



Rôle du facteur de virulence MGTC chez les mycobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* et son inhibition par un peptide naturel

Claudine Belon

► To cite this version:

Claudine Belon. Rôle du facteur de virulence MGTC chez les mycobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* et son inhibition par un peptide naturel. Virologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT072 . tel-01619124

HAL Id: tel-01619124

<https://theses.hal.science/tel-01619124>

Submitted on 19 Oct 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques
et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Et de l'unité de recherche UMR 5235 CNRS – Dynamique
des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques
(DIMNP)

Spécialité : **Microbiologie**

Présentée par **Claudine Belon**

**RÔLE DU FACTEUR DE VIRULENCE MGTC
CHEZ LES MYCOBACTÉRIES ET
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET SON
INHIBITION PAR UN PEPTIDE NATUREL**

Soutenue le 20 avril 2015 devant le jury composé de

Mme Catherine ASTARIE-DEQUEKER, CR, CNRS Toulouse	Rapporteur
M. Jean-Louis HERRMANN, PU-PH, Université de Versailles St Quentin	Rapporteur
Mme Estelle JUMAS-BILAK, PU-PH, Université de Montpellier	Examineur
Mme Emma COLUCCI-GUYON, CR, Institut Pasteur Paris	Examineur (invitée)
Mme Anne BLANC-POTARD, CR, Université de Montpellier	Directeur de thèse



*à la mémoire de Charles Belon,
et de tous ceux qui nous ont aimés et dont l'absence nous attriste.*

Remerciements

Durant ces quatre dernières années j'ai cotoyé un grand nombre de personnes, fait d'incroyables rencontres, vécu une expérience aussi soutenue qu'intense. Ma thèse s'achevant, l'heure est aux remerciements de celles et ceux qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours que ce soit au niveau professionnel ou personnel...

À Anne Blanc-Potard, directrice de thèse.

Je te remercie pour m'avoir fait confiance en me prenant sous ta responsabilité, pour ton implication dans mon travail. Malgré une tendance à mater tes étudiants, tu m'as permis d'évoluer dans le monde scientifique d'une manière remarquable grâce à tes conseils avisés et tes grandes qualités scientifiques et devenir moi-même une scientifique affirmée, prête à me lancer dans une carrière professionnelle.

À Estelle Jumas-Bilak, présidente de jury.

C'est avec grand plaisir que je vous retrouve au poste de présidente de jury. J'ai relu avec un sourire aux lèvres et un brin de nostalgie les remerciements à votre égard dans ma thèse de pharmacie, ils sont toujours d'actualité, même si depuis j'ai parcouru beaucoup de chemin. Vous qui avez su me guider et m'orienter tout au long (et c'est peu dire!) de mon cursus universitaire, je vous adresse une fois encore mes plus sincères remerciements.

À Catherine Astarie-Dequeker, rapportrice.

Je vous remercie d'avoir accepté d'endosser le rôle de rapporteur et de confronter mon travail à votre expertise scientifique pour une discussion qui sera sans aucun doute passionnante et constructive.

À Jean-Louis Hermann, rapporteur.

En premier lieu je tiens à te remercier d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteur. Tes compétences de clinicien associées à une bonne connaissance de mon sujet de thèse seront très bénéfiques pour alimenter une discussion. Ensuite, je voudrais te remercier en tant que collaborateur pour les interactions qui en découlent, indispensables au bon déroulement et à l'enrichissement d'un travail de thèse.

À Emma Colucci-Guyon, examinatrice invitée.

Bien que tu ne fasses partie du jury qu'au titre d'invitée, pour cause de mauvais timing associé à des contraintes administratives, je souhaite te remercier pour ta présence dans ce jury de thèse. Tes connaissances aussi bien théoriques que pratiques dans le domaine du zebrafish sont à mes yeux indispensables pour étayer mon travail.

À Sylvain Godreuil, MCU-PH

Pour les mêmes raisons qu'Emma, et à mon grand regret, tu ne fais pas partie de mon jury de thèse. Cependant, je te remercie pour m'avoir fait découvrir le monde fabuleux des mycobactéries et pour m'avoir transmis un peu de ta passion pour l'épidémiologie moléculaire.

À mes directeurs d'unité

Catherine Braun-Breton pour m'avoir accueilli dès mon stage de Master 2 au sein de l'unité.

Georges Lutfalla, je voudrais vous remercier pour nos collaborations avec les poissons, pour m'avoir formée sur ces techniques, mais aussi pour m'avoir conseillée et orientée tout au long de ma thèse.

À mes chefs d'équipes

Laurent Kremer pour m'avoir accueilli au sein de ton équipe, du stage de Master 2 jusqu'au début de ma 4^{ème} année de thèse.

Virginie Molle pour avoir pris le relais en m'accueillant à ton tour dans ton équipe pour mes derniers mois de thèse.

À Caty Gonzales

Je ne te remercierai jamais assez pour ton implication incroyable à l'animalerie poissons, pour ta bonne humeur et pour ta gentillesse.

À mes encadrants et collègues de monitorat

Guillaume Charrière, je voudrais te remercier de m'avoir fait confiance pour enseigner avec toi, même si ça n'a pas toujours été facile, je suis vraiment très heureuse d'avoir pu travailler avec toi.

Gilda Sanchez, merci infiniment pour ton efficacité, ta disponibilité et ta gentillesse tout au long de notre collaboration en TP, je ne sais vraiment pas comment j'aurais fait sans toi !

À Laïla et Ali Gannoun

Laïla, merci d'avoir été là, au laboratoire pour discuter de mes projets, pour me donner de bons conseils... en-dehors du labo, avec Ali, pour les soirées festives, les rigolades à en avoir mal au ventre, la Tunisie, sans oublier les fameuses boulettes d'Ali.

À mes collègues et amis thésards, post-doc, ingé, techniciens ou étudiants et en particulier :

Laetitia, tu m'as servie de guide à mon arrivée au laboratoire, en particulier pour les poissons, merci pour ta patience, ta gentillesse et tout les bons moments passés ensemble. Audrey B, nous avons débuté dans le laboratoire au même moment... je te remercie pour toutes ces années où nous avons galéré côte à côte, de jour comme de nuit ! Plus qu'une collègue, j'ai rencontré une amie.

Christian, Christian, Christian... Que dire à ton sujet ? Ce mélange de mauvaise humeur quasi permanente et d'esprit tendancieux étrangement similaire au mien fait de toi un ami cher avec qui j'ai apprécié partager du temps que ce soit au labo ou lors de nos soirées vin – tapas.

Tiffany, ma PS adorée, je voudrais te remercier pour la bonne ambiance que tu as su mettre au laboratoire malgré ton caractère bien trempé, également pour nos soirées et nos cours de pole qui sont bien triste sans toi !

Marc, rhalala... un peu nostalgique de l'époque où tu étais au laboratoire, les petites blagounettes, les massages, les tango dans le couloir, les chants, toussa toussa... Bref, beaucoup de très bons souvenirs au labo mais aussi en-dehors (les voyages, festoch, ski, soirées et j'en passe) Merci pour tout ça !

À mes amis et tout particulièrement,

Audrey V, pour nos discussions, ton écoute surtout ! Merci d'avoir pris le temps qu'on se voit avant que tu ne t'envoles vers Boston pour de nouvelles aventures...

Illiassou, merci à toi pour toutes les soirées endiablées passées ensemble et le soutien mutuel pendant ces années de thèse.

Lydia, je n'ai nullement besoin de t'écrire un roman pour t'exprimer mes remerciements car il existe un mot qui prend tout son sens lorsqu'il s'agit de toi et c'est tout simplement, merci.

Valentin pour nos promenades à Ikéa et à Casto, pour le réconfort que tu m'as apportée au décès de Petit chat, pour les crêpes à 3h du mat et j'en passe...

Ma Flo, même à l'autre bout du monde, tu réponds toujours présente lorsque j'ai besoin de toi, toujours à l'écoute, tu essaies de résoudre mes problèmes existentiels, nos 22 ans d'amitié y sont probablement pour quelque chose...

Ma petite Marie, toi aussi, toujours là pour m'écouter raconter ma vie passionnante mais aussi pour m'accueillir chez toi lorsque je viens à Paris.

François-Nicolas, merci de m'avoir fait découvrir le Lindy, merci pour les soirées swing, merci pour les travaux, merci d'être mon ami.

Fabien et Mélanie, même si je ne vous vois pas souvent, c'est toujours avec beaucoup de plaisir que je vous retrouve, vous êtes géniaux tout les deux, merci et restez comme vous êtes !

Marion, on ne se voit pas souvent non plus mais te retrouver me fais toujours beaucoup de bien, j'espère que l'on aura l'occasion de passer un peu de temps ensemble pendant encore de nombreuses années !

Guillaume, nos chemins se sont un peu éloignés depuis que tu t'es exilé à Valence mais j'espère que l'on aura l'occasion de se voir très bientôt. Merci d'avoir pris le temps de venir faire des travaux chez moi et surtout, merci d'avoir été là quand j'en ai eu besoin.

À mes profs de danse,

Mimi, Billy, Julien et Jessica qui m'ont permis de m'évader quelques heures par semaine et m'ont fourni les bouffées d'oxygène nécessaires à ma santé physique et mentale !

À ma famille et notamment,

Laurent et Sylvie pour votre soutien et pour le ravitaillement ponctuel en vivres, notamment pendant les périodes d'isolement nécessaires à la rédaction de mon manuscrit. Je vous souhaite plein de bonheur avec l'arrivée tant attendue de mon futur neveu.

Sophie, merci de m'avoir donné la chance d'être tatie pour la 1^{ère} fois ! Vous comptez beaucoup pour moi avec Marcel et Vincent, plein de bonheur à vous aussi !

Olivier, toujours aussi mystérieux, tu continues ta route aux côtés d'Isabelle et de ses enfants... Et malgré ta discrétion je sais que tu seras toujours là pour moi. Et j'ai envie d'ajouter, « à quand un petit neveu ou une petite nièce ? » !

Brigitte, maman, merci pour les bons repas du dimanche et les tupperwares qui vont avec, le raccomodage pour éviter de me retrouver dans des situations gênantes et enfin merci d'être toujours là, peut-être un peu trop parfois... Mais comme on dit, mieux vaut trop que pas assez !

Jean-Paul et Jacqueline, papy, mamie, toujours au top, des grands-parents de choc ! J'espère que ça va durer encore de nombreuses années !

À tous ceux et celles qui m'ont aidés ou soutenus pendant ces quatre années et que je n'ai pas remerciés avant car malheureusement je ne peux pas citer tout le monde...

Enfin, je dédie ce travail à Aberdeen (alias Petit chat) pour son indéniable et indéfectible fidélité, tendresse et réconfort qu'elle m'a apportée.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je tiens également à souligner le courage extraordinaire des zebrafish morts pour la Science. Je les remercie vivement pour leur participation. 

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	17
I INTRODUCTION.....	21
1 BACTERIES PATHOGENES RESPONSABLES D'INFECTIONS PULMONAIRES ET SANTE PUBLIQUE.....	23
1.1 La tuberculose.....	25
1.1.1 Les mycobactéries : généralités	25
1.1.1.1 Filiation taxonomique des mycobactéries	25
1.1.1.2 Classification phénotypique.....	26
1.1.2 Origine et évolution de la tuberculose	26
1.1.3 Epidémiologie	27
1.1.4 Manifestations cliniques	28
1.1.5 Physiopathologie	28
1.1.6 Traitement.....	30
1.1.7 Prophylaxie	30
1.2 Infections pulmonaires dans le contexte mucoviscidosique.....	31
1.2.1 La mucoviscidose	31
1.2.2 Traitements antimicrobiens chez les patients mucoviscidosiques.....	31
1.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
1.2.4 <i>Mycobacterium abscessus</i>	33
1.3 Stratégies anti-virulence : les alternatives aux antibiotiques	34
2 LE FACTEUR DE VIRULENCE MgtC.....	35
2.1 La protéine MgtC de <i>S. Typhimurium</i> et ses homologues.....	35
2.2 Organisation génomique.....	35
2.3 Phylogénie	37
2.4 Alignement des protéines MgtC étudiées au cours de la thèse avec la protéine MgtC de <i>S. Typhimurium</i>	38
2.5 Structure du domaine C-terminal de la protéine MgtC	39
2.6 Fonction de MgtC.....	41
2.6.1 Rôle de MgtC dans la virulence bactérienne: MgtC et survie intracellulaire.....	41
2.6.1.1 <i>Salmonella enterica</i> sérovars Typhimurium et Typhi.....	41
2.6.1.2 <i>Burkholderia cenocepacia</i>	42
2.6.1.3 <i>Brucella suis</i>	42
2.6.1.4 <i>Yersinia pestis</i>	42

2.6.1.5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
2.6.1.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
2.6.2	Rôle de MgtC dans la croissance en milieu carencé en magnésium	43
2.6.2.1	Importance du magnésium dans les systèmes biologiques.....	43
2.6.2.2	Chez <i>S. Typhimurium</i>	44
2.6.2.3	Chez les autres pathogènes.....	44
2.6.2.4	Fonction de MgtC et magnésium	44
2.6.3	Rôle de MgtC et ATP	46
2.6.3.1	La F ₁ F ₀ ATP synthase	46
2.6.3.2	Mécanisme d'action de MgtC.....	46
2.6.4	Hypothèse générale sur la fonction de MgtC	47
2.7	Régulation de MgtC	48
2.7.1	Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.....	48
2.7.1.1	Système régulateur PhoP-PhoQ et magnésium.....	48
a)	Chez <i>S. Typhimurium</i>	48
b)	Chez les autres pathogènes.....	49
2.7.1.2	ARN messager senseur d'ATP	49
2.7.1.3	ARN antisens: AmgR	49
2.7.2	Régulation post-traductionnelle: le peptide MgtR	50
3	LES PEPTIDES REGULATEURS DE LA VIRULENCE BACTERIENNE.....	51
3.1	Les peptides fonctionnels membranaires	51
3.2	MgtR: peptide régulateur du facteur de virulence MgtC	52
3.2.1	Chez <i>Salmonella Typhimurium</i>	52
3.2.1.1	Découverte et caractérisation du peptide MgtR	52
3.2.1.1	Mécanisme d'action de MgtR.....	53
a)	Dégradation de MgtC par FstH	53
b)	Interaction MgtR – MgtC.....	54
c)	Autre cible de MgtR: le transporteur de magnésium MgtA	55
3.2.1.2	Rôle physiologique de MgtR lors d'une infection: régulation de MgtC	55
3.2.2	MgtR et autres pathogènes	56
3.3	Autre peptide régulateur de la virulence bactérienne: KdpF	57
4	LES MODELES D'INFECTION.....	59
4.1	Mycobactéries et cellules phagocytaires	59
4.1.1	Macrophages.....	59
4.1.1.1	Phagocytose normale et devenir du phagosome.....	59
4.1.1.2	Principaux mécanismes de défense de l'hôte contre les bactéries.....	61
a)	Production de radicaux libres	62
b)	Privation d'éléments nutritifs ou excès de métaux toxiques	62
c)	Baisse du pH intravacuolaire	63
d)	Production de peptides antimicrobiens	63
e)	Production d'enzymes lytiques.....	64

4.1.1.3	Phagocytose des mycobactéries et devenir dans le macrophage	64
a)	Mécanismes de contournement et de modification de la maturation du phagosome	64
b)	Echappement du phagosome vers le cytosol et conséquences	65
4.1.2	Neutrophiles	66
4.1.2.1	Rôle "traditionnel" des neutrophiles	66
4.1.2.2	Rôle des neutrophiles lors d'infections par les mycobactéries	67
a)	Neutrophiles vs mycobactéries	67
b)	Double rôle des neutrophiles dans l'infection mycobactérienne	68
4.1.3	Coopération macrophages – neutrophiles	69
4.2	<i>Mycobacterium marinum</i> : modèle d'étude de la tuberculose	70
4.2.1	Génomes: <i>Mycobacterium marinum</i> versus <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	70
4.2.2	Le modèle d'infection <i>Mycobacterium marinum</i> / <i>Danio rerio</i>	72
4.2.2.1	Etude de la virulence des mycobactéries	74
4.2.2.2	Etude de la physiopathologie de la tuberculose	75
a)	Rôle des macrophages	75
b)	Rôle des neutrophiles	76
4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et cellules phagocytaires	77
4.3.1	Internalisation par les cellules phagocytaires	77
4.3.2	Stratégies bactériennes d'échappement à la phagocytose	78
4.3.2.1	Perte de la motilité flagellaire	78
4.3.2.2	Sécrétion d'exopolysaccharides	78
4.3.2.3	Système de sécrétion de type III (T3SS)	79
4.3.2.4	Inhibition de PAR2	79
4.3.3	Le modèle d'infection <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Danio rerio</i>	79
II	OBJECTIFS	81
1	Étudier le rôle du facteur de virulence MgtC chez les mycobactéries et chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
2	Tester les potentialités « anti-virulence » de peptides membranaires régulateurs	83
III	RÉSULTATS	85
1	Rôle du facteur de virulence MgtC	87
1.1	Identification d'un rôle de MgtC de <i>Mycobacterium marinum</i> dans la phagocytose	87
1.1.1	Résumé de l'article 1	87
1.1.2	Article 1 – <i>Mycobacterium marinum</i> plays a role in phagocytosis but is dispensable for intracellular multiplication	89
1.1.3	Résultats complémentaires	115
1.1.3.1	La réponse inflammatoire de l'hôte dans le modèle d'infection d'embryons de <i>Danio</i> suite à l'infection par la souche sauvage et le mutant <i>mgtC</i> de <i>M. marinum</i>	115
1.1.3.2	Analyse protéomique comparative de la souche sauvage et du mutant <i>mgtC</i> de <i>Mycobacterium marinum</i>	116

1.2 Rôle de MgtC chez le pathogène extracellulaire <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et potentialités anti-virulence du peptide MgtR	118
1.2.1 Résumé de l'article 2.....	118
1.2.2 Article 2 – A macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens	119
1.2.3 Résultats complémentaires	153
1.2.3.1 Etude de la résistance au stress oxydatif	153
1.2.3.1 Régulation de MgtC	153
1.2.3.2 Visualisation de l'infection dans le macrophage.....	154
1.2.3.3 Etude de la phagocytose.....	155
2 LES PEPTIDES REGULATEURS DE LA VIRULENCE	157
2.1 Potentialités anti-virulence du peptide MgtR chez les mycobactéries	157
2.1.1 Résumé de l'article 3.....	157
2.1.2 Article 3 - Anti-virulence properties of the <i>Salmonella</i> MgtR peptide expressed in mycobacteria	159
2.1.3 Résultats annexes.....	183
2.1.3.1 Interaction MgtC Mma / MgtR St	183
2.2 Surexpression du peptide membranaire KdpF chez <i>Salmonella</i> : modulation de l'expression des gènes <i>kdp</i> et de la croissance intramacrophagique	184
2.2.1 Résumé de l'article 4.....	184
2.2.2 Article 4 – Overexpression of the <i>Salmonella</i> KdpF membrane peptide modulates expression of <i>kdp</i> genes and intramacrophage growth	185
2.2.1 Rôle du peptide KdpF dans la virulence de <i>Salmonella</i>	193
IV DISCUSSION.....	195
1 REGULATION DE MGT C CHEZ LES MYCOBACTERIES ET CHEZ PSEUDOMONAS AERUGINOSA	197
1.1 Régulation par le magnésium	197
1.2 Régulation par le pH et activation intracellulaire chez <i>P. aeruginosa</i>	199
2 ROLE (INTRA)MACROPHAGIQUE DE MGT C ET ETUDE DE LA VIRULENCE DANS LE MODELE DANIO RERIO	200
2.1 Réplication intramacrophagique et virulence dans le modèle d'infection d'embryons de <i>Danio</i> chez <i>M. marinum</i>	200
2.2 Mise en évidence d'un nouveau rôle du facteur de virulence MgtC dans la phagocytose en utilisant le modèle <i>Mycobacterium marinum</i>	201
2.3 Subversion macrophagique chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	203
3 PROPRIETES ANTI-VIRULENCE DE PEPTIDES MEMBRANAIRES	206
3.1 MgtR comme potentielle molécule thérapeutique dans les infections à <i>P. aeruginosa</i> et mycobactériennes	206
3.1.1 Interactions MgtR/MgtC	206

3.1.2	Expression hétérologue de MgtR chez les mycobactéries et chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et effet anti-virulence	207
3.2	Applications: utilisation de peptides synthétiques comme adjuvant des traitements antibiotiques	209
V	CONCLUSION.....	211
VI	BIBLIOGRAPHIE.....	215

ABREVIATIONS

AAA+	ATPase Associée à diverses Activités cellulaires
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BAAR	Bacille Acido-Alcool Résistant
BACTH	Bacterial Adenylate Cyclase based Two-Hybrid system
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CFP-10	Culture Filtrate Protein 10
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CR3	Complement Receptor 3
DAT	Diacyltréhalose
DIM	Phtiocerol dimycocérosate
EEA1	Autoantigène endosomal précoce 1
ESAT-6	Early Secretory Antigenic 6 kDa
F-ATPase	F ₁ F ₀ ATP synthase
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GTPase	Guanosine triphosphate synthase
h	heure
HEp-2	Human Epithelial type 2
HNP	Human Neutrophil Peptide
IDR	Intra-Dermo-Réaction
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
IS	Séquence d'insertion
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LAM	Lipoarabinomannane
LAMP	Lysosomal-Associated Membrane Protein

LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
ManLAM	Phosphatidylinositol lipoarabinomannane
Mb	Mégabase
MDR	Multi-Drug Resistant
mM	millimolaire
Mma	<i>Mycobacterium marinum</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Nramp	Natural-resistance-associated macrophage protein
OMS / WHO	Organisation Mondiale de la Santé / World Health Organization
P-ATPase	ATP synthase de type P
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAM	Peptide Anti-Microbien
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAT	Polyacyltréhalose
PGL	Glycolipide phénolique
phox	phagocyte oxydase
PIMs	Phosphatidylinositol mannose
PIP3	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
PS	Petite Stagiaire
RD1	Régions de Différence 1
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
SE	Standard Error
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
St	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
TDM	Tréhalose dimycolate
TM	Transmembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
V-ATPase	ATP synthase vacuolaire
VIH	Virus de l'Immunodéfiscience Humaine
XDR	eXtensively Drug Resistant
µm	micromètre

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau 1 – Tableau récapitulatif des phénotypes de mutants <i>mgtC</i> chez différents pathogènes (adapté de Alix and Blanc-Potard, 2007)	45
Tableau 2 – Comparaison des facteurs de virulence de <i>Mycobacterium marinum</i> et de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Tobin and Ramakrishnan, 2008)	72
Tableau 3 – Protéines les plus représentées dans la souche sauvage et le mutant <i>mgtC</i>	116
Tableau 4 – Comparatif des phénotypes observés pour le mutant <i>mgtC</i> de <i>M. marinum</i> par rapport à la souche sauvage dans les modèles d'infection de macrophage et d'embryon de danio	203

FIGURES

Figure 1 – Taux d'incidence estimé de la tuberculose en 2013 (WHO, 2014)	23
Figure 2 – Taux de mortalité estimé de la tuberculose en 2013 (WHO, 2014)	23
Figure 3 – Nombre estimé de cas de tuberculoses MDR en 2013 (WHO, 2014)	24
Figure 4 – Répartition des germes respiratoires chez les patients de plus de 20 ans atteints de mucoviscidose en France (d'après les données du Registre Français de La Mucoviscidose - Bilan Des Données 2012. 2014)	25
Figure 5 – Représentation schématisée de la paroi mycobactérienne	25
Figure 6 – Représentation schématisée de la structure d'un granulome (Ramakrishnan, 2012)	29
Figure 7 – Facteurs impliqués dans le phénotype de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figure 8 – Environnement génétique aux abords des gènes <i>mgtC</i> de <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>B. melitensis</i> et <i>M. tuberculosis</i> (Blanc-Potard and Lafay, 2003)	36
Figure 9 – Environnement génétique aux abords des gènes <i>mgtC</i> de <i>M. tuberculosis</i> et de <i>M. marinum</i>	37
Figure 10 – Arbre phylogénétique simplifié des protéines MgtC obtenu par Neighbor-joining (adapté de Blanc-Potard and Lafay, 2003; Gastebois et al., 2011)	38
Figure 11 – Alignement des protéines MgtC de <i>S. Typhimurium</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. marinum</i> et <i>P. aeruginosa</i>	39
Figure 12 – Schématisation de la topologie des domaines de MgtC et position des résidus important pour la fonction en milieu carencé en magnésium et/ou dans les macrophages	40
Figure 13 – Fonction de MgtC chez <i>S. Typhimurium</i>	48
Figure 14 – Régulation de MgtC chez <i>S. Typhimurium</i>	50
Figure 15 – Différents rôles des peptides membranaires hydrophobes chez les bactéries (Alix and Blanc-Potard, 2009)	52

Figure 16 – Structure et expression de MgtR.....	53
Figure 17 – Mécanisme d'action de MgtR	54
Figure 18 – Interaction MgtR – MgtC	55
Figure 19 – Rôle de MgtR chez <i>S. Typhimurium</i> dans la croissance intra-macrophagique (Alix and Blanc-Potard, 2008)	56
Figure 20 – Modèles structuraux du dimère MgtR/MgtC TM4 généré par RosettaDock (Jean-Francois et al., 2014)	57
Figure 21 – Cinétique de croissance de <i>M. bovis</i> BCG surexprimant <i>kdpF</i> dans des macrophages murins BMDM (Gannoun-Zaki et al. 2013)	58
Figure 22 – Modulation de la virulence mycobactérienne par le peptide KdpF	58
Figure 23 – Représentation schématique de la maturation du phagosome.....	60
Figure 24 - Systèmes antimicrobiens des macrophages.....	61
Figure 25 – Phagocytose par les neutrophiles.....	67
Figure 26 – Représentation circulaire du chromosome de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Smith, 2003)	70
Figure 27 – Représentation circulaire du chromosome et du plasmide pMM23 de <i>Mycobacterium marinum</i> (Stinear et al., 2008).....	70
Figure 28 – Diagrammes de la région ExtRD1 de <i>M. marinum</i> (A) et de la région RD1 de <i>M. tuberculosis</i> (B) (adapté de Gao et al., 2004)	71
Figure 29 – Le modèle d'infection <i>Danio rerio</i>	73
Figure 30 – Courbe de survie des embryons en fonction du temps après infection par <i>Mycobacterium marinum</i> (Davis et al., 2002)	74
Figure 31 - Virulence de la souche sauvage de <i>Mycobacterium marinum</i> et de mutants extRD1 dans le modèle <i>Danio rerio</i> (Gao et al. 2004)	74
Figure 32 – Mécanismes et conséquences de la formation du granulome à un stade précoce et impact de RD1 (Davis and Ramakrishnan, 2009)	75
Figure 33 – Étapes de la formation du granulome dans la tuberculose (Bold and Ernst, 2009)	76
Figure 34 – Comportement des neutrophiles et conséquences lors d'une infection en utilisant le modèle <i>M. marinum</i> / <i>Danio rerio</i> (Yang et al., 2012a)	77
Figure 35 – Phagocytose de <i>P. aeruginosa</i>	78
Figure 36 – Visualisation de phagocytes infectés par <i>P. aeruginosa</i> (Brannon et al., 2009)	80
Figure 37 – Infection d'embryons de <i>Danio</i> avec le mutant T3SS de <i>P. aeruginosa</i> (Brannon et al., 2009)	80
Figure 38 – Infection d'embryons de <i>Danio</i> déplétés en phagocytes avec le mutant T3SS de <i>P. aeruginosa</i> (Brannon et al., 2009)	80
Figure 39 – Expression relative du <i>tnf</i> (haut) et de l' <i>il8</i> (bas) à différents temps post-infection sous trois conditions différentes, embryons non injectés (control), souche sauvage (WT) et mutant <i>mgtC</i> (Δ <i>mgtC</i>) de <i>M. marinum</i> injectés en sous-cutanée	115

Figure 40 – Expression des gènes <i>mgtC</i> de <i>P. aeruginosa</i> dans différentes conditions.....	154
Figure 41 – Visualisation de l'infection de macrophages J774 par la souche sauvage et le mutant <i>mgtC</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	155
Figure 42 – Effets du mutant <i>mgtC</i> et de l'expression de <i>MgtR</i> sur la phagocytose lors d'une infection de macrophage	155
Figure 43 – Schéma récapitulatif des effets régulateurs de <i>KdpF</i> chez <i>Salmonella</i>	193
Figure 44 – Régulation de <i>MgtC</i> par le magnésium	198
Figure 45 – Schéma comparatif de la subversion macrophagique entre pathogènes intracellulaire et extracellulaire	205
Figure 46 – Interactions <i>MgtR</i> / <i>MgtC</i> de différents pathogènes	206
Figure 47 – Effets « anti-virulence » par expression hétérologue de <i>MgtR</i> chez <i>M. bovis</i> BCG et <i>P. aeruginosa</i>	209



I INTRODUCTION



*Pour bien savoir les choses, il faut en savoir le détail et, comme il est presque toujours infini,
nos connaissances sont toujours superficielles et imparfaites.*

La Rochefoucault

1 Bactéries pathogènes responsables d'infections pulmonaires et santé publique

À l'heure actuelle, les maladies infectieuses d'origine bactérienne continuent à poser un véritable problème de santé publique, en relation avec la résistance aux antibiotiques et par conséquent à l'émergence de souches résistantes. J'ai principalement ciblé mon travail sur des bactéries pathogènes responsables d'infections pulmonaires. Dans ce chapitre je vais développer les problèmes causés par *Mycobacterium tuberculosis* et par certains pathogènes opportunistes chez les patients atteints de mucoviscidose.

Les mycobactéries sont à l'origine de pathologies infectieuses majeures, la principale étant la tuberculose, causée par *Mycobacterium tuberculosis*. Alors qu'une large gamme de médicaments antituberculeux et qu'un vaccin, le BCG (Bacillus de Calmette et Guérin) sont disponibles, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé en 2013 à 9,0 millions le nombre de nouveaux cas dans le monde et a enregistré 1,5 millions de décès dus à la tuberculose avec une majorité de cas située dans les pays en voie de développement (figures 1 et 2) (WHO, 2014).

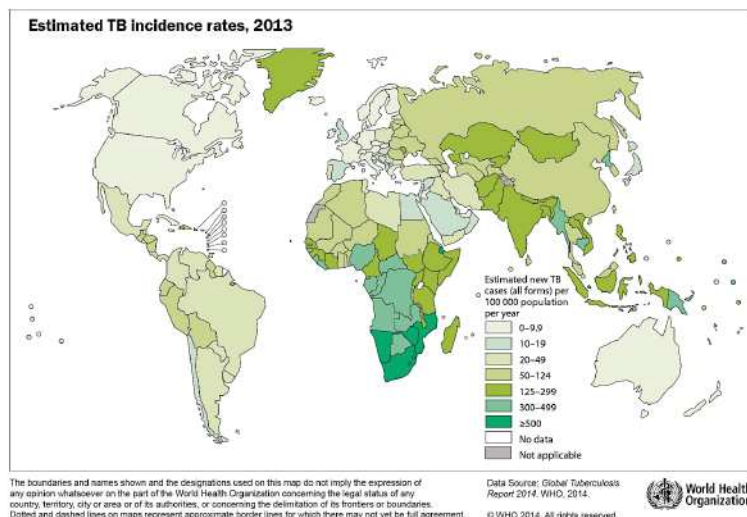


Figure 1 – Taux d'incidence estimé de la tuberculose en 2013 (WHO, 2014).

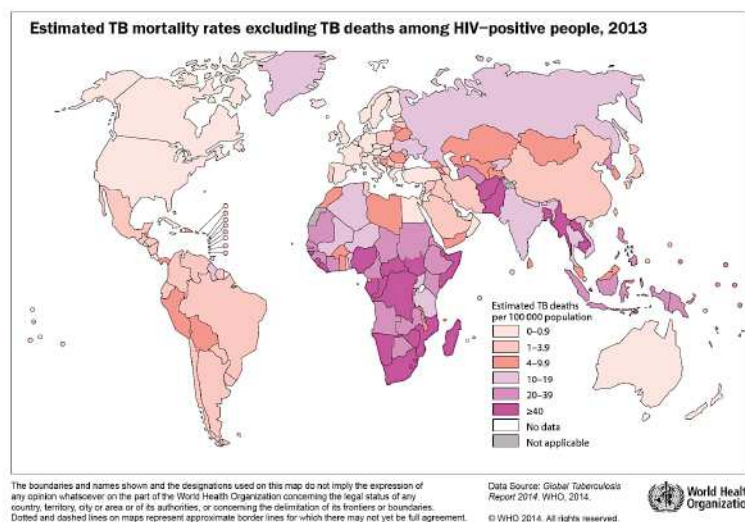


Figure 2 – Taux de mortalité estimé de la tuberculose en 2013 (WHO, 2014). Les décès chez les patients HIV positifs sont exclus.

La situation s'aggrave encore dans un grand nombre de pays en particulier due à la co-infection avec le virus du sida (Virus d'Immunodéficience Humaine ou VIH) mais aussi aux souches de *M. tuberculosis* devenues multi-résistantes (Multi-Drug Resistant ou MDR) voire ultra-résistantes (Extensively Drug Resistant ou XDR) (figure 3) (Gordon et al., 2009; WHO, 2014).

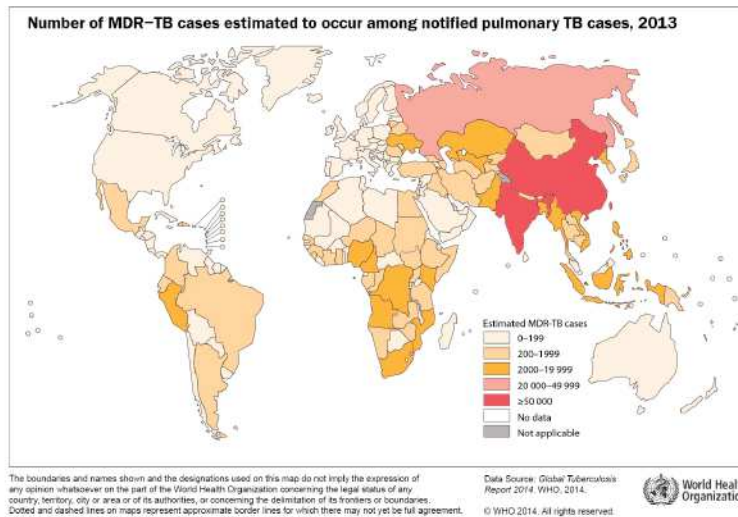
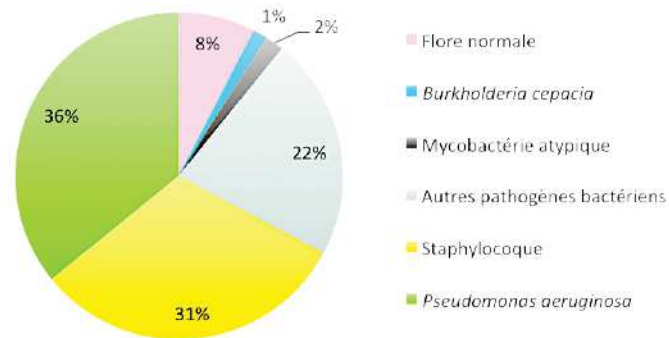


Figure 3 – Nombre estimé de cas de tuberculoses MDR en 2013 (WHO, 2014). Ces nombres ont été estimés parmi les cas de tuberculoses pulmonaires notifiés.

La lutte contre la tuberculose apparaît à l'heure actuelle comme une priorité en santé publique. L'OMS prévoit que le financement complet et la mise en œuvre intégrale du Plan mondial Halte à la tuberculose 2011-2015 permettront de sauver cinq millions de vie d'ici à 2015. Outre la vaccination, le diagnostic et le traitement des patients, le plan mondial Halte à la tuberculose 2011-2015 a pour objectif de favoriser et de promouvoir la recherche (WHO, 2006). Ainsi, de nombreux laboratoires se consacrent à l'étude de la pathogénie tuberculeuse d'un point de vue immunitaire et moléculaire.

De manière plus anecdotique, mais avec une fréquence en hausse entre 1999 et 2006, les mycobactéries atypiques, et notamment *Mycobacterium abscessus*, sont responsables d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (Roux et al., 2009). Or, les infections pulmonaires sont la cause principale de mortalité et de morbidité chez ces patients. Le pathogène principalement impliqué est *Pseudomonas aeruginosa* qui sera décrit dans le paragraphe 1.2.3. *M. abscessus*, qui sera décrit dans le paragraphe 1.2.4, est un pathogène émergent dans ce type d'infection (figure 4). Les problèmes de résistances aux antibiotiques sont également de plus en plus fréquents. En France, les souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes représentent 23 % de la totalité des infections avec ce germe chez les patients de plus de 20 ans. Sont considérés comme multi-résistants les germes résistants à tous les antibiotiques dans au moins deux classes d'antibiotiques (Registre Français de La Mucoviscidose - Bilan Des Données 2012. 2014).

Figure 4 – Répartition des germes respiratoires chez les patients de plus de 20 ans atteints de mucoviscidose en France (d'après les données du *Registre Français de La Mucoviscidose - Bilan Des Données 2012. 2014*).



1.1 La tuberculose

1.1.1 Les mycobactéries : généralités

1.1.1.1 Filiation taxonomique des mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales* et plus précisément à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comporte qu'un seul genre, le genre *Mycobacterium*. Les 200 espèces appartenant au genre *Mycobacterium* présentent plusieurs caractéristiques communes. La plus représentative est la paroi mycobactérienne représentée dans la figure 5.

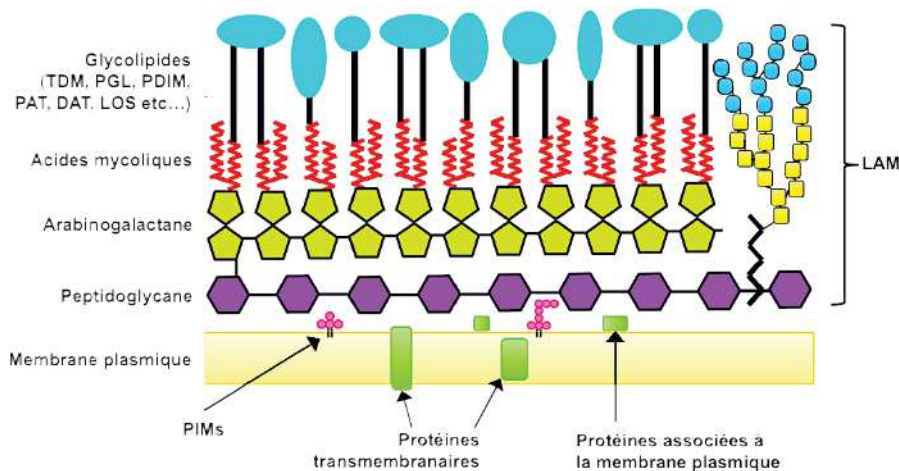


Figure 5 – Représentation schématique de la paroi mycobactérienne. Les mycobactéries sont caractérisées par la présence d'une épaisse couche externe riche en acides mycoliques constituant une barrière extrêmement efficace quant à sa perméabilité. LAM: Lipoarabinomannane; PIMs: Phosphatidylinositol mannosides.

Cette paroi cellulaire complexe joue un rôle actif dans le processus de virulence (Brennan and Nikaido, 1995; Scandurra et al., 2008). De plus, cette couche hydrophobe forme une barrière avec une perméabilité extrêmement limitée rendant les mycobactéries naturellement résistantes à une large variété de stress environnementaux incluant aussi bien la dessiccation que les agents antibactériens (Daffé and Draper, 1998). Cette paroi cellulaire est particulièrement riche en lipides complexes dont certains ont un rôle central dans la physiologie et la virulence de ces organismes (Gokhale et al., 2007). Cette richesse en lipides

et notamment en acides mycoliques la rend incapable de fixer les colorants usuels. En revanche, ce type de paroi est capable de fixer les colorants alcalins. De plus, elle résiste aux décolorations par traitement à l'acide et à l'alcool. Les mycobactéries sont qualifiées de Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR). Pour leur coloration on utilise une coloration spécifique dite coloration de Ziehl-Neelsen.

Au sein de ce genre on distingue trois groupes : le premier groupe est constitué par les mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » (MTBC) (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et BCG, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae* et *M. pinnipedii*). Ce groupe se caractérise par le fait que les mycobactéries sont uniquement retrouvées chez des hôtes mammifères. Le second groupe n'est constitué que d'une seule espèce, *M. leprae*, qui est restreinte à un seul hôte: l'homme. Quant au dernier groupe, il est constitué par les mycobactéries atypiques dont font parti *M. marinum* (décrit dans le paragraphe 4.2) et *M. abscessus* (paragraphe 1.2.4). Ces mycobactéries sont présentes dans l'environnement hydro-tellurique et peuvent contaminer l'homme ou les animaux par cet intermédiaire environnemental.

1.1.1.2 Classification phénotypique

La construction d'un arbre phylogénétique basée sur quatre gènes de ménages (*ARNr16S*, *hsp65*, *sod* et *rpoB*) a permis de mettre en évidence une caractéristique phénotypique (la vitesse de croissance) servant à classer les mycobactéries en deux groupes: celles à croissance lente (plus de 7 jours) et celles à croissance rapide (moins de 7 jours) (Devulder et al., 2005). Le groupe des bactéries à croissance lente comprend le complexe *tuberculosis* et des mycobactéries atypiques dont *M. marinum* tandis que le groupe des bactéries à croissance rapide est uniquement constitué par des mycobactéries atypiques dont *M. abscessus*.

1.1.2 Origine et évolution de la tuberculose

Reconnue dès le néolithique sur la base de témoignages anatomo-pathologiques, la tuberculose a fidèlement accompagné l'homme tout au long de son histoire. Chez l'homme, elle est majoritairement provoquée par *M. tuberculosis*, bacille découvert en 1882 par Robert Koch. Plus rarement, ce sont *M. bovis* et *M. africanum* qui sont en cause. Parmi les autres mycobactéries du complexe *tuberculosis*, le bacille de Calmette et Guérin (BCG) est une souche atténuée de *M. bovis* utilisé pour la vaccination. *M. canettii* a été plus tardivement reconnu comme étant une espèce responsable de tuberculose de l'homme. Quant à *M. microti*, c'est une espèce non pathogène pour l'homme mais qui est impliquée dans des infections animales.

Il est admis depuis quelques années que l'ensemble du complexe *tuberculosis* aurait évolué à partir d'un même ancêtre commun appelé *M. prototuberculosis* ou plus généralement désigné sous le terme de progéniteur du complexe *tuberculosis*. Cette théorie est survenue suite à l'observation d'une perte d'ADN de certaines lignées du complexe *tuberculosis*. Des

chercheurs ont émis l'hypothèse que cet ancêtre commun serait un pathogène humain et par conséquent contredirait l'hypothèse selon laquelle *M. tuberculosis* aurait évolué à partir de *M. bovis* agent de la tuberculose bovine (Brosch et al., 2002).

Une étude plus récente montre que le complexe *tuberculosis* est composé de 2 clades indépendants (Wirth et al., 2008). L'un est exclusivement composé de lignées provenant de l'homme tandis que l'autre est composé aussi bien d'isolats humains qu'animaux. Ce dernier dérivant d'une lignée de pathogènes humains, l'hypothèse selon laquelle le complexe *tuberculosis* aurait pour origine un hôte humain est renforcée. Par ailleurs, dans cette même étude, ils estiment l'âge du complexe *tuberculosis* à 40000 ans ce qui coïncide avec l'expansion des populations de l'homme "moderne" hors d'Afrique. De plus, ils observent une forte et récente expansion démographique de presque toutes les lignées de *M. tuberculosis* ce qui coïncide cette fois-ci avec l'explosion démographique de l'homme depuis les deux derniers siècles. Ils en concluent qu'il existerait une réelle dimension dynamique entre l'hôte humain et les populations de pathogènes.

1.1.3 Epidémiologie

Le réservoir de *M. tuberculosis* est strictement humain dans la mesure où la bactérie n'a jamais été retrouvée dans l'environnement. La tuberculose est une maladie contagieuse à déclaration obligatoire qui se propage par voie aérienne. L'infection d'un hôte se fait après inhalation de gouttelettes (aérosol) contenant un faible nombre de bacilles (Pieters, 2008). Seules les personnes dont les poumons sont atteints peuvent transmettre l'infection.

Les conditions socio-économiques défavorables jouent un rôle déterminant dans le déclenchement de la maladie. En France, la tuberculose touche principalement les sujets âgés, les personnes en situation de précarité, les jeunes enfants, les personnes immuno-déprimées et les migrants en provenance de régions comme l'Afrique subsaharienne où les prévalences de la tuberculose et de l'infection à VIH sont élevées.

De nombreuses études ont montré que des génotypes particuliers étaient associés à une zone géographique donnée. Ainsi, des auteurs ont classé les souches tuberculeuses selon six lignées chacune associée à une région particulière, à l'exception d'une lignée dont la distribution géographique est large (Amériques, Europe, Nord de l'Afrique, Moyen Orient). Ce même article souligne le fait que certains de ces génotypes peuvent également être associés à un phénotype particulier (Gagneux and Small, 2007). En effet, les souches de génotype Beijing sont considérées dans certaines études comme hyper-virulentes (López et al., 2003; Manca et al., 2001; Roberts et al., 2007).

1.1.4 Manifestations cliniques

La primo-infection est caractérisée par l'envahissement de l'organisme par la bactérie pour la première fois. L'incubation dure 1 à 3 mois. Caractérisée par une Intra-Dermo-Réaction (IDR) positive chez un sujet non vacciné, cette phase est majoritairement asymptomatique (primo-infection latente). Quand elle s'exprime (primo-infection patente), les symptômes sont fatigue, anorexie, amaigrissement et à la radiographie du thorax, l'apparition du nodule primaire et d'adénopathies médiastinales. Deux évolutions sont possibles :

Contrôle de la maladie au niveau du granulome (voir paragraphe 1.1.5) : guérison spontanée dans 90 % des cas chez les patients immuno-compétents et dans 70 % des cas chez les immuno-déficients ou portage du bacille sans signe de maladie évolutive, on parle alors de tuberculose infection.

Le granulome ne contient plus la croissance bactérienne donnant lieu à une maladie évolutive pulmonaire pouvant, par dissémination lymphatique atteindre de nombreux organes (rein, os, méninges...), on parle alors de tuberculose maladie, mortelle dans 50 % des cas en l'absence de traitement. La tuberculose maladie est le plus souvent caractérisée par une réactivation des bacilles quiescents dans les granulomes. Les formes pulmonaires sont les plus fréquentes et les manifestations cliniques sont une altération de l'état général, une toux avec expectoration, une fièvre vespérale et des sueurs nocturnes ainsi qu'une anorexie. Il existe également des formes graves dites « miliaires » avec dissémination hématogène ainsi que des formes extra-pulmonaires.

