane Microdomains Organize Signaling Networks in Bacteria. *Journal of Membrane Biology*, *250*(4), 367–378. https://doi.org/10.1007/s00232-016-9923-0
- Waidner, B., Melchers, K., Stähler, F. N., Kist, M., & Bereswill, S. (2005). The Helicobacter pylori CrdRS two-component regulation system (HP1364/HP1365) is required for copper-mediated induction of the copper resistance determinant CrdA. *Journal of Bacteriology*, *187*(13), 4683–4688. https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4683-4688.2005
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., & Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*, *304*(5678), 1800–1804. https://doi.org/10.1126/science.1099384
- Wang, D., Hosteen, O., & Fierke, C. A. (2012). ZntR-mediated transcription of zntA responds to nanomolar intracellular free zinc. *J Inorg Biochem.*, 23(1), 1–7. https://doi.org/10.1038/jid.2014.371
- Wang, K., Sitsel, O., Meloni, G., Autzen, H. E., Andersson, M., Klymchuk, T., Nielsen, A. M., Rees, D. C., Nissen, P., & Gourdon, P. (2014). Structure and mechanism of Zn2+transporting P-type ATPases. *Nature*, *514*(7253), 518–522. https://doi.org/10.1038/nature13618
- Wang, Yuchuan, Hu, L., Yang, X., Chang, Y. Y., Hu, X., Li, H., & Sun, H. (2015). On-line coupling of continuous-flow gel electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry to quantitatively evaluate intracellular metal binding properties of metallochaperones HpHypA and HpHspA in E. coli cells. *Metallomics*, 7(10), 1399– 1406. https://doi.org/10.1039/c5mt00054h
- Wang, Yun, Hemmingsen, L., & Giedroc, D. P. (2005). Structural and functional characterization of Mycobacterium tuberculosis CmtR, a PbII/CdII-sensing SmtB/ArsR metalloregulatory repressor. *Biochemistry*, *44*(25), 8976–8988. https://doi.org/10.1021/bi050094v
- Ward, S. K., Abomoelak, B., Hoye, E. A., Steinberg, H., & Talaat, A. M. (2010). CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, *77*(5), 1096–1110. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x