1.1.5 Physiopathologie

La physiopathologie de la tuberculose est un phénomène complexe faisant intervenir deux types de facteurs, d'une part, la virulence du bacille et d'autre part, la nature et l'intensité des mécanismes de défense de l'hôte. L'étroite coopération cellulaire fait intervenir des réactions qui évolueront selon deux axes principaux: la formation du granulome et la nécrose tissulaire.

Lorsqu'un malade infecté émet, en parlant, en toussant, un aérosol de fines gouttelettes, certaines sont chargées de quelques bacilles et sont alors mises en suspension dans l'atmosphère. Le sujet contact peut alors respirer ces gouttelettes qui vont arriver aux alvéoles pulmonaires où elles rencontrent les macrophages alvéolaires qui vont phagocyter les bacilles tuberculeux.

Plusieurs situations sont possibles suite à ce premier contact. Si le nombre de mycobactéries n'est pas trop élevé, il y aura digestion et élimination des bacilles après phagocytose. Si la contamination est plus importante ou les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies, des bacilles survivront et seront à l'origine de la phase de primo-infection. Dans le cas d'une primo-infection, il y aura mise en place par l'organisme d'une immunité à médiation cellulaire en 4 à 8 semaines entraînant un état d'hypersensibilité retardée. Cette immunité

limite le processus infectieux grâce à l'activation des macrophages mais aussi grâce à la nécrose tissulaire qui induit des conditions défavorables à la multiplication des bacilles.

Si l'organisme ne parvient pas à mettre en place des défenses immunitaires cellulaires rapidement, la multiplication des bacilles au niveau de la lésion entraîne l'augmentation de la charge antigénique. La formation du granulome s'effectue alors par recrutement de lymphocytes et de macrophages. Bien que la fonction précise du granulome reste mal comprise, des études ont montré que les granulomes étaient des structures organisées de cellules épithélioïdes. Les bactéries sont généralement dans l'espace central nécrotique dans lequel on retrouve les macrophages morts et mourants. Un grand nombre d'autres types cellulaires peuplent également le granulome tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T et les cellules NK, ou les fibroblastes (figure 6) (Pieters, 2008; Ramakrishnan, 2012).

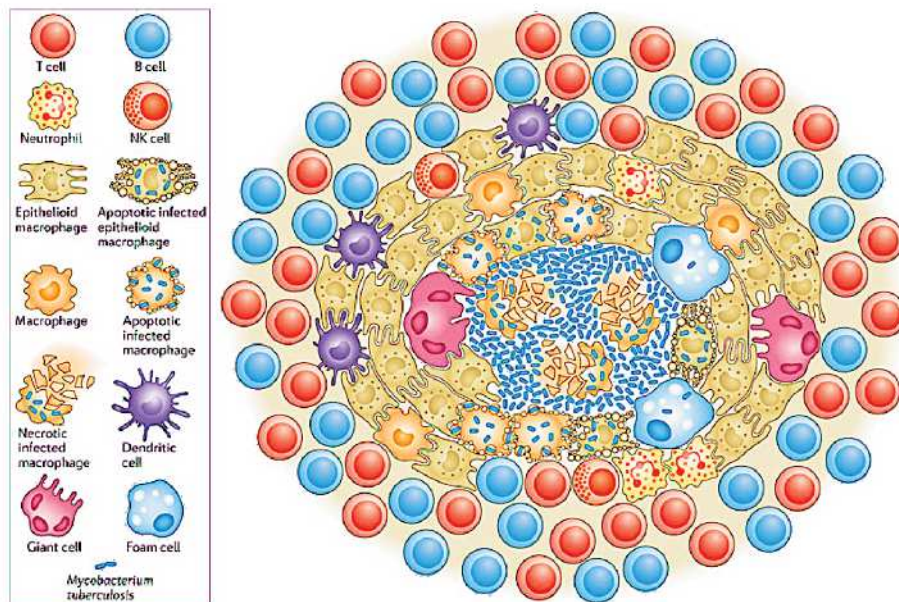


Figure 6 – Représentation schématique de la structure d'un granulome (Ramakrishnan, 2012).

D'un point de vue expérimental, la formation du granulome a été observée dans un modèle de souris infecté par *M. tuberculosis*. Cependant, des résultats particulièrement intéressants sur la formation du granulome et sa fonction ont été obtenus dans le modèle *M. marinum* / *Danio rerio*. En effet, comme cela sera décrit dans le paragraphe 4.2.2, les études menées chez le *Danio* indiquent que le granulome ne serait pas uniquement une structure bénéfique pour l'hôte permettant de contenir l'infection mais serait également bénéfique pour la multiplication et la dissémination bactérienne (Bold and Ernst, 2009; Davis and Ramakrishnan, 2009).

1.1.6 Traitement

Il existe 4 anti-tuberculeux majeurs dits de première intention: isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide. Le schéma thérapeutique actuel d'une tuberculose pulmonaire chez un sujet immuno-compétent est une prise quotidienne de chaque anti-tuberculeux majeur pendant 2 mois puis une association isoniazide/rifampicine les 4 mois suivants soit une durée totale de traitement de 6 mois. Dans certaines situations (résistance, co-infection VIH, rechutes) les médecins auront recours à des antibiotiques de seconde intention tels que certaines fluoroquinolones ou aminosides.

En ce qui concerne la résistance aux antibiotiques, l'OMS distingue deux types de tuberculose. La tuberculose multi-résistante (MDR) est définie comme la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide, antibiotiques de référence. Chez les souches dites "ultra-résistantes" (XDR), d'émergence récente, s'y ajoute une résistance aux antibiotiques de seconde intention, les fluoroquinolones et à un ou plusieurs antibiotiques injectables (amikacine, capréomycine, kanamycine).

1.1.7 Prophylaxie

Le vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin) a été mis au point au début du XX^{ème} siècle. La souche BCG est une souche atténuée de *M. bovis*. Les bases moléculaires de cette atténuation ont été élucidées grâce au séquençage des souches du MTBC. Ainsi, la comparaison des génomes a permis de mettre en évidence la délétion du locus RD1 (Regions of Difference) uniquement dans les souches BCG (Gordon et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que la virulence de *M. tuberculosis* et d'autres mycobactéries pathogènes nécessitait la sécrétion de deux protéines: ESAT-6 (Early Secretory Antigenic 6 kDa) et CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) (Tan et al., 2006). Ces protéines et un système de sécrétion sont codés par des gènes situés sur le locus RD1.

Bien que l'analyse de données cliniques a conclu que le BCG offrait une protection contre les formes disséminées de la maladie telles que les méningites tuberculeuses, il offre en revanche une faible protection contre la tuberculose pulmonaire de l'adulte dans les pays où la prévalence de la maladie est importante (Gordon et al., 2009).

Par ailleurs, des études ont montré que l'efficacité variait notamment avec les différentes régions géographiques (Gagneux and Small, 2007). Les différents génotypes pourraient être responsables des variations d'efficacité du BCG puisque chez la souris la protection du BCG est moindre contre les souches de génotype Beijing que contre la souche de laboratoire H37Rv (Grobe et al., 2005; López et al., 2003).

1.2 Infections pulmonaires dans le contexte mucoviscidosique

1.2.1 La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie autosomale récessive causée par une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) localisé chez l'homme sur le chromosome 7. Bien que les organes atteints soient variés, ces effets sur les poumons provoquent des symptômes sévères avec un taux important de mortalité associé à une fonction pulmonaire déficiente. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR provoque une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation notamment au niveau des poumons (Kreda et al., 2012; Ratjen, 2009). Le mucus ainsi accumulé est riche en nutriments qui constituent un bon environnement pour la colonisation bactérienne (Palmer et al., 2005; Sriramulu et al., 2005). Les poumons mucoviscidosiques sont infectés avec une flore microbienne complexe provoquant des infections chroniques et aiguës qui entraînent un déclin de la fonction pulmonaire, respiratoire et la mort prématurée des patients. Une fois l'infection bactérienne établie, son éradication par un traitement antibiotique n'est quasiment jamais obtenue (Bittar et al., 2008; Schobert and Jahn, 2010).

Malgré les progrès réalisés ces dernières années pour le traitement de la mucoviscidose, l'espérance de vie des patients reste très faible (autour de 37 ans), principalement à cause des infections bactériennes (Cystic Fibrosis Foundation, 2011).

1.2.2 Traitements antimicrobiens chez les patients mucoviscidosiques

Actuellement, il n'existe pas de traitement consensus antimicrobien pour éradiquer les infections bactériennes des poumons mucoviscidosiques (Döring et al., 2012; Jain and Smyth, 2012). Les traitements varient en fonction des établissements, des pays et même des continents. De nombreuses stratégies ont été utilisées variant la voie d'administration, les classes d'antibiotiques et la durée de traitement. Les antibiotiques inhalés, et principalement les aminosides, ont un taux de succès élevé pour l'éradication bactérienne, en particulier contre *P. aeruginosa*, dû à une administration directe de hautes doses d'antibiotiques dans la lumière bronchique avec une toxicité systémique limitée. Par exemple, l'inhalation de tobramycine a été utilisée pour traiter les infections bactériennes de long terme et chroniques avec un bénéfice significatif pour la fonction pulmonaire repoussant la ré-infection et réduisant la mortalité (Ratjen et al., 2010; Ryan et al., 2011; Sawicki et al., 2012). Les antibiotiques par voie orale et intraveineuse ont aussi un intérêt attractif et actuellement les quinolones, en particulier la ciprofloxacine, sont les plus utilisés. Cependant, l'utilisation de la ciprofloxacine est parfois limitée par l'émergence rapide de résistances. Pour palier à ce problème, la ciprofloxacine est souvent associée à d'autres antibiotiques via des voies d'administration différentes. La combinaison de colistine ou de tobramycine inhalées avec de la ciprofloxacine per os a été efficace (Jain and Smyth, 2012). D'autres antibiotiques ont

été introduits et utilisés comme traitement alternatif tels que l'amikacine inhalée, l'aztréonam et l'association fosfomycine et tobramycine (Döring et al., 2012; Jain and Smyth, 2012; Narasimhan and Cohen, 2011).

Devant la multi-résistance naturelle de *M. abscessus* aux antibiotiques, il est recommandé de traiter les patients en associant un macrolide (azithromycine), un aminoside (amikacine) et au moins une autre drogue appartenant à une classe différente (Leung and Olivier, 2013). Cependant, devant l'échec fréquent de ces antibiothérapies, il apparaît urgent de définir rapidement de nouvelles stratégies efficaces pour éradiquer ces infections (Sousa and Pereira, 2014) et par là-même de développer de nouvelles stratégies anti-infectieuses.

1.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

La communauté microbienne résidente dans les poumons mucoviscidosiques est connue pour être complexe et a considérablement changé, principalement à cause des altérations dans les régimes antibiotiques. Cependant, *P. aeruginosa* est toujours le pathogène le plus commun du mucus des patients mucoviscidosiques, avec la plus forte prévalence chez l'adulte (Bittar et al., 2008; Coutinho et al., 2008; Folkesson et al., 2012).

P. aeruginosa également appelé bacille pyocyanique est un micro-organisme ubiquitaire. On le retrouve dans de nombreux sites environnementaux mais plus particulièrement dans l'environnement hydrique. C'est un pathogène opportuniste à Gram négatif chez les patients hospitalisés ou immunodéprimés qui cause des infections pulmonaires, cutanées, urinaires ou encore gastro-intestinales (Coutinho et al., 2008; Silby et al., 2011). Son large génome est composé de près de 6000 gènes qui comprennent notamment des gènes associés à diverses voies métaboliques, des facteurs de virulence, de transport, d'efflux et de chemotactisme, conférant à *P. aeruginosa* une grande capacité d'adaptation. De plus, cette bactérie est capable de coordonner les voies métaboliques, d'optimiser son potentiel nutritionnel et reproductif selon les conditions et les ressources environnementales et ainsi survivre, croître et causer des infections dans différents environnements (Rau et al., 2010; Silby et al., 2011).

La présence de *P. aeruginosa* dans les voies aériennes mucoviscidosiques est fortement associée à une fonction pulmonaire faible, la morbidité et la mortalité des patients. En dépit de la réponse inflammatoire et des traitements antibiotiques intensifs et de long terme, les infections causées par le pathogène persistent dans les poumons mucoviscidosiques. Une fois entré dans les voies aériennes de ces patients, *P. aeruginosa* est presque impossible à éradiquer à cause de la remarquable plasticité de son génome lui permettant une adaptation rapide à un environnement mucoviscidosique considérablement stressant (Folkesson et al., 2012; Hogardt and Heesemann, 2010; Høiby et al., 2010). Après une colonisation par *P. aeruginosa* les patients peuvent souffrir d'épisodes successifs de re-

colonisation jusqu'à l'infection chronique qui peut persister plusieurs années ou ne jamais être éradiquée (Hogardt and Heesemann, 2010; Schelstraete et al., 2013).

Les infections aiguës et chroniques à *P. aeruginosa* se traduisent par deux phénotypes de virulence distincts. Un certain nombre de facteurs ont été impliqués dans l'un ou l'autre de ces phénotypes. Parmi eux, on peut citer le système de sécrétion de type 3 (T3SS) impliqué dans le phénotype de virulence aigu et la formation de biofilms qui décrit un phénotype de virulence chronique (figure 7) (Coggan and Wolfgang, 2012).

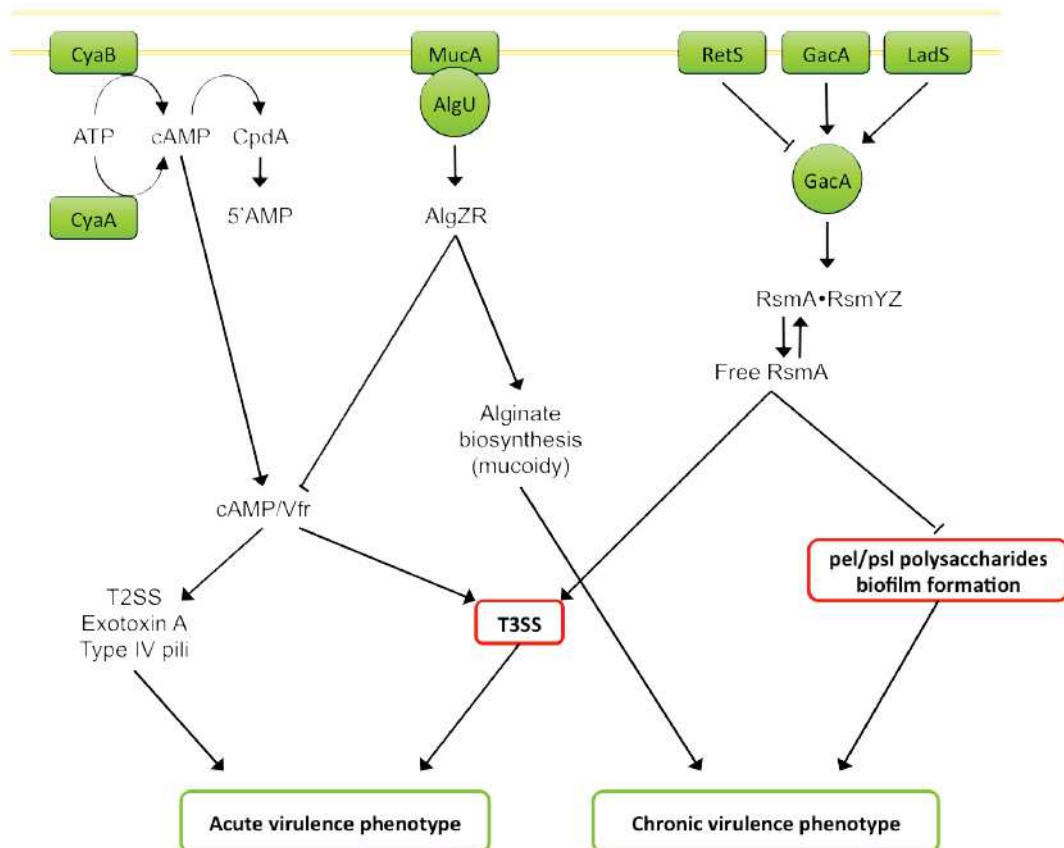


Figure 7 – Facteurs impliqués dans le phénotype de virulence de *P. aeruginosa*.

1.2.4 *Mycobacterium abscessus*

M. abscessus est une mycobactérie atypique à croissance rapide. Elle pousse sur milieu solide en 3 à 4 jours. Les colonies peuvent revêtir un morphotype rugueux ou lisse. Cet organisme est naturellement multi-résistant aux antibiotiques et c'est un pathogène émergent dans les infections chez les patients mucoviscidosiques. Son taux de prévalence total et estimé chez ce groupe de patients représente plus de la moitié de l'ensemble des mycobactéries atypiques isolées (Cystic Fibrosis Foundation, 2011; Seddon et al., 2013). Les infections à *M. abscessus* ont été associées à des pronostics cliniques défavorables dans la population mucoviscidosique, particulièrement après une transplantation de poumon (Gilljam et al., 2010; Luong et al., 2010; Watkins and Lemonovich, 2012).

Le haut niveau de résistance naturelle de *M. abscessus* à la plupart des classes d'antibiotiques est une caractéristique commune des espèces mycobactériennes. Cela est dû à la présence de leur paroi cellulaire imperméable, d'enzymes inactivant ou modifiant les antibiotiques, de pompes à efflux et de polymorphismes génétiques au niveau des gènes cibles. *M. abscessus* a la particularité d'être également naturellement résistant aux anti-tuberculeux classiques tels que la rifampicine et l'éthambutol (Nessar et al., 2012).

1.3 Stratégies anti-virulence : les alternatives aux antibiotiques

Depuis quelques années, la résistance bactérienne aux antibiotiques a conduit à la recherche de nouvelles approches antibactériennes. Les facteurs de virulence en tant que cible thérapeutique se sont révélés comme une approche alternative, ou du moins complémentaire, pour traiter les infections microbiennes. Le principe de ces nouvelles molécules est de dénuer le pathogène de ses propriétés de virulence sans pour autant menacer son existence. L'utilisation de tels antibactériens permettrait alors de réduire la pression de sélection exercée par l'antibiothérapie et de limiter l'émergence de résistances. Ces nouvelles thérapeutiques permettraient également d'éviter l'altération du microbiote de l'hôte comme c'est le cas des antibactériens actuellement sur le marché. De plus, certains facteurs de virulence sont communs à plusieurs pathogènes et de ce fait, ces molécules auraient un large spectre d'action (Barczak and Hung, 2009; Cegelski et al., 2008; Rasko and Sperandio, 2010). Avec par exemple l'histidine kinase QseC qui possède des homologues chez au moins 25 pathogènes majeurs humains ou de plantes (Rasko et al., 2008). Cependant, de récentes études indiquent qu'il existe des mécanismes de résistance aux drogues anti-virulence. Certaines souches avec de telles résistances ont été isolées en milieu clinique (García-Contreras et al., 2013; Maeda et al., 2012) et d'autres ont été générées en laboratoire (Hung et al., 2005; Maeda et al., 2012; Smith et al., 2012). Malgré tout, certains auteurs affirment que la sélection de résistances peut être réduite ou même inversée en utilisant des combinaisons appropriées du facteur de virulence cible et du traitement, seul ou en association avec les médicaments thérapeutiques traditionnels existants (Allen et al., 2014).

C'est dans ce contexte que je me suis intéressée au facteur de virulence MgtC qui apparaît comme une cible particulièrement intéressante du fait de sa présence chez un grand nombre de pathogènes majeurs, incluant *M. tuberculosis* et *P. aeruginosa*. Ce facteur de virulence est une cible d'autant plus attractive qu'il existe chez *S. Typhimurium* un peptide naturel, MgtR, qui favorise la dégradation de MgtC.

2 Le facteur de virulence MgtC

Le facteur de virulence MgtC est une protéine initialement découverte et décrite chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Snavey et al., 1991). Deux fonctions ont été décrites. *In vitro*, MgtC permet l'adaptation à un milieu carencé en magnésium. *Ex vivo*, MgtC est indispensable à la survie intramacrophagique. Il s'est avéré que cette protéine était également présente chez plusieurs bactéries pathogènes intracellulaires majeures telles que *Mycobacterium tuberculosis*, mais également chez une bactérie pathogène extracellulaire, *Pseudomonas aeruginosa*. Ce facteur de virulence apparaît alors comme étant une cible thérapeutique particulièrement intéressante.

Dans cette partie je vais détailler les connaissances actuelles concernant MgtC chez *S. Typhimurium* et chez les autres bactéries pathogènes.

2.1 La protéine MgtC de *S. Typhimurium* et ses homologues

C'est l'étude de la protéine MgtB, l'un des trois transporteurs de Mg^{2+} de *S. Typhimurium*, qui a permis de mettre en évidence la protéine MgtC. En effet, l'analyse génomique a montré que les deux gènes étaient cotranscrits et formaient l'opéron *mgtCB* (Snavey et al., 1991). Par la suite, il a été montré qu'un petit peptide régulateur, MgtR, faisait également partie de cet opéron formant ainsi l'opéron *mgtCBR* (Alix and Blanc-Potard, 2008). Le peptide MgtR sera décrit dans le chapitre 3.

Des expériences de Southern ont permis de détecter des séquences *mgtC* dans les huit sous-espèces de *S. enterica* (Blanc-Potard et al., 1999). Cependant, la distribution du gène *mgtC* reste très sporadique en ce qui concerne dix entérobactéries (Blanc-Potard and Groisman, 1997). MgtC est également présent chez les actinomycètes et une étude chez les mycobactéries a montré que les séquences *mgtC* n'ont pas été détectées dans toutes les espèces du genre *Mycobacterium*. En effet, elles sont absentes de certaines espèces à croissance rapide, *M. smegmatis* et *M. fortuitum* (Buchmeier et al., 2000). En revanche le gène *mgtC* est présent chez *M. tuberculosis*, *M. marinum* et deux homologues ont été retrouvés chez *M. abscessus* (Ripoll et al., 2009; Stinear et al., 2008). Le gène *mgtC* est donc réparti aussi bien chez des mycobactéries tuberculeuses que chez des mycobactéries non tuberculeuses.

2.2 Organisation génomique

Une étude bioinformatique, réalisée sur plus de 70 génomes, a permis de mettre en évidence 47 protéines homologues de MgtC issues de 41 génomes (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à l'organisation génomique aux abords du gène *mgtC*. Plus particulièrement, ils ont étudié des gènes provenant de bactéries capables de survivre dans les macrophages. Chez *S. Typhimurium*, *mgtC* est cotranscrit avec *mgtB*, et l'opéron *mgtCB* est porté par l'îlot de pathogénicité SPI-3 de 17 kb (région absente d'une

bactérie très proche, *Escherichia coli*) (Blanc-Potard and Groisman, 1997) dont la teneur en G + C diffère de celle de l'ensemble du génome de *S. Typhimurium*. Or, l'absence de cette région chez une bactérie très proche et une teneur atypique en G + C sont des indicateurs d'évènements de transferts horizontaux (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Lawrence and Ochman, 2002). Chez *S. Typhi*, *Y. pestis* et *B. melitensis*, un gène *mgtB* pourrait être en opéron avec *mgtC* suggérant l'acquisition concomittante de ces 2 gènes et dont la fonction pourrait être liée. Cependant, aucun homologue MgtB n'a été mis en évidence à proximité de *mgtC* chez *M. tuberculosis* et aucun homologue de gènes codant SPI-3 n'a été retrouvé à proximité de *mgtC* pour les génomes de *Y. pestis*, *B. melitensis* ou *M. tuberculosis*. Chez *Brucella*, la région étudiée est localisée en aval d'un locus d'ARNt. Ces loci sont reconnus comme être des points d'insertion d'ADN étranger. L'ensemble de ces résultats a montré que l'acquisition du gène *mgtC* a probablement eu lieu par transfert horizontal de gène (figure 8) (Blanc-Potard and Lafay, 2003).

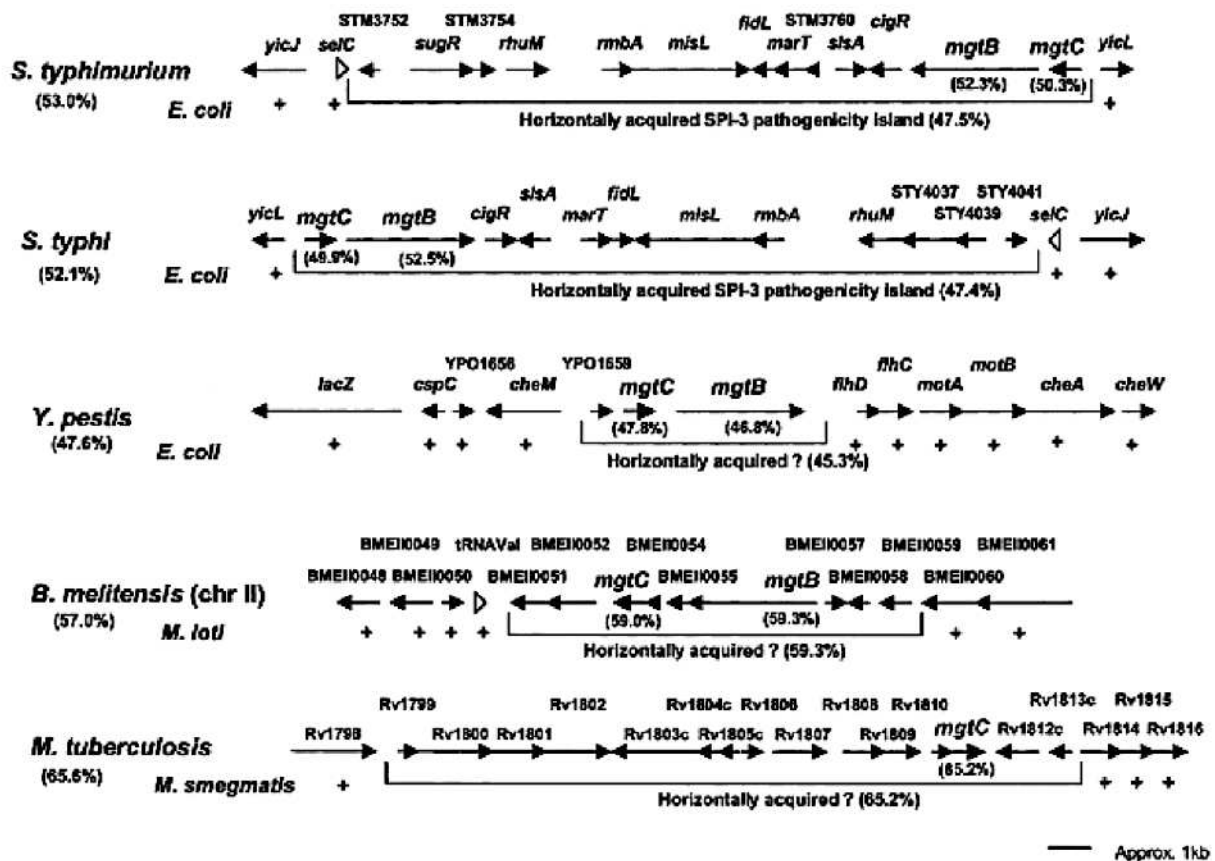


Figure 8 – Environnement génétique aux abords des gènes *mgtC* de *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *Y. pestis*, *B. melitensis* et *M. tuberculosis* (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Les ORFs sont représentées par des flèches et les ARNt apparaissent sous forme de triangle blanc. L'ADN génomique de chaque espèce est comparé à l'ADN génomique d'une bactérie proche qui ne code pas pour un orthologue de MgtC. *S. Typhimurium*, *S. Typhi* et *Y. pestis* sont comparés à *E. coli*, *B. melitensis* à *Mesorhizobium loti* et *M. tuberculosis* à *M. smegmatis*. "+" indique la présence d'un orthologue dans l'espèce comparée. Les régions supposées de transfert horizontal sont indiquées. La teneur en G + C des génomes, les régions d'ADN supposées d'origine étrangère et les gènes *mgtC* et *mgtB* sont indiqués dans les crochets.

Chez les mycobactéries, *M. marinum* possède un homologue *mgtC* dont l'organisation génomique aux abords du gène est conservée avec celle de *M. tuberculosis*. Pour les deux espèces, *mgtC* est situé en aval de plusieurs gènes codant pour des protéines PPE et il est adjacent à un gène codant pour une protéine de fonction inconnue (MMAR_2686 ou Rv1810) (Figure 9).

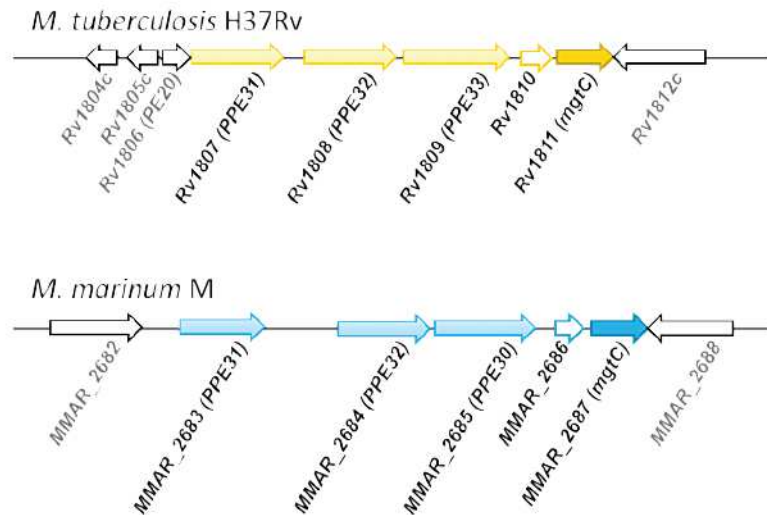


Figure 9 – Environnement génétique aux abords des gènes *mgtC* de *M. tuberculosis* et de *M. marinum*. Pour les deux espèces le gène *mgtC* (flèches colorées foncées) est adjacent à Rv1810 (flèche blanche à liseré jaune) qui est l'homologue de MMAR_2686 (flèche blanche à liseré bleu) et des gènes PPE (flèches colorées claires). Le gène MMAR_2688 est homologue au gène Rv1812c.

2.3 Phylogénie

Les homologues MgtC ont fait l'objet d'une analyse phylogénétique avec construction d'un dendrogramme selon la méthode du neighbor-joining. Trois clusters distincts de protéines ont pu être identifiés. L'ensemble des homologues de ces trois groupes possède un domaine N-terminal bien conservé. En revanche, seul le cluster appelé groupe 1, possède un domaine C-terminal conservé. On retrouve dans le groupe 1 des homologues issus de plusieurs pathogènes intracellulaires tels que *S. Typhimurium* et *S. Typhi*, *M. tuberculosis*, *Burkholderia*, *Brucella* et *Y. pestis* pour lesquels le rôle de MgtC dans la virulence a été étudié et sera décrit dans le paragraphe 2.6.1. On remarquera que *M. marinum* est inclus dans ce groupe. Concernant *M. abscessus* il possède 2 homologues de la protéine MgtC (Ripoll et al., 2009) mais un seul des deux est inclus dans le groupe 1. De manière étonnante, un pathogène extracellulaire est également présent dans ce cluster. Il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa*. Il existe aussi 2 homologues chez ce pathogène mais contrairement à *M. abscessus*, les deux homologues appartiennent au groupe 1 (Blanc-Potard and Lafay, 2003; Gastebois et al., 2011) (figure 10).

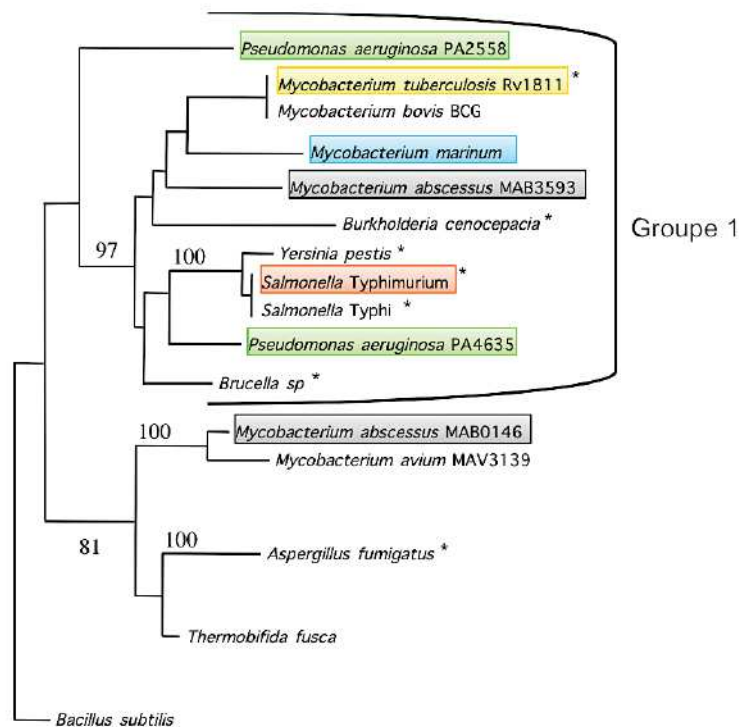


Figure 10 – Arbre phylogénétique simplifié des protéines MgtC obtenu par Neighbor-joining (adapté de Blanc-Potard and Lafay, 2003; Gastebois et al., 2011). Les astérisques indiquent les pathogènes dont le rôle de MgtC dans la virulence a été étudié.

2.4 Alignement des protéines MgtC étudiées au cours de la thèse avec la protéine MgtC de *S. Typhimurium*

MgtC est une protéine membranaire d'environ 230 acides aminés et 22,5 kDa avec un domaine N-terminal composé de 5 segments transmembranaires et un domaine C-terminal cytosolique (Rang et al., 2007; Snively et al., 1991). L'alignement des séquences protéiques de MgtC de *S. Typhimurium*, *M. tuberculosis* et *M. marinum* (figure 11A) montre une grande similarité dans la partie N-terminale et une partie C-terminale plus divergente. Cependant, les 3 espèces partagent 5 résidus conservés qui sont important pour la fonction de MgtC chez *S. Typhimurium* (Rang et al., 2007). L'alignement des séquences protéiques de MgtC de *S. Typhimurium* et de *P. aeruginosa* (figure 11B) montre un profil similaire à l'alignement décrit précédemment avec notamment la conservation de 4 résidus impliqués dans la fonction de MgtC de *S. Typhimurium* (Rang et al., 2007).

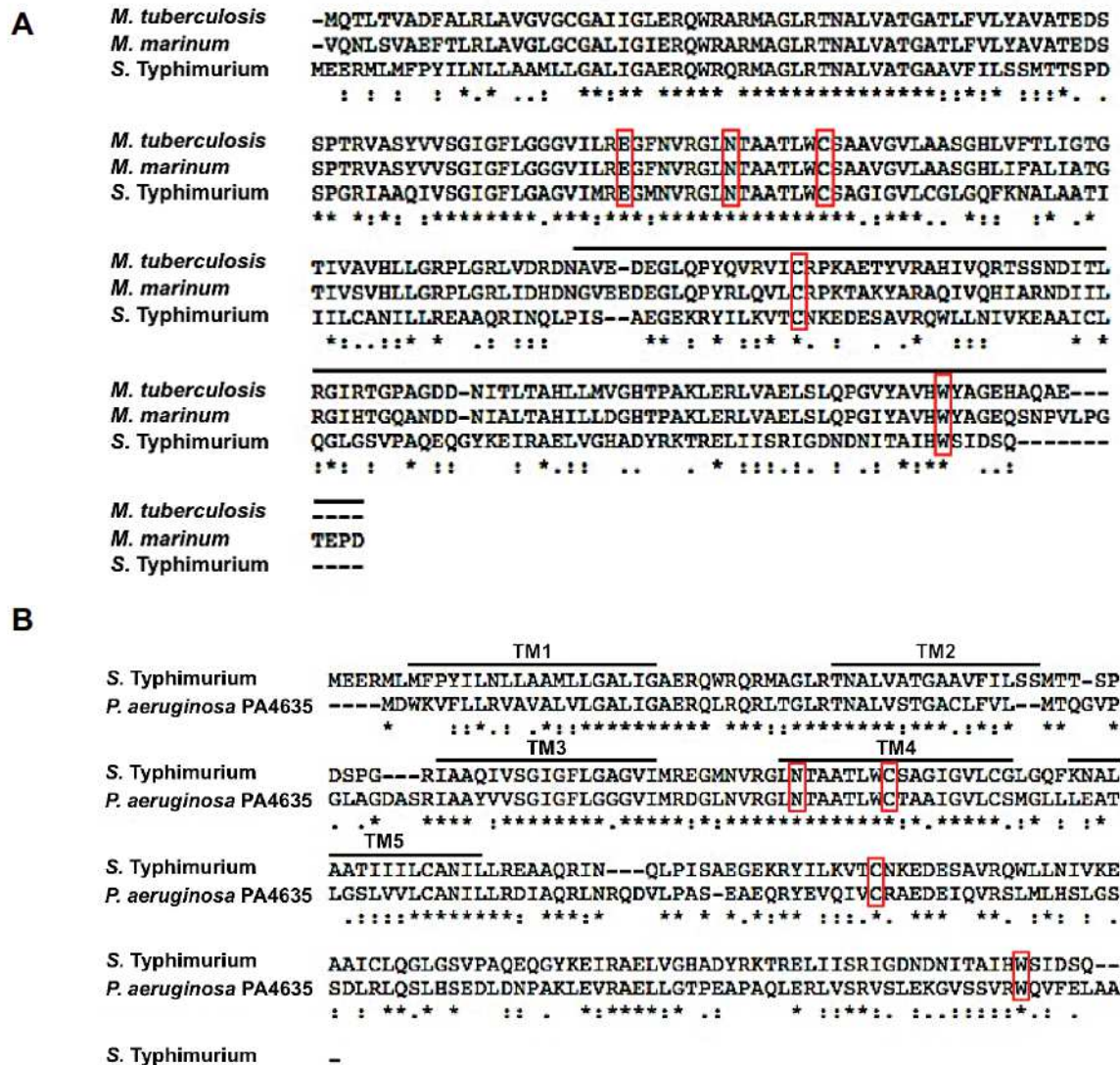


Figure 11 Alignement des protéines MgtC de *S. Typhimurium*, *M. tuberculosis*, *M. marinum* et *P. aeruginosa*. (A) L'alignement des séquences protéiques de MgtC de *S. Typhimurium* (numéro d'accès AAL22622.1), de *M. tuberculosis* (numéro d'accès NP_216327.1) et de *M. marinum* (numéro d'accès ACC41130.1) a été réalisé avec ClustalW. La ligne supérieure noire indique la partie C-terminale soluble. Les rectangles rouges indiquent les résidus conservés et essentiels pour la fonction de MgtC chez *Salmonella*. (B) L'alignement des séquences protéiques de MgtC de *S. Typhimurium* (numéro d'accès AAL22622.1) et de *P. aeruginosa* (numéro d'accès AAG08023.1) a été réalisé avec ClustalW. Les lignes supérieures noires correspondent aux domaines transmembranaires (TM) du domaine N-terminal. Les rectangles rouges indiquent les résidus conservés et essentiels pour la fonction de MgtC chez *Salmonella*.

2.5 Structure du domaine C-terminal de la protéine MgtC

Le domaine C-terminal soluble de MgtC de *S. Typhimurium* a été prédit pour adopter une topologie $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (Rang et al., 2007). Ce repliement, partiellement confirmé par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), est retrouvé dans les domaines de liaison aux métaux. Cependant, les études de transport et électrophysiologiques ont démontré que MgtC n'était pas un transporteur de Mg^{2+} (Günzel et al., 2006; Moncrief and

Maguire, 1998). Par ailleurs, des expériences de mutagénèses de résidus acides conservés (chargés négativement) ainsi que des analyses sur le domaine C-terminal purifié ne soutiennent pas l'hypothèse d'une fixation du Mg^{2+} par MgtC (Rang et al., 2007). Ce repliement est également retrouvé dans les domaines de liaison de petites molécules (ARN, protéines ou acides aminés) qui sont appelés domaines ACT. Au-delà de la structure de la protéine, il a été mis en évidence que certains résidus conservés jouaient un rôle important dans la croissance en milieu carencé en magnésium et/ou dans la survie intra-macrophagique, se traduisant par des phénotypes respectivement *in vitro* et/ou *ex vivo* (figure 12).

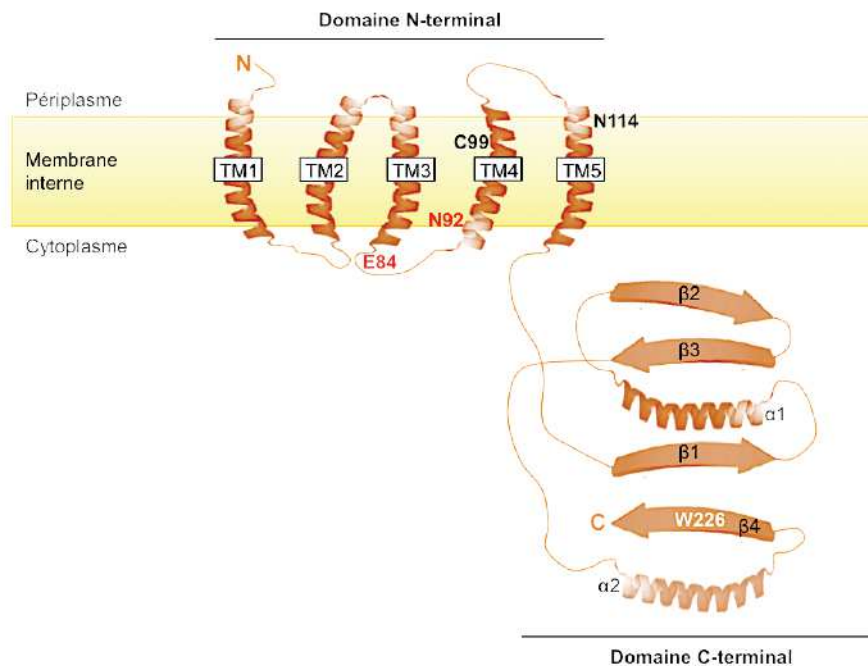


Figure 12 – Schématisation de la topologie des domaines de MgtC et position des résidus important pour la fonction en milieu carencé en magnésium et / ou dans les macrophages. Le modèle topologique de MgtC (5 hélices transmembranaires, TM1 à TM5, et un domaine C-terminal cytoplasmique) dérive d'une combinaison de prédiction de topologie et de la détermination expérimentale de la localisation C-terminale. La structure secondaire du domaine C-terminal a été partiellement caractérisée par RMN et prédite en se basant sur la reconnaissance de repliement. Les hélices α sont schématisées par des hélices et les feuillets β par des flèches. La position des acides aminés qui sont important pour la fonction, basée sur l'analyse de MgtC de *Salmonella* mais aussi de *P. aeruginosa*, est indiquée. En rouge sont indiqués les résidus ayant un rôle *in vitro* et *ex vivo*. En noir, ceux qui ont un rôle principalement *ex vivo* et en blanc, ceux ayant un rôle principalement *in vitro* (Rang et al., 2007).

Récemment, la structure du domaine C-terminal de MgtC de *M. tuberculosis*, déterminée par spectroscopie RMN, confirme le repliement sous la forme $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ et le domaine ACT (Yang et al., 2012b). Cependant, le domaine ACT diffère des domaines ACT standards puisqu'il semble qu'il ait perdu la capacité de se lier à de petites molécules. En revanche, le domaine ACT a été impliqué dans des phénomènes de dimérisation et des expériences de double hybride bactérien ont permis de montrer que la protéine MgtC pouvait dimériser et que le domaine C-terminal facilitait cette dimérisation (Yang et al., 2012b).

2.6 Fonction de MgtC

2.6.1 Rôle de MgtC dans la virulence bactérienne: MgtC et survie intracellulaire

L'étude phylogénétique des protéines MgtC a montré que le groupe 1 présentait une séquence conservée entre les pathogènes suggérant, par extrapolation, une fonction conservée (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Un récapitulatif du rôle de MgtC dans la virulence des différents pathogènes décrits ci-après est disponible dans le tableau 1.

2.6.1.1 *Salmonella enterica* sérovars Typhimurium et Typhi

Les bactéries appartenant au genre *Salmonella* sont capables d'établir une infection systémique chez de nombreux hôtes tels que l'homme, les rongeurs, les volailles ou les bovins. La capacité de *Salmonella* à contourner la réponse immunitaire active de l'hôte est le résultat de facteurs de virulence spécialisés qui favorisent les infections à long terme (Lawley et al., 2006).

De manière plus spécifique, le rôle de MgtC dans la virulence a été étudié chez *S. Typhimurium*. Un criblage génétique utilisant une technique de microarray a permis d'identifier les gènes, parmi lesquels *mgtC*, indispensables au développement d'une infection systémique à long terme chez la souris dans laquelle *S. Typhimurium* peut persister jusqu'à un an après infection sans qu'elle ne succombe à celle-ci (Lawley et al., 2006). Le rôle de MgtC dans la virulence avait également été démontré en infectant des souris BALB/c (Blanc-Potard and Groisman, 1997). Au niveau cellulaire, des expériences ont été réalisées dans un modèle d'infection de macrophages J774. D'une part, il a été montré que le gène *mgtC* était très fortement induit dès 4h après infection (Eriksson et al., 2003). D'autre part, des données indiquent qu'un mutant *mgtC* est très atténué dans ce modèle. Des mutagénèses ont été réalisées sur quatre résidus (N92, C99, C155 et W226) de la protéine MgtC de *S. Typhimurium* qui sont conservés dans le groupe phylogénétique de *Salmonella*. La capacité des protéines mutées à compléter le mutant *mgtC* a ensuite été testée. Il en est ressorti que les résidus N92, C99 et C155 sont essentiels pour la survie intramacrophagique (Rang et al., 2007).

Le rôle de MgtC dans la virulence a également été décrit chez *S. Typhi*, agent responsable de la fièvre typhoïde chez l'homme. Dans un modèle d'infection cellulaire de monocytes humains, le mutant *mgtC* est atténué. La multiplication du mutant *mgtC* a également été testée dans un modèle de cellules épithéliales humaines HEp-2. Les résultats obtenus suggèrent un rôle de MgtC restreint à la phase d'invasion pour ce type de cellules. Ce phénotype, également observé dans les macrophages, n'a pas été étudié pour les autres sérovars de *Salmonella* mais suggère que MgtC pourrait être requis pendant la phase initiale de l'infection par *S. Typhi* (Retamal et al., 2009).

2.6.1.2 *Burkholderia cenocepacia*

B. cenocepacia, une bactérie environnementale commune, est aussi un agent pathogène opportuniste des patients atteints de mucoviscidose. Une expérience de mutagenèse signature-tagged dans un modèle d'infection de poumons de rats a permis d'identifier les gènes impliqués dans la survie bactérienne *in vivo*. Un des mutants les plus atténués portait une insertion dans le gène *mgtC* (Hunt et al., 2004). Un mutant *mgtC* testé dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages murins a montré une diminution de la survie intramacrophagique confirmant la nécessité de MgtC pour la survie intracellulaire. Par ailleurs, ce mutant n'induit pas de retard dans la fusion phagolysosomale et les vacuoles contenant les bactéries sont rapidement ciblées par les lysosomes où les bactéries sont détruites (Maloney and Valvano, 2006).

2.6.1.3 *Brucella suis*

De la même manière que *S. enterica*, les espèces appartenant au genre *Brucella* ont développé des stratégies de virulence pour la survie intracellulaire. C'est dans ce contexte qu'un mutant *mgtC* de *B. suis* a été testé dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages J774. Il a été montré que le mutant *mgtC* était atténué dans ce modèle et par conséquent que MgtC était nécessaire pour la croissance intramacrophagique de *B. suis*. Il a aussi été montré que *mgtC* ne semblait pas impliqué dans les stades précoces de la croissance intra-macrophagique (Lavigne et al., 2005).

2.6.1.4 *Yersinia pestis*

Y. pestis est un pathogène intracellulaire facultatif. C'est l'agent responsable de la peste. Le criblage de la mutagenèse Tn5-*lacZ* a identifié *mgtC* comme étant un gène important pour la survie de *Y. pestis* dans les macrophages. Des expériences dans un modèle d'infection de macrophages J774 a confirmé cette analyse. En effet, un mutant *mgtC* a une survie intracellulaire diminuée, il est atténué dans ce modèle. De plus, on peut distinguer deux temps lors de l'infection. Un temps précoce (entre 5 et 8 h post-infection) où la survie intracellulaire du mutant diminue considérablement. Suivi d'un temps plus tardif (entre 8 et 24 h post-infection) où la charge bactérienne reste stable (Grabenstein et al., 2006). De plus, la protéine MgtC de *Y. pestis* est capable de compléter un mutant *mgtC* de *S. Typhimurium* dans les macrophages (Rang et al., 2007).

2.6.1.5 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis, agent responsable de la tuberculose est un pathogène très différent de *S. enterica*. Pourtant, ces deux micro-organismes partagent une stratégie équivalente de survie intraphagosomale. Dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages humains issus de monocytes, le mutant *mgtC* est atténué. La complémentation restaure la fonction. Le gène *mgtC* est donc nécessaire pour la croissance de *M. tuberculosis* dans ce modèle (Buchmeier

et al., 2000). De plus, l'expression hétérologue de la protéine MgtC de *M. tuberculosis* dans un mutant *mgtC* de *S. Typhimurium* complémente très partiellement le phénotype dans les macrophages (Alix et al., 2006). Des expériences ont également été menées dans un modèle *in vivo* de souris BALB/c. L'analyse de la charge bactérienne des poumons et de la rate des animaux au cours du temps a montré que le mutant *mgtC* était également atténué dans ce modèle. Cela démontre que MgtC est nécessaire pour la croissance de *M. tuberculosis* dans un modèle d'infection *in vivo* (Buchmeier et al., 2000).

2.6.1.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Bien que *P. aeruginosa* soit un pathogène extracellulaire, il possède deux homologues MgtC, tout deux appartenant au groupe 1 de l'arbre phylogénétique représenté par la figure 4 (Blanc-Potard and Lafay, 2003). Ces résultats suggèrent une fonction potentielle commune avec les protéines des pathogènes intracellulaires appartenant au même groupe phylogénétique. Pourtant, l'un des rôles majeurs de ce facteur de virulence est son importance dans la survie intramacrophagique (voir ci-dessus). En dépit du fait que *P. aeruginosa* soit un pathogène extracellulaire, une étape intracellulaire dans les cellules épithéliales des voies aériennes pourrait avoir lieu avant la formation de biofilms lors de la phase aigüe de l'infection (Garcia-Medina et al., 2005; Sana et al., 2012). Des expériences de complémentation hétérologues ont été réalisées avec les deux gènes *mgtC* de *P. aeruginosa* (PA4635 et PA2558) dans un mutant *mgtC* de *S. Typhimurium*. Aucun des 2 gènes ne complémentent le phénotype dans les macrophages. Cependant, la mutation d'un seul résidu de PA4635 (E112N) a permis une augmentation significative de la capacité de la protéine mutée à complémenter le mutant *mgtC* de *S. Typhimurium* dans les macrophages (Rang et al., 2007).

2.6.2 Rôle de MgtC dans la croissance en milieu carencé en magnésium

Le tableau 1 fournit un récapitulatif du rôle MgtC dans la croissance en milieu carencé en magnésium des différents pathogènes décrit ci-après.

2.6.2.1 Importance du magnésium dans les systèmes biologiques

Le magnésium est un élément indispensable à tous les systèmes biologiques. Au niveau cellulaire, il est présent sous forme de cation Mg^{2+} . Cet ion est particulièrement abondant dans les cellules. Sa concentration intracellulaire sous forme libre a été évaluée à 0,9 mM chez *S. Typhimurium* (Froschauer et al., 2004). Il est impliqué comme cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques. Il a également un rôle essentiel dans l'activité biologique de l'ATP puisque l'ATP doit être couplé au magnésium pour être active. De plus, les ions Mg^{2+} permettent de stabiliser l'ADN et l'ARN ou encore de maintenir l'intégrité des membranes cellulaires chargées négativement.

2.6.2.2 Chez *S. Typhimurium*

Le gène *mgtC* étant en opéron avec *mgtB* qui code pour un transporteur de magnésium, les études ont donc cherché à établir un lien entre MgtC et le magnésium.

Une première étude a montré que l'opéron *mgtCB* était nécessaire pour une croissance optimale en milieu carencé en magnésium (Soncini et al., 1996). Par la suite, il a été montré que MgtC avait par lui-même un rôle dans la croissance en milieu carencé en magnésium (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Moncrief and Maguire, 1998; Rang et al., 2007). Un mutant *mgtC* présente une croissance très diminuée en condition de carence en Mg^{2+} alors que la complémentation restaure le phénotype observé avec la souche sauvage. De la même manière que pour la survie dans les macrophages, des mutagénèses ont été réalisées sur les résidus N92, C99, C155 et W226. Les protéines mutées ont alors été testées pour la complémentation du mutant *mgtC* en condition de carence en Mg^{2+} . Les résultats indiquent que les résidus N92, C155 et W226 sont essentiels à la croissance dans un milieu carencé en Mg^{2+} (Rang et al., 2007).

2.6.2.3 Chez les autres pathogènes

Le rôle de MgtC dans la croissance en milieu carencé en magnésium a également été étudié chez d'autres pathogènes. Les mutants *mgtC* de ces pathogènes sont déficients pour une croissance dans des milieux liquides à faibles concentrations en Mg^{2+} (10 à 20 μM). Le défaut de croissance est accentué avec la diminution de la concentration en Mg^{2+} . Ces souches présentent une croissance normale dans des milieux avec une concentration forte en Mg^{2+} (10 mM) (Alix and Blanc-Potard, 2007). De plus, les protéines MgtC de *Y. pestis*, de *P. aeruginosa* et de *M. tuberculosis* ont été exprimées dans le mutant *mgtC* de *S. Typhimurium* pour évaluer si le phénotype était restauré lors de ces complémentations hétérologues (Alix et al., 2006; Rang et al., 2007). Alors que les protéines MgtC de *Y. pestis* et de *M. tuberculosis* complémentent le mutant *mgtC* de *S. Typhimurium*, seule l'une des deux protéines MgtC de *P. aeruginosa* (PA4635) restaure le phénotype. La fonction de MgtC vis-à-vis de la croissance en milieu carencé en magnésium est donc conservée pour la majorité des différentes espèces bactériennes pathogènes (Rang et al., 2007).

2.6.2.4 Fonction de MgtC et magnésium

Le parallèle entre le défaut de croissance des mutants *mgtC* dans les macrophages et dans les milieux carencés en Mg^{2+} a naturellement suggéré que l'environnement faiblement concentré en Mg^{2+} des macrophages était responsable du défaut de réplication des mutants *mgtC*. En accord avec cette hypothèse, l'addition de Mg^{2+} au milieu de culture cellulaire restaure partiellement le défaut de croissance des mutants *mgtC* de *S. Typhimurium* et *B. suis* dans les macrophages (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Lavigne et al., 2005). Cependant, une étude a révélé que les 2 fonctions (survie intramacrophagique et croissance en milieu carencé en Mg^{2+}) pouvaient être dissociées (Rang et al., 2007). En effet,

la protéine MgtC de *P. aeruginosa* complémente le mutant *mgtC* de *S. Typhimurium* en milieu carencé en Mg^{2+} mais pas dans les macrophages. D'autre part, une mutagénèse du gène *mgtC* de *Salmonella* a permis de caractériser des mutants MgtC à la position C99 qui empêchent le rôle de MgtC dans les macrophages sans affecter son rôle en culture de faible concentration en Mg^{2+} . À l'inverse, un mutant MgtC W226A présente un défaut de croissance en milieu faiblement concentré en Mg^{2+} alors que sa fonction dans les macrophages reste intacte. Tous ces résultats convergent vers l'hypothèse que le phagosome n'est pas nécessairement carencé en Mg^{2+} . Ceci est corroboré par des mesures directes de la concentration en Mg^{2+} dans le phagosome faites à un temps précoce d'infection (Martin-Orozco et al., 2006). Enfin, l'étude structurale menée sur le domaine C-terminal de MgtC de *M. tuberculosis* indique que la protéine n'aurait pas de fonction intrinsèque liée à la prise en charge du Mg^{2+} mais aurait un rôle régulateur indirect dans la prise en charge de ce cation (Yang et al., 2012b).

Pathogènes	Complémentation du mutant <i>mgtC</i> de <i>S. Typhimurium</i> ^a	Survie intra-macrophagique (<i>ex vivo</i>) ^b	Modèle animal (<i>in vivo</i>) ^c	Défaut de croissance en milieu de culture de concentration faible en Mg^{2+} (<i>in vitro</i>) ^d	Références
<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium	<i>ex vivo</i> : oui <i>in vitro</i> : oui	Déficient	Souris (mortalité et survie à long terme)	< 50 μM	(Blanc-Potard and Groisman, 1997; Lawley et al., 2006; Rang et al., 2007)
<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhi	ND	Déficient	ND	10 μM	(Retamal et al., 2009)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ND	Déficient	Rat (CFU poumons)	< 45 μM	(Hunt et al., 2004; Maloney and Valvano, 2006)
<i>Brucella suis</i>	ND	Déficient	ND	< 60 μM	(Lavigne et al., 2005)
<i>Yersinia pestis</i>	<i>ex vivo</i> : oui <i>in vitro</i> : oui	Déficient	ND	ND	(Grabenstein et al., 2006; Rang et al., 2007)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>ex vivo</i> : partiel <i>in vitro</i> : partiel	Déficient	Souris (CFU poumons et rate)	< 50 μM	(Alix et al., 2006; Buchmeier et al., 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>ex vivo</i> : non <i>in vitro</i> : oui	ND	ND	ND	(Rang et al., 2007)

Tableau 1 – Tableau récapitulatif des phénotypes de mutants *mgtC* chez différents pathogènes (adapté de (Alix and Blanc-Potard, 2007)). ^aLe mutant *mgtC* de *S. Typhimurium* est complétement avec les protéines MgtC des pathogènes indiqués qui restaure ou non les fonctions de survie intramacrophagique (*ex vivo*) et de croissance en milieu carencé en Mg^{2+} (*in vitro*). Les expériences pour la survie intramacrophagique ont été menées dans des macrophages dérivés de souris J774 (Alix et al., 2006; Rang et al., 2007). ^bLes mutants *mgtC* sont déficients pour la survie intramacrophagique. Les expériences ont été menées dans des macrophages dérivés de souris J774 (Alix et al., 2006; Blanc-Potard and Groisman, 1997; Grabenstein et al., 2006; Lavigne et al., 2005; Rang et al., 2007) et RAW 264.7 (Maloney and Valvano, 2006) ou dans des monocytes humains (Buchmeier et al., 2000; Retamal et al., 2009). ^cLes mutants *mgtC* sont déficients pour une infection dans le modèle animal indiqué. ^dLes mutants *mgtC* sont déficients pour la croissance aux concentration en Mg^{2+} indiquées. Le défaut de croissance est accentué au fur et à mesure de la diminution de la concentration en Mg^{2+} .

2.6.3 Rôle de MgtC et ATP

Les pathogènes intracellulaires utilisent différentes stratégies pour survivre dans l'environnement acide des phagosomes notamment en sécrétant des facteurs de virulence qui ciblent l'ATPase vacuolaire de l'hôte et ainsi résister à l'acidité du phagosome. C'est le cas de *Legionella pneumophila* (Xu et al., 2010). *M. tuberculosis* affecte également l'ATPase vacuolaire de l'hôte pour inhiber l'acidification du phagosome (Wong et al., 2011). Chez *Salmonella*, l'expression de *mgtC* est modifiée en réponse aux changements du niveau d'ATP cytosolique et cette modification est nécessaire à la virulence du pathogène (Lee and Groisman, 2012). C'est dans ce contexte qu'une étude s'est intéressée à la F_1F_0 ATP synthase (Lee et al., 2013a).

2.6.3.1 La F_1F_0 ATP synthase

La F_1F_0 ATP synthase est responsable de la production d'ATP pour l'homéostasie énergétique de différentes espèces (Andries et al., 2005). Ce complexe couple la translocation de protons avec la synthèse/hydrolyse de l'ATP. Un complexe fonctionnel est critique pour les pathogènes intracellulaires qui demeurent dans un compartiment acide limité par une membrane. L'inactivation de l'*atpB*, le gène codant pour la sous-unité $F_0 a$ de la F_1F_0 ATP synthase atténue la virulence de *Salmonella* chez la souris et le poulet (Turner et al., 2003).

2.6.3.2 Mécanisme d'action de MgtC

La protéine MgtC de *M. tuberculosis* ne possède pas de fonction intrinsèque liée à la prise en charge ou à la liaison du Mg^{2+} mais pourrait agir en tant que facteur régulateur basé sur une interaction protéine-protéine pouvant être facilitée par son domaine ACT (Yang et al., 2012b). Récemment, il a été établi que le facteur de virulence MgtC avait pour cible la propre F_1F_0 ATP synthase de *Salmonella* et que cette interaction était critique dans la contribution de MgtC pour la pathogénicité de *Salmonella* (Lee et al., 2013a). MgtC se lie à la sous-unité $F_0 a$ de la F_1F_0 ATP synthase ce qui entraîne l'altération des capacités de la F_1F_0 ATP synthase et plus précisément ses capacités de translocation de protons et de couplage translocation de protons et synthèse d'ATP. Cela a pour conséquence que *Salmonella* est capable de maintenir son niveau d'ATP physiologique, son pH cytosolique et son potentiel de membrane. D'autre part, le résidu N92 de MgtC qui est essentiel aux fonctions de croissance en milieu carencé en Mg^{2+} mais aussi de survie dans les macrophages (Rang et al., 2007), a été identifié comme étant nécessaire à la liaison avec la F_1F_0 ATP synthase. La mutation de ce résidu entraîne la perte de l'interaction de la protéine mutée avec la F_1F_0 ATP synthase ainsi que l'inhibition de la translocation de protons et de l'hydrolyse de l'ATP (Lee et al., 2013a).

2.6.4 Hypothèse générale sur la fonction de MgtC

Le rôle de MgtC dans les macrophages n'est probablement pas le résultat de l'adaptation à une carence en Mg^{2+} puisqu'il a été montré que les deux fonctions étaient indépendantes l'une de l'autre (Rang et al., 2007).

On sait désormais que la protéine MgtC inhibe la propre F_1F_0 ATP synthase de *Salmonella* lui permettant de survivre dans les macrophages (Lee et al., 2013a).

La contribution de MgtC de *Salmonella* dans la survie intramacrophagique et la capacité du pathogène à causer une infection léthale chez la souris apparaissent être dépendantes de sa capacité à altérer l'activité de la F_1F_0 ATP synthase puisque le défaut de virulence d'un mutant de la sous-unité F_0a est inchangé après inactivation du gène *mgtC*.

De plus, il a été proposé que la protéine MgtC aurait une ou plusieurs autres cibles que la F_1F_0 ATP synthase car un mutant *mgtC* présente une hyperpolarisation de la membrane mais également parce que la surexpression du gène *mgtC* réduit très légèrement le niveau d'ATP chez un mutant *atpB* (Lee et al., 2013a).

Une étude plus ancienne avait suggéré que MgtC pourrait moduler l'activité d'une ATPase de type P eucaryote (Günzel et al., 2006). Pour cela, la protéine MgtC de *S. Typhimurium* a été exprimée de manière hétérologue dans des oocytes de *Xenopus laevis*. L'analyse électrophysiologique a démontré que l'expression de MgtC pouvait avoir un effet significatif sur l'homéostasie ionique cellulaire grâce à la modulation de l'activité d'une Na^+K^+ -ATPase. Les auteurs font l'hypothèse que lors d'une infection, MgtC pourrait servir de sous-unité de la Na^+K^+ -ATPase de la cellule hôte ou activer de manière directe ou indirecte l'ATPase de type P de l'hôte. Alix et Blanc-Potard, tout comme Lee et collaborateurs s'accordent à dire que cette hypothèse est difficilement envisageable notamment lors d'une infection, dans la mesure où MgtC est une protéine membranaire et qu'il faudrait que la protéine soit sécrétée, traverse le périplasme et la membrane externe de la bactérie pour aller s'insérer dans la membrane de l'hôte (Alix and Blanc-Potard, 2007; Lee et al., 2013a).

Par ailleurs, bien que MgtC ne soit pas directement un transporteur de Mg^{2+} (Günzel et al., 2006), la protéine pourrait agir en séquestrant et / ou en facilitant le transport de Mg^{2+} , par des transporteurs spécifiques (Rang et al., 2007). Plus généralement, MgtC pourrait promouvoir l'activité d'ATPases de type P, tel que le transporteur de magnésium MgtB (Alix and Blanc-Potard, 2007). Cette hypothèse est soutenue par le fait que MgtB est retrouvé dans des expériences de pull-down visant à identifier les protéines interagissant avec MgtC (Lee et al., 2013a) (figure 13).

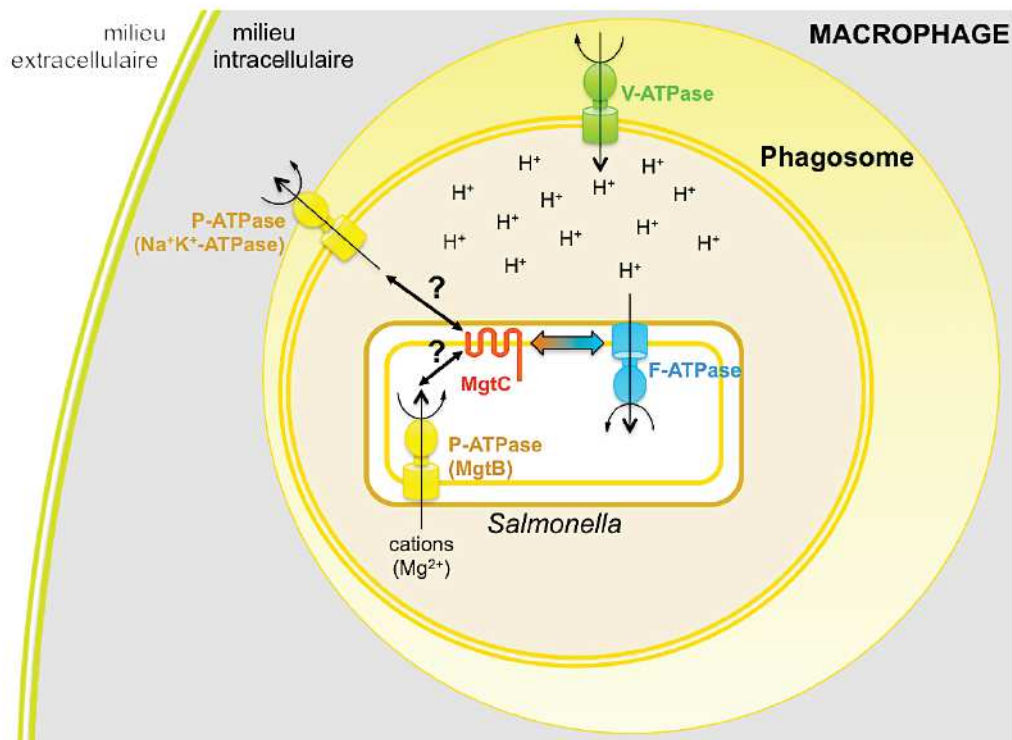


Figure 13 – Fonction de MgtC chez *S. Typhimurium*. Inhibition de la F_1F_0 ATP synthase de *Salmonella* par interaction avec MgtC entraînant une diminution du niveau d'ATP intracellulaire augmenté par le pH acide du phagosome. MgtC pourrait agir sur d'autres cibles de manière directe ou indirecte telles que les ATPase de type P de l'hôte ou de la bactérie comme le transporteur de cations MgtB.

2.7 Régulation de MgtC

Salmonella met en oeuvre toute une variété de mécanismes pour réguler la production de MgtC dans des conditions particulières et pour un temps limité (figure 14).

2.7.1 Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

2.7.1.1 Système régulateur PhoP-PhoQ et magnésium

a) Chez *S. Typhimurium*

Le système à deux composants PhoP-PhoQ contrôle l'expression de plusieurs facteurs de virulence chez *S. Typhimurium* (Miller et al., 1989). La protéine PhoQ est une kinase senseur qui répond à des changements environnementaux qui sont une faible concentration en Mg^{2+} , la présence de peptides antimicrobiens, ou encore un pH acide (Bader et al., 2005; Prost et al., 2007). Lors de ces changements, elle phosphoryle la protéine PhoP qui va se lier à un grand nombre de promoteurs dont le promoteur *mgtCBR* et ainsi initier leur transcription. Concernant le magnésium, MgtC est très fortement induit par une faible concentration en Mg^{2+} (Véscovi et al., 1996). La fixation du cation à la partie cytoplasmique de PhoQ au niveau d'une région riche en résidus acides (Cho et al., 2006) provoque un changement de conformation de PhoQ (Véscovi et al., 1996, 1997) qui enclenche l'activité phosphatase de la kinase.

b) Chez les autres pathogènes

En-dehors de *S. Typhimurium*, la régulation de MgtC a peu été étudiée. Cependant, la régulation par PhoP, protéine du système à deux composants PhoP-PhoQ, a été mise en évidence pour *S. Typhi* et *Y. pestis* (Grabenstein et al., 2006; Retamal et al., 2009). De la même manière que pour *S. Typhimurium*, l'expression du gène *mgtC* de *Y. pestis* est fortement induite par une concentration faible en Mg^{2+} (Véscovi et al., 1996; Zhou et al., 2006). Chez *M. tuberculosis*, MgtC n'est pas régulé par ce qui est considéré comme PhoP. Et l'induction du gène *mgtC* de *M. tuberculosis* par une concentration faible en Mg^{2+} est de faible amplitude (1,8 fois) alors que les gènes situés en amont de *mgtC* (Rv1806 à Rv1810) sont clairement induits (Walters et al., 2006; Yang et al., 2012b). Cela est à mettre en relation avec le fait que l'amplitude de l'expression génique chez *M. tuberculosis* est de manière générale beaucoup moins forte que chez *S. Typhimurium* ou *Y. pestis*. Cela suggère que la régulation de *mgtC* aurait évolué différemment en fonction des espèces. Il a été proposé que *mgtC* pourrait être régulé par le magnésium seulement quand il est en opéron avec le gène codant pour le transporteur de magnésium, MgtB (Yang et al., 2012b).

2.7.1.2 ARN messenger senseur d'ATP

Elle nécessite également un signal cytoplasmique détecté par l'ARN messenger (ARNm) leader *mgtCBR*. Le pH acide produit aussi un gradient de protons à travers la membrane interne ce qui a pour effet d'augmenter le niveau d'ATP intracellulaire. Une petite ORF *mgtM* est sensible aux variations du niveau d'ATP. Les séquences adjacentes et incluant *mgtM* ont la capacité d'adopter deux structures tige-boucle A et B. Lorsque le niveau d'ATP est élevé la structure tige-boucle A permettra l'expression de l'opéron *mgtCBR*. Inversement lorsque le niveau d'ATP est faible, la structure tige-boucle B diminuera l'expression de l'opéron *mgtCBR*. Le mécanisme de régulation par un ARNm senseur d'ATP a donc été montré pour *Salmonella* mais les données évoquées pour d'autres pathogènes laissent penser qu'une telle régulation pourrait être mise en place chez d'autres pathogènes ayant des gènes *mgtB* et *mgtC*. Cela n'exclue pas le fait que l'on puisse retrouver ce type de régulation chez des pathogènes n'ayant pas d'homologue *mgtB* comme par exemple *M. tuberculosis* (Lee and Groisman, 2012).

2.7.1.3 ARN antisens: AmgR

Par ailleurs, la protéine PhoP est à l'origine de la transcription de l'ARN antisens AmgR qui dégrade préférentiellement la portion *mgtC* du transcrit *mgtCBR*. Le promoteur de *amgR* est localisé dans la région intergénique qui sépare les gènes *mgtC* et *mgtB* (Lee and Groisman, 2010).

2.7.2 Régulation post-traductionnelle: le peptide MgtR

En plus des régulations décrites précédemment, il existe un peptide MgtR qui favorise la dégradation de la protéine MgtC. L'opéron *mgtCB* décrit initialement est composé d'une séquence supplémentaire située en aval et codant pour le peptide transmembranaire MgtR pour former l'opéron *mgtCBR*. Le peptide a pour cible la protéine MgtC. Les deux protéines ont la capacité d'interagir directement l'une avec l'autre. La dégradation de MgtC est dépendante d'une protéase FtsH fonctionnelle. Le mécanisme précis de dégradation de MgtC par FtsH reste inconnu à ce jour. Cependant, il a été proposé que l'interaction entre MgtC et MgtR pourrait modifier la conformation de la protéine et en faire un substrat pour la dégradation via FtsH (Alix and Blanc-Potard, 2008). Le peptide MgtR fera l'objet d'une description détaillée dans le chapitre suivant.

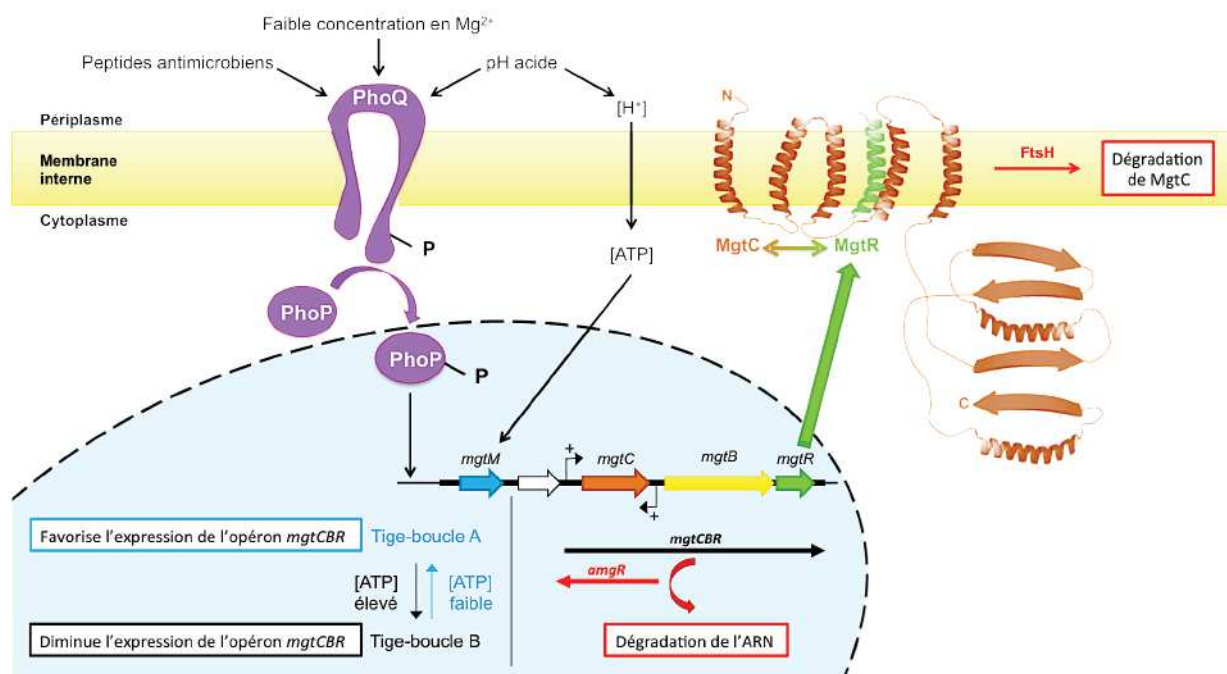


Figure 14 – Régulation de MgtC chez *S. Typhimurium*.

3 Les peptides régulateurs de la virulence bactérienne

Plusieurs classes de peptides fonctionnels et actifs ont été décrites chez les eucaryotes incluant les régulateurs de canaux ioniques, les chémoattracteurs, les hormones, les inhibiteurs de protéase, les cytotoxines et les antimicrobiens.

Chez les bactéries, alors que le rôle régulateur des petits ARNs non codants a largement été étudié au cours des dernières années (Waters and Storz, 2009), très peu d'études se sont penchées sur le rôle des petits ARNs codant pour des peptides.

Ces derniers se définissent par un cadre ouvert de lecture codant pour des protéines de moins de 50 acides aminés. Les quelques peptides fonctionnels qui ont été caractérisés sont principalement des peptides antimicrobiens ou des peptides signaux sécrétés. Pendant longtemps la bactérie à Gram positif *Bacillus subtilis* a été le principal modèle bactérien pour la caractérisation de peptides fonctionnels. Chez *B. subtilis*, les peptides jouent un rôle dans la sécrétion, la régulation cellulaire, les réponses au stress, le métabolisme, la traduction ou la sporulation (Zuber, 2001).

Dans la plupart des génomes, ces petites protéines ne sont pas annotées et ne sont pas détectées dans les études de protéomique. Une analyse génomique axée sur la recherche de petites séquences codantes chez les streptocoques a été nécessaire pour prédire l'existence de plusieurs peptides non annotés (Ibrahim et al., 2007). Dans le même contexte, malgré sa considérable utilisation comme modèle bactérien à Gram négatif, les gènes d'*Escherichia coli* codant pour de petites protéines ont largement été négligés jusqu'en 2008 où des recherches *in silico* menées sur son génome ont permis de révéler l'existence de peptides (Hemm et al., 2008). Des études chez *E. coli* et chez *S. Typhimurium* ont permis d'identifier de nouveaux peptides fonctionnels dont 50 % sont des peptides hydrophobes localisés au niveau de la membrane.

3.1 Les peptides fonctionnels membranaires

Ces peptides membranaires peuvent modifier l'activité et/ou la stabilité de protéines membranaires. Une interaction directe entre un peptide et une protéine membranaire pourrait induire des modifications structurales de la protéine ciblée et/ou entrer en compétition avec d'autres molécules. Certains sont régulés par des stress environnementaux et seraient impliqués dans l'adaptation à ces stress.

On distingue les peptides capables de réguler des protéines kinases senseurs (Lippa and Goulian, 2009), les peptides toxiques qui pourraient provoquer une déstabilisation membranaire et la mort cellulaire (Unoson and Wagner, 2008), les peptides qui pourraient moduler l'activité de transporteurs comme le transporteur KdpABC (Gaßel et al., 1999) ou encore les peptides qui modulent la dégradation de protéines membranaires comme le peptide régulateur MgtR (Alix and Blanc-Potard, 2008; Hemm et al., 2010; Hobbs et al., 2010) (figure 15).

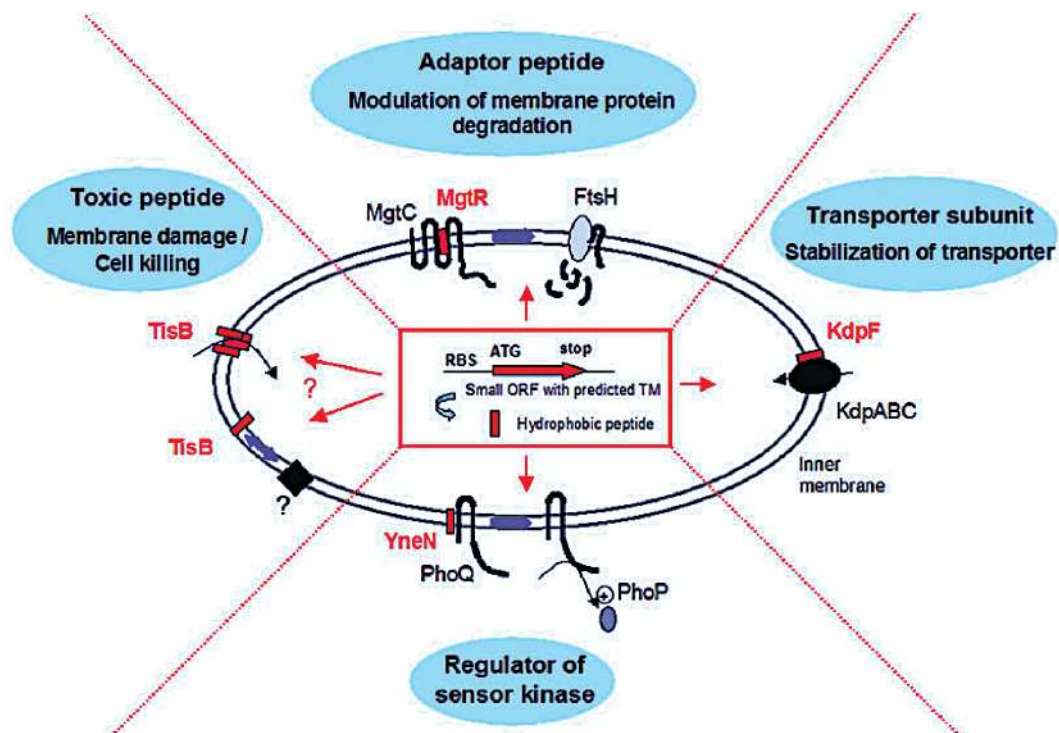


Figure 15 – Différents rôles des peptides membranaires hydrophobes chez les bactéries (Alix and Blanc-Potard, 2009).

Dans les paragraphes suivants je vais m'attarder sur les deux peptides auxquels je me suis intéressée dans le but d'évaluer leur capacité à moduler la virulence de bactéries pathogènes: MgtR, peptide régulateur de MgtC et KdpF.

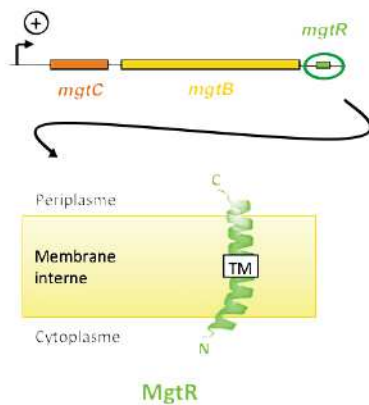
3.2 MgtR: peptide régulateur du facteur de virulence MgtC

3.2.1 Chez *Salmonella Typhimurium*

3.2.1.1 Découverte et caractérisation du peptide MgtR

Chez *S. Typhimurium*, le gène *mgtC* est co-transcrit avec *mgtB* qui code pour un transporteur de Mg^{2+} . Bien que l'expression de l'opéron *mgtCB* soit fortement induite dans un milieu carencé en magnésium, la protéine MgtC est difficilement détectable contrairement à la protéine MgtB. Cette régulation négative de MgtC est due à une région d'ADN située en aval du gène *mgtB*. Cette région code pour une petite ORF de 30 acides aminés appelée MgtR (Alix and Blanc-Potard, 2008). Le gène *mgtR* appartient à l'opéron *mgtCB*. MgtR est un peptide de la membrane interne de 3,5 kDa avec une courte extrémité N-terminale cytoplasmique, une hélice α trans-membranaire hautement hydrophobe et une courte extrémité C-terminale périplasmique (figure 16).

Figure 16 – Structure et expression de MgtR.



3.2.1.1 Mécanisme d'action de MgtR

a) Dégradation de MgtC par FtsH

Chez les bactéries à Gram négatif, un petit nombre de protéases ATP-dépendantes (protéases AAA+) dégradent des protéines spécifiques, généralement par interaction directe avec la protéine substrat (Baker and Sauer, 2006). FtsH, la seule protéase AAA+ liée à la membrane chez *Escherichia coli*, joue un rôle important dans le contrôle qualité des protéines de membrane (Ito and Akiyama, 2005). Cette protéase reconnaît des séquences peptidiques déstructurées qui sont typiquement localisées aux extrémités N- ou C-terminales de la protéine cible qu'elle dégrade ensuite progressivement. Des boucles internes contribuent également à la dégradation des substrats par la FtsH et par d'autres protéases AAA+ (Datta et al., 2005; Hoskins and Wickner, 2006; Okuno et al., 2006). Chez *S. Typhimurium*, MgtR favorise la dégradation de MgtC par un mécanisme dépendant de la présence d'une FtsH fonctionnelle.

Le mécanisme précis reste inconnu mais le segment transmembranaire de MgtR interagit directement avec MgtC dans un système de double hybride bactérien (BACHT). L'hypothèse est que cette interaction pourrait déplier MgtC et en faire alors un substrat pour la dégradation par une FtsH (Alix and Blanc-Potard, 2008) (figure 17).

Fonctionnellement, MgtR ressemble aux protéines adaptatrices qui modulent l'activité des protéases AAA+ en favorisant ou en inhibant l'interaction entre des substrats spécifiques et des protéases AAA+ (Baker and Sauer, 2006; Dougan et al., 2002). La plupart des protéines adaptatrices interagissent directement avec le substrat en complexe avec la protéine AAA+ partenaire et modulent généralement la reconnaissance du substrat. Les adaptateurs sont souvent de petites protéines (100 à 200 résidus) codées par des gènes rarement cotranscrits avec les gènes codant pour leurs cibles. Aucune protéine adaptatrice avec des domaines transmembranaires n'a été identifiée à ce jour. MgtR diffère donc de ces adaptateurs de par sa très petite taille (30 résidus), sa localisation membranaire et sa co-expression avec sa cible (Alix and Blanc-Potard, 2009).

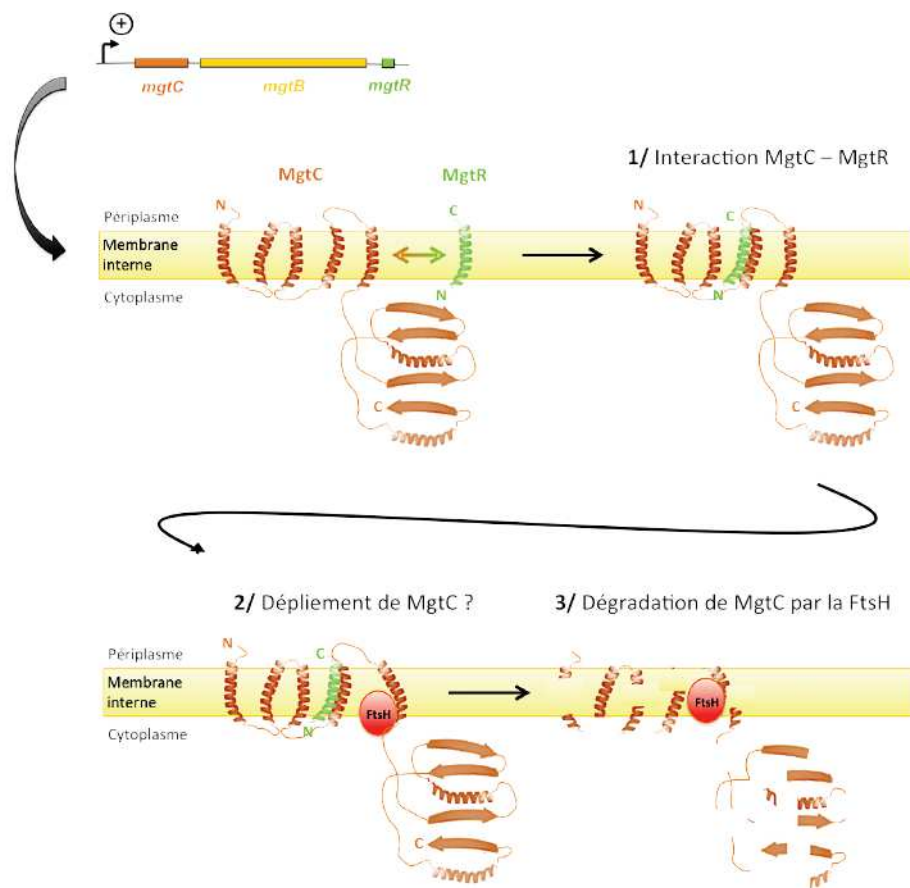


Figure 17 – Mécanisme d'action de MgtR.

b) Interaction MgtR – MgtC

Le système de BACHT a permis de démontrer que MgtR et MgtC interagissaient *in vivo*. La force de cette interaction est corrélée à la capacité de MgtR à médier la dégradation de MgtC. L'hydrophobicité et la structure en hélice α de MgtR sont importants pour sa fonction. L'interaction entre des hélices enchâssées dans la membrane reste difficile à prédire uniquement sur la base de la séquence en acides aminés. Cependant, certains motifs peuvent conduire à des interactions hélice-hélice (Schneider et al., 2007).

MgtR possède un motif Ala-coil caractérisé par 3 petits résidus dans une répétition d'heptades. Ce motif est impliqué dans l'association d'hélices enchâssées dans la membrane (Walters and DeGrado, 2006). Le motif Ala-coil de MgtR semble essentiel pour l'interaction MgtC-MgtR et la dégradation de MgtC médié par MgtR. Dans MgtR, les mutations A10L, S17I ou A24L n'empêchent pas l'expression ou la localisation à la membrane du peptide mais en revanche, abolissent complètement sa fonction de régulation et son interaction avec MgtC.

Des mutations dans MgtC ont également été identifiées empêchant sa régulation négative par MgtR et diminuant l'interaction MgtC – MgtR dans un système de BACHT. Ces mutations sont localisées dans la boucle cytoplasmique entre les 3^{ème} et 4^{ème} domaines transmembranaires (TM3 et TM4) de MgtC. Le contexte d'hélice transmembranaire est

essentiel pour sa correcte topologie et les boucles peuvent contribuer à la stabilité des interactions entre hélices (Schneider et al., 2007). Les mutations au niveau de la boucle pourraient donc perturber l'arrangement de l'hélice dans les TM3 et/ou TM4 et ainsi empêcher l'interaction avec MgtR. Par ailleurs, le TM4 de MgtC possède un motif Ala-coil. Cependant, les mutagénèses de simples résidus ne montre pas de contribution forte de ce motif dans l'interaction avec MgtR. Seule la mutation G108A a un effet mais qui n'est pas très prononcé. Le domaine d'interaction de MgtC serait complexe et impliquerait plus qu'un seul domaine TM (Alix and Blanc-Potard, 2008) (figure 18).

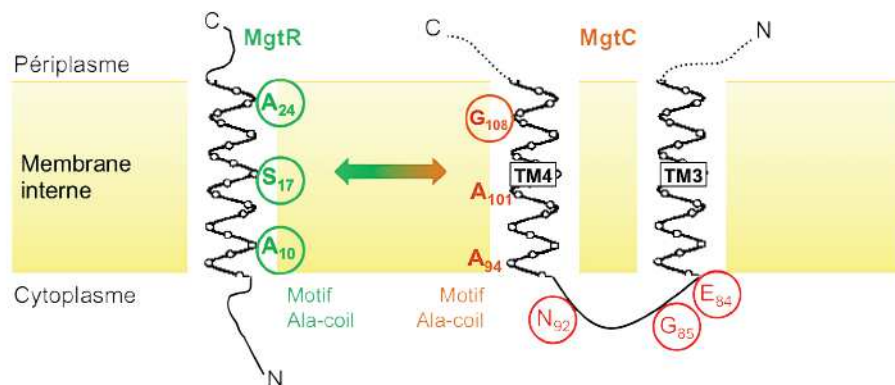


Figure 18 – Interaction MgtR – MgtC. Les résidus entourés en vert sur le peptide MgtR sont indispensables à l'interaction avec MgtC. La mutation des résidus entourés sur MgtC entraînent une diminution de l'interaction mais n'abolit pas cette interaction avec un effet mineur pour la mutation des résidus N92 et G108.

c) Autre cible de MgtR: le transporteur de magnésium MgtA

MgtA est l'un des trois transporteurs de magnésium identifié chez *S. Typhimurium* (Smith and Maguire, 1998). De la même manière que pour l'opéron *mgtCBR*, l'expression de MgtA est induite uniquement dans des conditions de carence en Mg^{2+} (Snively et al., 1989, 1991). Récemment, une étude a montré que MgtA est également une protéine sous le contrôle direct du peptide MgtR. Le peptide limite le niveau de la protéine MgtA à de faibles concentrations en Mg^{2+} . L'expression de MgtA est augmentée dans une souche de *Salmonella* où le gène *mgtR* est délété, elle diminue dans une souche qui surexprime MgtR. Des expériences de BACHT ont révélé que MgtR se liait également à la protéine MgtA *in vivo*, sans affecter la transcription du gène *mgtA*. Le transporteur MgtA lié au peptide MgtR pourrait suivre une voie protéolytique similaire à celle proposée pour MgtC (Choi et al., 2012). En revanche, MgtR n'a aucun effet sur la stabilité du transporteur de magnésium MgtB (Alix and Blanc-Potard, 2008; Lee and Groisman, 2010).

3.2.1.2 Rôle physiologique de MgtR lors d'une infection: régulation de MgtC

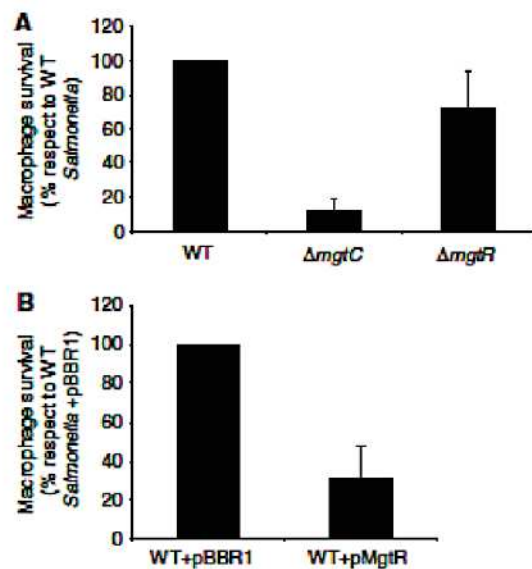
Le fait que MgtC cible la F_1F_0 ATP synthase (Lee et al., 2013a) pourrait expliquer pourquoi *Salmonella* a développé des mécanismes variés pour restreindre la production de ce facteur de virulence à des conditions particulières et pour une période de temps limitée. La

régulation négative par le peptide MgtR pourrait notamment être importante pour limiter la quantité de MgtC dans certaines conditions où le gène *mgtC* est fortement exprimé.