- Wei, Y., & Fu, D. (2005). Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the Escherichia coli metal transporter YiiP (FieF). *Journal of Biological Chemistry*, *280*(40), 33716–33724. https://doi.org/10.1074/jbc.M506107200
- Weinberg, E. D. (1978). Iron and infection. In *Microbiological Reviews* (Vol. 42, Issue 1, pp. 45–66). Microbiol Rev. https://doi.org/10.1128/mmbr.42.1.45-66.1978
- Weir, R. E., Black, G. F., Nazareth, B., Floyd, S., Stenson, S., Stanley, C., Branson, K., Sichali, L., Chaguluka, S. D., Donovan, L., Crampin, A. C., Fine, P. E. M., & Dockrell, H. M. (2006). The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guérin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clinical and Experimental Immunology*, *146*(3), 390–399. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03222.x
- Welin, A., Winberg, M. E., Abdalla, H., Särndahl, E., Rasmusson, B., Stendahl, O., & Lerm, M. (2008). Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infection and Immunity*, *76*(7), 2882–2887. https://doi.org/10.1128/IAI.01549-07
- Wells, R. M., Jones, C. M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K. S., Sun, P., Wu, F., Tian, C., & Niederweis, M. (2013). Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 9(1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003120
- Wenzel, M., Vischer, N., Strahl, H., & Hamoen, L. (2018). Assessing Membrane Fluidity and Visualizing Fluid Membrane Domains in Bacteria Using Fluorescent Membrane Dyes. *BIO-PROTOCOL*, 8(20). https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3063
- WHO. (2017). Guidelines for Drinking-water Quality (FOURTH EDI).
- WHO. (2019). GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2019 (Vol. 369, Issue 1). https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., Van Soolingen, D., Rüsch-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., & Niemann, S. (2008). Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. *PLoS Pathogens*, 4(9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160
- Wishart, D. S., Sykes, B. D., & Richards, F. M. (1992). The Chemical Shift Index : A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure Through NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, *31*(6), 1647–1651. https://doi.org/10.1021/bi00121a010
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. https://doi.org/10.1084/jem.20071367
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T. B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., Wang, Y., Bossmann, S. H., Basaraba, R. J., & Niederweis, M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1621–1626. https://doi.org/10.1073/pnas.1009261108
- Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., & Av-Gay, Y. (2011). Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H +-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19371–19376. https://doi.org/10.1073/pnas.1109201108
- Wong, K.-W. (2017). The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 1–8. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbtb2-0001-2015
- Woodruff, H. B. (2014). Selman A. Waksman, winner of the 1952 nobel prize for physiology or medicine. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(1), 2–8. https://doi.org/10.1128/AEM.01143-13
- Woodworth, J. S. M., & Behar, S. M. (2006). Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Critical Reviews in Immunology*, *26*(4), 317–352. https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v26.i4.30
- Wüthrich, K. (1991). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. https://www.wiley.com/enus/NMR+of+Proteins+and+Nucleic+Acids-p-9780471828938
- Yadav, R., Noinaj, N., Ostan, N., Moraes, T., Stoudenmire, J., Maurakis, S., & Cornelissen, C. N. (2020). Structural Basis for Evasion of Nutritional Immunity by the Pathogenic Neisseriae. *Frontiers in Microbiology*, *10*(January), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02981
- Yoon, K. P., & Silver, S. (1991). A second gene in the Staphylococcus aureus cadA cadmium resistance determinant of plasmid pl258. *Journal of Bacteriology*, *173*(23), 7636–7642. https://doi.org/10.1128/jb.173.23.7636-7642.1991
- Young, S. L., Slobbe, L., Wilson, R., Buddle, B. M., De Lisle, G. W., & Buchan, G. S. (2007). Environmental strains of Mycobacterium avium interfere with immune responses associated with Mycobacterium bovis BCG vaccination. *Infection and Immunity*, 75(6), 2833–2840. https://doi.org/10.1128/IAI.01826-06
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., & Tsien, R. Y. (2002). Partitioning of lipidmodified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 296(5569), 913–916. https://doi.org/10.1126/science.1068539
- Zackular, J. P., Knippel, R. J., Lopez, C. A., Beavers, W. N., Maxwell, C. N., Chazin, W. J., & Skaar, E. P. (2020). ZupT Facilitates Clostridioides difficile Resistance to Host-Mediated Nutritional Immunity . *MSphere*, *5*(2). https://doi.org/10.1128/msphere.00061-20
- Zalba, S., & ten Hagen, T. L. M. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, *52*, 48–57. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008
- Zeth, K., Sancho-Vaello, E., & Okuda, M. (2019). Metal Positions and Translocation Pathways of the Dodecameric Ferritin-like Protein Dps. *Inorganic Chemistry*, *58*(17), 11351–11363. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b00301
- Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., & Sun, Z. (1999). Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2044–2049. https://doi.org/10.1128/jb.181.7.2044-2049.1999
- Zhou, K. L., Li, X., Zhang, X. L., & Pan, Q. (2019). Mycobacterial mannose-capped lipoarabinomannan: a modulator bridging innate and adaptive immunity. *Emerging Microbes and Infections*, *8*(1), 1168–1177. https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1649097
- Zielazinski, E. L., Cutsail, G. E., Hoffman, B. M., Stemmler, T. L., & Rosenzweig, A. C. (2012). Characterization of a cobalt-specific P1B-ATPase. *Biochemistry*, *51*(40), 7891–7900. https://doi.org/10.1021/bi3006708
- Zielazinski, E. L., González-Guerrero, M., Subramanian, P., Stemmler, T. L., Argüello, J. M., & Rosenzweig, A. C. (2013). Sinorhizobium meliloti Nia is a P1B-5-ATPase expressed in the nodule during plant symbiosis and is involved in Ni and Fe transport. *Metallomics*, *5*(12), 1614–1623. https://doi.org/10.1039/c3mt00195d
- Zimmerman, M. R. (1979). Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy.

Bulletin of the New York Academy of Medicine: Journal of Urban Health, 55(6), 604–608.