L'investigation du phénotype de croissance d'un mutant *mgtR* dans les macrophages a permis de mettre en évidence que MgtR n'avait pas un rôle majeur durant l'infection. Le mutant *mgtR* est très légèrement atténué pour la croissance intra-macrophagique. En revanche, la surexpression de MgtR dans une souche sauvage de *S. Typhimurium* réduit significativement la croissance intra-macrophagique de la souche. Cela pourrait être lié à un fort niveau de dégradation du facteur de virulence MgtC (figure 19) (Alix and Blanc-Potard, 2008).

Figure 19 – Rôle de MgtR chez *S. Typhimurium* dans la croissance intra-macrophagique (Alix and Blanc-Potard, 2008). La réplication des souches de *Salmonella* dans les macrophages J774 a été évaluée 18 h après infection. Les données représentent la moyenne des valeurs +SE d'au moins trois expériences indépendantes.

(A) Analyse du mutant *mgtR* ($\Delta mgtR$) en comparaison à une souche sauvage (WT) et un mutant *mgtC* ($\Delta mgtC$). Les valeurs présentées sont un pourcentage relatif à la souche sauvage *S. Typhimurium* 14028s. **(B)** Analyse d'une souche sauvage de *Salmonella* qui surexprime MgtR (WT+pMgtR). Les valeurs présentées sont un pourcentage relatif à la souche sauvage *S. Typhimurium* 14028s avec le vecteur pBBR1MCS.



3.2.2 MgtR et autres pathogènes

MgtR est conservé chez plusieurs sérovars de *S. enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Typhi* et *S. choleraesuis*) mais est absent d'autres espèces bactériennes qui codent pour MgtC (Alix and Blanc-Potard, 2008). Ainsi, bien que MgtC de *M. tuberculosis* soit hautement homologue à la protéine MgtC de *S. Typhimurium*, il ne semble pas exister chez *M. tuberculosis* d'homologue de MgtR. Cependant, il est possible que le peptide MgtR de *S. Typhimurium* puisse interagir avec la protéine MgtC de *M. tuberculosis* puisqu'une étude a démontré la formation d'un hétérodimère entre MgtR de *S. Typhimurium* et l'hélice transmembranaire 4 de MgtC de *M. tuberculosis* (Jean-Francois et al., 2014). À partir de contraintes expérimentales, un modèle structural de cet hétérodimère a été développé *in silico*. Même si l'étude est réalisée seulement avec le domaine TM4 isolé, d'après les auteurs, MgtR apparaît idéalement situé dans la membrane pour influencer la fonctionnalité de MgtC. Chez la protéine MgtC de *S. Typhimurium*, le résidu conservé C99 est critique pour la réplication intra-macrophagique (Rang et al., 2007). Le modèle structural obtenu suggère comment MgtR de *S. Typhimurium* pourrait interférer avec la fonctionnalité et l'activité de virulence au niveau du résidu équivalent (C98) de MgtC de *M. tuberculosis* (figure 20) (Jean-Francois et al., 2014).

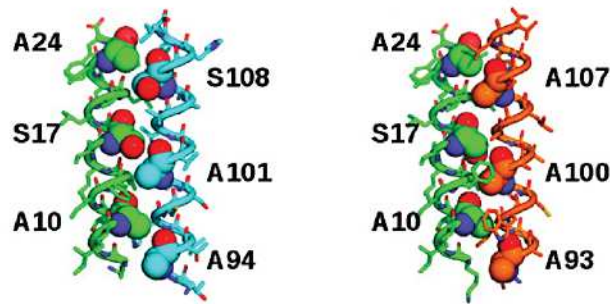


Figure 20 – Modèles structuraux du dimère MgtR/MgtC TM4 généré par RosettaDock (Jean-Francois et al., 2014). L'hélice verte est MgtR et les hélices bleues et oranges sont le domaine TM4 de MgtC respectivement dans les clusters majeurs et mineurs. Les résidus des motifs Ala-coil sont représentés par des sphères et leur position est indiquée en noir. Les autres résidus sont représentés par des bâtonnets.

3.3 Autre peptide régulateur de la virulence bactérienne: KdpF

Chez *M. tuberculosis* seulement deux peptides membranaires ont été identifiés dont KdpF (Gannoun-Zaki et al., 2013; Veyron-Churlet et al., 2011). C'est un peptide de 30 acides aminés qui a été utilisé pour établir les conditions d'une analyse structurale des domaines transmembranaires de *M. tuberculosis* (Hu et al., 2007).

Le gène *kdpF* est le premier gène de l'opéron *kdpFABC*. Le système Kdp a été très étudié chez *E. coli*. Il s'agit d'une ATPase de type P qui transporte les ions potassium (K^+) avec une haute affinité (Greie, 2011; Greie and Altendorf, 2007). Chez *E. coli* le peptide KdpF a été proposé pour être une sous-unité impliquée dans la stabilisation du complexe KdpABC *in vitro* (Gaßel et al., 1999). Cependant, le rôle de KdpF *in vivo* reste évasif puisqu'il n'est pas essentiel pour la fonction du transporteur Kdp (Gaßel et al., 1999).

L'expression de l'opéron *kdpFABC* est dépendant de la concentration externe en K^+ aussi bien chez *E. coli* que chez *M. tuberculosis* ou *S. Typhimurium* (Frymier et al., 1997; Greie, 2011; Greie and Altendorf, 2007; Hamann et al., 2008; Steyn et al., 2003).

L'opéron *kdpFABC* est régulé par le système à deux composants KdpDE lui-même codé par un opéron adjacent. Ce système semble jouer un rôle dans la virulence de plusieurs bactéries pathogènes (Freeman et al., 2013). Il a un rôle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* puisqu'une souche où les gènes *kdpDE* sont délétés, a une virulence augmentée (Parish et al., 2003). Chez *Salmonella*, le système à deux composants KdpDE joue aussi un rôle dans la pathogénicité. Une souche de *S. Typhimurium* où les gènes *kdpDE* sont délétés est atténuée dans le modèle nématode et présente une survie diminuée dans les macrophages (Alegado et al., 2011).

Par ailleurs, la surexpression de KdpF chez *M. bovis* BCG diminue la croissance intra-macrophagique (figure 21) et altère la morphologie des cordes. Bien que le mécanisme soit inconnu, il pourrait être relié au fait que le peptide KdpF est capable d'interagir avec le senseur KdpD. Le mécanisme impliqué pourrait aussi être dû à l'interaction de KdpF avec d'autres protéines. KdpF est capable d'interagir avec MmpL7, une protéine de membrane

qui a clairement été impliquée dans la virulence de *M. tuberculosis* (Cox et al., 1999; Domenech et al., 2005). Cette interaction pourrait entraîner une modification de la paroi cellulaire. Une interaction avec le complexe KdpABC pourrait quant à elle moduler le transport de K^+ (figure 22) (Gannoun-Zaki et al., 2013). Par ailleurs, des données récentes suggèrent une sensibilité accrue au stress oxydatif (L. Gannoun). KdpF apparaît donc comme un peptide membranaire attractif puisqu'il présente des fonctions anti-virulence lors d'une surexpression chez les mycobactéries.

Figure 21 – Cinétique de croissance de *M. bovis* BCG surexprimant *kdpF* dans des macrophages murins BMDM (Gannoun-Zaki et al. 2013).

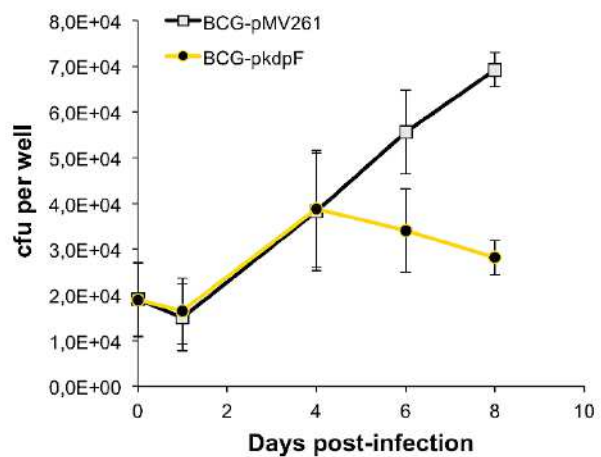
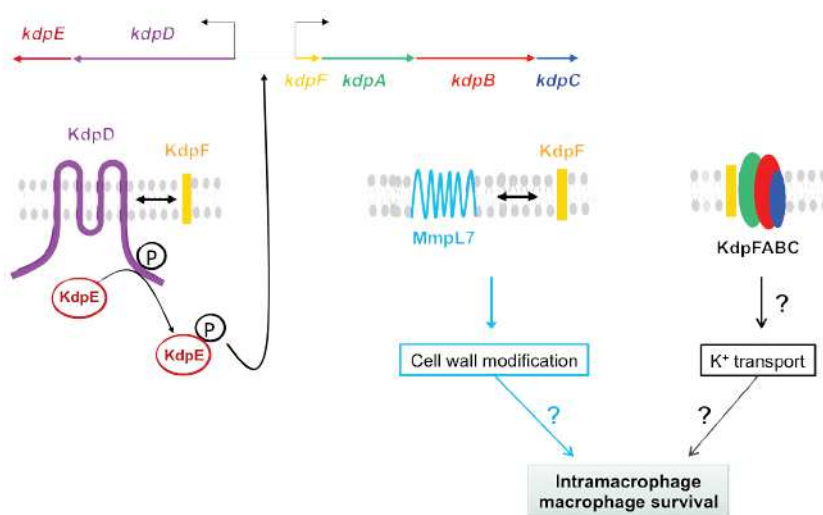


Figure 22 – Modulation de la virulence mycobactérienne par le peptide KdpF.

L'interaction observée entre KdpD et KdpF ne semble pas moduler significativement l'expression des gènes *kdp*. L'effet sur la multiplication intramacrophagique pourrait être due à la modulation de l'expression d'autres gènes régulés par le système KdpDE ou à l'interaction de KdpF avec d'autres protéines que KdpD tels que MmpL7 ou le complexe KdpFABC.



4 Les modèles d'infection

Face aux problèmes de santé publique évoqués dans le premier chapitre, mon travail s'est basé sur une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à cibler un facteur de virulence. Je me suis donc intéressée à la fois à la cible (le facteur de virulence MgtC) et à une potentielle molécule thérapeutique (le peptide régulateur MgtR qui cible la protéine MgtC), mais plus précisément aux propriétés anti-virulence de MgtR.

L'étude de ces molécules nécessite l'utilisation de modèles d'infection aussi bien cellulaires qu'animaux. Ce chapitre est donc consacré à la description des modèles d'infection utilisés pendant la thèse.

4.1 Mycobactéries et cellules phagocytaires

Le système immunitaire chez l'homme et de manière plus générale, chez les vertébrés, est très complexe. On distingue l'immunité innée et l'immunité adaptative. Le système immunitaire inné permet à l'organisme de se défendre contre les agents infectieux de manière rapide et non spécifique, à l'inverse du système immunitaire adaptatif qui confère une protection plus tardive mais plus durable et spécifique. Nous allons nous intéresser aux cellules phagocytaires qui font parties de l'immunité innée et plus particulièrement aux macrophages et aux polynucléaires neutrophiles plus couramment appelés neutrophiles. Ces leucocytes ont la particularité de ne pas être associés à un organe ou un tissu particulier. Ils peuvent se déplacer librement dans l'organisme et ont la capacité d'éliminer les corps étrangers de l'organisme grâce à de nombreux mécanismes.

4.1.1 Macrophages

Les macrophages représentent la niche principale parmi les cellules hôtes pour la croissance et la survie de *M. tuberculosis*. À travers l'expression de nombreux récepteurs de la surface cellulaire, le macrophage reconnaît, lie et internalise les particules étrangères, incluant les mycobactéries. Cela initie un processus complexe de contrôle de la croissance intracellulaire des bactéries via une cascade de signaux qui résultent de la libération de médiateurs antimicrobiens et de médiateurs de l'immunité innée (Kaisho and Akira, 2000).

4.1.1.1 Phagocytose normale et devenir du phagosome

Lors d'une phagocytose normale les mouvements de la membrane associés à l'actine permettent d'ingérer les bactéries via des récepteurs. Les vacuoles intracellulaires ainsi formées et appelées phagosomes subissent une série d'évènements de fission et de fusion qui modifient la composition de leur membrane limitante et de leur contenu par un processus qui ressemble à la progression de la voie d'endocytose et qui est étroitement lié à cette voie. Ce processus constitue la maturation du phagosome et permet à la vacuole d'acquérir des propriétés de dégradation et donc de développer sa fonction microbicide (Berón et al., 1995; Tjelle et al., 2000) (figure 23).

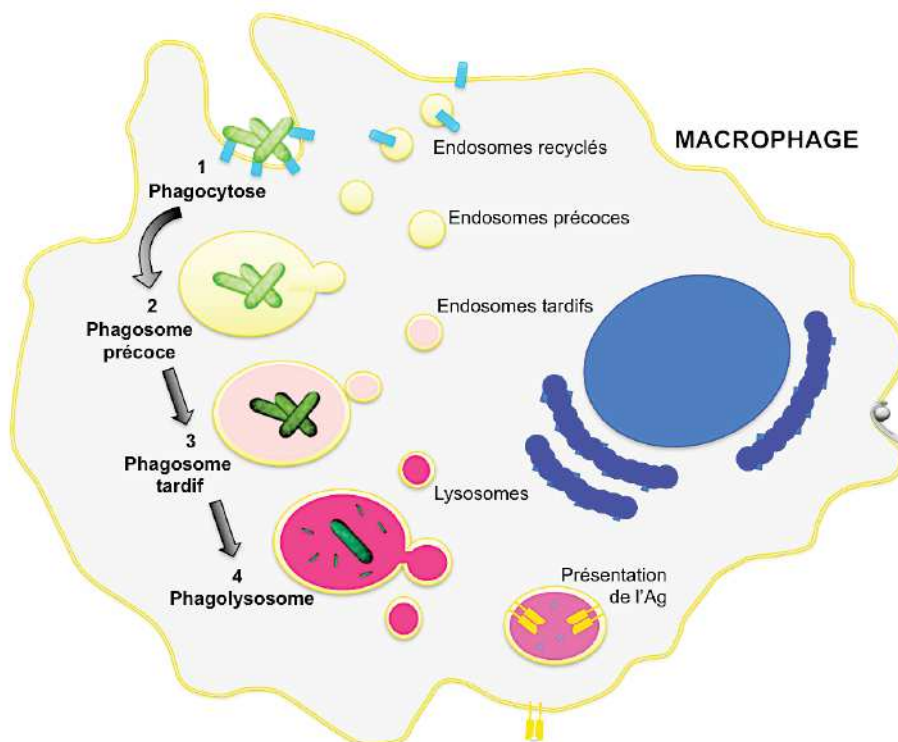


Figure 23 – Représentation schématique de la maturation du phagosome.

La phagocytose est typiquement définie par la prise en charge de particules de plus de 0,5 μm (Chen et al., 1997). Elle est initiée via l'implication de récepteur ou via des ligands microbiens ou des ligands de l'hôte déposés à la surface du pathogène. Il existe deux types de récepteurs PRRs (pattern-recognition receptors) à la surface du macrophage. Lorsque les PRRs reconnaissent des molécules PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) à la surface des micro-organismes, ils sont dits non-opsoniques. Lorsqu'ils reconnaissent des molécules de l'hôte déposées à la surface des micro-organismes, ils sont dits opsoniques. Ce type de récepteur comprend notamment le CR3 (complement receptor 3) qui reconnaît les particules opsonisées par le complément C3bi mais aussi le Fc γ R qui reconnaît les particules opsonisées par les IgG (Flannagan et al., 2012; Vieira et al., 2002).

Une fois internalisé le contenu du phagosome doit être digéré. Pour les phagocytes présentateurs de l'antigène (macrophages et cellules dendritiques) les antigènes dérivent de la dégradation des micro-organismes qui sont présentées dans un second temps à la surface du phagocyte. Pour achever cette dégradation, les phagosomes passent par une série d'étapes de maturation en interagissant avec les endosomes précoces, tardifs puis les lysosomes. Ces interactions permettent au phagosome d'acquérir de nouvelles molécules mais également de perdre des molécules devenues inutiles via le tri et le recyclage des endosomes créant ainsi une dynamique de la membrane du phagosome (Kinchin and Ravichandran, 2008).

Le phagosome précoce perd rapidement la membrane plasmique. Il interagit avec les endosomes précoces et recyclés. Ces interactions permettent notamment le recrutement de la GTPase Rab5 à la membrane du phagosome. Ainsi un certain nombre de marqueurs

spécifiques des endosomes précoces (EEA1, Rab5) vont être transférés au phagosome précoce. Dix à trente minutes après sa formation, le phagosome perd les caractéristiques des endosomes précoces et recrute les marqueurs des endosomes tardifs (Rab7, récepteur mannose-6-phosphate) (Pitt et al., 1992). Le pH interne s'est acidifié autour de 5,5. On parle alors de phagosome tardif. Le phagolysosome est finalement formé quand les phagosomes tardifs fusionnent avec les lysosomes qui sont remplis d'hydrolases (nucléases, lipases, glycosidases, protéases et cathepsines). Le pH interne devient alors très acide ($\text{pH} \approx 4,5$). Les lysosomes amènent aussi les protéines membranaires LAMP et l'ATPase de type V. Cette dernière est une pompe à protons qui concourt à l'acidification du contenu phagolysosomal. Enfin, les phagolysosomes peuvent éventuellement fusionner avec des vésicules du Golgi portant le CMH-II pour permettre la présentation des peptides antigéniques formés (Smith and May, 2013).

4.1.1.2 Principaux mécanismes de défense de l'hôte contre les bactéries

On distingue deux types de systèmes antimicrobiens chez le macrophage. Les systèmes dépendants de l'oxygène qui impliquent la production d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène [1]. Il existe ensuite des systèmes indépendants de l'oxygène qui sont aussi multifactoriels et qui peuvent impliquer la privation d'éléments nutritifs [2], l'acidification de la vacuole phagolysosomale [3], la production de défensines et d'autres peptides antimicrobiens [4] et l'action d'enzymes hydrolytiques lysosomales [5] (figure 24).

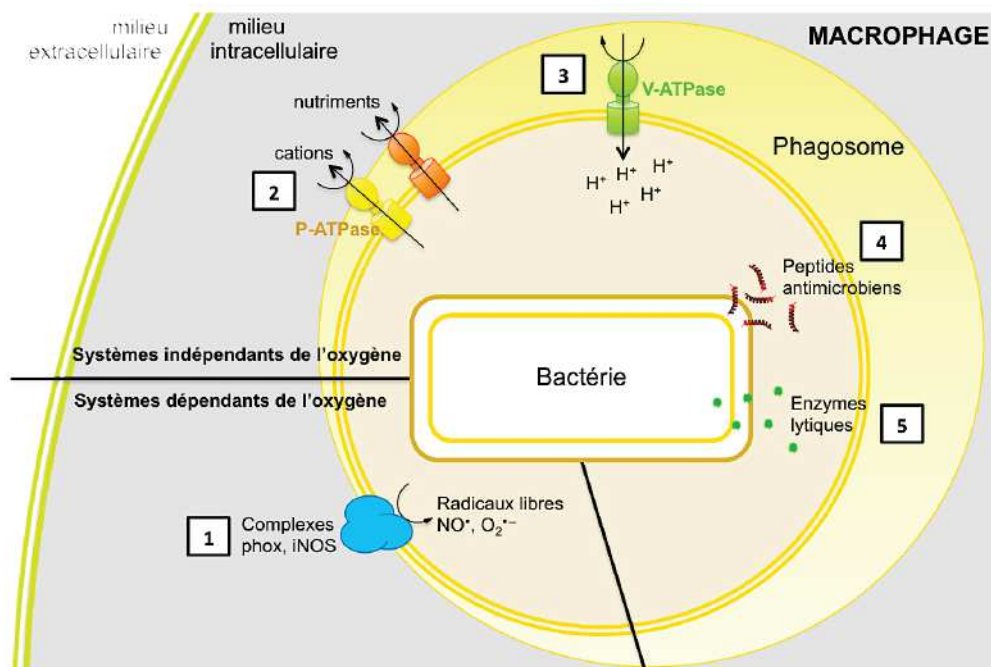


Figure 24 - Systèmes antimicrobiens des macrophages.

a) Production de radicaux libres

Les plus importants systèmes antimicrobiens des cellules phagocytaires sont les voies de la NADPH phagocyte oxydase (phox) et de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) qui sont responsables de la génération des radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$), respectivement. Bien que ces systèmes dépendent tout les deux de la NADPH et de l'oxygène et fonctionnent parfois ensemble, la phox et l'iNOS sont des complexes enzymatiques séparés avec une régulation indépendante. Le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) essentiels pour la fonction microbicide du phagocyte (Fang, 2004; Nunes et al., 2013). Les sous-unités de phox sont régulées notamment par l'action de cytokines inflammatoires ($TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, GM-CSF) et de produits bactériens comme le LPS sur leurs transcriptions ou leurs activations (Fang, 2004). Le radical oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$) peut inhiber la réplication de l'ADN bactérien (Schapiro et al., 2003). L'activation de la transcription de iNOS est l'aboutissement d'une cascade de réaction déclenchée par la détection de facteurs microbiens et de cytokines ($TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$) par les récepteurs du macrophage (Fang, 2004; Mattila and Thomas, 2014).

b) Privation d'éléments nutritifs ou excès de métaux toxiques

Un autre système antimicrobien consiste à réduire l'accès des pathogènes aux éléments nutritifs importants à travers une isolation spatiale et des mécanismes moléculaires actifs de privation de nutriments. Ainsi, le fer et le manganèse sont activement exclus du phagosome par l'action d'un transporteur de métaux Nramp1 (Natural Resistance-Associated Membrane Protein) également connu sous le nom de SLC11A1 (Fortier et al., 2005). L'exclusion du fer et du manganèse de la lumière phagosomale par Nramp1 a longtemps été considérée comme un système modèle pour la métallobiologie de l'immunité antimicrobienne. En revanche, le rôle des autres nutriments, incluant les ions métalliques tels que le cuivre et le zinc, bien que reconnu importants pour l'immunité (Maggini et al., 2007; Solomons, 2007), est resté opaque dans le contexte des interactions hôte-pathogène. Cependant, des études récentes fournissent un certain nombre d'évidences argumentant pour l'utilisation de nutriments métalliques par les cellules immunitaires afin d'empoisonner les pathogènes invasifs (Botella et al., 2012; Russell, 2011; Shafeeq et al., 2011). Concernant le magnésium, comme indiqué précédemment, des mesures directes ont révélé que sa concentration était stable dans les phagosomes à un temps précoce (environ 1 mM) (Martín-Orozco et al., 2006). Par ailleurs, des études ont montré une carence en d'autres nutriments indispensables à la multiplication bactérienne. Il s'agit des acides aminés, pyrimidines, purines et vitamines (Appelberg, 2006; Kohler et al., 2002).

c) Baisse du pH intravacuolaire

La capacité d'acidifier son contenu est fondamentale pour la physiologie du phagosome. Pour affecter directement la croissance bactérienne l'acidification augmente l'efficacité des autres composants microbicides. Par exemple, de nombreuses enzymes hydrolytiques sont pH sensibles et requièrent des conditions acides pour une activité optimale. La translocation de protons permet également la persistance de l'activité de la phox et fournit un substrat pour la génération des ROS dans la vacuole phagocytaire (Fialkow et al., 2007). L'acidification du phagosome peut aussi directement contribuer au processus de maturation en régulant les événements de trafic membranaire (Steinberg et al., 2007). Initialement, le milieu intravacuolaire est légèrement alcalin. Puis il subit une acidification graduelle, typiquement jusqu'à des valeurs de pH inférieures à 5,5 (Jankowski and Grinstein, 2002; Lukacs et al., 1991). Le degré d'acidification peut cependant varier entre neutrophiles et macrophages. Les phagosomes de macrophages affichent une acidification forte et rapide tandis que les phagosomes de neutrophiles initialement alcalins présentent par la suite une acidification modérée (Jankowski et al., 2002). Les taux variables de consommation de protons par la phox justifieraient la disparité du pH entre les types cellulaires (Steinberg et al., 2007). Par ailleurs, ce processus d'acidification est dépendant d'une ATPase vacuolaire (V-ATPase) (Lukacs et al., 1990), un complexe enzymatique multimérique associé à la membrane phagosomale. Cette V-ATPase est une pompe active qui transforme l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en un mouvement de protons à travers la membrane du phagosome (Steinberg et al., 2007). Elle peut être spécifiquement inhibée par une drogue, la bafilomycine A1, ce qui aura pour conséquence le blocage de l'acidification intravacuolaire (Yoshimori et al., 1991).

d) Production de peptides antimicrobiens

Le premier peptide antimicrobien (PAM) a été décrit au début des années 80 (Steiner et al., 1981). Depuis, on dénombre plus de 2400 PAMs dont la majorité proviennent des eucaryotes (<http://aps.unmc.edu/AP/>). Les PAMs sont des composés de la réponse immunitaire conservés au cours de l'évolution et retrouvés chez de nombreux organismes (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Zasloff, 2002). Ils sont présents dans les granulations des cellules phagocytaires et sont capables d'éliminer un large spectre de micro-organismes dont les bactéries. En-dehors de leurs actions antimicrobiennes directes, les PAMs interagissent aussi avec l'hôte lui-même: ils peuvent être chemo-attractants pour les neutrophiles et les monocytes, moduler la production de cytokine ou encore lier et neutraliser le LPS (Wassing et al., 2014). Les deux classes majeures de PAMs communément retrouvées chez l'homme sont les cathélicidines et les défensines. Elles se différencient par leur structure: les premières ont une structure en hélice α tandis que les défensines ont une structure en feuillet β stabilisé par trois ponts disulfures. En revanche, de manière similaire, les deux types de PAM nécessitent

une ou plusieurs étapes protéolytiques pour générer un peptide mature (Gennaro and Zanetti, 2000; White et al., 1995).

e) Production d'enzymes lytiques

Le dernier mécanisme utilisé pour éliminer les bactéries fait appel à plus de 50 hydrolases acides lysosomales différentes. Ainsi, l'action concertée de protéases, lipase, nucléases, glycosidases et phosphatases permet la complète désintégration d'un grand nombre de structures complexes tels que les micro-organismes morts ou mourants. La cathepsine qui appartient à la famille des enzymes lysosomales est composée de sérine protéases, d'aspartate protéases et de cystéine protéases. Toutes ces enzymes ont des activités antimicrobiennes directes (Flannagan et al., 2012).

4.1.1.3 Phagocytose des mycobactéries et devenir dans le macrophage

De nombreux pathogènes ont développé des mécanismes pour interrompre, arrêter ou rediriger la voie entière de maturation du phagosome.

Lors d'une infection mycobactérienne, les voies de signalisation du phagosome sont altérées grâce à de multiples mécanismes de manière à perturber les activités microbicides de la cellule hôte et/ou les fonctions du phagosome (Guirado et al., 2013; Reiner, 1994). *M. tuberculosis* est ainsi capable de stopper la maturation normale du phagosome (Via et al., 1997). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence que les étapes précoces dans la maturation du phagosome n'étaient pas altérées. En effet, lors de l'internalisation, l'étape d'interaction du phagosome avec l'endosome précoce est conservée chez les mycobactéries (Clemens and Horwitz, 1996; Russell et al., 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1996). Certaines caractéristiques des endosomes précoces sont conservées, notamment la GTPase Rab5, alors que la GTPase Rab7, spécifique des endosomes tardifs, n'est pas retrouvé au niveau du phagosome (Via et al., 1997). De la même manière, l'interaction du phagosome avec les endosomes recyclés n'est pas non plus altérée (Clemens and Horwitz, 1996). D'autres études suggèrent que *M. tuberculosis* serait capable de s'échapper du phagosome (Pieters, 2008; Simeone et al., 2012).

a) Mécanismes de contournement et de modification de la maturation du phagosome

Les mécanismes impliqués concernent majoritairement les étapes tardives de la maturation du phagosome et les molécules impliquées dans ces processus proviennent à la fois de l'hôte et des mycobactéries (Nguyen and Pieters, 2005).

L'inhibition de la maturation complète du phagosome implique le défaut de recrutement des protéines effectrices de la GTPase Rab5 à la membrane phagosomale tel que l'autoantigène 1 endosomal précoce (EEA1) (Fratti et al., 2001). EEA1 est nécessaire pour l'apport d'hydrolases lysosomales et d'ATPases vacuolaires (Fratti et al., 2001; Sturgill-Koszycki et al., 1994). La Coronin 1, une protéine de l'hôte uniquement exprimée dans les leucocytes,

est également impliquée dans la prévention de la maturation du phagosome (Ferrari et al., 1999; Tailleux et al., 2003). Plus récemment, des études se sont focalisées sur l'utilisation des réserves d'acides gras de l'hôte et leur métabolisme pour la persistance de *M. tuberculosis* dans le phagosome (Daniel et al., 2011; Lee et al., 2013b; Peyron et al., 2008).

Un grand nombre de composants de la paroi mycobactérienne dont certains sont représentés dans la figure 5, sont impliqués dans ces mécanismes de contournement et de modification de la maturation du phagosome.

Le phosphatidylinositol lipoarabinomannane (ManLAM) de *M. tuberculosis* serait capable de modifier le trafic et la fusion phagolysosomale (Chan et al., 1991; Chua and Deretic, 2004) en altérant l'action du PIP3 qui est un lipide critique de l'hôte, intermédiaire dans le recrutement de GTPases vacuolaires au phagosome (Roth, 2004).

Plusieurs glycolipides de la paroi mycobactérienne ont été identifiés comme étant impliqués dans la phagocytose des mycobactéries (Astarie-Dequeker et al., 2010; Tabouret et al., 2010). Les lipooligosaccharides (LOS) sont ainsi capables de moduler la phagocytose de *M. marinum* (Alibaud et al., 2014; Ren et al., 2007). D'autres molécules associées à la paroi tels que les diacyltrehaloses (DAT) et les polyacyltrehaloses (PAT), les phtiocerol dimycocerosates (DIM) ou les glycolipides phénoliques (PGL) sont impliquées dans la phagocytose chez *M. tuberculosis* ou *M. leprae* (Astarie-Dequeker et al., 2009; Rousseau et al., 2003; Schlesinger and Horwitz, 1991; Vilcheze et al., 2014).

Les phosphatidylinositol mannose (PIMs), plus communément retrouvés chez des mycobactéries moins virulentes que *M. tuberculosis*, peuvent quant à eux promouvoir la fusion du phagosome avec les endosomes précoces (Vergne et al., 2004).

Enfin, des glycolipides tel que le trehalose dimycolate (TDM) peuvent interférer avec le trafic membranaire et donc interférer dans la maturation du phagosome (Kan-Sutton et al., 2009).

b) Echappement du phagosome vers le cytosol et conséquences

De nombreuses études ont fourni des preuves que *M. tuberculosis* entrait et se divisait dans les phagosomes des macrophages (Guirado et al., 2013). Cependant, une controverse persiste à propos de l'échappement du pathogène du phagosome vers le cytosol (Welin and Lerm, 2012). Des images de microscopie électroniques ont montré des bacilles dépourvus de membrane phagosomale quelques jours après infections (Myrvik et al., 1984). Chez *M. marinum*, il a clairement été établi que le pathogène avait la capacité d'échapper au phagosome vers le cytosol grâce à un système de propulsion via l'actine et de manière similaire à *Listeria* (Stamm et al., 2003). D'autres ont montré la nécessité du locus RD1 pour cet échappement (Smith et al., 2008).

Par ailleurs, aussi bien *M. tuberculosis* que *M. marinum* seraient éjectés de l'amibe *Dictyostelium* à travers une structure d'actine appelée éjectosome, utilisant des éléments de RD1 (Hagedorn et al., 2009). *M. tuberculosis* peut également s'échapper du phagosome des

cellules dendritiques et des macrophages après plusieurs jours en cultures (van der Wel et al., 2007). Ce phénomène a été identifié comme dépendant de RD1 et ESAT-6 (Houben et al., 2012).

Plusieurs études ont donc proposé que *M. tuberculosis* pourrait être présent dans le cytosol quelques jours après infection dans le but de s'échapper des cellules et de se propager vers d'autres cellules adjacentes (Guirado et al., 2013). En effet, *M. tuberculosis* et *M. marinum* sont capables d'induire une rupture du phagosome qui est suivie de près par la mort cellulaire par nécrose des macrophages infectés (Simeone et al., 2012). Récemment, il a été montré que les capacités de *M. tuberculosis* à réduire l'acidification phagosomale et à accéder au cytosol étaient liées (Simeone et al., 2015).

4.1.2 Neutrophiles

4.1.2.1 Rôle "traditionnel" des neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine humaine. Ils jouent un rôle crucial dans la défense immunitaire contre les pathogènes bactériens et fongiques et participent également au développement de la réaction inflammatoire (Mócsai, 2013; Nathan, 2006).

Dans la circulation les neutrophiles cherchent les signes d'infection ou d'inflammation qui déclenchent une série d'évènements aboutissant à la migration des neutrophiles à travers la paroi des vaisseaux et à l'intérieur des tissus jusqu'au site d'invasion microbien (Ley et al., 2007; Nourshargh et al., 2010). Lorsqu'ils rencontrent les particules infectieuses, les neutrophiles entament un processus d'élimination microbienne par phagocytose (Nordenfelt and Tapper, 2011). Des agents toxiques, incluant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées grâce à l'activité de la NADPH oxydase (Leto and Geiszt, 2006), et le contenu des granules intracellulaires (Borregaard et al., 2007; Soehnlein, 2009) sont ensuite libérés dans le phagosome ce qui a pour conséquences la mort et la digestion des microorganismes (Mócsai, 2013) (figure 25).

D'un point de vue clinique, une neutrophilie est initialement observée lors d'une infection. Cependant, certaines infections peuvent se compliquer de neutropénie notamment lors d'infections à *Brucella* ou à *Salmonella* (Arnoulet and Sebahoun, 2005). Ces neutropénies sont considérées comme un marqueur de mauvais pronostic (Fine et al., 1996).

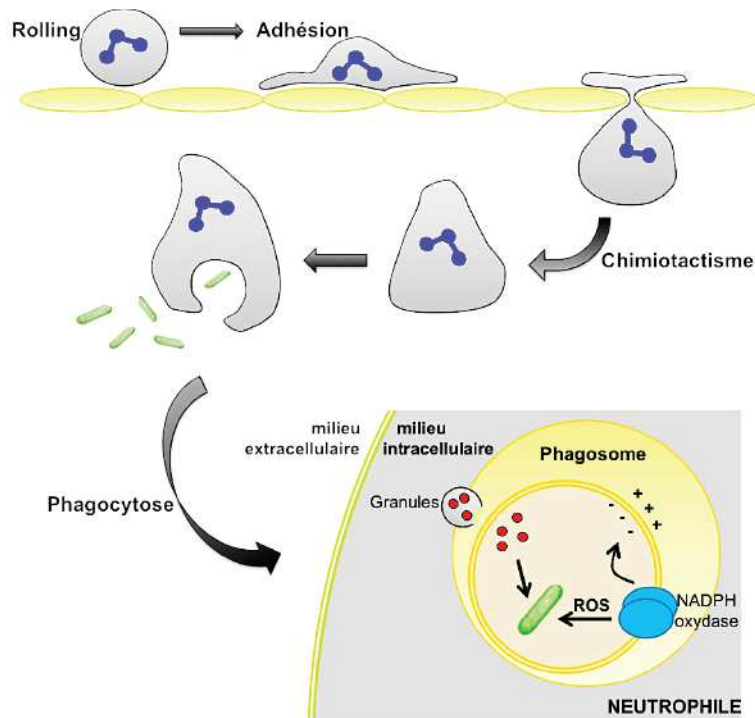


Figure 25 – Phagocytose par les neutrophiles.

4.1.2.2 Rôle des neutrophiles lors d'infections par les mycobactéries

Les pathogènes intracellulaires et notamment les mycobactéries, sont principalement pris en charge par les macrophages. Cependant, des études récentes fournissent d'importantes et nouvelles connaissances sur le rôle des neutrophiles dans le combat contre les pathogènes intracellulaires. L'analyse d'individus sains ayant été en contact avec des patients tuberculeux révèle une forte corrélation inverse entre le risque d'infection tuberculeuse et le nombre de neutrophiles dans le sang périphérique. Il a également été montré que la croissance *ex vivo* des mycobactéries dans le sang total était très fortement augmentée en l'absence de neutrophiles. Par ailleurs, les peptides anti-microbiens dérivant des neutrophiles inhibent la croissance mycobactérienne dans des cultures bactériennes *in vitro* (Martineau et al., 2007).

a) Neutrophiles vs mycobactéries

Les neutrophiles sont recrutés aux sites d'infection où ils reconnaissent les mycobactéries, soit directement, soit via opsonisation, et les internalisent. Les neutrophiles sont activés dans la circulation sanguine, interagissent avec les produits microbiens et sont stimulés par des cytokines et des chemokines. Ce changement s'accompagne d'une modification de l'expression des molécules de surface et de l'augmentation de la fonction microbicide (Mantovani et al., 2011). En réponse à *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG, les neutrophiles synthétisent et sécrètent des cytokines (Lowe et al., 2012; Lyons et al., 2004; Shigenaga et al., 2001; Sugawara et al., 2004).

Le fait que les neutrophiles soient capables de tuer les mycobactéries internalisées est très controversé, en particulier avec les souches virulentes de *M. tuberculosis*. Bien que les probables variabilités expérimentales expliquent certaines disparités entre les études *in vitro* il semblerait qu'à la fois l'élimination et l'échec d'élimination soient des conséquences possibles *in vivo*. Cela dépendra des nombreux facteurs spécifiques de l'hôte et de l'organisme, qui ensemble pourrait déterminer les conséquence de la stimulation mycobactérienne.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer comment les neutrophiles tuent ou réduisent la croissance des mycobactéries et notamment via l'action de peptides de neutrophiles humains (HNP), membres de la famille des α -défensines. Les HNP sont des protéines cationiques stockées dans les granulations azurophiles des neutrophiles. Elles se lient aux molécules anioniques, incluant les composants de la membrane plasmique, pour perturber l'intégrité membranaire et mener à la perte du contenu cellulaire (Fu, 2003).

Récemment, une étude a montré que la phagocytose de *M. tuberculosis* par des neutrophiles humains enclenchait leur programme microbicide qui cependant ne réussit pas à éliminer la mycobactérie. Au lieu de ça, *M. tuberculosis*, grâce à la région de virulence RD1, provoque une nécrose cellulaire dépendante des espèces réactives de l'oxygène (Corleis et al., 2012).

b) Double rôle des neutrophiles dans l'infection mycobactérienne

Neutrophiles: cheval de Troie pour la dissémination des bactéries ?

En théorie, une élimination efficace pourrait permettre aux neutrophiles de stopper l'infection à une étape très précoce (Lowe et al., 2012).

En absence d'élimination, non seulement l'infection pourrait progresser localement mais les neutrophiles infectés pourraient aussi se déplacer dans l'organisme vers d'autres sites, en particulier si les bacilles atteignent la circulation systémique (Lowe et al., 2012). Ce mécanisme a été décrit pour les neutrophiles de souris qui sont capables de phagocyter des mycobactéries vivantes au site d'infection puis de les transporter vers les nodules drainant la lymphe par migration dans les vaisseaux lymphatiques et ceci de manière similaire à la migration des cellules dendritiques lors d'une réponse immunitaire générale (Abadie et al., 2005).

Contribution des neutrophiles pour la phase chronique de la tuberculose

Les neutrophiles ont non seulement un rôle dans la phase précoce de l'infection tuberculeuse mais aussi dans la phase chronique de la tuberculose puisque qu'ils ont un rôle dans l'apparition de dommages tissulaires induits lors de l'infection. Chez la souris, il a été suggéré que la libération excessive d'IL-17 lors d'expositions mycobactériennes répétées provoque un recrutement de neutrophiles et des dommages tissulaires médiés par ces

cellules (Cruz et al., 2010). Cette réponse semble être atténuée par la production d'IFN pendant une réponse immunitaire antimycobactérienne normale (Nandi and Behar, 2011) indiquant que l'accumulation de neutrophiles et les dommages tissulaires qui en découlent pourraient être causés par l'échec du système immunitaire à contenir les agents infectieux (Mócsai, 2013).

Double rôle des neutrophiles

Ce double rôle des neutrophiles dans la tuberculose a été décrit chez la souris. Les auteurs suggèrent que les neutrophiles régulent négativement l'inflammation pendant les stades précoces de l'infection mycobactérienne tandis qu'ils contribuent à l'inflammation et à l'élimination mycobactérienne lors d'une tuberculose chronique (Zhang et al., 2009). Cependant, il n'est pas certain que l'IL-10, qui est la cytokine proposée pour être responsable de la plupart des effets chez la souris (Zhang et al., 2009), soit également libérée par les neutrophiles humains (Davey et al., 2011). L'ensemble de ces informations suggère que les neutrophiles pourraient avoir un rôle beaucoup plus vaste (protecteur ou parfois pathogénique) que ce qui avait été décrit jusqu'à maintenant lors d'infection mycobactérienne.

4.1.3 Coopération macrophages – neutrophiles

Lorsqu'un neutrophile internalise un bacille il peut éliminer le pathogène. Dans ce cas, le phagocyte va généralement mourir *in situ* par apoptose ou nécrose avant d'être ingéré par un macrophage. Influencée par le type de mort cellulaire du neutrophile et la libération de cytokines avant la mort, la réponse du macrophage pourra être pro- ou anti-inflammatoire (Lowe et al., 2012).

In vitro, les études montrent que l'association de macrophages à des neutrophiles apoptotiques ou à des granulations purifiées de neutrophiles augmente l'activité bactériostatique des phagocytes mononucléaires contre *M. tuberculosis* (Tan et al., 2006).

Le contact macrophage-neutrophile peut induire des changements transcriptionnels. Par exemple, les neutrophiles stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages infectés par *M. tuberculosis* via des récepteurs de co-stimulation (Hoshino et al., 2007).

Comme je vais le détailler dans les paragraphes suivants, l'utilisation de *M. marinum* dans le modèle d'infection d'embryons de danio a permis d'étudier la contribution à la fois des neutrophiles et des macrophages lors d'infections en temps réel.

4.2 *Mycobacterium marinum*: modèle d'étude de la tuberculose

4.2.1 Génomes: *Mycobacterium marinum* versus *Mycobacterium tuberculosis*

Le génome de la souche de laboratoire H37Rv, séquencé en 1998, est représenté sur la figure 26 (Cole et al., 1998). Le génome de *M. marinum*, séquencé à partir d'une souche « M », est représenté sur la figure 27. La souche « M » contient également un large plasmide pMM23 qui contient 29 séquences codantes ainsi qu'un opéron de résistance au mercure avec 2 gènes codant pour des enzymes spécifiques de la famille des recombinaisons et qui seraient à l'origine de la mobilité indépendante de cet élément (Stinear et al., 2008).

Figure 26 – Représentation circulaire du chromosome de *Mycobacterium tuberculosis* (Smith, 2003)

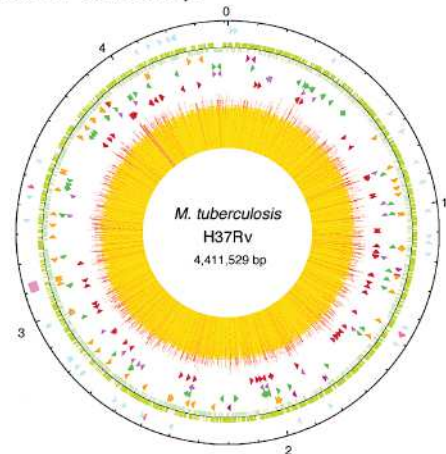
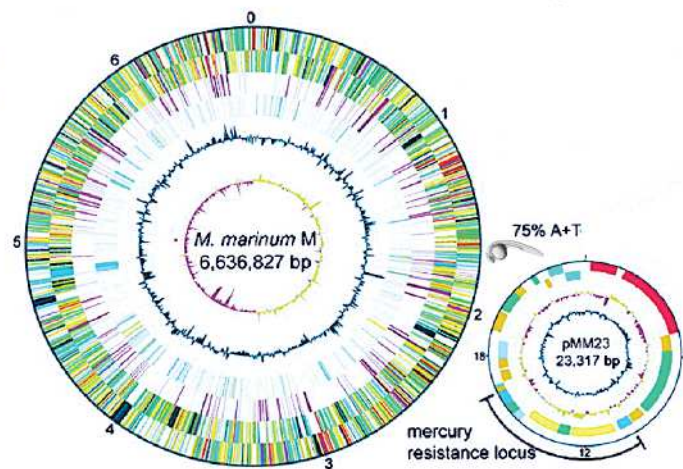


Figure 27 – Représentation circulaire du chromosome et du plasmide pMM23 de *Mycobacterium marinum* (Stinear et al., 2008).



Le génome de *M. marinum* mesure environ 1,5 fois celui de *M. tuberculosis*. Cette différence reflète l'étendue de son spectre d'hôtes par rapport à *M. tuberculosis*. Cependant, les génomes ont 85 % de régions orthologues identiques. Une analyse de l'ARNr 16S de 80 espèces mycobactériennes a confirmé une intime relation entre *M. marinum* et *M. tuberculosis* du point de vue de leur évolution. Cette même analyse a permis de faire l'hypothèse que les deux espèces dériveraient d'un même ancêtre commun possédant des capacités d'adaptation aussi bien à un hôte qu'à une niche environnementale (Tobin and Ramakrishnan, 2008). La principale différence entre les génomes est donc les 2,2 Mb supplémentaires de *M. marinum*. Il a été suggéré qu'une majeure partie de cette séquence

résulterait d'une diminution du génome de *M. tuberculosis* à partir de l'espèce ancestrale, renonçant à la niche environnementale et se spécialisant pour survivre exclusivement à l'intérieur d'un hôte. Finalement, *M. marinum* aurait continué à acquérir de nouveaux loci puisque il y a des preuves de transferts latéraux et de duplication de gènes concourant à l'accroissement du génome de *M. marinum* après la divergence avec *M. tuberculosis* (Tobin and Ramakrishnan, 2008). La proximité génétique des deux espèces a été illustrée notamment par l'étude des gènes ESAT-6 et CFP-10 tout deux codant pour des protéines impliquées dans la virulence de *M. tuberculosis*. Ces deux protéines situées dans la région RD1 du génome de *M. tuberculosis* ont été retrouvées chez *M. marinum* dans une région nommée extRD1 (extended RD1) (figure 28) (Gao et al., 2004).

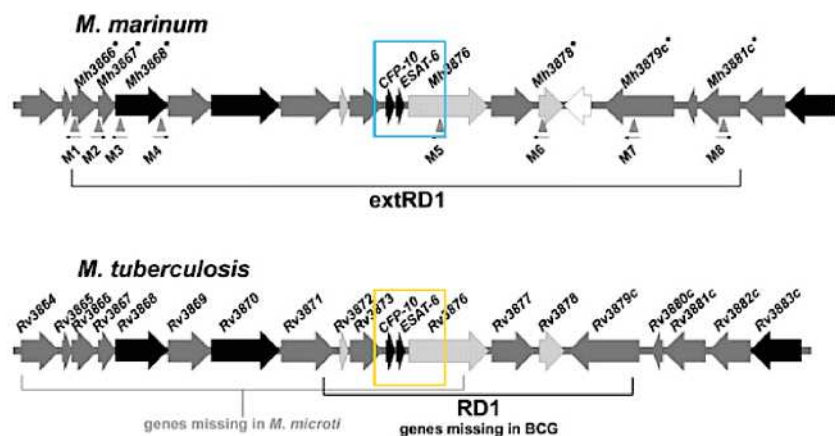


Figure 28 – Diagrammes de la région ExtRD1 de *M. marinum* (A) et de la région RD1 de *M. tuberculosis* (B) (adapté de (Gao et al., 2004)). Les gènes ESAT-6 et CFP-10 sont encadrés par un rectangle coloré.

Plus généralement, des études ont révélé que *M. tuberculosis* et *M. marinum* partageaient des facteurs de virulence orthologues. Comme le montre le tableau 2, les fonctions des principaux facteurs de virulence de *M. tuberculosis* sont conservées chez *M. marinum* ce qui fait de ce dernier un bon outil pour l'étude des bases moléculaires de la virulence chez les mycobactéries (Tobin and Ramakrishnan, 2008).

Molecule	<i>M. marinum</i>		<i>M. tuberculosis</i>	
	Presence	Mutant phenotype	Presence	Mutant phenotype
Cell wall lipids				
<i>kasB</i> (mycolic acid structure)	+	Attenuated, Rifampicin, defensin hypersusceptibility	+	Attenuated, Rifampicin hypersusceptibility
PDIM	Altered stereochemistry, Biosynthetic pathway, transporters present	ND	+	Attenuated
TDM	Biosynthetic pathway present	ND	+	Attenuated
PGL	Biosynthetic pathway present	ND	Some strains (e.g. W-Beijing)	Presence of PGL correlates with hypervirulence
SL1	–	NA	+	None reported
Carotenoids				
CrtB	+	Attenuated	–	–
CrtP	+	Attenuated	+	ND
Erp	+	Attenuated, Rifampicin hypersusceptibility	+	Attenuated, detergent sensitivity
ESX secretion				
ESX-1	+	Attenuated, phagolysosome fusion, granuloma formation, haemolysis	+	Attenuated, altered cytokine profile, phagolysosome fusion and others
ESAT-6	+	Attenuated	+	Attenuated
CFP-10	+	Attenuated	+	Attenuated
EspA	Probable, but orthologue unclear	ND	+	Attenuated
EspB	+	Attenuated	+	ND
ESX-5	+	Attenuated	+	ND

Tableau 2 – Comparaison des facteurs de virulence de *Mycobacterium marinum* et de *Mycobacterium tuberculosis* (Tobin and Ramakrishnan, 2008).

4.2.2 Le modèle d'infection *Mycobacterium marinum* / *Danio rerio*

Mycobacterium marinum est un pathogène spécifique des poissons et d'autres animaux aquatiques avec un large spectre d'hôtes (amphibiens, crustacés, mollusques). On le retrouve aussi bien dans les eaux douces que dans les eaux salées avec une répartition géographique mondiale. L'homme représente un hôte accidentel et une impasse épidémiologique. *M. marinum* présente un grand intérêt pour l'étude des bases moléculaires de la pathogenèse mycobactérienne du fait de sa proximité génétique et clinique avec *M. tuberculosis*. De plus, sa manipulation demande un niveau de sécurité L2 moins contraignant que celui de *M. tuberculosis* (L3) puisque le risque de contamination à l'homme par *M. marinum* est moins élevé que par *M. tuberculosis*. Par ailleurs, la croissance de *M. marinum* est beaucoup plus rapide que celle de *M. tuberculosis*. Les animaux à sang froid constituent l'hôte naturel de *M. marinum*. L'infection de ces animaux est réalisée avec succès et la mycobactérie provoque une maladie granulomateuse semblable à la tuberculose. C'est pour cela que le modèle d'infection expérimentale chez le *Danio rerio* (danio ou zebrafish) a été proposé comme modèle d'étude de la tuberculose.

Le *Danio rerio* est un hôte particulièrement intéressant. En effet, en plus de la réponse innée, cet animal possède un système immunitaire adaptatif complexe semblable à celui des mammifères. Les embryons de poisson sont exploités pour étudier les interactions hôte/pathogène de nombreuses bactéries et notamment les mycobactéries (Meijer et al., 2014). Les embryons ont l'avantage d'avoir un développement externe et d'être transparents ce qui permet de visualiser l'infection en temps réel chez l'animal vivant. De plus, ils possèdent des macrophages fonctionnels dès 30 hpf et des neutrophiles fonctionnels

dès 48 hpf, compétents pour une infection. Ceci permet d'étudier les effets de l'immunité innée. Il est également possible d'étudier l'immunité adaptative chez des embryons matures infectés car celle-ci se développe plus tardivement (la circulation des lymphocytes n'apparaît que vers le 21^{ème} jour post-fertilisation) (Pozos and Ramakrishnan, 2004).

Par ailleurs, plusieurs types de manipulations génétiques sont possibles chez cet animal.

Des lignées transgéniques ont été développées. Le mutant Golden a une pigmentation moins intense que l'animal sauvage. À partir de ce mutant des lignées transgéniques qui portent un marqueur fluorescent spécifique d'un type cellulaire ont vu le jour. Ainsi, les lignées *Tg(mpx:eGFP)* (Renshaw et al., 2006) et *Tg(mpeg1:mCherry-F)* (Bernut et al., 2014) ont été construites en prenant des promoteurs spécifiques respectivement de granulocytes et de macrophages et en clonant des protéines fluorescentes en aval. Le gène *mpx* code pour la myéloperoxydase qui est un marqueur spécifique des neutrophiles. Ces derniers sont marqués en vert dans la lignée *Tg(mpx:eGFP)* alors que les macrophages sont marqués en rouge dans la lignée *Tg(mpeg1:mCherry-F)*.

Chez l'embryon de danio, l'inhibition transitoire de l'expression de gènes est désormais possible par introduction de morpholinos qui sont des oligonucléotides antisens modifiés. Les morpholinos dirigés contre le gène *pu.1* codant pour un facteur de transcription myéloïde permettent de dépler l'embryon en macrophages (Clay et al., 2007; Rhodes et al., 2005). En fonction de la dose utilisée, l'embryon peut être dépleté à la fois en macrophages et en neutrophiles.

Ce modèle d'infection offre également la possibilité d'injecter dans différents compartiments. L'injection intra-veineuse est la plus utilisée mais l'injection peut également se faire en sous-cutanée, dans la cavité otique ou encore dans le péricarde (figure 29).

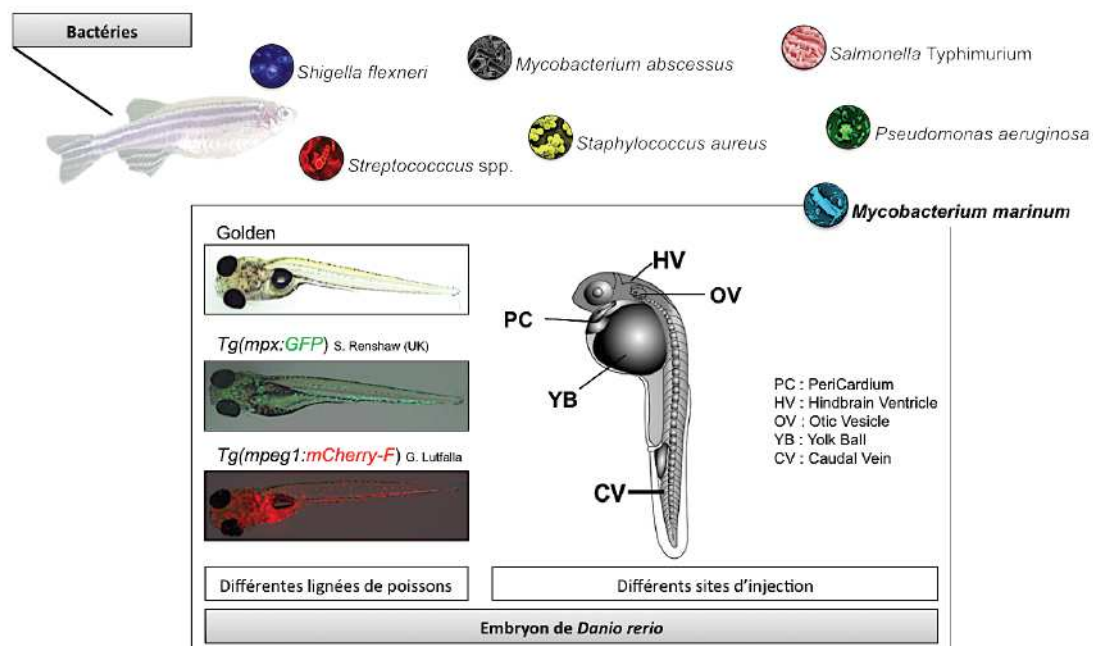


Figure 29 – Le modèle d'infection *Danio rerio*.

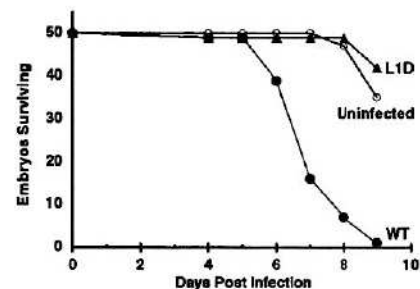
Une étude a démontré que *M. marinum* causait une infection systémique chez les embryons de danio avec les caractéristiques clefs des mycobactérioses du poisson adulte, notamment, l'aggrégation des macrophages dans des structures granulomateuses (Davis et al., 2002). Depuis, les embryons de poissons sont utilisés dans le modèle *M. marinum*/danio pour les avantages énoncés précédemment. Ce modèle s'est révélé être particulièrement intéressant depuis qu'il a permis de visualiser l'interaction *Mycobacterium*-macrophage à un stade précoce de l'infection. D'un point de vue technique, pour visualiser les bactéries on utilise généralement des souches qui expriment de manière constitutive une protéine fluorescente (GFP ou mCherry).

4.2.2.1 Etude de la virulence des mycobactéries

Le modèle *M. marinum*/danio est largement utilisé pour l'étude de la virulence des mycobactéries. La virulence est déterminée par deux paramètres qui sont, d'une part la survie du poisson après infection par *M. marinum* et d'autre part, l'évaluation de la croissance bactérienne dans l'animal. Chez des embryons infectés par *M. marinum*, la mortalité est plus précoce que chez des embryons non infectés (figure 30) (Davis et al., 2002; Gao et al., 2004).

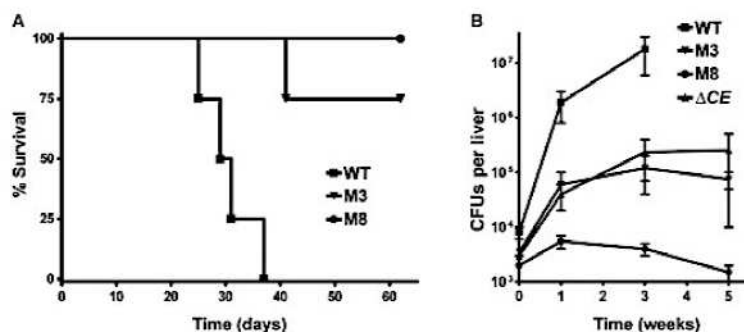
Figure 30 – Courbe de survie des embryons en fonction du temps après infection par *Mycobacterium marinum* (Davis et al., 2002).

WT: souches infectées; Uninfected: souches non infectées; L1D: souche mutante atténuée.



Pour évaluer la croissance des bactéries, les poissons sont lysés puis le nombre de bactéries viables est déterminé par comptage sur boîtes à différents temps post-infection. Ce modèle permet également d'étudier la virulence de mutants de *M. marinum*. Ces derniers sont construits par délétion de gènes impliqués dans la virulence des mycobactéries. C'est le cas de mutants extRD1 où le locus extRD1, impliqué dans la virulence de *M. marinum*, est délété. On observe alors une diminution de la mortalité et du nombre de bactéries viables traduisant une pathologie moins virulente et donc une forme atténuée de la maladie (figure 31).

Figure 31 - Virulence de la souche sauvage de *Mycobacterium marinum* et de mutants extRD1 dans le modèle *Danio rerio* (Gao et al. 2004). (A) Pourcentage de survie des embryons en fonction du temps. (B) Nombre de CFUs dans les embryons en fonction du temps. WT: souche sauvage; M3, M8 et ΔCE : mutants extRD1.



4.2.2.2 Etude de la physiopathologie de la tuberculose

a) Rôle des macrophages

Le granulome a longtemps été uniquement considéré comme une structure bénéfique pour l'hôte permettant de contenir l'infection (Davis and Ramakrishnan, 2009; Rubin, 2009). Cependant, l'analyse de l'infection en temps réel dans le modèle danois a bouleversé cette vision des choses en suggérant que le granulome pouvait également promouvoir l'infection (Davis and Ramakrishnan, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé deux types de souches de *M. marinum*: des souches virulentes sauvages et des souches mutées par délétion du locus RD1 ce qui implique des souches dont la virulence est atténuée. Ils ont alors pu mettre en évidence l'importance de RD1 dans les étapes de formation du granulome. En effet, lors de l'infection par un mutant RD1, la formation du granulome est retardée et l'expansion bactérienne est faible par rapport au modèle virulent (figure 32) (Bold and Ernst, 2009; Pozos and Ramakrishnan, 2004).

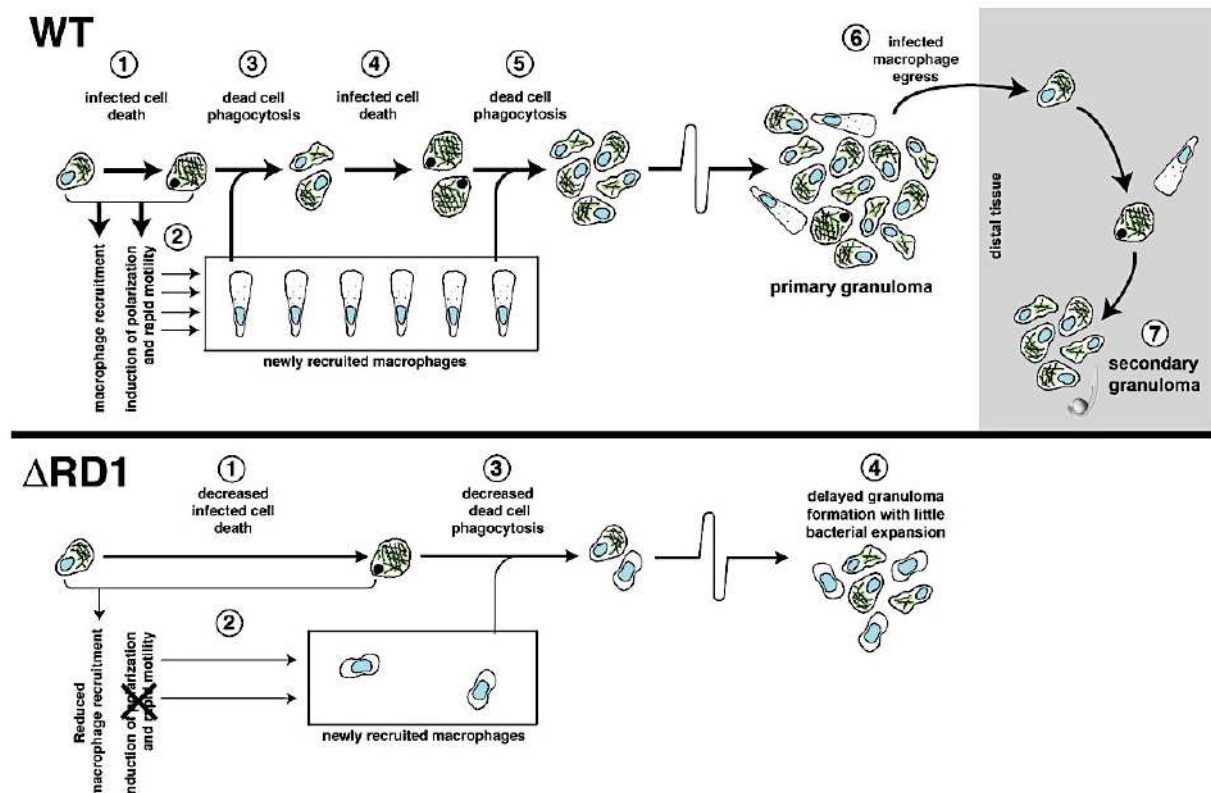


Figure 32 – Mécanismes et conséquences de la formation du granulome à un stade précoce et impact de RD1 (Davis and Ramakrishnan, 2009).

Les observations faites fournissent des éléments sur la manière dont les mycobactéries pathogènes exploitent le granulome pour une expansion locale et une dissémination systémique révélant ainsi un nouveau mécanisme de dissémination bactérienne telle que l'attraction de macrophages non-infectés vers l'aggrégat et le transfert inter-macrophagique des bactéries (figure 33).

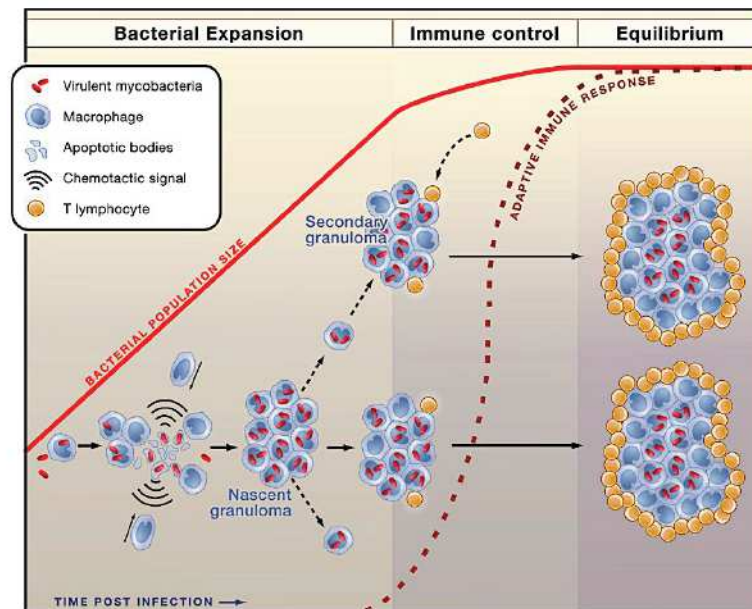
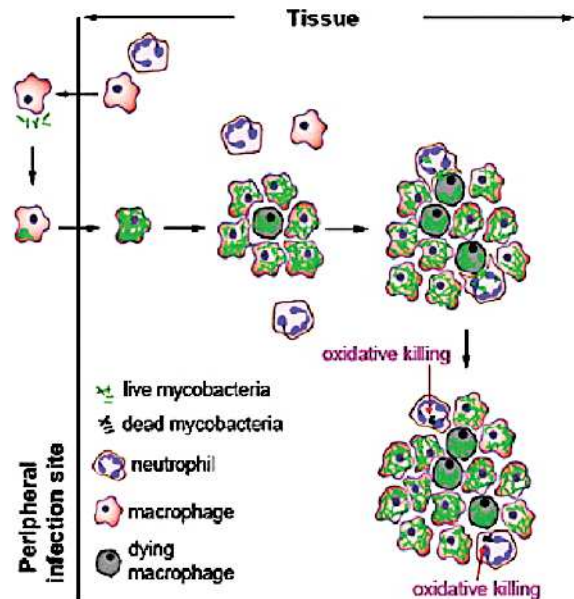


Figure 33 – Étapes de la formation du granulome dans la tuberculose (Bold and Ernst, 2009).

b) Rôle des neutrophiles

Dans la tuberculose, bien que la présence des neutrophiles aux sites d'infection soit connue depuis longtemps, leur rôle dans la défense contre les mycobactéries reste vague. La traçabilité génétique et la transparence des embryons de danio ont donc été exploitées pour monitorer le comportement des neutrophiles et ses conséquences lors d'une infection par *M. marinum* (figure 34). Chez le zebrafish, le monitoring *in vivo* d'une infection mycobactérienne a montré que les neutrophiles n'interagissaient pas avec les bacilles lors de la phase très précoce de l'infection mais que les neutrophiles étaient recrutés par la suite au granulome naissant en réponse à des signaux provenant des macrophages infectés mourants à l'intérieur du granulome et qu'ils vont phagocyter. Ensuite, quelques neutrophiles tuent rapidement des mycobactéries internalisées grâce à des mécanismes dépendants de la NADPH oxydase (Yang et al., 2012a). Ce phénomène sert donc, non seulement à nettoyer le site d'infection mais aussi à contenir l'infection (Mócsai, 2013). Il faut noter que ces infections ont été réalisées dans le compartiment sanguin (Yang et al., 2012a). Alors que les neutrophiles internalisent peu des bactéries tel qu'*E. coli* dans ce compartiment, ils sont très efficaces pour s'en débarrasser dans un compartiment tissulaire (Colucci-Guyon et al., 2011). L'action des neutrophiles vis-à-vis de *M. marinum* suite à une infection sous-cutanée n'a pas été étudiée.

Figure 34 – Comportement des neutrophiles et conséquences lors d'une infection en utilisant le modèle *M. marinum*/*Danio rerio* (Yang et al., 2012a).



4.3 *Pseudomonas aeruginosa* et cellules phagocytaires

La phagocytose est un processus critique dans le répertoire inné des défenses contre *P. aeruginosa*. Les structures cellulaires et les récepteurs qui gouvernent la phagocytose du pathogène et comment ceux-ci interagissent avec les effecteurs du pathogène et les facteurs de virulence ne sont pas entièrement élucidés (Lovewell et al., 2014).

4.3.1 Internalisation par les cellules phagocytaires

Les événements de signalisation qui gouvernent la prise en charge de *P. aeruginosa* par les neutrophiles et les macrophages sont complexes. L'internalisation est médiée par le contact et la liaison bactérie-phagocyte, conjointement à la reconnaissance de récepteurs de *P. aeruginosa* et à la signalisation en aval pour réguler l'ingestion. Par ailleurs, l'internalisation est dictée par de nombreux facteurs incluant l'expression de récepteurs sur le phagocyte autant que l'expression et l'exposition de ligands sur le pathogène.

La motilité flagellaire est un déterminant bactérien clef pour la sensibilité phagocytaire de *P. aeruginosa* par les phagocytes murins et humains. L'internalisation de *P. aeruginosa* semble être actine-dépendante et contrôlée par la voie de signalisation PI3K/Akt (figure 35) (Lovewell et al., 2014).

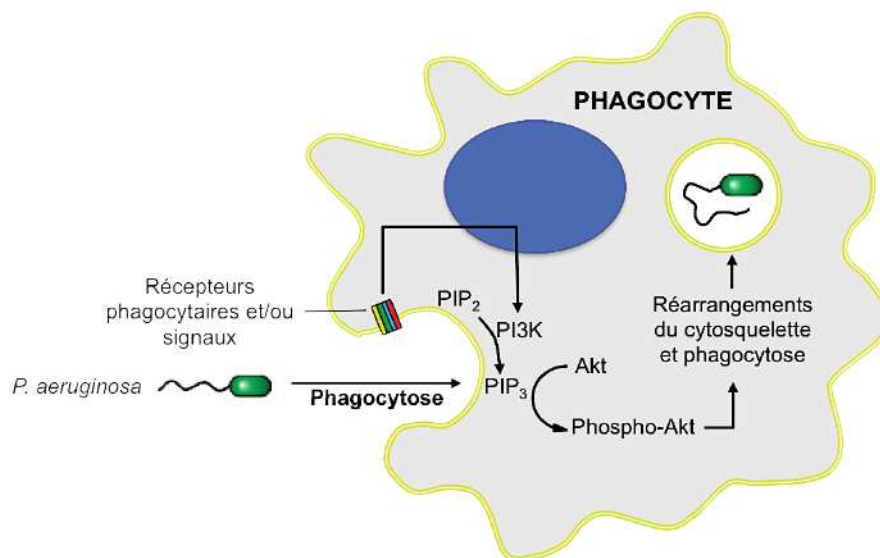


Figure 35 – Phagocytose de *P. aeruginosa*.

4.3.2 Stratégies bactériennes d'échappement à la phagocytose

P. aeruginosa est sensible à l'internalisation et la dégradation par les cellules phagocytaires. Cependant, de nombreuses tactiques ont été identifiées par lesquelles le pathogène est capable de diminuer sa vulnérabilité vis-à-vis de la phagocytose (Lovewell et al., 2014).

4.3.2.1 Perte de la motilité flagellaire

La motilité flagellaire a été identifiée comme un élément critique d'activation phagocytaire *in vitro* et *in vivo* (Amiel et al., 2010). La perte de la motilité flagellaire, indépendamment du flagelle lui-même, fournit à la bactérie une augmentation de sa résistance d'environ 100 fois à la prise en charge phagocytaire notamment par les macrophages et les neutrophiles (Amiel et al., 2010). Ce phénomène est indépendant des autres facteurs de virulence bactériens ou de l'opsonisation par l'hôte. Il est dû à l'activation bactérienne de la voie de signalisation cellulaire de l'hôte PI3K/Akt (Lovewell et al., 2011, 2014). Le pathogène est donc capable de passer dans un état non-motile caractérisé par la formation de biofilms qui permettent la colonisation de l'hôte par la bactérie (Folkesson et al., 2012; Luzar et al., 1985). La perte de motilité flagellaire contribue donc à la résistance phagocytaire et par conséquent à la persistance bactérienne et l'entrée dans une phase chronique de l'infection.

4.3.2.2 Sécrétion d'exopolysaccharides

P. aeruginosa possède un nombre de loci génétiques capables de générer ou modifier les exopolysaccharides, la production d'alginate et le phénotype mucoïde (Mishra et al., 2012; Ryder et al., 2007). Des analyses génétiques ont identifié que l'expression de certains de ces gènes était impliquée dans la résistance phagocytaire (Krieg et al., 1988; Oliver and Weir, 1985).

4.3.2.3 Système de sécrétion de type III (T3SS)

P. aeruginosa possède un T3SS qui lui permet d'injecter des protéines effectrices directement dans les cellules hôtes (Le Berre et al., 2011; Ben Haj Khalifa et al., 2011). Parmi ces protéines effectrices, il a été montré que les toxines ExoT et ExoS limitaient la prise en charge de *P. aeruginosa* par les macrophages (Hauser, 2009). De manière générale, ces protéines effectrices contribuent à la persistance de l'infection par atténuation de l'ingestion et de la clairance par les phagocytes. Elles facilitent aussi la mort cellulaire entraînant l'exacerbation de la sévérité de l'infection (Engel and Balachandran, 2009).

4.3.2.4 Inhibition de PAR2

Un autre facteur de virulence a été identifié comme responsable de l'inhibition fonctionnelle de la phagocytose. Il s'agit de la métalloprotéinase élastolytique LasB qui clive des récepteurs de l'hôte tel que PAR2 (Dulon et al., 2005). Ainsi, la perte de PAR2 chez des neutrophiles diminue significativement la prise en charge phagocytaire de *P. aeruginosa* par un mécanisme non défini (Moraes et al., 2008). L'activation de PAR2 entraînerait le recrutement de la machinerie phagocytaire (Buddenkotte et al., 2005) et la protéine pourrait agir comme récepteur phagocytaire direct (Lovewell et al., 2014).

4.3.3 Le modèle d'infection *Pseudomonas aeruginosa* / *Danio rerio*

Depuis que la réponse phagocytaire de l'hôte a été décrite comme la clef déterminante dans la pathologie infectieuse, de nombreux modèles de réponses des cellules phagocytaires à *P. aeruginosa* (*in vitro* et animaux) ont été développés.

Bien que le modèle murin soit apparu pendant longtemps comme le modèle animal le plus pertinent pour l'étude des interactions hôte-pathogène, les avantages décrits dans le paragraphe 4.2.2 pour le danio ont été mis à profit pour l'étude des interactions hôte-pathogène des infections aiguës de *P. aeruginosa*. Le danio est sensible à l'infection par *P. aeruginosa* et dépend des mécanismes de l'immunité innée pour le contrôle des infections bactériennes.

Ce modèle a donc été utilisé et a permis d'observer le comportement des phagocytes en temps réel dans l'animal vivant (Brannon et al., 2009; Clatworthy et al., 2009). Il a été montré qu'à la fois les neutrophiles et les macrophages phagocytent puis éliminent les bacilles (figure 36). Le rôle dans la virulence du système de sécrétion de type 3 (T3SS) a été étudié dans le cas d'une infection aiguë et a montré que le mutant T3SS était atténué dans ce modèle (figure 37). En revanche, la déplétion des embryons en phagocytes, grâce à l'utilisation de morpholinos dirigés contre le gène *pu.1*, montre une virulence similaire entre la souche sauvage et le mutant T3SS (figure 38). Ces travaux soulignent l'implication des cellules phagocytaires lors de l'infection aiguë à *P. aeruginosa*.

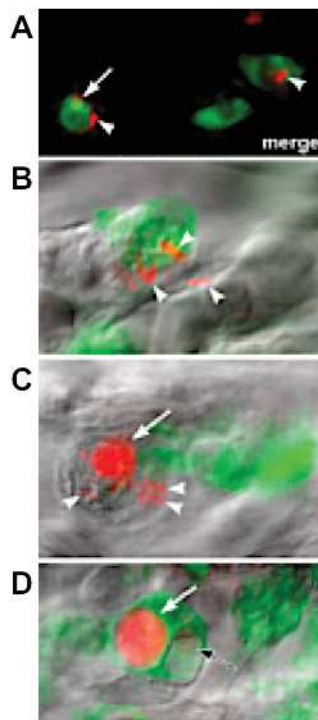


Figure 36 – Visualisation de phagocytes infectés par *P. aeruginosa* (Brannon et al., 2009). Les phagocytes ont une fluorescence verte. Les bactéries fluorescentent en rouge. **(A)** Cellules ayant phagocyté les bactéries. Les triangles indiquent les bactéries dans les phagocytes. La flèche indique les bactéries digérées. **(B)** Cellules avec des bactéries à 2 hpi. Les triangles indiquent les bactéries à l'intérieur ou adhérentes aux cellules. **(C)** Cellules contenant des bactéries intactes (triangles) ou digérées (flèche), 2 hpi. **(D)** Cellule avec une vacuole contenant un relargage de fluorescence rouge (flèche blanche) et une seconde vacuole contenant presque plus de fluorescence rouge (flèche noire), probablement après digestion complète de *P. aeruginosa*.

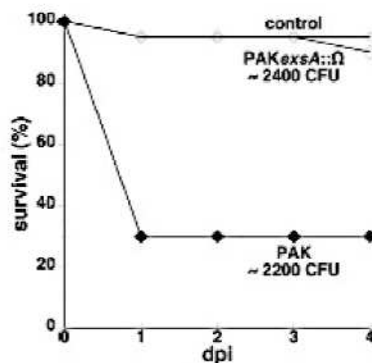


Figure 37 – Infection d'embryons de Danio avec le mutant T3SS de *P. aeruginosa* (Brannon et al., 2009). Courbe de survie du mutant T3SS atténué. PAK, souche sauvage; PAKexsA::Δ, mutant T3SS.

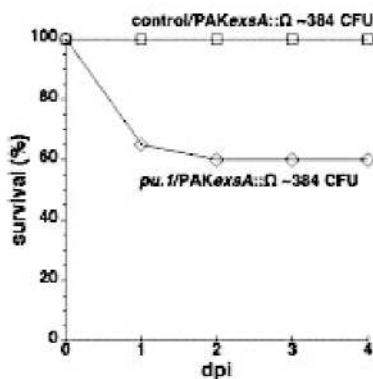


Figure 38 – Infection d'embryons de Danio déplétés en phagocytes avec le mutant T3SS de *P. aeruginosa* (Brannon et al., 2009). Courbe de survie du mutant T3SS. *pu.1*/PAKexsA::Δ, mutant T3SS avec déplétion des embryons en phagocytes; control/PAKexsA::Δ, mutant T3SS sans déplétion des embryons en phagocytes.

II OBJECTIFS



*Pour résoudre un problème ou pour atteindre un but,
vous n'avez pas besoin de connaître toutes les réponses à l'avance.
Mais vous devez avoir une idée claire du problème ou l'objectif que vous souhaitez atteindre*

W. Clement Stone

MgtC est un facteur de virulence présent chez de nombreux pathogènes intracellulaires majeurs incluant *Mycobacterium tuberculosis*. Cette protéine joue un rôle majeur dans la survie intra-macrophagique mais le rôle de MgtC *in vivo* reste inconnu. Une grande partie de mon travail a porté que l'étude de MgtC de *Mycobacterium marinum*. De manière surprenante, MgtC est également présent chez le pathogène extracellulaire *Pseudomonas aeruginosa* et j'ai contribué à une étude du rôle de MgtC chez ce pathogène extracellulaire. De plus, la découverte du peptide membranaire régulateur MgtR, capable de favoriser la dégradation de MgtC, fait de ce facteur de virulence une cible thérapeutique de choix dans le cadre d'une stratégie anti-virulence et j'ai exploité cette piste chez les mycobactéries et chez *Pseudomonas aeruginosa*.

1 Étudier le rôle du facteur de virulence MgtC chez les mycobactéries et chez *Pseudomonas aeruginosa*

Dans le but de mieux comprendre le rôle du facteur de virulence MgtC chez les mycobactéries, nous avons utilisé le modèle *Mycobacterium marinum* qui est fréquemment utilisé comme modèle d'étude de la tuberculose. Un premier objectif est d'évaluer la régulation de MgtC chez *M. marinum*. Un second objectif est de déterminer si les fonctions de MgtC décrites chez *M. tuberculosis* sont conservées chez *M. marinum* pour ensuite utiliser le modèle d'infection *M. marinum*/*Danio rerio* qui a d'ores et déjà fait ses preuves dans la compréhension des mécanismes de la pathogénèse tuberculeuse.

D'autre part, le rôle de MgtC n'ayant jamais été étudié chez un pathogène extracellulaire, il nous a semblé particulièrement intéressant de l'étudier chez *P. aeruginosa*. Cette étude a été menée dans un modèle d'infection cellulaire de macrophages et *in vivo* dans le modèle d'infection d'embryons de danio. Dans ce projet, mon objectif était de mieux comprendre le rôle MgtC dans le macrophage et d'étudier sa régulation.

2 Tester les potentialités « anti-virulence » de peptides membranaires régulateurs

Pour valider MgtC en tant que nouvelle cible thérapeutique, mon second objectif était d'étudier le peptide membranaire MgtR en tant que potentielle molécule thérapeutique. MgtR n'étant présent que chez *Salmonella*, il nous fallait dans un premier temps déterminer si ce peptide est capable d'interagir avec les protéines MgtC issues d'autres pathogènes, mycobactéries et *P. aeruginosa*. J'ai également évalué les potentielles propriétés anti-virulence de MgtR chez ses pathogènes en utilisant les mêmes modèles d'infection (modèle cellulaire de macrophage et modèle animal du danio) que pour l'étude de MgtC.

En marge de cet objectif principal, j'ai participé à l'étude d'un autre peptide, KdpF, ayant des potentialités anti-virulence. Cette étude a été réalisée chez le pathogène intracellulaire *S. Typhimurium*.

III RESULTATS



*L'expérience ne trompe jamais ; seuls vos jugements errent,
qui se promettent des résultats étrangers à notre expérimentation personnelle.*

Léonard de Vinci

1 Rôle du facteur de virulence MgtC

1.1 Identification d'un rôle de MgtC de *Mycobacterium marinum* dans la phagocytose

1.1.1 Résumé de l'article 1

MgtC est un facteur de virulence impliqué dans la croissance intramacrophagique et présent chez plusieurs pathogènes intracellulaires, notamment *Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. MgtC participe aussi à l'adaptation à une carence en magnésium.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de MgtC chez les mycobactéries, j'ai construit un mutant *mgtC* chez *Mycobacterium marinum*.

J'ai pu montrer que le gène *mgtC* de *M. marinum* était fortement induit par une absence de magnésium et était nécessaire pour une croissance optimale dans un milieu carencé en magnésium. J'ai ensuite étudié le comportement du mutant *mgtC* de *M. marinum* dans le modèle d'infection d'embryons de *Danio rerio*. J'ai utilisé une lignée transgénique de danio marquant spécifiquement les neutrophiles. D'après les courbes de survie, le mutant *mgtC* n'est pas atténué dans ce modèle d'infection. En revanche, les résultats indiquent que la phagocytose du mutant *mgtC* par les neutrophiles est augmentée par rapport à celle de la souche sauvage dans le cas d'une infection sous-cutanée. Une augmentation de la phagocytose de la souche mutée est également observée, *ex vivo*, dans une lignée cellulaire murine de macrophages J774. Par ailleurs, aucune différence n'a été trouvée entre le mutant *mgtC* et la souche sauvage au niveau de l'adhésion bactérienne aux macrophages et de l'internalisation par des cellules épithéliales. Contrairement au rôle décrit chez les autres pathogènes intracellulaires, MgtC de *M. marinum* ne contribue pas significativement à la répllication intramacrophagique.

Ces résultats indiquent donc une fonction inattendue de MgtC de *M. marinum* à une étape précoce de l'infection dans les cellules phagocytaires. De plus, les résultats indiquent que bien que la fonction de MgtC soit conservée entre les pathogènes concernant l'adaptation à des conditions de carence en magnésium, son rôle à l'égard des cellules phagocytaires peut différer, probablement en raison des différents styles de vie des pathogènes.

1.1.2 Article 1 – *Mycobacterium marinum* plays a role in phagocytosis but is dispensable for intracellular multiplication



RESEARCH ARTICLE

Mycobacterium marinum MgtC Plays a Role in Phagocytosis but is Dispensable for Intracellular Multiplication

Claudine Belon^{1,2}, Laïla Gannoun-Zaki^{1,2}, Georges Lutfalla^{1,2}, Laurent Kremer^{1,2,3}, Anne-Béatrice Blanc-Potard^{1,2*}

1. Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier 2 et 1, Place Eugène Bataillon, 34095, Montpellier, Cedex 05, France, 2. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5235, Montpellier, France, 3. Institut national de la santé et de la recherche médicale, Montpellier, France

*anne.blanc-potard@univ-montp1.fr



click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Belon C, Gannoun-Zaki L, Lutfalla G, Kremer L, Blanc-Potard A-B (2014) *Mycobacterium marinum* MgtC Plays a Role in Phagocytosis but is Dispensable for Intracellular Multiplication. PLoS ONE 9(12): e116052. doi:10.1371/journal.pone.0116052

Editor: Jérôme Nigou, Centre National de la Recherche Scientifique - Université de Toulouse, France

Received: September 18, 2014

Accepted: December 4, 2014

Published: December 29, 2014

Copyright: © 2014 Belon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: French National Agency (ANR ZebraFlam) and European Community's Seventh Framework Programme (FP7-PEOPLE-2011-ITN) under Grant Agreement PITN-GA-2011-289209 for the Marie-Curie Initial Training Network FishForPharma. CB is supported by a MRT fellowship from the French Ministry of Research and the Fondation for Medical Research (FRM FDT20140930905). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Laurent Kremer is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

Abstract

MgtC is a virulence factor involved in intramacrophage growth that has been reported in several intracellular pathogens, including *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. MgtC participates also in adaptation to Mg²⁺ deprivation. Herein, we have constructed a *mgtC* mutant in *Mycobacterium marinum* to further investigate the role of MgtC in mycobacteria. We show that the *M. marinum mgtC* gene (*Mma mgtC*) is strongly induced upon Mg²⁺ deprivation and is required for optimal growth in Mg²⁺-deprived medium. The behaviour of the *Mma mgtC* mutant has been investigated in the *Danio rerio* infection model using a transgenic reporter zebrafish line that specifically labels neutrophils. Although the *mgtC* mutant is not attenuated in the zebrafish embryo model based on survival curves, our results indicate that phagocytosis by neutrophils is enhanced with the *mgtC* mutant compared to the wild-type strain following subcutaneous injection. Increased phagocytosis of the mutant strain is also observed *ex vivo* with the murine J774 macrophage cell line. On the other hand, no difference was found between the *mgtC* mutant and the wild-type strain in bacterial adhesion to macrophages and in the internalization into epithelial cells. Unlike the role reported for MgtC in other intracellular pathogens, *Mma* MgtC does not contribute significantly to intramacrophage replication. Taken together, these results indicate an unanticipated function of *Mma* MgtC at early step of infection within phagocytic cells. Hence, our results indicate that although the MgtC function is conserved among pathogens regarding adaptation to Mg²⁺ deprivation, its role towards phagocytic cells can differ, possibly in relation with the specific pathogen's lifestyles.

Introduction

MgtC is a virulence factor common to several intracellular pathogens [1]. It was first described in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) as required for intramacrophage multiplication and systemic infection in mice [2–4]. Later, it was described as a critical factor for the intramacrophage growth of *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella suis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia cenocepacia* and *Salmonella enterica* serovar Typhi [5–9]. Despite its importance in the virulence of various bacterial pathogens, the mechanism by which MgtC promotes intracellular growth remains unknown. *Salmonella* MgtC has been recently shown to directly interact with bacterial F_1F_o ATP synthase, thereby altering its ability to translocate protons and to couple translocation to ATP synthesis [10]. Hence, modulation of F-ATP synthase activity is proposed to drive the ability of MgtC to promote intramacrophage replication.

MgtC has been associated to adaptation to low Mg^{2+} environments in broth media in the various pathogens mentioned above, based on the observation that growth of the corresponding *mgtC* mutants is impaired in Mg^{2+} deprived media [1]. Moreover, expression of *mgtC* gene is highly induced by deprivation of external Mg^{2+} concentration in *S. Typhimurium* and *Y. pestis* [11, 12], which are two organisms where *mgtC* is cotranscribed with the Mg^{2+} transporter encoded by *mgtB*. However, *mgtC* has been shown to be only slightly induced by Mg^{2+} limitation in *M. tuberculosis* [13, 14], suggesting that Mg^{2+} may regulate MgtC only in bacterial species where it is cotranscribed with a Mg^{2+} transporter.

MgtC is a membrane-associated protein that harbors a conserved hydrophobic N-terminal and a more divergent soluble C-terminal domain that exhibits conservation among proteins from intracellular pathogens as *S. Typhimurium* and *M. tuberculosis* [15]. MgtC has been shown to play a role in *M. tuberculosis* virulence in macrophage and mice infection models [5] but the contribution of *mgtC* in mycobacterial physiology and virulence needs further investigation. Because MgtC is conserved between *M. tuberculosis* and *Mycobacterium marinum*, we aimed to address its role in *M. marinum* virulence, as well as its regulation by magnesium. *M. marinum* is closely related to *M. tuberculosis* not only in its pathology but also genetically [16, 17], and has been increasingly used as a suitable model for understanding the pathogenesis of tuberculosis. As a natural host for this pathogen, zebrafish provides a powerful vertebrate model to study *M. marinum* pathogenesis. Moreover, because of their genetic tractability and optical transparency, zebrafish embryos have been successfully used to investigate host-bacteria interactions and the role of innate immunity during *M. marinum* infection [18–20].

The present results indicate that *Mma mgtC* transcription is strongly induced by magnesium deprivation and, unexpectedly, that *Mma* MgtC appears dispensable for intramacrophage replication but plays a role in phagocytosis, a phenotype first uncovered in zebrafish embryos.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth culture conditions

Mycobacterium marinum M and *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strains were grown at 30°C and 37°C, respectively, in Sauton's medium containing 0.025% of tyloxapol (Sigma) or on Middlebrook 7H10 agar plates supplemented with 10% Oleic acid-Albumin-Dextrose-Catalase (OADC) enrichment, in the presence of kanamycin (25 mg/ml), hygromycin (80 mg/ml) and zeocin (25 mg/ml), when required. Low magnesium medium was obtained by replacing the magnesium sulfate in the Sauton's medium by a similar concentration of potassium sulfate. *Escherichia coli* (DH5a) was used for cloning and was grown in LB medium with zeocin (25 mg/ml) at 37°C.

RNA extraction and qRT-PCR

RNA was prepared from 5 ml of mid-logarithmic bacterial cultures (grown in Sauton's medium containing or not magnesium). Bacteria were harvested, resuspended in 1 ml of RNA protect reagent (Qiagen) and incubated for 1 h at room temperature. Bacteria were centrifuged and resuspended in 1 ml of RLT buffer from RNeasy Mini kit (Qiagen), transferred in a Lysing matrix B tube (MP Bio) and disrupted with a bead-beater apparatus (3 times, 45 sec, maximal speed). RNA was purified with the RNeasy kit, according to manufacturer's instructions. DNA was further removed using DNaseI (Invitrogen). cDNA was produced using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out DNA contamination. Quantitative real-time PCR was performed using an in-house SYBR Green mix and a 480 light cycler instrument (Roche). PCR conditions were as follows: 3 min denaturation at 98°C, 45 cycles of 98°C for 5 sec, 68°C for 10 sec and 72°C for 10 sec. The *sigA* gene (*MMAR_2011*) was used as internal control. The sequences of primers used for qRT-PCR are listed in [S1 Table](#).

Construction of *M. marinum* mgtC mutant and complemented strains

A strain deleted for the *mgtC* gene was constructed in *M. marinum* M using mycobacteriophage-mediated allelic exchange to replace *mgtC* by a hygromycin cassette. The construction of the allelic exchange substrate (AES) phasmid, the preparation of phage and the phage transduction was performed as described [21]. One kb long sequences upstream and downstream of *mgtC* were cloned into the pJSC347 on both sides flanking the hygromycin cassette. The mutant was checked by PCR and southern blot using probes corresponding to the *mgtC* and hygromycin genes. Complementation of the *mgtC* mutant was performed using a chromosomal copy of the *mgtC* gene placed under the control of its own promoter. A DNA fragment including the *mgtC* gene and 840 bp upstream (which contains the intergenic region between *MMAR_2685* and *MMAR_2686* as well as *MMAR_2687* gene) was amplified by PCR using primers pMV306-*XbaI*-59

and pMV306-*HindIII*-39 and was cloned at the *XbaI* and *HindIII* sites of the integrative vector pMV306 [22]. The resulting plasmid was electroporated in the *mgtC* mutant to integrate the *mgtC* gene with its upstream sequences at the chromosomal *attB* site with selection on 7H10 agar plates containing kanamycin. As a control, the empty pMV306 vector was also electroporated into the wild-type strain and the *mgtC* mutant strain.