Zulauf, K. E., Sullivan, J. T., & Braunstein, M. (2018). The SecA2 pathway of Mycobacterium tuberculosis exports effectors that work in concert to arrest phagosome and autophagosome maturation. *PLoS Pathogens*, *14*(4), 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007011

ABSTRACT

Metals are essential trace elements for all living organisms yet their accumulation is toxic and causes deleterious effects. Immune cells have many mechanisms for the elimination of pathogens. In particular, they are capable of manipulating intracellular metal concentrations, and can poison them by confining them into specialized cell compartments enriched in metals such as copper or zinc. Resistance to intoxication by transition metals has emerged as an important virulence feature of bacterial pathogens. In the major human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, resistance to zinc is mediated by the P-type ATPase efflux pump CtpC. The *ctpC* gene is located in operon with *Rv3269*, a gene encoding a 93-amino acids protein of unknown function. The main objective of my thesis focused on the involvement of Rv3269 in zinc resistance and its relationship with CtpC. Using molecular genetic and biochemical approaches, my thesis work demonstrated that Rv3269 is a novel membranebound zinc-binding protein necessary for zinc resistance in *M. tuberculosis*. Rv3269 and CtpC co-localize in functional membrane microdomains (FMMs) in *M. tuberculosis*, and Rv3269 contains motifs typical of prokaryotic flotillin (FloT)-like scaffold proteins that are involved in FMM assembly. Genetic disruption of the transmembrane domain, of the zinc-binding domain or of the FloT-like motifs in Rv3269 renders *M. tuberculosis* highly sensitive to zinc. Similar *Rv3269-ctpC*-like tandems are present in the genome of other bacteria. Thus, Rv3269 defines an unprecedented class of metallochaperone scaffold-like proteins dedicated to P-ATPasemediated metal efflux through FMMs in prokaryotes.

RESUME

Les métaux sont des oligo-éléments essentiels pour tous les organismes vivants, néanmoins leur accumulation est toxique et provoque des effets délétères. Les cellules immunitaires sont dotées de nombreux moyens pour l'élimination d'agents pathogènes. Capable de manipuler les concentrations métalliques intracellulaires, elles peuvent en particulier les intoxiquer en les confinant dans des compartiments cellulaires spécialisés riches en métaux, comme le cuivre ou le zinc. La résistance à l'intoxication par les métaux de transition est récemment apparue comme un des mécanismes importants de la virulence des bactéries pathogènes. Chez Mycobacterium tuberculosis, un pathogène majeur responsable de la tuberculose, la résistance au zinc est médiée par une pompe à efflux, l'ATPase de type P CtpC. Le gène ctpC se trouve en opéron avec Rv3269, un gène codant une protéine de 93 acides aminés de fonction inconnue. L'objectif principal de ma thèse s'est concentré sur l'implication de Rv3269 dans la résistance au zinc et sa relation avec CtpC. Par des approches de génétique moléculaire et biochimie, mes travaux de thèse ont permis de démontrer que Rv3269 est elle aussi nécessaire pour la résistance au zinc. Rv3269 contient un motif de fixation du zinc et est associée à la membrane cytoplasmique. Rv3269 et CtpC co-localisent dans des microdomaines membranaires fonctionnels dynamiques au sein de la membrane de M. tuberculosis et Rv3269 présente des motifs typiquement rencontrés chez les flotillines (FloT), des protéines organisatrices de microdomaines membranaires chez les bactéries. L'analyse génétique de Rv3269 a montré que l'altération du domaine transmembranaire, des motifs de type FloT ou du domaine de fixation du zinc ont toutes pour conséquence de rendre M. tuberculosis sensible au zinc. Deux autres P-ATPases de M. tuberculosis sont aussi associées à de petites protéines similaires à Rv3269. Ces petites protéines co-localisent avec Rv3269. Une analyse phylogénétique indique que ce type d'organisation est retrouvé chez d'autres espèces bactériennes. Nous proposons que Rv3269 est le premier exemple décrit d'une nouvelle classe de métallochaperons capables d'organiser des plateformes fonctionnelles dédiées à l'efflux des métaux de transition chez les bactéries.