Zebrafish embryos injections and microscopy

Experiments were performed using the *golden* zebrafish mutant [23] or the *Tg(mpx:EGFP)* where GFP is specifically expressed in neutrophils [24]. Zebrafish were raised and maintained according to standard procedures [25]. Embryos were obtained from pairs of adult fish by natural spawning and raised at 28.5°C in tank water. Ages are expressed as hours or days post fertilization (hpf or dpf). Mycobacteria from mid-log phase cultures grown in Sauton's medium were washed twice in PBS, resuspended in PBS and homogenized with a 26G syringe (five times) at an OD₆₀₀ of 3. Zebrafish larvae of 30 hpf (caudal vein injection) or 3 dpf (subcutaneous injection) were anesthetized by immersion in buffered tricaine (Sigma A-5040) and manually dechorionated, if needed. For subcutaneous infection, embryos were fed with tetrahymenas from 5 dpf to the end of the experiment, 3 times per week. They were injected with 1 nl of bacterial suspension using a Tritech Research digital microINJECTOR (MINJ-D). To determine bacterial loads in infected embryos, groups of two infected embryos were collected and dissociated using the BD mycoprep Kit. Suspensions were homogenized with a 26G syringe (five times) and dilutions were plated on Middlebrook 7H10 supplemented with 25 mg/ml of kanamycin to determine the colony forming units (CFU). All quantitative results are from triplicate experiments. Wide-field, bright-field and fluorescence live microscopy of infected embryos were performed using an Olympus MVX10 epifluorescence microscope. Images were acquired with a digital color camera (Olympus XC50) and processed using CellSens (Olympus). Fluorescence filters cubes (FITC-MVX10 and TRITC-MVX10) were used to detect green and red light, respectively. Confocal fluorescence microscopy was performed using a Leica DM2500CSQ upright microscope with a Leica TCS SPE confocal scan head, differential interference contrast (DIC) optics and a SuperZGalvo SPE z-step controller. For fixed-sample observations, embryos in 50% glycerol in PBS were mounted flat onto depression transparent slides with a coverslip and observed with a 106 Leica Apo 0.3 NA, 406 Leica Apo oil 1.15 NA or 636 Leica Apo oil 1.33 NA objectives. Overlays of fluorescent and DIC images and 2D reconstructions of image stacks were processed and assembled using LAS-AF software. Final image analysis and visualization were performed using GIMP 2.8 freeware to adjust levels and brightness and to remove out-of-focus background fluorescence.

Ethics statement

All animal experiments described in the present study were conducted at the University Montpellier 2 according to European Union guidelines for handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and were approved by the Direction Sanitaire et Ve'térinaire de l'Herault and Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale under reference CEEA-LR-13007. The breeding of adult fish adhered to the international guidelines specified by the EU Animal Protection Directive 2010/63/EU and adult zebrafish were not sacrificed for this study. For survival curves, cardiac rhythm was used as a clinical criteria to fix the endpoint at which embryos are euthanized using the anaesthetic Tricaine up to a lethal dose. Condition of the infected animals was monitored three times a day. For CFU counts, embryos were anaesthetized with Tricaine up to a lethal dose before lysis with triton. Embryos that survive infection were anaesthetized with Tricaine up to a lethal dose before bleach treatment. For live imaging analysis, embryos were anaesthetized with Tricaine. For microscopic observation of fixed samples, embryos were fixed with 4% paraformaldehyde after being anaesthetized with Tricaine up to a lethal dose.

Macrophage infection assays

J774 cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). J774 cells were allowed to adhere in a 24-well plate at a density of 5610⁴ cells/well for 24 h at 37°C in 5% CO₂.

For infection, *M. marinum* cultures grown exponentially in Sauton's medium (OD₆₀₀ around 0.8 to 1) were centrifuged, washed in phosphate buffer saline (PBS) and bacterial clumps were disrupted by 8 successive passages through a 26G needle. The remaining aggregates were then eliminated with a short spin (1 min at 1,100 rpm). For experiments including the *wbb12* mutant as control, mycobacteria were grown on Sauton's agar plates (to induce LOS production in the wild-type strain) containing 10% OADC enrichment for 5–7 days as described [26]. Bacterial lawns were scraped off the plates, resuspended in 1 ml of PBS and clumps were disrupted as indicated above followed by low speed centrifugation to eliminate aggregates. In all experiments, macrophages were infected at a multiplicity of infection (MOI) of approximately 2. The infection was allowed to proceed for 3 h at 32°C in 5% CO₂ prior to exposure to 200 mg/ml gentamicin for 60 min to kill the remaining extracellular bacteria. Infected cells were then washed three times with PBS. Cells were then lysed with 0.1 ml of 1% Triton X-100 in PBS and the number of intracellular mycobacteria counted by plating appropriate dilutions onto Middlebrook 7H10 agar plates. To evaluate the numbers of phagocytosed bacteria, the ratio between the count of internalized bacteria and the count of bacteria in the inoculum was determined. For kinetic experiments, earlier infection times (0.5, 1, and 2 h) were also assessed. To evaluate the multiplication rate, after the three washes with PBS, infected cells were incubated for 5 days in DMEM medium supplemented with 20 mg/ml gentamicin (a concentration that

prevents growth of *M. marinum* strains) at 32°C in 5% CO₂ prior to cell lysis and bacterial enumeration. The ratio between the number of internalized bacteria at day 5 and the number of internalized bacteria after 3 h infection was calculated. To evaluate bacterial adherence, the same procedure was applied, except that J774 cells were incubated 30 min with 10 mg/ml cytochalasin D prior to infection or were incubated at 4°C during the phagocytic time. All results are derived from at least three independent experiments where strains are tested in triplicate.

To visualize and count the number of bacterium-containing macrophages, a similar protocol was used except that macrophages were allowed to adhere on coverslips prior to infection with fluorescent bacteria carrying the pMV261_mCherry (Table 1). Following exposure to gentamycin, infected cells were washed three times in PBS and labeled with fluorescein-conjugated phalloidin (Sigma), according to the manufacturer's instructions to visualize the shape of the cells. Stained cells were then observed using a Zeiss Axioimager and quantification of mycobacterium-residing cells was determined by counting 20 fields per coverslip. Each strain was analyzed in triplicate.

HeLa cells infection assays

HeLa cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. HeLa cells were allowed to adhere in 24-well plates at a density of 5610⁴ cells per well for 24 h at 37°C in 5% CO₂. For infection, mycobacteria were prepared as described above from Sauton's agar plates because the *wbb12* mutant was also included in the experiment. The internalization protocol was similar to the phagocytosis protocol.

Extraction and analysis of mycobacterial apolar lipids

M. marinum strains were grown to mid-log growth phase in Sauton's medium containing or not magnesium sulfate and labeled with 0.5 mCi/ml [1-¹⁴C]propionate (specific activity of 54 mCi/mmol, American Radiolabeled Chemicals, Inc) for 24 h. The non-polar fraction was separated from the polar fraction as described [27]. The [1-¹⁴C]-propionate-labeled apolar lipids were extracted by adding 2 ml of CH₃OH/0.3% NaCl (100/10; v/v) and 2 ml of petroleum ether to the cell pellet followed by stirring for 1 h. After centrifugation, the upper petroleum ether layer was removed and 2 ml of petroleum ether was added to the lower phase. The combined petroleum ether extracts were then evaporated under a nitrogen stream to yield apolar lipids that were resuspended in CH₂Cl₂ and analyzed by TLC using silica gel plates (5735 silica gel 60F254; Merck, Darmstadt, Germany). Equivalent amounts of lipids (20 000 cpm) were spotted on TLC plates that were run in various solvent systems: Petroleum ether/diethylether 9:1 (v/v) for PDIM; chloroform/methanol 19:1 (v/v) for TDM and PGL and chloroform/methanol 99:1 (v/v) for PAT. TLCs were exposed to a Kodak Biomax MR film for 24 h.

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strains, plasmids, phages	Description or phenotype	Source/Ref.
<i>Mycobacterium marinum</i> strains		
Mma M	wild-type	[16]
Mma DmgtC	DmgtC	This study
Mma DmgtC+mgtC	DmgtC+attB::mgtC	This study
Mma Dwbb12	Dwbb12	[26]
<i>Mycobacterium smegmatis</i> strains		
mc ² 155	Electroporation-proficient <i>ept</i> mutant of <i>M. smegmatis</i> strain mc ² 6	[49]
Plasmid		
pJSC347	Vector for cloning allelic-exchange substrates to be used for specialized transduction, Hyg ^R	[50]
pMV306	Single-copy-integrating vector, Kan ^R	[22]
pMV306-mgtC	pMV306 carrying the <i>mgtC</i> gene and 840 bp upstream, Kan ^R	This study
pMV261-mCherry	pMV261 carrying mCherry under the control of the <i>hsp60</i> promoter, Zeo ^R	[51]
Phage		
phAE159	Conditionally replicating shuttle phasmid derived from the lytic mycobacteriophage TM4	Kind gift from W.R. Jacobs

doi:10.1371/journal.pone.0116052.t001

Statistical analyses

For zebrafish embryos infections, statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 (Graphpad Software). Survival curves were compared between two groups by using the logrank test. For cells infection assays, averages were compared by using an unpaired Student *t*-test. Only *P*-values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Identification of a MgtC-like protein in *M. marinum* and construction of *Mma mgtC* mutant strain

An MgtC-like protein is encoded by the *MMAR_2687* gene in *M. marinum* genome (<http://mycobrowser.epfl.ch/marinolist.html>). The *Mma* MgtC protein shares strong similarity to the *Mtb* MgtC protein (82% identity, 90% similarity) (Fig. 1A), the major difference residing in the very C-terminal end of the protein. The sequence of *Mma* MgtC is also well conserved with that of *S. Typhimurium* MgtC in the N-terminal half of the protein (61% identity, 73% similarity), but more divergent in the C-terminal half (102 last a.a. 20% identity, 37% similarity). In addition, *Mma* MgtC harbors four conserved residues that have been shown to be important for *Salmonella* MgtC function (Fig. 1A) [28]. The genomic organization around *mgtC* is conserved between *M. marinum* and *M. tuberculosis* (Fig. 1B). In both species, *mgtC* is located downstream of several genes coding for PPE proteins and is adjacent to a gene coding for a protein of unknown function (Rv1810 or *MMAR_2686*). This genomic organization differs from the one of *S. Typhimurium* where *mgtC* is in operon with a gene that encodes a Mg²⁺

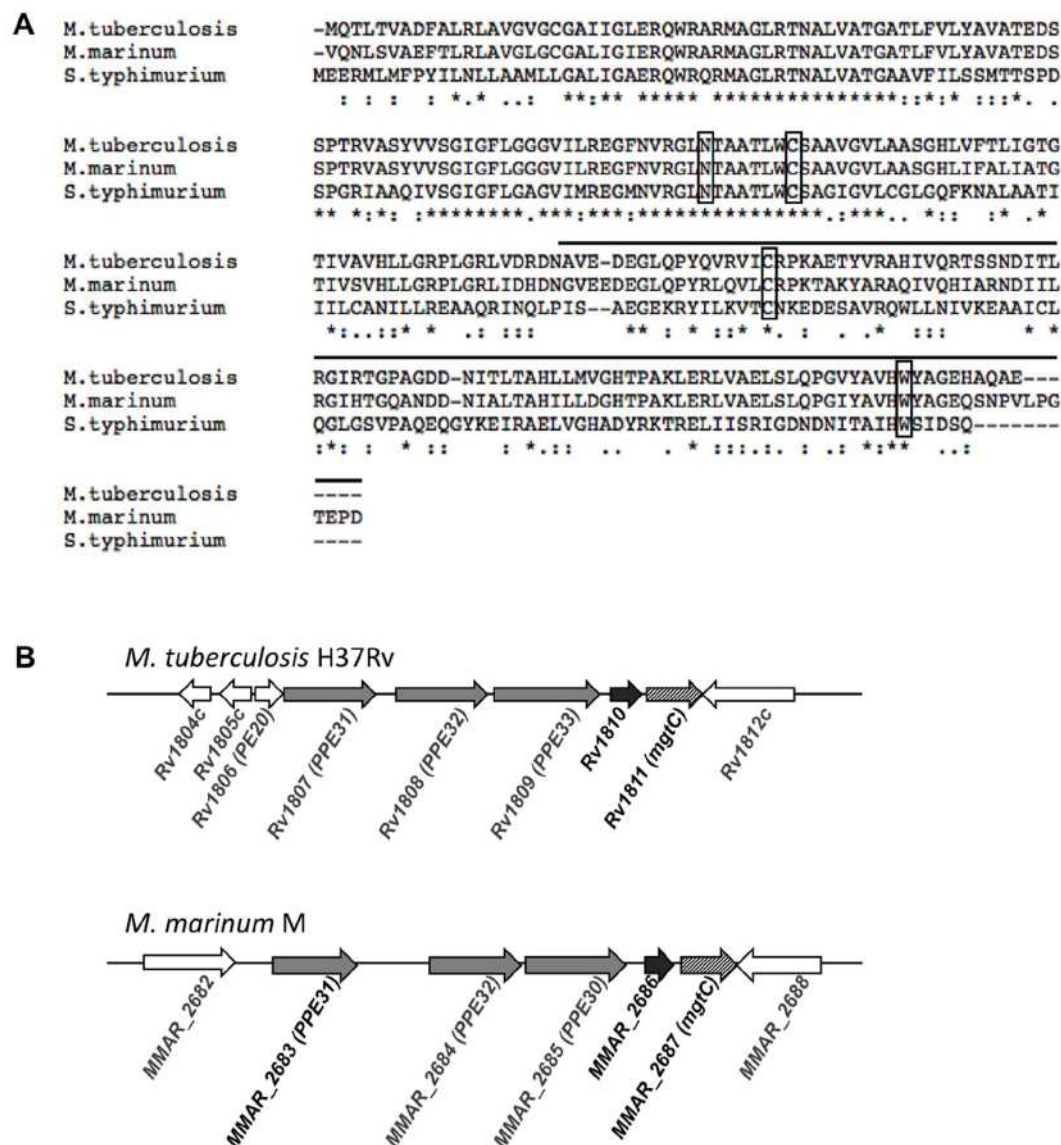


Fig. 1. Alignment of mycobacterial MgtC proteins and genetic environment of *mgtC* gene. (A) Alignment of *S. Typhimurium* MgtC (Accession Number AAL22622.1), *M. tuberculosis* MgtC (Accession Number NP_216327.1) and *M. marinum* MgtC (Accession Number ACC41130.1) using ClustalW. The upper line indicates the soluble C terminal part. Rectangles indicate four conserved residues that have been shown to be essential for *Salmonella* MgtC function. (B) Genetic environment of *mgtC* gene (striped arrows) in *M. tuberculosis* and *M. marinum* genomes. In both species, the *mgtC* gene is adjacent to *Rv1810* that is homologous to *MMAR_2686* (black arrows) and to PPE genes (grey arrows). The *MMAR_2688* gene is homologous to *Rv1812c*.

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g001

transporter. The position of the regulatory sequences that drive *Mma mgtC* expression is not known.

To investigate the role of *mgtC* in *M. marinum* pathogenesis, we generated a loss-of-function mutation by replacing the *mgtC* gene with a Hygro^r cassette via homologous recombination. The mutation was confirmed by PCR and Southern

blotting (S1 Fig.). This mutation was complemented by introducing in the chromosome the wild-type *mgtC* gene as well as upstream sequence at the bacterial *att* site.

Regulation of *Mma mgtC* expression by Mg^{2+} and growth of *mgtC* mutant in Mg^{2+} deprived medium

MgtC is highly induced by low Mg^{2+} concentrations in *S. Typhimurium* [11]. In *M. tuberculosis*, Mg^{2+} deprivation only slightly induced the *mgtC* gene (1.5 fold) whereas genes upstream of *mgtC* (Rv1806 through Rv1809) are clearly induced [13, 14]. *M. marinum* M strain was grown in Sauton's medium with or without Mg^{2+} and RNA was extracted to monitor the expression of *mgtC* along with two upstream genes: *MMAR_2686* that is located immediately upstream *mgtC* and *MMAR_2683* (*PPE31*), which is the first of the *PPE* genes. RT-PCR experiments indicated that expression of all three genes is highly induced by Mg^{2+} deprivation (Fig. 2A) whereas the control gene *sigA* is similarly transcribed in both conditions. Quantitative RT-PCR using *sigA* gene as internal control indicated an induction level by low Mg^{2+} of about 30 fold for *PPE31* and *mgtC* (Fig. 2B). The induction rate of *MMAR_2686* is lower (about 5 fold), due to higher endogenous expression in high Mg^{2+} medium.

RNA extraction was also performed from *mgtC* mutant and complemented strain, to test the expression of *mgtC* from an ectopic location. As anticipated, the *mgtC* gene is not expressed in the *mgtC* mutant (whereas *PPE31* and *MMAR_2686* are expressed and regulated similarly than in the wild-type context) (Fig. 2). The *mgtC* gene is expressed and regulated by Mg^{2+} in the complemented strain to a level similar to the one found in the wild-type strain. This result demonstrates that *mgtC* is properly expressed and regulated at the *attB* locus in the complemented strain. Thus, upstream sequences present in the complementation vector (i.e. included in the 840 bp upstream *mgtC*) are sufficient for Mg^{2+} regulation of *mgtC*.

The growth rate of the *mgtC* mutant was evaluated in liquid cultures. The mutant shows a slight growth defect at late exponential phase in Mg^{2+} -deprived broth medium (Fig. 3A), but not in medium supplemented with Mg^{2+} (Fig. 3B). As expected, the complemented strain behaves similarly to the wild-type strain in Mg^{2+} -deprived medium, confirming the proper expression of the *mgtC* gene at the *attB* locus.

Together, these data indicate that MgtC is induced by Mg^{2+} deprivation and required for optimal growth in Mg^{2+} -deprived medium in *M. marinum*. The results allowed validating the complementation of *mgtC* mutant by an extrachromosomal copy of the gene with its upstream DNA sequence.

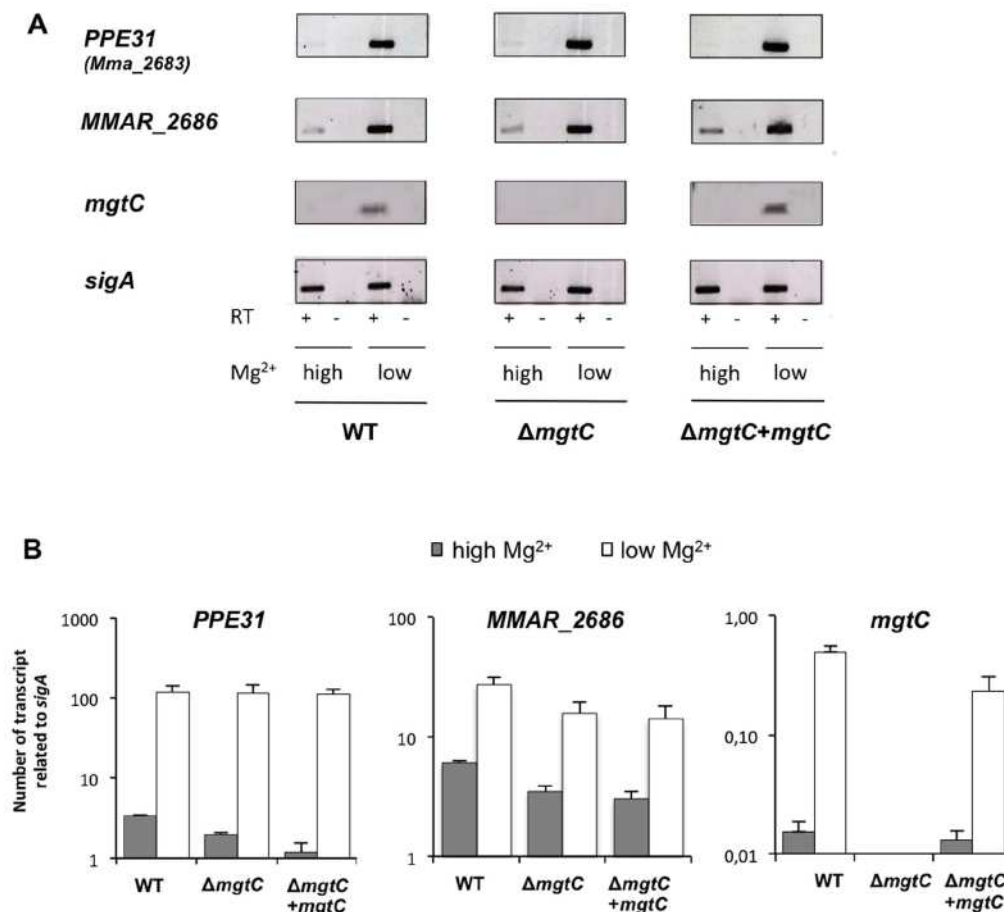


Fig. 2. Expression of *Mma mgtC* and upstream genes in high Mg²⁺ and low Mg²⁺ conditions. (A) RT-PCR experiment on RNA isolated from *M. marinum* strains grown in high or low Mg²⁺ with primers specific for *mgtC*, *MMAR_2686*, *MMAR_2683* (*PPE31*) and *sigA*. Experiment was carried out with wild-type strain, *mgtC* mutant strain and complemented strain. Controls where reverse transcriptase was omitted (indicated by RT -) are done to verify the absence of genomic DNA contamination in the RNA sample. The *sigA* gene is used as control. (B) Quantification of *mgtC*, *MMAR_2686* and *MMAR_2683* RNA by Q-RT-PCR experiment using RNA isolated from *M. marinum* strains grown in high or low Mg²⁺. The sigma factor *sigA* was used as an internal standard. Results are expressed as means+standard deviations (SD) from a representative experiment performed in triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g002

Behaviour of *mgtC* mutant upon intravenous infection in zebrafish embryos

Studies were undertaken using the zebrafish infection model to probe the pathogenicity of the *Mma mgtC* mutant. *MmaM*, *DmgtC* mutant and *DmgtC+attB::mgtC* strains were transformed with pMV261_*mCherry* (S1 Table) and red fluorescent mycobacteria were injected intravenously (*iv*) in the Caudal Haematopoietic Tissue (CHT) in 30 hpf embryos. In this biological system, *iv*-injected mycobacteria are rapidly phagocytosed by circulating macrophages [29]. The infected embryos were monitored for survival and bacterial loads at different time points. The survival curves indicated that the virulence of the *mgtC* mutant is not significantly different from the parental *Mma M* or the complemented strains

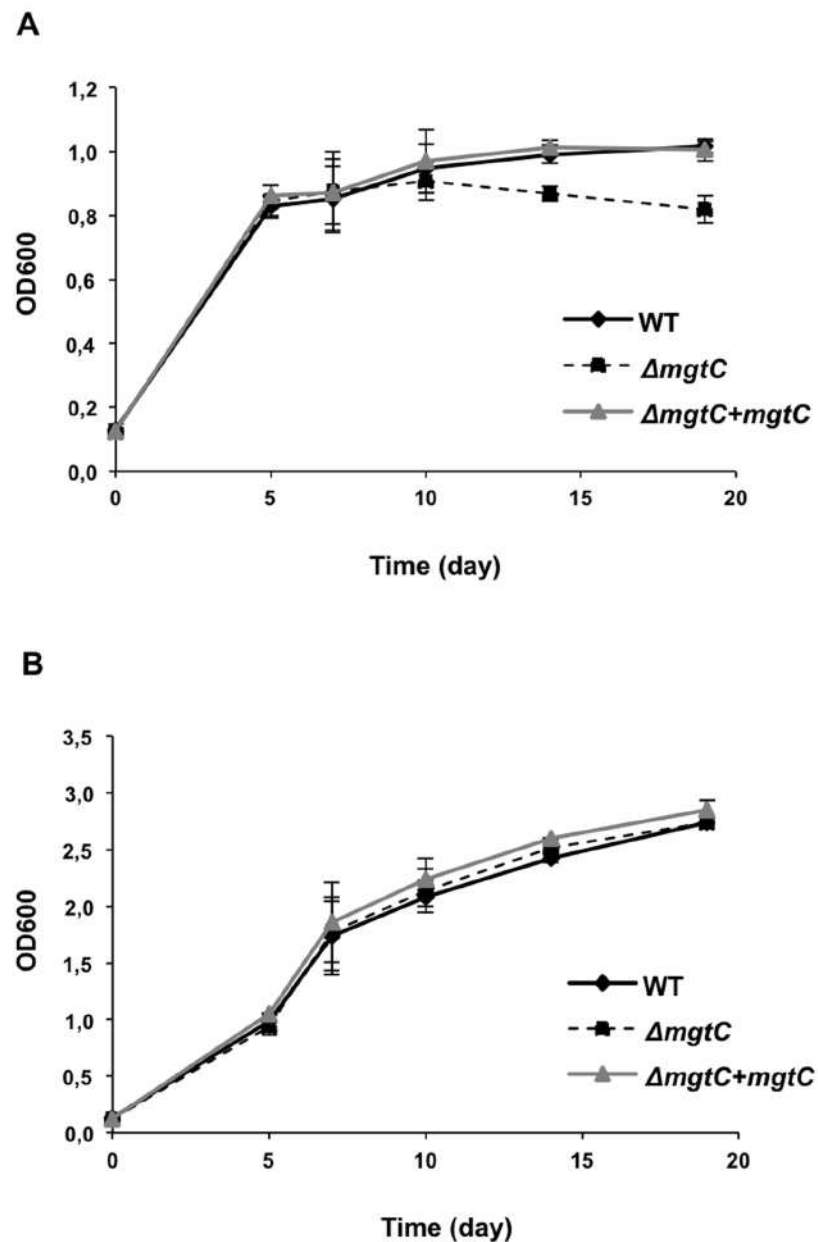


Fig. 3. Growth of *Mma mgtC* mutant in Mg^{2+} deprived liquid medium. (A) Growth curves of *M. marinum* wild-type, *DmgtC* and *DmgtC+mgtC::attB* strains grown in Sauton's medium without magnesium. (B) or in regular Sauton's medium supplemented with magnesium. OD₆₀₀ is indicated over the growth period. The curves from two independent experiments are shown with SD.

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g003

(Fig. 4A). The bacterial loads after 3 dpi or 5 dpi were slightly lower with the *mgtC* mutant, since less CFU were counted in embryos injected with the mutant strain comparatively to the wild-type strain (Fig. 4B). The number of neutrophils

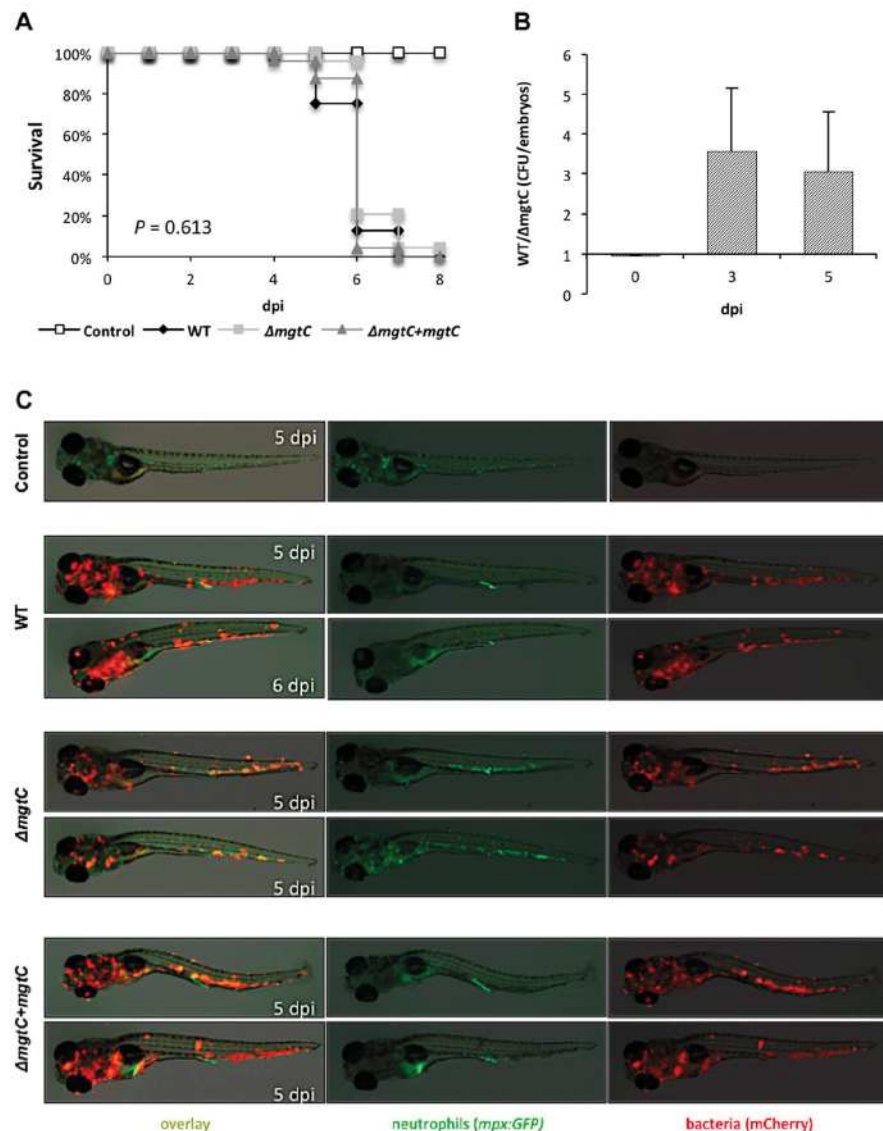


Fig. 4. Intravenous infection of zebrafish with the *Mma mgtC* mutant. (A) Survival of 30 hpf embryos intravenously infected with 150–200 CFU of wild-type *M. marinum*, *DmgtC* mutant or complemented strain compared to non-injected controls (n524). Results are from a representative experiment (infection with 133 CFU for wild-type, 142 CFU for *mgtC* mutant and 205 CFU for complemented strain) out of three independent experiments. (B) Ratio of whole embryo bacterial counts between *Mma M* and *mgtC* mutant strain-infected embryos at 0, 3 and 5 dpi. A ratio of 1 indicates equal CFU values. A ratio ≥ 1 indicates that WT CFU are higher than *mgtC* mutant CFU. Results are expressed as mean CFU per embryo $\pm$ SD from four independent experiments (0 and 5 dpi) or two independent experiments (3 dpi). The mild difference between mutant and wild-type strains is not statistically significant (Student Test). (C) Visualization of neutrophils in *mpx:GFP* infected larvae at late stages of infection (one day before embryo's death). Neutrophils fluoresce in green while *mcherry*-expressing bacteria fluoresce in red. Neutropenia occurs in wild-type and complemented strains but not in the *mgtC* mutant.

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g004

has been shown to dramatically decrease in zebrafish larvae unable to control bacterial proliferation upon injection with *Staphylococcus* or *Shigella* and neutropenia has been proposed to correlate with bacterial overgrowth [30, 31]. We took advantage of the *mpx*:GFP transgenic line (harbouring green fluorescent neutrophils) to follow the behaviour of neutrophils at late time of infection. By infecting *mpx*:GFP embryos with *M. marinum* strains, we observed the day before embryo's death that the increased number of bacteria is associated with a drastic decrease of green fluorescence in wild-type and complemented strains, indicative of a neutropenia (Fig. 4C). Interestingly, neutropenia was not observed with the *mgtC* mutant strain the day before embryo's death.

Overall, these results suggest that the *mgtC* mutant may not replicate as efficiently as the wild-type strain in zebrafish embryos, but that this effect is not sufficient to influence the outcome of the infection since embryos died similarly with both strains.

The *Mma mgtC* mutant is more efficiently phagocytosed than its parental strain

To further explore the behaviour of *Mma* strains towards neutrophils at early infection time, we carried out subcutaneous injections because it has been reported that, with this injection route, bacteria are directly taken up by neutrophils recruited at the infection site [32]. These previous subcutaneous experiments were performed using non-pathogenic *E. coli* and we report here for the first time subcutaneous injections of *Mma*. Comparing the death curves of embryos failed to show differences between the wild-type and mutant strains (Fig. 5A). Confocal microscopy was then used to study the recruitment of neutrophils at the early stage of infection (4 hpi). In agreement with the previous report on *E. coli* [32], we show here that neutrophils are recruited at the injection site and that mycobacteria are taken up by neutrophils upon sub-cutaneous injection (Fig. 5B). Interestingly, a higher proportion of red fluorescent bacteria within the green fluorescent neutrophils was detected with the mutant than with its parental or complemented strains, suggesting that the frequency at which the mutant is phagocytosed by neutrophils is higher than the other strains (Fig. 5B). The quantification of infected neutrophils confirmed a significant higher number for *mgtC* mutant, which was approximately twice that of the two reference strains (Fig. 5C).

To further investigate the behaviour of the *mgtC* mutant towards phagocytosis, experiments were carried out using phagocytic and non-phagocytic cells. Measurement of entry of bacteria into murine J774 macrophages indicated a two-fold increased uptake with the mutant strain as compared to the wild-type or complemented strains (Fig. 6A). The phagocytosis rate was next addressed by visualization of fluorescent bacteria and numeration of infected macrophages, leading to a similar pattern (Fig. 6B). An increased phagocytosis of similar magnitude was also observed upon infection of primary bone-marrow derived macrophages isolated from mice (BMDM) (data not shown). When the cells were

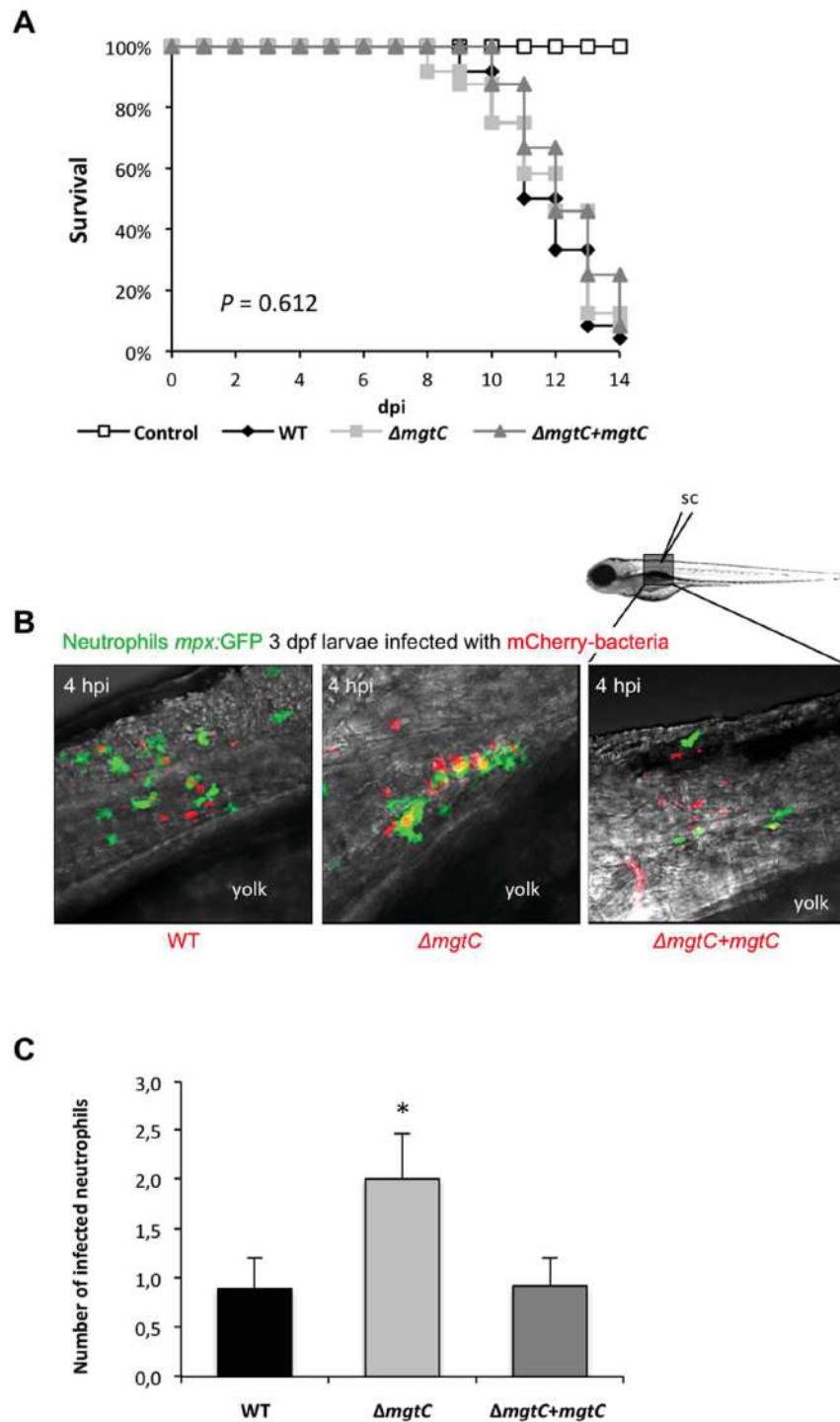


Fig. 5. Increased phagocytosis of *mgtC* mutant by neutrophils upon subcutaneous injection of zebrafish embryos. (A) Survival of embryos subcutaneously injected at 3 dpf with approximately 50–100 CFU of wild-type *M. marinum*, *mgtC* mutant, complemented strain or PBS as control (n524). Results are from a representative experiment (infection with 119 CFU for wild-type, 74 CFU for *mgtC* mutant and 32 CFU for complemented strain) out of three independent experiments. A drawing of the injection site is shown. (B) Maximum intensity projection of neutrophil-phagocytosed bacteria at the site of injection, at 4 hpi by confocal microscopy. (C) Quantification of bacterial phagocytosis by neutrophils. The number of neutrophils containing phagocytosed bacteria at the site of injection was counted at 4 hpi using confocal microscope of a minimum of 10 embryos. Results are expressed+SD from a representative (104 CFU for wild-type, 82 CFU for *mgtC* mutant and 34 CFU for complemented strain) of three independent experiments. Asterisk indicates statistical significance (* $P \leq 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g005

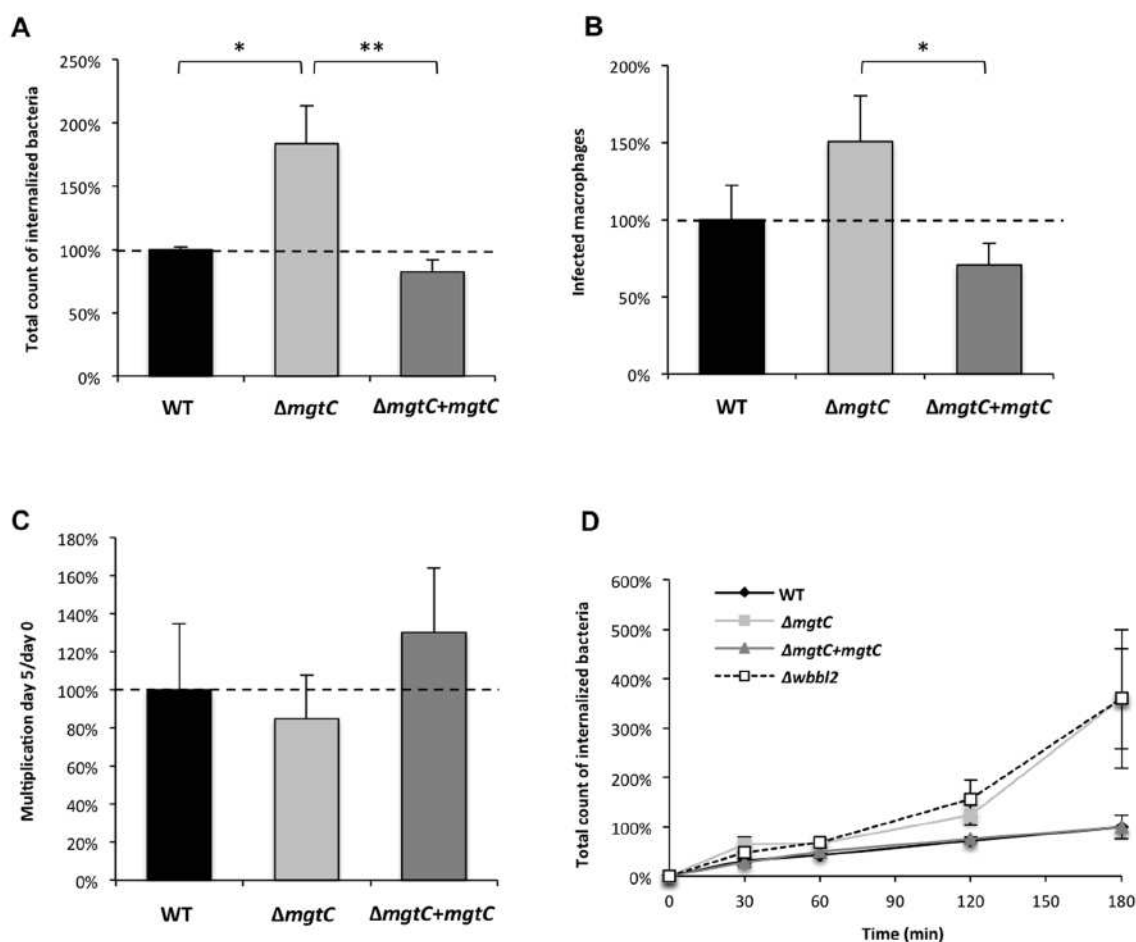


Fig. 6. Phagocytosis and replication of the *mgtC* mutant in the J774 macrophage cell line. (A) Phagocytosis of the *mgtC* mutant and complemented strains by J774 macrophages is normalized to 100% for the wild-type strain. Results are expressed as means+SD from four independent experiments. (B) Numeration of macrophages infected with *mcherry*-expressing bacteria, normalized to 100% for the wild-type strain. Results are expressed as means+SD from three independent experiments. (C) Replication of the *mgtC* mutant and complemented strains by J774 macrophages normalized to the wild-type strain. Results are expressed as means+SD from four independent experiments. (D) Kinetic of phagocytosis of the *mgtC* mutant and complemented strains by J774 macrophages normalized to 100% for the wild-type strain at 180 min. The *wbb12* mutant strain is used as a positive control. Results are expressed as means $\pm$ SD (error bars) from three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g006

lysed five days after infection to monitor the replication rate, the replication of the mutant appeared slightly lower than the other strains but the difference was not significant (Fig. 6C), which was also confirmed in BMDM (data not shown). We next analyzed the kinetic of *mgtC* mutant phagocytosis by including a *Mma* mutant defective in lipooligosaccharide (LOS) production (*DwbbL2* strain), which had been shown to be more efficiently phagocytosed by macrophages [26]. Both the *mgtC* and the *wbbL2* mutant share a highly similar kinetic profile (Fig. 6D). Differences with the parental strain appear more pronounced after 1 hr of infection, suggesting that inactivation of *mgtC* does not alter very early step of bacterial phagocytosis. Accordingly, when the experiment was carried out at 4°C to prevent active phagocytosis, no difference between the *mgtC* mutant and the parental strain was observed (Fig. 7A). A similar pattern was also observed following addition of cytochalasin D that prevents actin-driven phagocytosis (Fig. 7B). Hence, the increased phagocytosis of the mutant strain appears mediated by an actin-dependent process. Collectively, these results suggest that the higher phagocytic rate of *mgtC* mutant is not due to increased bacterial adherence to macrophages but is very likely due to a higher uptake of bacteria.

Mycobacterium species have been shown to have the ability to invade non-phagocytic cells, as epithelial cells [33, 34]. To investigate the behaviour of the *mgtC* mutant towards non-phagocytic cells, internalization experiments were performed using epithelial HeLa cells (Fig. 7C). Whereas the *wbbL2* mutant deficient for LOS synthesis shows higher internalization in HeLa cells, the *mgtC* mutant, as well as its parental and complemented counterpart, were equally internalized. From these results, it can be inferred that the phenotype of the *mgtC* mutant is restricted to professional phagocytes.

Cell surface analysis

Whereas the function of MgtC in mycobacteria remains unknown, its recent identification as a protein that modulates ATP-synthase in *Salmonella* implies that MgtC may have pleiotropic effects. Previous studies in *Salmonella* indicated that the level of some outer membrane proteins are modulated in a *mgtC* mutant grown in low Mg^{2+} medium, which may be related with defect in bacterial division and cell elongation [35]. Bacterial surface plays a role in phagocytosis. In this respect, several mycobacterial (glyco)lipids are involved in many aspects of host pathogenesis [36, 37], including the internalization of bacteria by phagocytic and non-phagocytic cells. As mentioned above, LOS are bacterial surface molecules capable to modulate *Mma* phagocytosis [26, 38]. That the *wbbL2* and *mgtC* mutants are different toward internalization within epithelial cells suggests that *mgtC* mutant does not act by modulating expression of LOS. However, other cell wall-associated molecules, such as diacyltrehaloses (DAT) and polyacyltrehaloses (PAT), phtiocerol dimycocerosates (DIM) or phenolic glycolipids (PGL), have been reported to participate in *M. tuberculosis*/*M. leprae* phagocytosis [39–42].

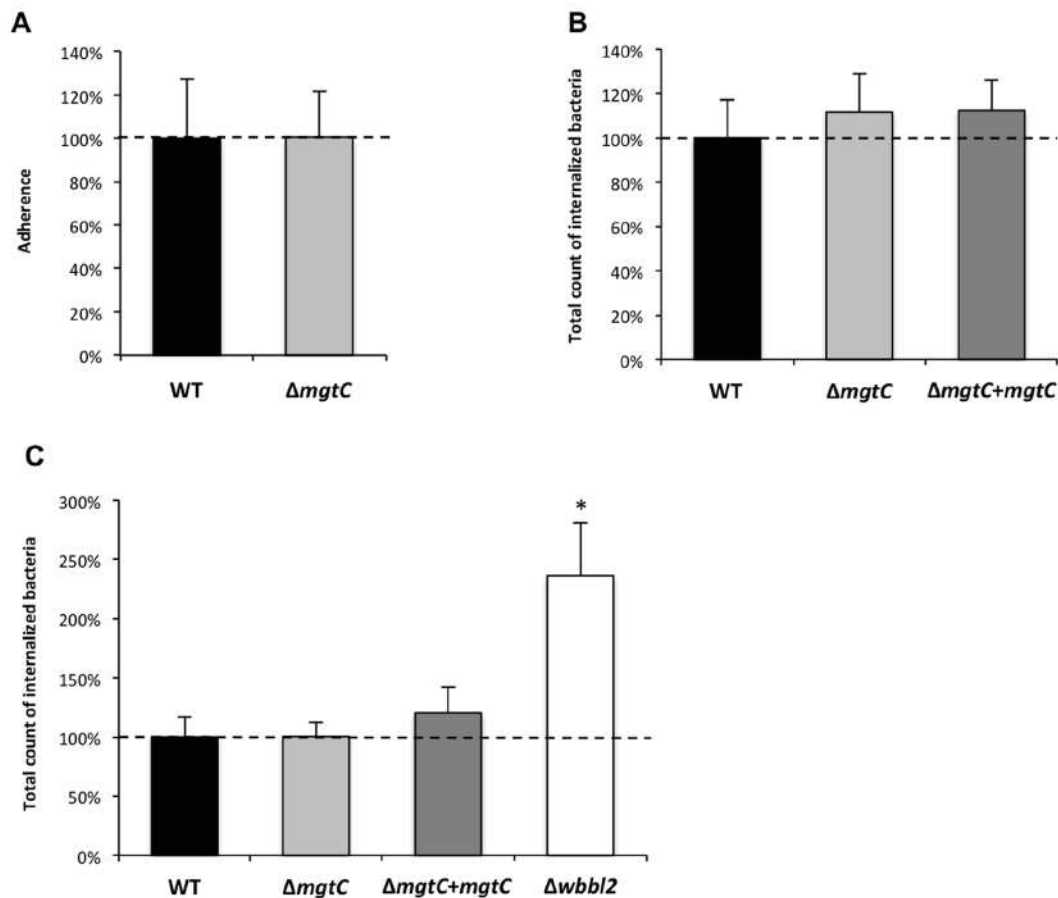


Fig. 7. Adherence of the *mgtC* mutant on J774 macrophages and internalization in HeLa cells. (A) Adherence of the *mgtC* mutant strain to J774 macrophages after a 3-hr period of infection at 4°C, as compared to the WT strain. Results are normalized to 100% for the wild-type strain and expressed as means±SD from three independent experiments. (B) J774 macrophage internalization of the WT, the *mgtC* mutant and the complemented strains after a 3-hr period of infection in the presence of cytochalasin D (10 mg/ml). Results are normalized to 100% for the wild-type strain and expressed as means±SD from three independent experiments. (C) Internalization of the *mgtC* mutant and complemented strains in HeLa cells. The *wbb12* mutant strain is included as a positive control. Results are normalized to 100% for the wild-type strain and expressed as means±SD from four independent experiments. Asterisks indicate statistical significance (* $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0116052.g007

To investigate the molecular basis that may explain the different phagocytosis rate of the *mgtC* mutant, we compared the profile of TDM/PGL, DIM and PAT in wild-type, *mgtC* mutant and complemented strain grown in Sauton's medium with or without Mg^{2+} (S2 Fig.). No significant differences were found between the three strains. If bacterial surface indeed differ between the wild-type and the mutant strains, this implies that differences rely on other surface molecules or that experimental conditions are not suitable to detect more subtle qualitative/quantitative differences.

Discussion

MgtC appears as a unique virulence factor, shared by several intracellular bacterial pathogens, which, at least in *S. Typhimurium* inhibits bacterial's own F_1F_0 ATP synthase [10]. To further investigate the role of MgtC in mycobacteria, we have investigated its regulation and function in *Mma* virulence.

The transcription of the *Mma mgtC* gene and an upstream PPE gene (*PPE31*) is highly induced by Mg^{2+} limitation (about 30 fold). Complementation experiments demonstrated that the *mgtC* regulation is driven by a Mg^{2+} -dependent regulatory element present between the end of PPE genes and the *mgtC* gene and do not rely on the *PPE31* upstream sequences. The regulation of *Mma mgtC* is similar to that of *S. Typhimurium* and *Y. pestis* but contrasts with that of *M. tuberculosis* where the *mgtC* gene is only slightly induced (1.5 fold) by Mg^{2+} deprivation [13, 14]. Hence, a strong regulation by Mg^{2+} is not restricted to cases where *mgtC* is co-transcribed with an Mg^{2+} transporter (as *S. Typhimurium* and *Y. pestis*). The fact that magnesium dependent expression of MgtC is conserved in phylogenetically distantly related bacteria is probably linked to the conserved function of MgtC in adaptation to magnesium fluctuations as indicated by the requirement of *Mma* MgtC for optimal growth in Mg^{2+} -deprived broth medium. Despite the conserved role of *M. tuberculosis* MgtC for optimal growth in low Mg^{2+} media [5], the poor regulation of *Mtb mgtC* by Mg^{2+} suggests that *mgtC* regulation has evolved differently in this species. This could be related to the fact that *M. tuberculosis* is less exposed to environmental conditions, where magnesium concentrations are fluctuating, than non-tuberculous pathogens like *M. marinum* which have an external lifestyle and have to cope with various environmental changes.

MgtC is regarded as an intramacrophage multiplication factor in several intracellular bacterial pathogens that replicate in phagosomes, including *M. tuberculosis* [1]. However, we failed to detect a significant multiplication defect of the *Mma mgtC* mutant in either J774 macrophages or bone-marrow derived macrophages, even though a slight defect was observed. The lack of strong phenotype for the *Mma mgtC* mutant upon zebrafish embryos infection and intramacrophage replication may be related to the *Mma* intracellular niche. Even though *Mma* displays many similar virulence traits to *M. tuberculosis*, it exhibits also notable differences such as the ability to promote actin tail formation in the cytoplasm, probably to favor cell-to-cell spread [43]. *Mma* escapes from the phagosome rapidly and with a frequent rate [44], which may explain the lack of contribution of MgtC in intramacrophage replication. Another hypothesis to explain the discrepancy between the intracellular phenotypes of *M. tuberculosis* and *Mma mgtC* mutants may be related to the *M. tuberculosis* genetic background. Whereas a *mgtC* mutant constructed in the Erdman background exhibited an intramacrophage replication defect [5], an independent unpublished work reported in a review [45] failed to observe an intracellular growth defect for an *mgtC* mutant constructed in the H37Rv background, supporting the view that the

genetic requirements and/or macrophage cell type may account for these differences.

The use of transgenic zebrafish embryos with fluorescent neutrophils allowed us to follow neutrophil behaviour *in vivo* upon *Mma* infection. Earlier studies demonstrated that neutrophils are very efficient to engulf *E. coli* on tissue surface but are virtually unable to phagocytose microbes in fluid environments [32]. Consistently, we confirm here that *Mma* can be phagocytosed by neutrophils shortly after infection upon subcutaneous injection, whereas neutrophils do not phagocytose *Mma* at initial site of infection when injected in the circulation [46]. After injection in the circulation, neutrophils are recruited to the granulomas where they phagocytize dying infected macrophages [46]. At later stages of infection, we observed a neutrophil depletion associated with bacteremia preceding the death of the larvae following infection with wild-type *Mma*. Neutropenia has also been reported in zebrafish embryos unable to control *Staphylococcus* or *Shigella* proliferation [30, 31]. This behaviour has been proposed to be a critical correlate of bacterial overgrowth [30], supported by the fact that in clinical infection, leukopenia is observed in overwhelming infections and is regarded as a poor prognostic sign [47]. Interestingly, neutropenia is not seen in embryos infected with the *Mma mgtC* mutant. The finding that bacterial loads in embryos are restricted with the mutant strain supports the idea of a direct link between neutropenia and the bacterial burden.

Mma MgtC is dispensable for intramacrophage replication, but we uncovered a novel role for MgtC in the early phase of macrophage infection. Our results indicate the *Mma mgtC* mutant is more efficiently phagocytosed than the wild-type strain by neutrophils upon subcutaneous infection of zebrafish embryos. This was subsequently confirmed in *ex vivo* experiments using various types of macrophages. In addition, this phenotype appears specific to phagocytic cells since no difference was found in epithelial cells, which contrasts with a LOS defective mutant that clearly showed increased uptake by macrophages and epithelial cells. In addition, kinetic experiments, as well as experiments carried out at 4°C, indicate that MgtC does not play a role in the initial attachment events of bacteria to macrophages but rather in later steps of the internalization process. Moreover, experiments carried out in the presence of cytochalasin D confirmed that this phenotype relies on an actin-based process. Cumulatively, our results demonstrate that the presence of MgtC limits the phagocytic process. Despite of its phagocytosis phenotype, the *mgtC* mutant is not attenuated in the zebrafish larvae infection model. This finding is consistent with other studies in *Mma* or *M. tuberculosis* mutants that also exhibited higher phagocytosis rate and were not correlated with an increased virulence phenotype in animal models [26, 39].

Several surface/cell wall components, including LOS, DAT/PAT, DIM and PGL, have been shown to modulate mycobacterial phagocytosis [36]. The glycan-rich outer layer of *M. tuberculosis* cell wall can act as an antiphagocytic capsule but its effect is mediated by limiting the association of the bacterium with macrophages [48], which thus differs from MgtC effect. Given the distinct phenotypes characterizing the *mgtC* and LOS mutants towards non-phagocytic cells, we

propose that the differences reside unlikely in these glycolipids. DAT/PAT deficiency improved binding and entry of *M. tuberculosis* both in phagocytic and non-phagocytic cells, thus also differing from the phenotype of *Mma mgtC* mutant [39]. Interestingly, DIM deficiency reduced *M. tuberculosis* internalization in macrophages in an actin-dependent process, without affecting the bacterial binding to macrophages [40]. However, our TLC analysis failed to reveal major differences in DIM between the strains in the conditions tested. Moreover, no differences were found in the other lipids tested (DAT/PAT and PGL). Hence, experimental conditions may not be optimized to detect quantitative differences in those lipids or other surface molecules may be involved. Alternatively, the uptake phenotype may be driven by a mechanism that triggers signaling pathways of phagocytic receptors and/or early trafficking without noticeable bacterial surface modification.

In conclusion, our results indicate that the Mg^{2+} regulation of MgtC and its role for optimal growth in Mg^{2+} -deprived media is conserved among bacteria that are not phylogenetically linked as *M. marinum* and *S. Typhimurium*. The role of MgtC in macrophages has been previously reported to be dissociated from its role in low Mg^{2+} medium [28]. This view is further substantiated by the present study, since *Mma* MgtC appears to have a role towards phagocytic cells linked to phagocytosis rather than intracellular multiplication. Even though the precise role of *Mma* MgtC during the infection process remains to be established, our results suggest that the involvement of MgtC towards professional phagocytes has evolved in bacterial pathogens, possibly to fit to the specific pathogen's lifestyles.

Supporting Information

S1 Fig. Construction of *mgtC* mutant in *M. marinum*. A) A DNA substrate for allelic replacement of the *M. marinum mgtC* gene was generated by cloning 979 bp upstream and downstream *mgtC* sequences to flank the *hyg^R* gene. The locations of primers 1/19, 2/29 and 3/39 used to check the *mgtC* mutant by PCR are indicated by arrows. Electrophoresis migration of PCR fragments 1 (primers 1/19), 2 (primers 2/29) and 3 (primers 3/39) amplified from cultures of wild-type and *mgtC* mutant strain is shown. The upper lane indicates the 1569 bp DNA fragment cloned in the integrative vector pMV306 to complement the *Mma mgtC* mutant. B) Southern blot analysis of the *mgtC* mutant. The genomic structure of gene replacement mutant was examined by Southern blot analysis. Chromosomal DNA of wild-type and *mgtC* mutant strains were digested with *XhoI* and probed with either a segment of DNA of *mgtC* or the *hyg^R* cassette. Hybridization signals at the expected size are detected (1792 bp for the *mgtC* probe in the wild-type strain and 3012 bp for *hyg* probe in the mutant strain).

[doi:10.1371/journal.pone.0116052.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116052.s001) (TIFF)

S2 Fig. Lipid profiles. One-dimensional autoradiographic TLC of [$1-^{14}C$]-propionate-labeled apolar lipids from *M. marinum* wild-type, *mgtC* mutant and complemented strains grown in Sauton's liquid medium A) or in Sauton's liquid

medium without magnesium B). Equal amount (20,000 cpm) of radiolabeled lipids were spotted on TLC plates run in various solvents: chloroform/methanol (19:1, v/v) for TDM/PGL, chloroform/methanol (99:1, v/v) for PAT and petroleum ether/diethylether 9:1 (v/v) for PDIM.

[doi:10.1371/journal.pone.0116052.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116052.s002) (TIFF)

S1 Table. Primers used in the study.

[doi:10.1371/journal.pone.0116052.s003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116052.s003) (DOC)

Acknowledgments

We thank Steve Renshaw (University of Sheffield, UK) for providing the mpx::GFP fish line and William Jacobs (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) for the gift of phAE159 phage. We thank Catherine Gonzalez for fish facility maintenance, Audrey Bernut for assistance with confocal microscopy and the RIO Imaging platform at University Montpellier 2.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB LGZ GL ABBP. Performed the experiments: CB LGZ ABBP. Analyzed the data: CB LGZ GL LK ABBP. Contributed reagents/materials/analysis tools: GL LK. Wrote the paper: CB ABBP.

References

1. Alix E, Blanc-Potard A-B (2007) MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol* 15: 252–256.
2. Blanc-Potard A-B, Groisman EA (1997) The *Salmonella* *selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* 16: 5376–5385.
3. Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, et al. (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2: e11.
4. Thompson JA, Liu M, Helaine S, Holden DW (2011) Contribution of the PhoP/Q regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. *Microbiology* 157: 2084–2093.
5. Buchmeier N, Blanc-Potard A-B, Ehrt S, Piddington D, Riley L, et al. (2000) A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 35: 1375–1382.
6. Lavigne J-P, O'Callaghan D, Blanc-Potard A-B (2005) Requirement of MgtC for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment. *Infect Immun* 73: 3160–3163.
7. Grabenstein JP, Fukuto HS, Palmer LE, Bliska JB (2006) Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. *Infect Immun* 74: 3727–3741.
8. Maloney KE, Valvano MA (2006) The *mgtC* Gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infect Immun* 74: 5477–5486.
9. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC (2009) Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *PLoS One* 4: e5551.
10. Lee E-J, Pontes MH, Groisman EA (2013) A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F₁F_o ATP synthase. *Cell* 154: 146–156.

11. Vecovi EG, Soncini FC, Groisman EA (1996) Mg^{2+} as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84: 165–174.
12. Zhou D, Han Y, Qin L, Chen Z, Qiu J, et al. (2005) Transcriptome analysis of the Mg^{2+} -responsive PhoP regulator in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol Lett* 250: 85–95.
13. Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, et al. (2006) The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 60: 312–330.
14. Yang Y, Labesse G, Carre-Kremer S, Esteves K, Kremer L, et al. (2012) The C-terminal domain of the virulence factor MgtC is a divergent ACT domain. *J Bacteriol* 194: 6255–6263.
15. Blanc-Potard A-B, Lafay B (2003) MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol* 57: 479–486.
16. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, et al. (2008) Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 18: 729–741.
17. Tobin DM, Ramakrishnan L (2008) Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 10: 1027–1039.
18. Ramakrishnan L (2013) Looking within the zebrafish to understand the tuberculous granuloma. In: Divangahi M, editor. *The new paradigm of immunity to tuberculosis. Advances in experimental medicine and biology*. Springer New York. pp. 251–266.
19. Meijer AH, van der Vaart M, Spaijk HP (2014) Real-time imaging and genetic dissection of host–microbe interactions in zebrafish. *Cell Microbiol* 16: 39–49.
20. Torraca V, Masud S, Spaijk HP, Meijer AH (2014) Macrophage–pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Dis Model Mech* 7: 785–797.
21. Larsen MH, Biermann K, Tandberg S, Hsu T, Jacobs William R (2007) Genetic manipulation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
22. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, et al. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456–460.
23. Lamason RL, Mohideen M-APK, Mest JR, Wong AC, Norton HL, et al. (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310: 1782–1786.
24. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW, et al. (2006) A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108: 3976–3978.
25. Westerfield M (2007) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 5th ed. Eugene: University of Oregon Press.
26. Alibaud L, Pawelczyk J, Gannoun-Zaki L, Singh VK, Rombouts Y, et al. (2014) Increased phagocytosis of *Mycobacterium marinum* mutants defective in lipooligosaccharide production. *J Biol Chem* 289: 215–228.
27. Dobson G, Minnikin DE, Minnikin SM, Parlett JH, Goodfellow M, et al. (1995) Systematic analysis of complex mycobacterial lipids. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Goodfellow M. and Minnikin D.E., (eds). pp. 237–265.
28. Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L, et al. (2007) Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Mol Microbiol* 63: 605–622.
29. Clay H, Davis JM, Beery D, Huttenlocher A, Lyons SE, et al. (2007) Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe* 2: 29–39.
30. Mostowy S, Boucontet L, Mazon Moya MJ, Sirianni A, Boudinot P, et al. (2013) The zebrafish as a new model for the *in vivo* study of *Shigella flexneri* interaction with phagocytes and bacterial autophagy. *PLoS Pathog* 9: e1003588.
31. Prajsnar TK, Cunliffe VT, Foster SJ, Renshaw SA (2008) A novel vertebrate model of *Staphylococcus aureus* infection reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. *Cell Microbiol* 10: 2312–2325.

32. Colucci-Guyon E, Tinevez J-Y, Renshaw SA, Herbomel P (2011) Strategies of professional phagocytes *in vivo*: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J Cell Sci* 124: 3053–3059.
33. Bermudez LE, Shelton K, Young LS (1995) Comparison of the ability of *Mycobacterium avium*, *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* to invade and replicate within HEP-2 epithelial cells. *Tuber Lung Dis* 76: 240–247.
34. Flesselles B, Anand NN, Remani J, Loosmore SM, Klein MH (1999) Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 177: 237–242.
35. Alix E, Miki T, Felix C, Rang C, Figueroa-Bossi N, et al. (2008) Interplay between MgtC and PagC in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 45: 236–240.
36. Astarie-Dequeker C, Nigou J, Passemar C, Guilhot C (2010) The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech* 7: e33–e41.
37. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, et al. (2010) *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog* 6: e1001159.
38. Ren H, Dover LG, Islam ST, Alexander DC, Chen JM, et al. (2007) Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Mol Microbiol* 63: 1345–1359.
39. Rousseau C, Neyrolles O, Bordat Y, Giroux S, Sirakova TD, et al. (2003) Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. *Cell Microbiol* 5: 405–415.
40. Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh F-K, Chalut C, et al. (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog* 5: e1000289.
41. Schlesinger LS, Horwitz MA (1991) Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med* 174: 1031–1038.
42. Vilcheze C, Molle V, Carrere-Kremer S, Leiba J, Mourey L, et al. (2014) Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 10: e1004115.
43. Stamm LM, Morisaki JH, Gao L-Y, Jeng RL, McDonald KL, et al. (2003) *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med* 198:1361–1368.
44. Collins CA, De Maziere A, van Dijk S, Carlsson F, Klumperman J, et al. (2009) Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. *PLoS Pathog* 5: e1000430.
45. Smith I (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16: 463–496.
46. Yang C-T, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, et al. (2012) Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe* 12: 301–312.
47. Fine M, Smith M, Carson C, Mutha S, Sankey S, et al. (1996) Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia: A meta-analysis. *JAMA* 275: 134–141.
48. Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D, et al. (2004) The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun* 72: 5676–5686.
49. Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4: 1911–1919.
50. Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, Russell RG, Derrick S, et al. (2002) A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 8: 1171–1174.
51. Alibaud L, Rombouts Y, Trivelli X, Burguie' re A, Cirillo SLG, et al. (2011) A *Mycobacterium marinum* TesA mutant defective for major cell wall-associated lipids is highly attenuated in *Dictyostelium discoideum* and zebrafish embryos. *Mol Microbiol* 80: 919–934.

Figure S1

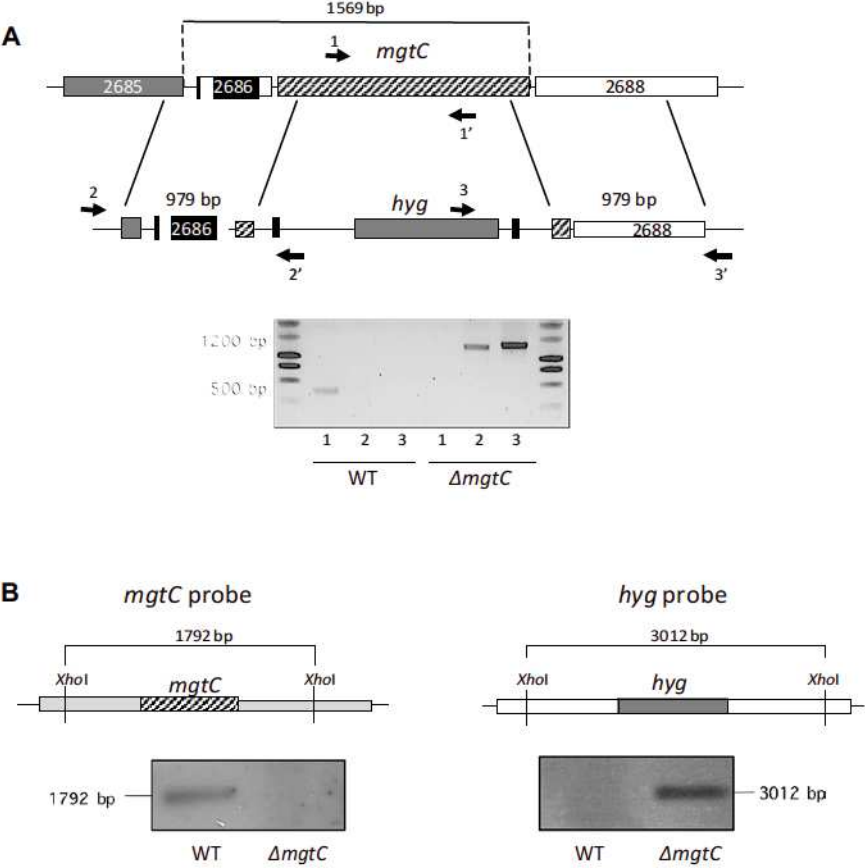


Figure S2

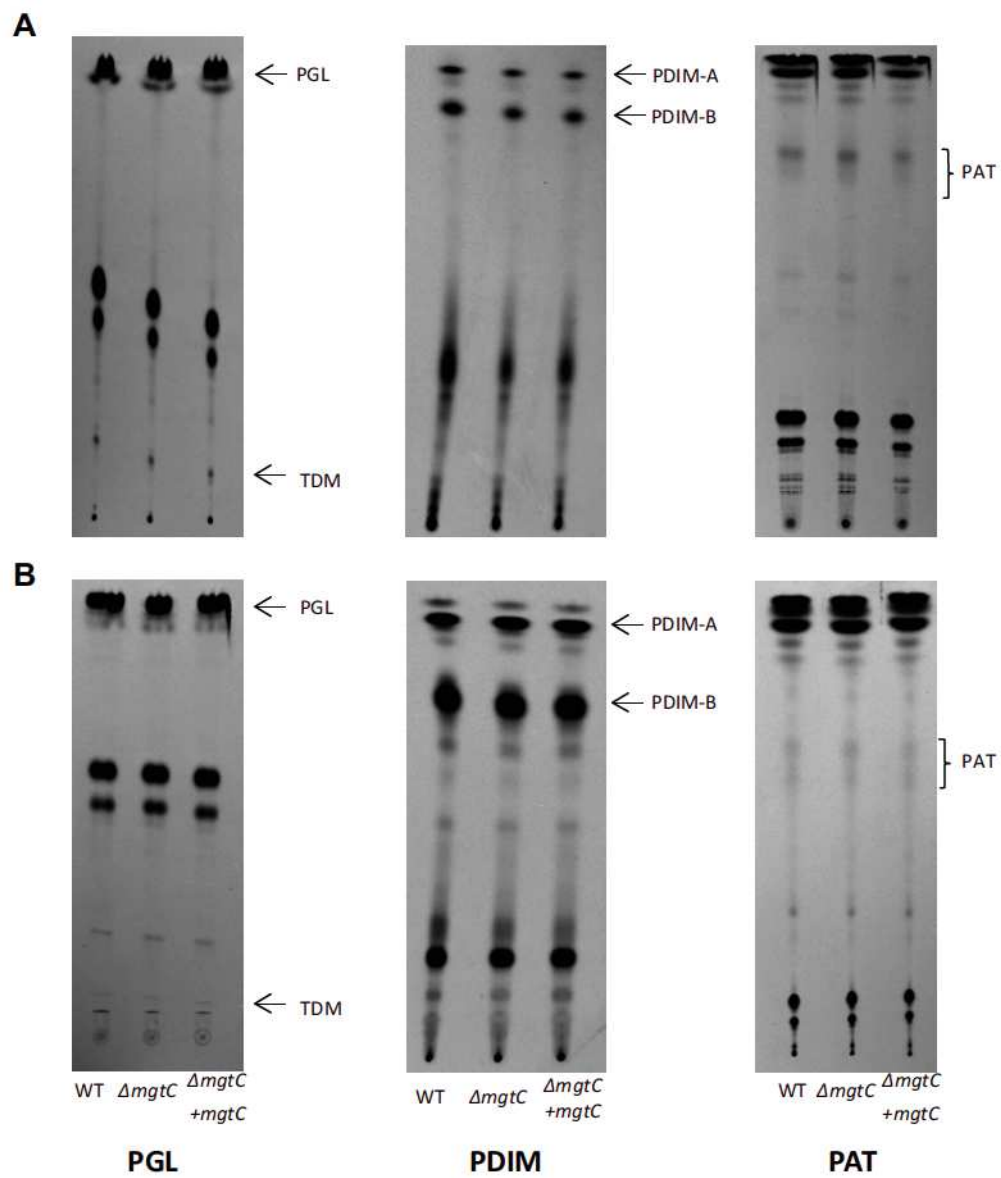


Table S1

Primers	Sequences
pMV306- <i>Xba</i> I-5'	GGTCTAGACAGCCAGGCTAGTGGGA
pMV306- <i>Hind</i> III-3'	CCCAAGCTTTCAGTCCGGCTCGGTGCC
Mma_mgtC_qPCR_F	GGAGCCACGCTATTCTGCTT
Mma_mgtC_qPCR_R	GCGCAAAGATCAAGTGTCG
Mma_2686_qPCR_F	GGCTGTCTGCCATGATTTGG
Mma_2686_qPCR_R	ATCCGGGATTGTGGGTCTTC
PPE31_Mma_qPCR_F	CCGTAGAGGCCCAATACTGC
PPE31_Mma_qPCR_R	AGTGTGGAAGACGCCAGTC
SigA_Mma_qPCR_F	ACGGTGATCGTGCGAAAAAC
SigA_Mma_qPCR_R	CGCGTAGGTGGAGAACTTGT
mgtCint-F	TGGTGGCCACCGGAGCCAC
mgtCint-R	CAACAGGATGTGGGCGGTC
pMV5'	GCCCGGCCAGCGTAAGTAG
pJSC347- <i>Spe</i> I-up-5'	GGACTAGTGATCCATGCTGTGCACC
pJSC347- <i>Hind</i> III-up-3'	CCCAAGCTTCGCTCGATGCCGATGAGG
pJSC347- <i>Xma</i> I-down-5'	CCCCCGGGGCTGGTGGCCGAGCTGTC
pJSC347- <i>Kpn</i> I-down-3'	GGGGTACCGTCAGGTGGCCAAGCCCG

1.1.3 Résultats complémentaires

1.1.3.1 La réponse inflammatoire de l'hôte dans le modèle d'infection d'embryons de

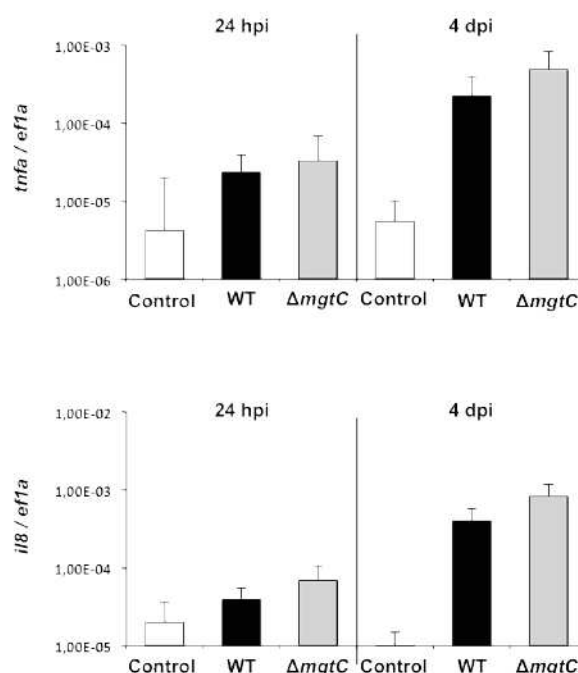
Danio suite à l'infection par la souche sauvage et le mutant *mgtC* de *M. marinum*

La réponse inflammatoire de l'hôte est un aspect important des infections mycobactériennes. Face à un recrutement de neutrophiles et une phagocytose du mutant *mgtC* augmentés, nous avons quantifié l'expression d'un certain nombre de cytokines, notamment le TNF α et l'IL-8. Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les macrophages notamment lors de la phase aiguë d'une infection. L'IL-8 est une chémokine, également sécrétée par les macrophages et connue pour être un facteur de chimiotactisme des neutrophiles et donc induire leur recrutement.

Des extractions d'ARN ont donc été réalisées à partir d'embryons infectés par voie sous-cutanée par la souche sauvage et le mutant *mgtC*, ou non infectés (control) aux temps 24 hpi et 4 dpi. J'ai ensuite effectué une qRT-PCR avec des oligos spécifiques des cytokines. Le gène *ef1a* a été utilisé comme référence.

Les résultats obtenus ont montré que, comme lors d'une infection par voie intraveineuse, les deux cytokines, TNF α et IL-8, sont induites. Cette induction est plus marquée à 4 dpi. Concernant le TNF α , l'induction semble identique entre les deux souches. Pour l'IL-8, l'induction à 24 hpi et à 4 dpi est légèrement plus forte avec le mutant *mgtC* mais la différence avec la souche sauvage n'est pas significative. Cette légère différence est en accord avec l'augmentation de recrutement des neutrophiles observée avec le mutant *mgtC* (figure 39). Les autres cytokines testées (IFN γ 1; IFN γ 2; IL1 β ; CXCL1; CXCL3; CXCL4; CXCL5; CXCL6) ne montraient pas de différence d'induction entre les deux souches (résultats non montrés).

Figure 39 – Expression relative du *tnf* α (haut) et de l'*il8* (bas) à différents temps post-infection sous trois conditions différentes, embryons non injectés (control), souche sauvage (WT) et mutant *mgtC* (Δ *mgtC*) de *M. marinum* injectés en sous-cutanée. Le nombre de CFU injectées pour le WT et le mutant *mgtC* sont respectivement de 47 et 150. Une RT-PCR quantitative en temps réel sur des ARN extraits de l'embryon entier a été réalisée en utilisant *ef1a* comme gène de référence; les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% (Student's *t*-test). Une absence de chevauchement des barres d'erreur indique $P < 0.05$.



1.1.3.2 Analyse protéomique comparative de la souche sauvage et du mutant *mgtC* de *Mycobacterium marinum*

Une analyse protéomique a été réalisée pour identifier une protéine d'environ 25 kDa qui semblait plus exprimée dans le mutant *mgtC*. Des expériences complémentaires ont finalement montré qu'il s'agissait d'un artefact causé par la présence d'hygromycine dans les cultures du mutant *mgtC* mais les données de protéomique pourraient être informatives. Par ailleurs, cette taille étant proche de celle de MgtC de *M. marinum* (25,8 kDa), nous pensions également détecter la protéine MgtC dans cette analyse.

L'analyse protéomique a été réalisée 3 fois selon les conditions suivantes. Toutes les expériences ont été réalisées à partir de lysats de la fraction membranaire provenant de cultures ayant poussé en présence d'hygromycine pour le mutant *mgtC*. Pour les deux premières expériences, les lysats provenaient de cultures en milieu Sauton normal. La troisième expérience a été réalisée à partir de lysats provenant de cultures en milieu Sauton normal ou carencé en Mg^{2+} .

MgtC n'a jamais été détecté même à partir de lysat carencé en Mg^{2+} . Il est possible que l'expression de la protéine soit trop faible ou réfractaire à l'analyse protéomique pour laquelle les protéines membranaires sont moins représentées.

Cependant, la première expérience a permis de mettre en évidence des différences entre la souche sauvage et le mutant *mgtC*. Les principales sont répertoriées dans le tableau 3.

Protéines plus représentées dans la souche sauvage (WT)	MW (kDa)
phosphoglycerate mutase, Gpm_1 [Mycobacterium marinum M]	24,2
TRK system potassium uptake protein CeoB [Mycobacterium marinum M]	24,1
glycosyl transferase [Mycobacterium marinum M]	25,3
short-chain type oxidoreductase [Mycobacterium marinum M]	26,1
lipoprotein LpqQ [Mycobacterium marinum M]	25,9
lipoate biosynthesis protein B LipB [Mycobacterium marinum M]	25,1
glucose-inhibited division protein B Gid [Mycobacterium marinum M]	24,8
triosephosphate isomerase Tpi [Mycobacterium marinum M]	27,3

Protéines plus représentées dans le mutant <i>mgtC</i>	MW (kDa)
glycerophosphoryl diester phosphodiesterase GlpQ1 [Mycobacterium marinum M]	30,5
methyltransferase [Mycobacterium marinum M]	30,5
short-chain type dehydrogenase/reductase [Mycobacterium marinum M]	29,8
phosphate-transport system transcriptional regulatory protein PhoY1 [Mycobacterium marinum M]	24,2
adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase), Adk [Mycobacterium marinum M]	20,1
conserved lipoprotein LppX [Mycobacterium marinum M]	24,0
transcriptional regulatory protein (possibly TetR-family) [Mycobacterium marinum M]	23,7
phosphate-transport system regulatory protein, PhoY2 [Mycobacterium marinum M]	24,7
transcription regulator, TetR family [Mycobacterium marinum M]	23,0
adenine phosphoribosyltransferase, Apt [Mycobacterium marinum M]	19,0

Tableau 3 – Protéines les plus représentées dans la souche sauvage et le mutant *mgtC*. La sélection est basée sur le nombre de peptides (cut-off > 3 et absence pour l'autre souche).

Cette analyse fait ressortir de nombreuses protéines dont la représentation peptidique est différente pour les deux souches. La signification biologique de ces résultats reste inconnue. Parmi les protéines retrouvées dans cette analyse, nous nous sommes notamment intéressés à Adk qui présentait un intérêt par rapport à des données non publiées chez *Salmonella* (EA Groisman, communication personnelle). J'ai mené une étude pour évaluer si la transcription du gène *adk* était différente dans la souche sauvage et le mutant *mgtC*. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence à ce niveau-là. Ne disposant pas d'anticorps dirigé contre cette protéine pour confirmer les données de protéomique, les investigations se sont arrêtées à ce stade.

1.2 Rôle de MgtC chez le pathogène extracellulaire *Pseudomonas aeruginosa* et potentialités anti-virulence du peptide MgtR

1.2.1 Résumé de l'article 2

Les bactéries pathogènes ont développé des stratégies pour s'adapter à l'environnement de l'hôte et résister à la réponse immunitaire de l'hôte. Plusieurs pathogènes bactériens intracellulaires, notamment *Salmonella enterica* et *Mycobacterium tuberculosis*, partagent le facteur de virulence MgtC acquis par transfert horizontal de gène et qui est important pour la multiplication intramacrophagique.

MgtC est également présent chez le pathogène *Pseudomonas*. Nous avons donc étudié pour la première fois le rôle de MgtC dans la virulence d'un pathogène extracellulaire, *Pseudomonas aeruginosa*. Ma contribution dans cette étude s'est faite principalement aux niveaux de la compréhension des mécanismes impliqués dans les phénotypes décrits et de la régulation de la protéine MgtC de *P. aeruginosa*. J'ai également étudié l'effet anti-virulence du peptide MgtR de *Salmonella* sur la protéine MgtC de *P. aeruginosa*.

Un mutant *mgtC* a été construit par nos collaborateurs du LISM à Marseille. Ils ont étudié l'effet du magnésium et la formation de biofilm.

Audrey Bernut a montré que le mutant *mgtC* de *P. aeruginosa* est atténué dans le modèle d'infection d'embryon de danio. Ce phénotype atténué est dépendant de la présence de macrophages. Lors d'expérimentations ex vivo, Anne Blanc-Potard a montré que le mutant *mgtC* de *P. aeruginosa* est plus sensible que la souche sauvage à l'effet bactéricide des macrophages et j'ai montré que cela différait du phénotype d'un mutant T3SS. Cependant, les deux souches ont le même comportement lorsque les macrophages sont traités avec un inhibiteur de l'ATPase vacuolaire. Ces résultats sont en faveur de l'implication d'une étape intramacrophagique lors d'une infection aigüe à *P. aeruginosa* et ils suggèrent que MgtC nécessite l'acidification phagosomale pour jouer son rôle intracellulaire.

De plus, MgtC est nécessaire pour une croissance optimale dans un milieu carencé en Mg^{2+} , une propriété partagée par les facteurs MgtC des pathogènes intracellulaires.

MgtC partage donc une fonction similaire entre pathogènes intracellulaires et extracellulaire ce qui contribue à la subversion macrophagique et affine l'adaptation de la réponse immunitaire de l'hôte en relation aux différents styles de vie bactériens.

Enfin, les phénotypes observés avec le mutant *mgtC* dans les modèles d'infection peuvent être mimés par une souche sauvage qui exprime un peptide antagoniste de MgtC (MgtR), ce qui désigne MgtC comme une nouvelle cible prometteuse dans le cadre d'une stratégie anti-virulence.

1.2.2 Article 2 – A macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens

RESEARCH ARTICLE

A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens

Claudine Belon¹, Chantal Soccia², Audrey Bernut¹, Aurélie Laubier², Sophie Bleves^{2*}, Anne-Béatrice Blanc-Potard^{1*}

¹ Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier, CNRS-UMR5235, Montpellier, France, ² CNRS & Aix-Marseille Université, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (UMR7255), Marseille, France

These authors contributed equally to this work.

* bleves@imm.cnrs.fr (SB); anne.blanc-potard@univ-montp2.fr (ABBP)



Abstract

Pathogenic bacteria have developed strategies to adapt to host environment and resist host immune response. Several intracellular bacterial pathogens, including *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis*, share the horizontally-acquired MgtC virulence factor that is important for multiplication inside macrophages. MgtC is also found in pathogenic *Pseudomonas* species. Here we investigate for the first time the role of MgtC in the virulence of an extracellular pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. A *P. aeruginosa* mgtC mutant is attenuated in the systemic infection model of zebrafish embryos, and strikingly, the attenuated phenotype is dependent on the presence of macrophages. In *ex vivo* experiments, the *P. aeruginosa* mgtC mutant is more sensitive to macrophage killing than the wild-type strain. However, wild-type and mutant strains behave similarly toward macrophage killing when macrophages are treated with an inhibitor of the vacuolar proton ATPase. Importantly, *P. aeruginosa* mgtC gene expression is strongly induced within macrophages and phagosome acidification contributes to an optimal expression of the gene. Thus, our results support the implication of a macrophage intracellular stage during *P. aeruginosa* acute infection and suggest that *Pseudomonas* MgtC requires phagosome acidification to play its intracellular role. Moreover, we demonstrate that *P. aeruginosa* MgtC is required for optimal growth in Mg²⁺ deprived medium, a property shared by MgtC factors from intracellular pathogens and, under Mg²⁺ limitation, *P. aeruginosa* MgtC prevents biofilm formation. We propose that MgtC shares a similar function in intracellular and extracellular pathogens, which contributes to macrophage resistance and fine-tune adaptation to host immune response in relation to the different bacterial lifestyles. In addition, the phenotypes observed with the mgtC mutant in infection models can be mimicked in wild-type *P. aeruginosa* strain by producing a MgtC antagonistic peptide, thus highlighting MgtC as a promising new target for anti-virulence strategies.

OPEN ACCESS

Citation: Belon C, Soccia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, Blanc-Potard A-B (2015) A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. PLoS Pathog 11(6): e1004969. doi:10.1371/journal.ppat.1004969

Editor: Alan R. Hauser, Northwestern University, UNITED STATES

Received: December 18, 2014

Accepted: May 21, 2015

Published: June 16, 2015

Copyright: © 2015 Belon et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work is supported by Vaincre La Mucoviscidose (IC1002, IC0902 and RF20110600446/1/1/47). CB is supported by a MRT fellowship from the French Ministry of Research and the Fondation for Medical Research (FRM FDT20140930905). AB is supported by a VLM fellowship (RF20110600446/1/1/47). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Pathogenic bacteria have to resist host immune response and MgtC is used by several intracellular pathogens to promote bacterial multiplication inside macrophages. Here we investigated MgtC's role in the virulence of an extracellular pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. A *P. aeruginosa* *mgtC* mutant is attenuated in zebrafish embryos, but only in the presence of macrophages. Moreover, this mutant is more rapidly killed by macrophages than the wild-type strain. Both phenotypes can be mimicked upon production of a MgtC antagonistic peptide in wild-type *Pseudomonas* strain. MgtC thus provides a singular example of a virulence determinant that promotes strategies to subvert the antimicrobial behavior of macrophages, in both intracellular and extracellular pathogens and our results support an intramacrophage stage during in *P. aeruginosa* acute infection, as well as an interplay between MgtC role and phagosome acidification. In addition, *P. aeruginosa* MgtC is required for growth in Mg^{2+} deprived medium, a property shared by MgtC factors from intracellular pathogens, and limits biofilm formation. MgtC may share a similar function in intracellular and extracellular pathogens, with an outcome adapted to the different bacterial lifestyles

Introduction

Pathogenic bacteria have developed numerous strategies to adapt to host environment and common strategies can be used by pathogens that share similar lifestyle or similar environmental niches. MgtC is a virulence factor common to several intracellular pathogens [1]. It was first described in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) as required for intramacrophage multiplication and systemic infection in mice [2–4]. MgtC appears as a singular factor that promotes pathogenicity by inhibiting the *Salmonella*'s own F_1F_0 ATP synthase [5]. MgtC has been shown to directly interact with F_1F_0 ATP synthase, thereby altering its ability to translocate protons and to couple translocation to ATP synthesis. *Salmonella mgtC* is highly regulated both at the transcriptional and post-transcriptional levels. This regulation includes a positive regulation by Mg^{2+} deprivation [6] and by an increase in cytosolic ATP [7] as well as a negative regulation by the MgtR peptide [8]. MgtC was also described as a critical factor for the intramacrophage growth of *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella suis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia cenocepacia* and *Salmonella enterica* serovar Typhi, being a virulence factor in a mouse model for *M. tuberculosis* and *B. cenocepacia* [9–13]. More recently, a contribution for MgtC in phagocytosis has been uncovered in *Mycobacterium marinum* [14]. In addition, MgtC has been involved in adaptation to low Mg^{2+} environments in these many pathogens [1]. However, the role of MgtC in low Mg^{2+} environments can be dissociated from its role in macrophages, suggesting that MgtC has a dual function [15].

Genes encoding MgtC-like proteins are found in a limited number of eubacterial genomes and phylogenetic analysis suggested that *mgtC* has been acquired by horizontal gene transfer repeatedly throughout bacterial evolution [16]. Alignment of MgtC-like proteins as well as hydrophobicity pattern clearly define two domains: an hydrophobic N-terminal part, highly conserved in all MgtC-like proteins, and a soluble C-terminal part that is much more variable, but specifically conserved in the subgroup of MgtC proteins from intracellular pathogens [16]. Noticeably, this phylogenetic subgroup also contains two MgtC-like proteins, PA4635 and PA2558, from *Pseudomonas aeruginosa* [16], suggesting a potential common function with proteins from intracellular pathogens. Because of this phylogenetic clustering, we have previously investigated whether the *P. aeruginosa mgtC*-like genes can complement a *S. Typhimurium*

$\Delta mgtC$ strain [15]. PA4635 fully complemented the *Salmonella mgtC* mutant for growth in low Mg^{2+} medium but not in macrophages. On the other hand, PA2558 failed to complement the *Salmonella* $\Delta mgtC$ mutant for growth both in low Mg^{2+} medium and in macrophages. In addition, amino-acid sequence alignment of MgtC-like proteins from *Salmonella* phylogenetic subgroup indicated that some conserved residues important for *Salmonella* MgtC function are not conserved in PA2558 [15]. Taken together, these results suggested that only PA4635 shares functional properties with the *Salmonella* MgtC and is herein referred as *P. aeruginosa* MgtC.

In the present study, we investigated for the first time the role of MgtC in an extracellular pathogen, *P. aeruginosa*. The environmental bacterium and opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* is a major cause of mortality in cystic fibrosis (CF) patients. Interestingly, MgtC has been highlighted as a horizontally-acquired gene shared by several opportunistic bacteria infecting CF patients [17]. *P. aeruginosa* virulence and resistance to treatment is largely due to its ability to form biofilms, whose stability can be affected by extracellular cations [18,19]. *P. aeruginosa* is known to impair host phagocytic functions in chronic lung infections of CF patients. However, macrophages can play a protective role against *P. aeruginosa* infection in a systemic model of infection in zebrafish embryos, where *P. aeruginosa* has been shown to be phagocytosed by macrophages [20]. In addition, despite the fact that *P. aeruginosa* is an extracellular pathogen, an intracellular step in airway epithelial cells might occur before the formation of biofilm during the acute phase of infection [21,22]. In the present study, we have constructed a *P. aeruginosa mgtC* mutant and have analysed its infection phenotype in animal and cellular models, as well as biofilm formation. We also investigated *mgtC* gene expression *in vitro* and *in cellulo*. In addition, MgtR, a peptide that has been proposed as a MgtC antagonist in *Salmonella* [8] has been heterologously produced in a wild-type *P. aeruginosa* strain (*P. aeruginosa* does not encode a MgtR homologue). We establish that MgtC contributes to *Pseudomonas* acute infection and resistance to macrophage killing, thus being a factor that subverts the antimicrobial behavior of macrophages both in intracellular and extracellular pathogens.

Results

Phylogenetic analysis of MgtC-like proteins from *Pseudomonas* species

The genome of *P. aeruginosa* strain PAO1 encodes two MgtC-like proteins, PA4635 and PA2558, which both belong to the same phylogenetic subgroup as *Salmonella* MgtC [16]. In Fig 1A, we provided a phylogenetic analysis of this subgroup that focused on proteins from bacterial pathogens able to replicate in macrophages for which MgtC role in virulence has been studied, as well as proteins from opportunistic bacteria infecting CF patients.

As *mgtC* sequences may have been acquired by horizontal gene transfer [16], we investigated the distribution of *mgtC* coding sequence in *Pseudomonas* genomes and performed phylogenetic analysis. MgtC appeared to be conserved in all *P. aeruginosa* strains present in the *Pseudomonas* genome database [23,24], including the atypical PA7 strain [24]. In addition, MgtC was found in the insect pathogen *Pseudomonas entomophila* as well as the closely related *Pseudomonas putida* (> 85% identity with PA4635, Fig 1B). In contrast, other *Pseudomonas* species harbor MgtC-like proteins that largely differ from PA4635 (below 40% identity, Fig 1B) or do not harbor any MgtC-like protein (*Pseudomonas syringae*). This analysis indicates a strong association of MgtC with *Pseudomonas* species that are pathogenic for humans and insects, suggesting a putative role during animal/human host infection.

To address the role of MgtC in *P. aeruginosa*, we constructed an in-frame deletion in *mgtC* (PA4635) to avoid any polar effect on the expression of the downstream PA4636 gene (S1 Fig). The resulting $\Delta mgtC$ mutation was complemented by a single copy of the *mgtC* gene with its own promoter inserted into the unique *attB* site in strain PAO1 (S1 text).

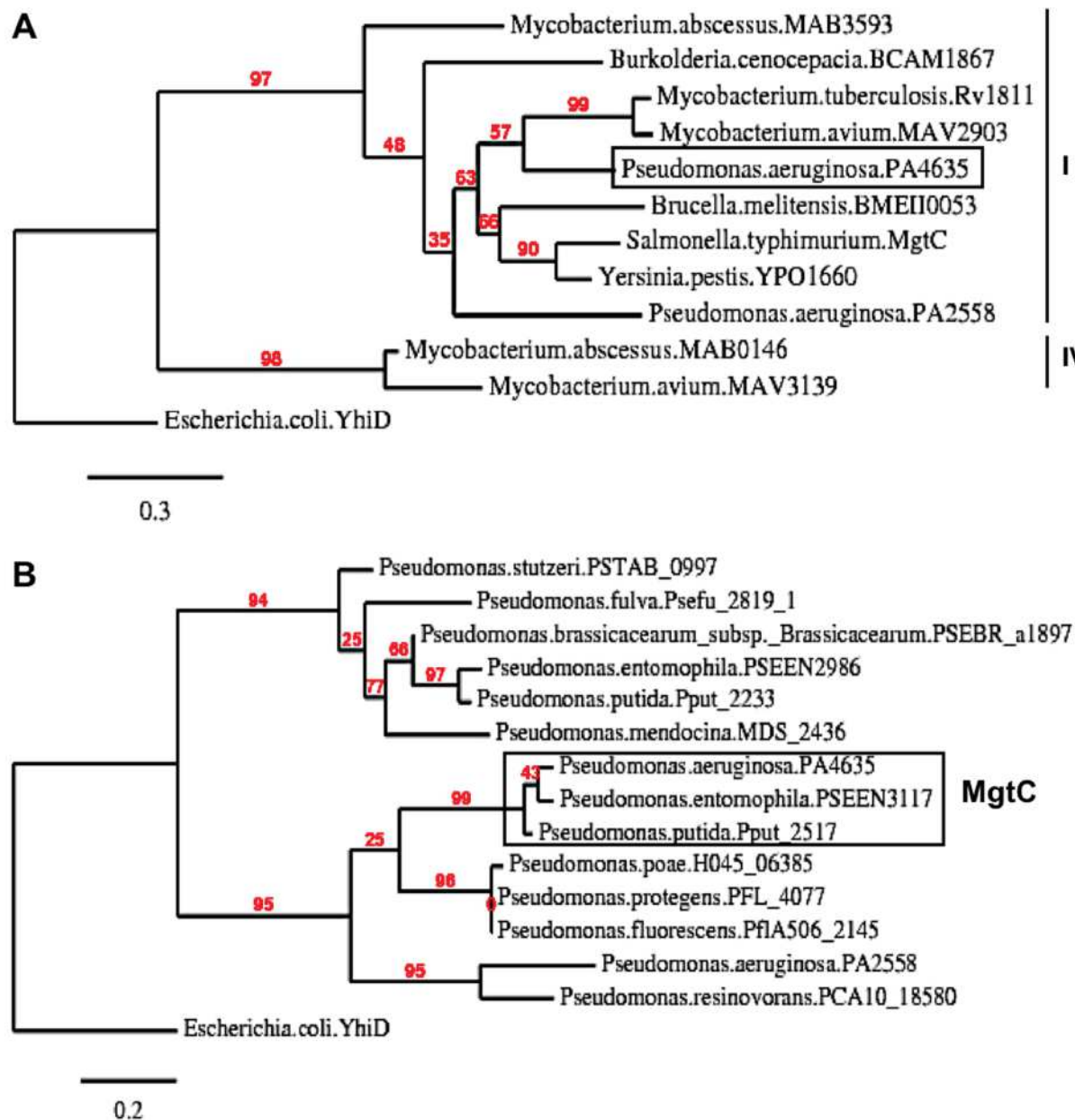


Fig 1. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas* MgtC-like proteins. (A) Phylogenetic tree of MgtC-like proteins from bacterial pathogens that survive in macrophages for which MgtC role in virulence has been studied (*S. Typhimurium*, *M. tuberculosis*, *B. suis*, *B. cenocepacia*, *Y. pestis*) and opportunist bacterial pathogens found in CF patients (*P. aeruginosa*, *B. cenocepacia*, *M. avium*, *M. abscessus*). Several bacteria, including *P. aeruginosa*, encode two MgtC-like proteins. Phylogenetic analyses were carried out with the "Phylogeny.fr" web server (<http://www.phylogeny.fr>) [57] using MUSCLE, PhyML and TreeDyn softwares. Numeration of phylogenetic groups follows a previous analysis [58]. *Escherichia coli* YhiD is used as a distantly related MgtC-like protein [16] to root the tree. (B) Phylogenetic tree of MgtC-like sequences recovered from *Pseudomonas* genomes. MgtC-like protein sequences were recovered from BlastP analysis using PA4635 sequence on completed genomes from the *Pseudomonas* genome database (<http://v2.pseudomonas.com/>) [23]. PA4635 is conserved (>99% identity) in the 10 *P. aeruginosa* genomes other than PAO1 found in the *Pseudomonas* database, including the divergent strain PA7. Besides *P. aeruginosa* genomes, MgtC is found in *P. entomophila* and *P. putida* (>85% identity with PA4635). Other genomes harbor MgtC-like proteins that differ from PA4635 (<40% identity with PA4635).

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g001

MgtC is important for *P. aeruginosa* virulence in the *Danio rerio* infection model in a macrophage-dependent manner

To evaluate the role of MgtC in *P. aeruginosa* virulence, we used the zebrafish (*Danio rerio*) embryo model. This model, which has been used for various intracellular and extracellular bacterial pathogens, is a model of choice to investigate the contribution of cells from the innate immune system during infection [25]. The *Danio* has been successfully used to monitor the role of *P. aeruginosa* determinants in virulence based on survival curves of larvae infected with mutants deficient in type III secretion system (T3SS) or Quorum Sensing [20,26]. Bacteria producing a fluorescent protein were injected intravenously in the caudal vein of embryos (Fig 2A) at 30 hours post-fertilization, a time where macrophages, but not neutrophils, are fully functional and capable of engulfing invading bacteria [27]. The survival curves of infected embryos indicated that MgtC is a critical virulence determinant in this model since the *mgtC* mutant is significantly attenuated as compared to the wild-type PAO1 strain (Fig 2B). In agreement, fluorescence microscopy of 18 hpi infected embryos showed a lower bacterial burden with PAO1 strain than *mgtC* mutant (Fig 2C).

Confocal microscopy at early time after injection allowed us to visualize bacteria phagocytosed by macrophages close to the site of injection (Fig 2D). Macrophages can be depleted from zebrafish embryos with a validated method that uses antisense oligonucleotides (morpholinos) against the myeloid transcription factor gene *pu.1* [28,29]. Macrophage-depleted zebrafish embryos have been shown to be hypersusceptible to *P. aeruginosa* infection [20]. In addition, it has been shown that macrophage depletion restored the virulence of the attenuated T3SS mutant in zebrafish embryos [20]. We carried out experiments with Tg(*mpeg1::mCherry*) embryos in which macrophages are visualized as red cells [29]. Therefore, macrophage depletion can be checked upon *pu.1* morpholinos injection (S2 Fig). Interestingly, the survival curve of macrophage-depleted embryos was similar upon infection with wild-type and mutant strains (Fig 2E and S3 Fig), indicating that macrophage depletion suppresses the difference between wild-type and mutant strain. Taken together, these results suggest that MgtC acts by protecting *P. aeruginosa* against macrophages.

MgtC contributes to *P. aeruginosa* resistance to macrophage killing in J774 macrophages

The virulence of *P. aeruginosa* is associated with its ability to resist the innate immune system notably because of a cytotoxic action towards macrophages and the T3SS plays a major role in *Pseudomonas* cytotoxicity [30]. We thus tested the cytotoxicity of the *mgtC* mutant on J774 macrophages and showed that the mutant is slightly but significantly less cytotoxic than the wild-type strain or the complemented strain (Fig 3A). However, the reduction of cytotoxicity was much lower than the one observed with a T3SS mutant (Fig 3A). Given our results in zebrafish embryos, we hypothesized that MgtC may play a role in the ability of *P. aeruginosa* strains to resist killing by phagocytic cells. We therefore tested the sensitivity of *P. aeruginosa* strains to the bactericidal activity of J774 macrophages. Whereas the T3SS mutant behaves similarly than the wild-type strain towards the killing by macrophages after phagocytosis, our results indicated that the *mgtC* mutant is more sensitive to macrophage killing than the wild-type or complemented strain, with a striking difference at time 1.5 hr (Fig 3B). The survival decrease of the wild-type strain at the second time point may account for a slower killing, but may also be due in part to the damage of infected macrophages.

Salmonella MgtC can inhibit the bacterial F-ATP synthase and modulate physiological ATP levels and cytosolic pH, which has been proposed to play a role in the ability of *Salmonella* strain to replicate in macrophages [5]. Moreover, acidification of the phagosome has been

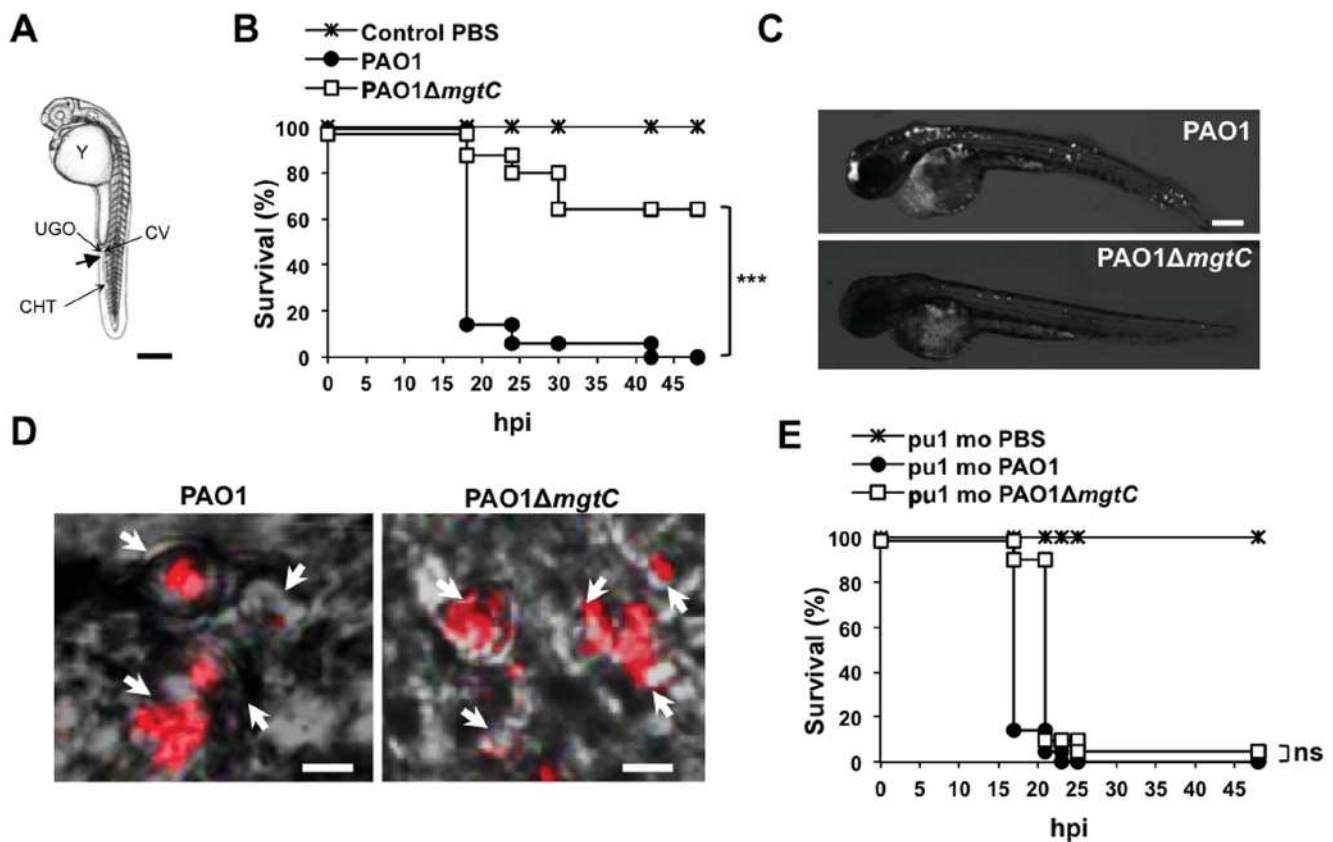


Fig 2. Infection of zebrafish embryos with the *P. aeruginosa* *mgtC* mutant. (A) Diagram of 30 hours post-fertilization (hpf) zebrafish embryo showing the injection site used in this study (arrow). All injections were done in the caudal vein (CV) just behind to the urogenital opening (UGO). Y: Yolk, CHT: Caudal Hematopoietic Tissue. Scale bar, 100 μ m. (B) Survival curves of embryos infected with PAO1 wild-type strain or PAO1 $\Delta mgtC$ mutant and PBS-injected (control). Approximately 1200–1400 CFU *P. aeruginosa* were microinjected into the caudal vein ($n = 20$ per group). Results are expressed as the percentage of surviving on each hour post-infection. Representative results of three biologically independent replicates are shown. Embryos are significantly more susceptible to infection with PAO1 wild-type than $\Delta mgtC$ mutant ($P < 0.001$). (C) 30 hpf embryos are intravenously infected with PAO1 or $\Delta mgtC$ mutant expressing mCherry. Representative fluorescence microscopy images of 18 hpf embryos infected with PAO1 (top panel) or PAO1 $\Delta mgtC$ mutant (bottom panel) are shown (1200–1400 CFU). Scale bar, 200 μ m. (D) 30 hpf zebrafish embryos are intravenously infected with mCherry-expressing PAO1 (left panel) or PAO1 $\Delta mgtC$ mutant (right panel) and imaged by confocal microscopy. Arrows indicate maximum intensity projection of macrophages that phagocytose bacteria close to the site of injection at 1 hpi. Scale bar, 10 μ m. (E) Survival curves of *pu.1* morphant (*pu.1* mo) embryos ($n = 20$ each) infected with 900 CFU of PAO1 wild type strain or PAO1 $\Delta mgtC$ mutant compared to the PBS-injected control. Representative results of three biologically independent replicates are shown. No statistically significant difference is obtained between wild type-infected embryos and $\Delta mgtC$ mutant-infected embryos (ns: non significant).

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g002

proposed to promote *Salmonella* MgtC production by increasing bacterial ATP level [7]. The acidification of the phagosome is dependent on the activity of the host vacuolar ATPase, which can be specifically inhibited by the inhibitor bafilomycin A1 [31]. To decipher the contribution of phagosome acidification in the intramacrophage role of *Pseudomonas* MgtC protein, macrophage infection was performed in presence of bafilomycin A1 (Fig 3C). The addition of bafilomycin A1 did not affect significantly the mutant strain whereas the survival rate of the PAO1 strain or the complemented strain was significantly reduced. As a consequence, the survival rate of wild-type and mutant strains did not differ when cells are treated with vacuolar ATPase inhibitor.

To visualize intracellular bacteria upon infection of J774 cells, we imaged slides of fixed macrophages infected with fluorescent bacteria (Fig 4A). Moreover, bacterial counts on images

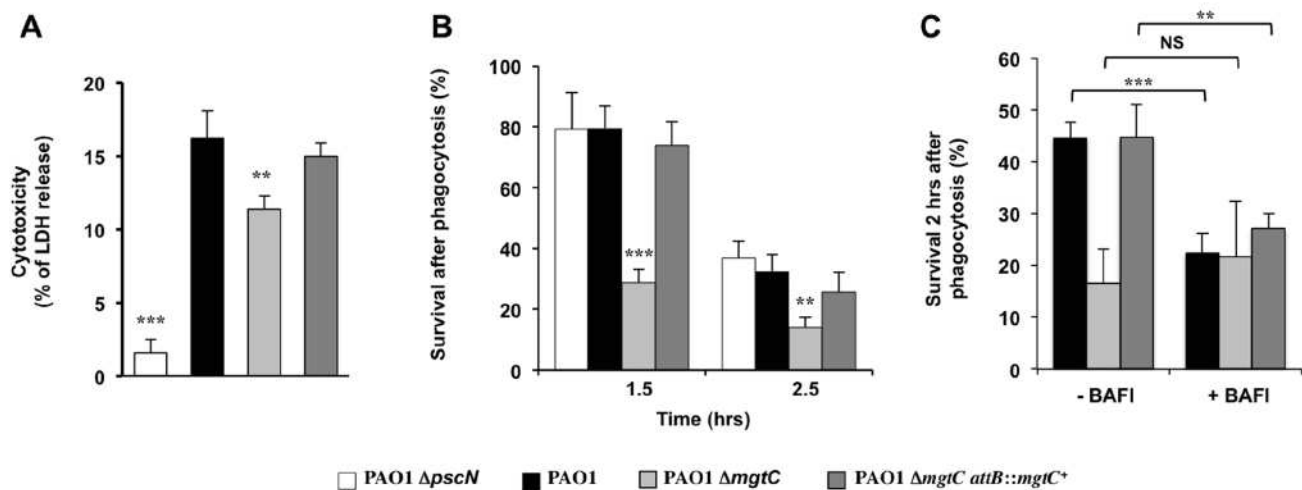


Fig 3. Behaviour of *mgtC* mutant towards J774 macrophages. (A) Strain cytotoxicity was evaluated using a LDH assay. A T3SS mutant (Δ pscN) is included as negative control. Error bars correspond to standard deviations from three independent experiments. (B) Survival of bacteria upon phagocytosis. Results are expressed as percentage of surviving bacteria at the indicated time comparatively to the number of bacteria internalized after 30 min of phagocytosis. Error bars correspond to standard errors (SE) from five independent experiments. (C) Effect of inhibition of vacuolar proton ATPase on bacterial survival. The survival of bacteria was measured from macrophages treated or not with bafilomycin A1. Error bars correspond to standard errors (SE) from three independent experiments. In all panels the asterisks indicate *P* values (Student's *t* test, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001).

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g003

were made at time 0 and 2 hrs after phagocytosis (Fig 4B). Our results indicated that the number of bacteria per cell after phagocytosis is slightly higher for the mutant strain than for the wild-type strain. We further quantified the phagocytosis rate with CFUs counts and showed that the *mgtC* mutant is phagocytosed at a slightly but significantly higher rate than the wild-type strain (S4 Fig). The evolution of the patterns between time 0 and time 2 hrs (Fig 4B) indicated that the bacterial number per cell rather increased with the wild-type but not with the mutant. These experiments, which do not discriminate between live and dead/dying bacteria, suggested a survival of wild-type bacteria with limited bacterial multiplication.

We also investigated the behavior of the *mgtC* mutant towards non-phagocytic cells that can be targeted by the pathogen during the infection [22]. Gentamycin protection assays performed to measure internalisation in HeLa cells did not show significant difference between wild-type and *mgtC* mutant strains (S4 Fig).

Cumulatively, *ex vivo* experiments indicate that, similarly to intracellular pathogens, the MgtC virulence determinant of *P. aeruginosa* plays a role towards macrophages. Wild-type bacteria resisted better to phagocytosis and to bacterial killing by the phagosome than the *mgtC* mutant. Moreover, our results indicate an interplay between *Pseudomonas* MgtC role in macrophages and phagosome acidification.

Expression of *P. aeruginosa* *mgtC* is induced within macrophages

We first investigated the regulation of *mgtC* expression in liquid media depending on Mg^{2+} concentration and pH. Quantitative RT-PCR experiment showed that *mgtC* gene (*PA4635*) is strongly induced by low Mg^{2+} environment (Fig 5A). Moreover, in low Mg^{2+} condition, the level of *mgtC* gene expression can be further increased by lowering the pH (Fig 5A). On the other hand, the other *mgtC*-like gene (*PA2558*) was not regulated by Mg^{2+} nor pH (Fig 5B). We then quantified the *mgtC* mRNA level from infected macrophages. Importantly, we showed that *mgtC* is highly induced in macrophages, which agrees with a specific role in this

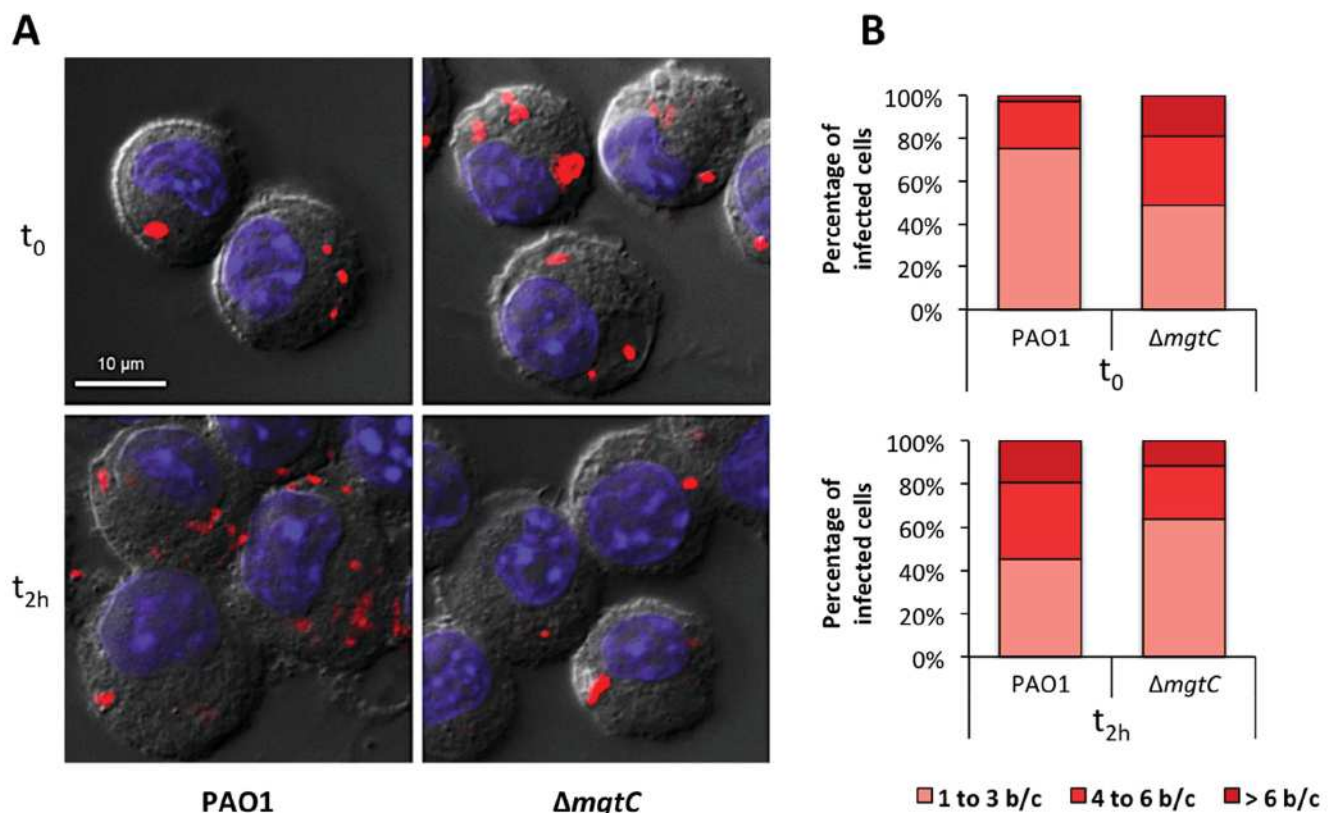


Fig 4. Visualisation and quantification of intracellular bacteria in fixed macrophages. Macrophages infected with PAO1 or $\Delta mgtC$ mutant expressing mCherry were fixed after phagocytosis and 20 min (t_0) or 2 hours (t_{2h}) treatment with amikacin. (A) Visualization of intracellular bacteria. The images shown were obtained by making a maximum projection of 12 central planes from a Z-stack. The merged image shows Differential Interference Contrast (DIC), nucleus staining (blue) and bacteria expressing mCherry (red). (B) Count of the number of bacteria in infected macrophages from images obtained with the maximum projection. The numbers of bacteria per cell (b/c) were classified in three groups and percentage of each class is shown. Count is done from at least 20 cells and results are expressed as means from three independent experiments.

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g004

step. On the other hand *PA2558*, as well as the T3SS gene *pcrV* or the house-keeping gene *gyrA* (S5 Fig), were similarly expressed in liquid medium and macrophages, and are therefore not induced in macrophages. Bafilomycin A1 treatment of macrophages, which decreases phagosome acidification, lowered *mgtC* expression intracellularly, which is consistent with the pH regulation observed *in vitro*. Taken together, these results indicate that *mgtC* is specifically expressed in macrophages and that phagosome acidification contributes to an optimal expression of the gene.

Role of MgtC for *P. aeruginosa* growth in low magnesium medium and biofilm formation on abiotic surface

Bacterial growth of *P. aeruginosa* strains was measured in minimal medium deprived for magnesium (without added Mg^{2+} or with $10 \mu M Mg^{2+}$) or containing $1 mM Mg^{2+}$ (corresponding to physiological concentration). Growth of the *mgtC* mutant was significantly impaired in low Mg^{2+} media (Fig 6A and Fig 6B), while it did grow similarly to the PAO1 wild-type strain in high Mg^{2+} medium (Fig 6C). The complemented strain displayed a wild-type growth in these conditions. Hence, MgtC contributes to the adaptation of *P. aeruginosa* to low Mg^{2+}

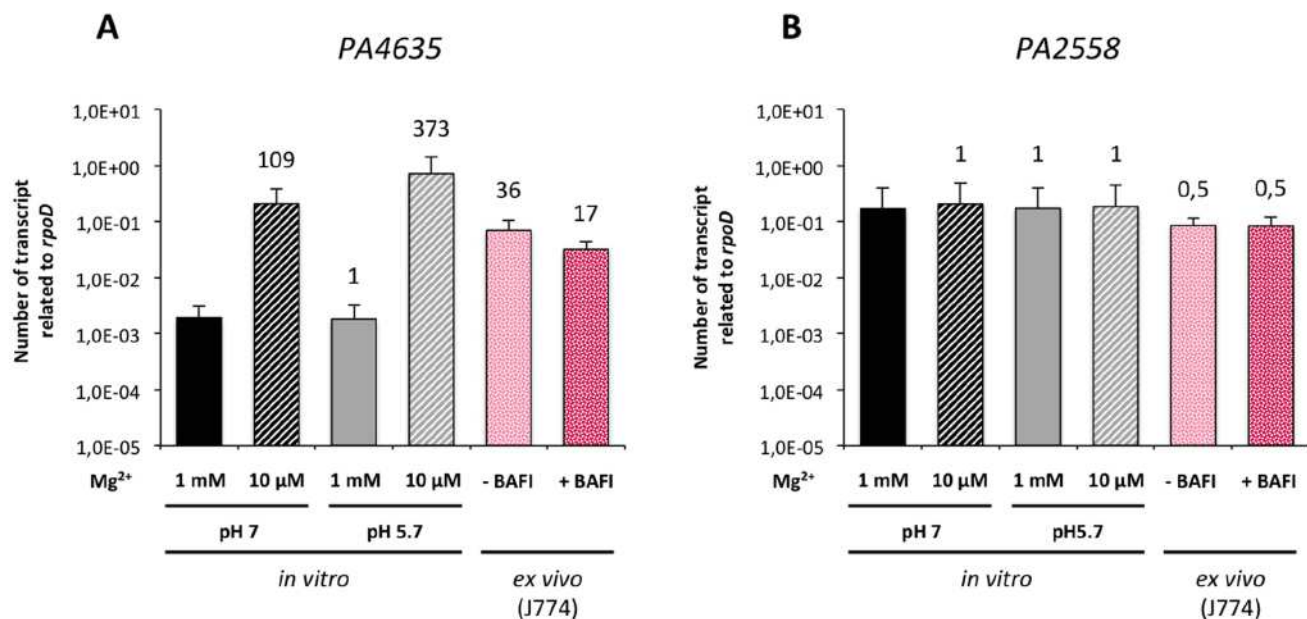


Fig 5. Expression of *P. aeruginosa* *mgtC* gene in liquid medium and intracellularly. The levels of PA4635 (A) and PA2558 (B) transcripts relative to those of the *rpoD* gene were measured by qRT-PCR. RNA was extracted from bacteria grown in liquid medium (*in vitro*) containing a high (1 mM) or low (10 μM) concentration of MgSO₄ and a pH of 7 or at 5.7. A pH of 5.7 is expected to mimic the pH faced by bacteria in the phagosome. Bacterial RNA was also extracted from infected J774 macrophages (*ex vivo*) that were treated (+ BAFI) or not (- BAFI) with bafilomycin A1. For all conditions, RNA were prepared two times independently. Results are expressed as means ± SD from at least three independent measurements (each performed in triplicate). The numbers indicate the induction fold relatively to the condition 1 mM MgSO₄ pH 7.

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g005

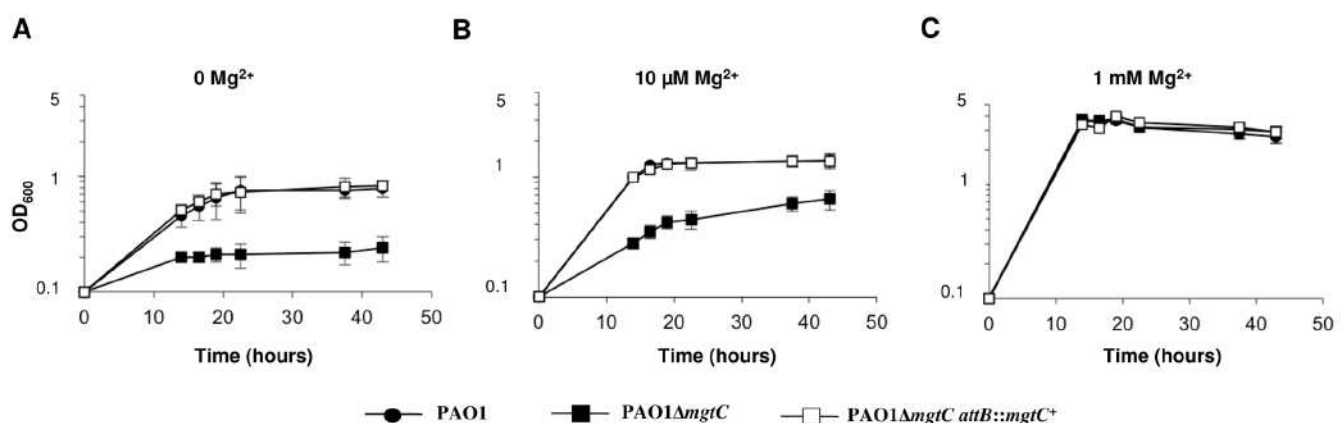


Fig 6. MgtC is required for growth of *P. aeruginosa* in Mg²⁺ deprived medium. (A) *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO1ΔmgtC, and PAO1ΔmgtC attB::mgtC⁺ were grown at 30°C in minimal medium without MgSO₄. OD₆₀₀ is indicated over the growth period. The experiment was independently repeated three times and results are expressed as means ± SD. Statistical analyses indicate significant difference between growth of the *mgtC* mutant and the wild-type or the complemented strain (Student's t test, *P* < 0.001 at times 20 hrs and 40 hrs). (B) The same strains were grown in medium with 10 μM MgSO₄. Statistical analyses indicate significant difference between growth of the *mgtC* mutant and the wild-type or the complemented strain (Student's t test, *P* < 0.001 at times 20 hrs and 40 hrs). (C) The same strains were grown in high magnesium medium (1 mM MgSO₄). No significant difference is found between the three strains.

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g006

environment, similarly to MgtC homologues from intracellular pathogens [1]. This result is consistent with the induction of *mgtC* gene expression in low Mg^{2+} environment (Fig 5A). To test whether the phenotype observed with the *mgtC* mutant in macrophages may be related to the growth defect upon Mg^{2+} limitation, the killing assay by J774 macrophages was repeated upon addition of 25 mM Mg^{2+} in the DMEM medium. However, addition of Mg^{2+} did not rescue the enhanced sensitivity of the *mgtC* mutant to macrophages (S6 Fig), suggesting that the increased killing of the mutant is not related to intracellular Mg^{2+} limiting environment.

P. aeruginosa ability to form biofilm is a crucial virulence determinant, more particularly in chronic infection. Interestingly, biofilm formation has been shown to be sensitive to EDTA through chelation of divalent cations including Mg^{2+} [18]. To check the role of both MgtC and Mg^{2+} ions during biofilm formation, wild-type, mutant and complemented strains were grown in different Mg^{2+} concentrations in glass tubes for 24 h and bacterial adherence to the glass was visualized (Fig 7A) and quantified using crystal violet staining (Fig 7B) to infer the ability of strains to form biofilm. Profiles of the three strains were the same in both assays if bacteria are grown in high Mg^{2+} , indicating similar biofilm formation at physiological Mg^{2+} concentration.

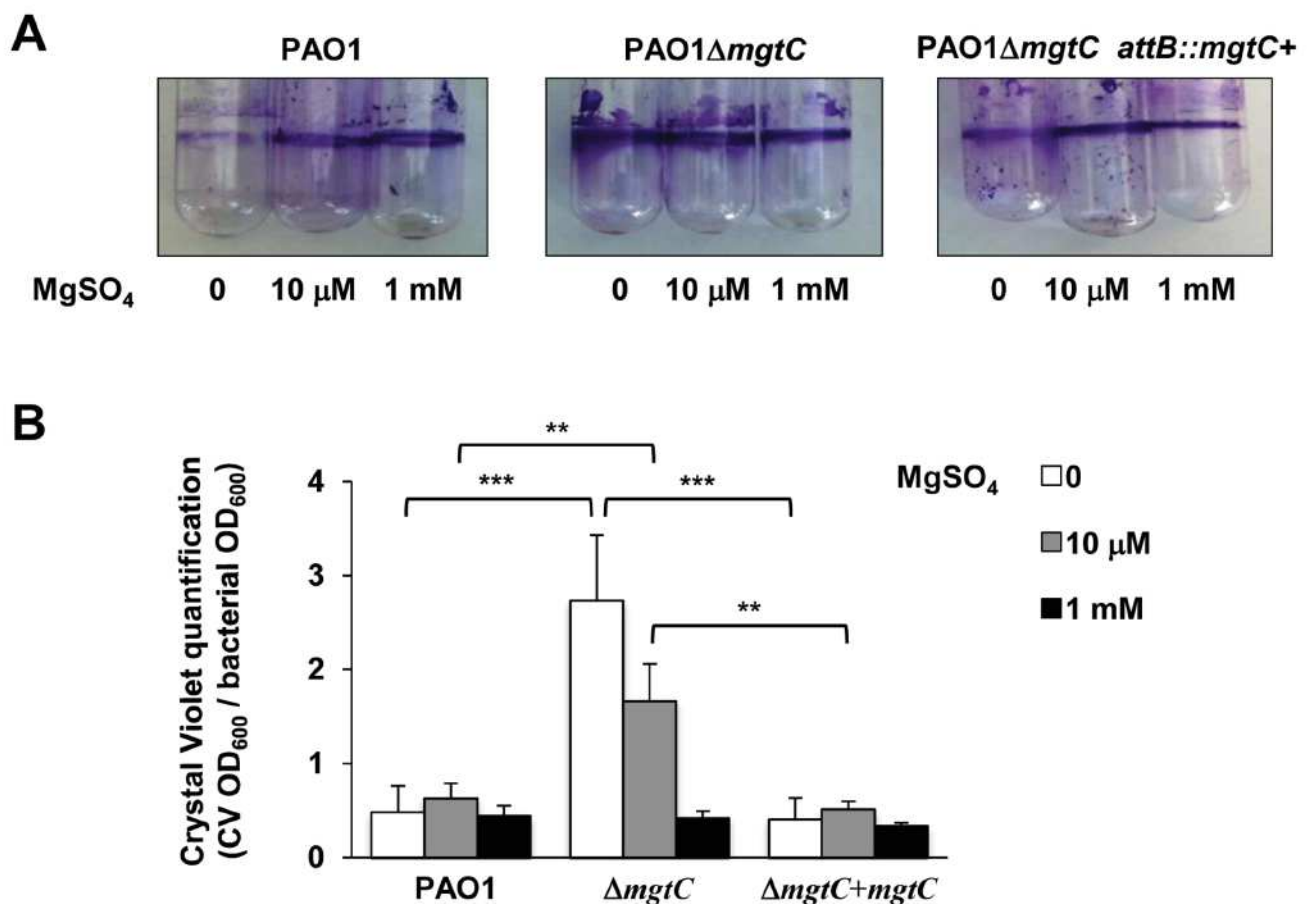


Fig 7. Quantification of bacterial adherence to glass tubes to infer the ability of strains to form biofilm. (A) Adherence assay with *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO1Δ*mgtC*, and PAO1Δ*mgtC* *attB::mgtC*⁺ grown at 30°C for 24 hrs in minimal medium without MgSO₄ or with MgSO₄ (10 μM and 1 mM). The biofilm quantification is visualized by crystal violet ring on the glass tube. (B) Crystal violet quantification (CV OD₆₀₀) is divided by the bacterial density (bacterial OD₆₀₀). Error bars correspond to standard errors (+ SE) from three independent experiments and the asterisks indicate *P* values (Student's *t* test, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001).

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g007

However, in the absence of Mg^{2+} , wild-type and complemented strains poorly attached to the glass, indicating that Mg^{2+} is required for biofilm initiation by *P. aeruginosa*. In contrast, the $\Delta mgtC$ mutant was still able to form biofilm. The increased biofilm formation for the $\Delta mgtC$ mutant comparatively to the wild-type strain was also observed in the presence of $10 \mu M$ Mg^{2+} . Cumulatively, these results indicate that when expressed, i.e. under Mg^{2+} limitation, MgtC limits biofilm formation. Since exopolysaccharides (EPS) are essential biofilm matrix components, important for initial adherence and biofilm formation [32,33], EPS production was measured by Congo red assay [34] in low and high Mg^{2+} (S7 Fig). Whereas, all strains produced similar EPS level at $1 mM$ Mg^{2+} , the mutant strain produced significantly more EPS than wild-type and complemented strain in low Mg^{2+} medium.

We also investigated whether the increased biofilm formation of the *mgtC* mutant strain under Mg^{2+} limitation may be related to altered properties of the flagellum or the type IV pili, which are major adhesins required for initial attachment [35]. Our results indicated that the twitching and swimming motilities, which depend on type IV pili and flagellum, respectively, were similar in wild-type, mutant and complemented strain (S8 Fig). On the other hand, we observed that *P. aeruginosa* $\Delta mgtC$ bacteria grown under Mg^{2+} starvation were more elongated than wild-type bacteria (S9 Fig). Hence the increased biofilm formation of the *mgtC* mutant strain under Mg^{2+} limitation may be due to increased EPS production and/or bacterial cell elongation.

Heterologous production of the *Salmonella* MgtR peptide in PAO1 mimics the *mgtC* mutant virulence phenotypes

MgtR is a membrane peptide (30 amino-acid long) encoded downstream of *mgtC* in *S. Typhimurium* that regulates negatively MgtC expression [8]. MgtR interacts directly with *Salmonella* MgtC in a bacterial two-hybrid system and over-expression of *mgtR* in a wild-type *Salmonella* strain reduced significantly the ability of the strain to grow within macrophages, thus displaying an anti-infective effect [8]. Site-directed mutagenesis and structural analysis have suggested that MgtR interacts with the 4th transmembrane domain of MgtC [8,36]. Examination of the DNA region adjacent to PA4635 as well as Blast analyses did not reveal any peptide similar to MgtR in *P. aeruginosa*. Because the 4th transmembrane domain of MgtC is well conserved between *S. Typhimurium* and *P. aeruginosa* (S10 Fig), we have tested whether the *Salmonella* MgtR peptide could interact with *P. aeruginosa* MgtC (PaMgtC) using the bacterial two-hybrid system BACTH [37]. The interaction between T18-PaMgtC and T25-MgtR fusion proteins was evaluated by measuring β -galactosidase activity (Fig 8A). Negative controls consisted in T18-PaMgtC with empty pKT25 (Fig 8A) and empty pUT18 with T25-MgtR (S11 Fig). The high level of β -galactosidase activity, which was 60 fold the value of the negative control, was indicative of an interaction between the MgtR peptide and PaMgtC in this system. On the other hand, PaMgtC did not interact with another membrane peptide, the *Salmonella* KdpF peptide (S11 Fig), indicating that the interaction with MgtR is not due to sticky properties of PaMgtC.

We then transformed the wild-type *P. aeruginosa* strain with pMgtR, a plasmid that harbors the *Salmonella mgtR* gene [8]. Expression of *mgtR* in PAO1 was verified by RT-PCR (Fig 8B). The virulence of the strain was evaluated using the zebrafish embryo model. As shown in Fig 8C, a wild-type PAO1 strain that expressed *mgtR* was attenuated comparatively to a control PAO1 strain that harbored an empty vector. On the other hand, no effect of the pMgtR plasmid was detected in the context of the PAO1 *mgtC* mutant strain. Expression of *mgtR* also increased significantly the killing of wild-type PAO1 strain, whereas no significant effect was found in the presence of the *mgtC* mutation (Fig 8D). In addition, a mild but significant increase in

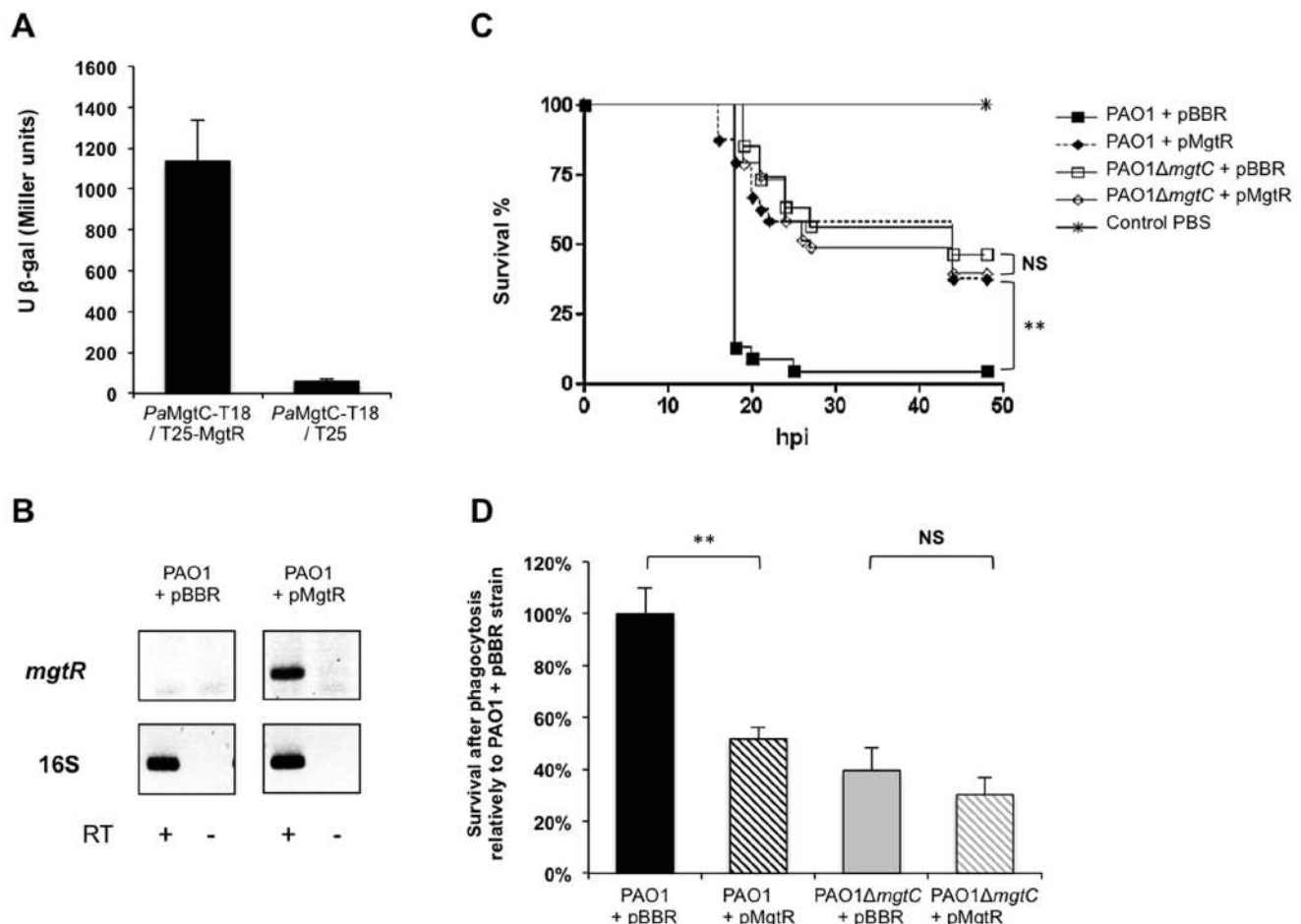


Fig 8. Virulence phenotypes of a PAO1 strain expressing *mgtR*. (A) *In vivo* interaction of *Pa* MgtC with MgtR peptide. The interaction was assayed using the BACTH system by transforming *E. coli* BTH101 cells with plasmids producing *Pa*MgtC-T18 and T25-MgtR. Liquid β-galactosidase assays were performed from six independent experiments. As negative control, BTH101 bacteria were cotransformed with a plasmid expressing *Pa*MgtC-T18 and the pKT25 vector. Error bars represent SD. (B) Expression of *Salmonella mgtR* in PAO1 strain. RT-PCR experiment was performed with primers specific for *mgtR* gene from RNA isolated from PAO1 strain carrying the pBBR1MCS vector (pBBR) or a pBBR1MCS derivative that encodes *mgtR* (pMgtR). Primers specific for 16S gene were used as positive control. Controls where reverse transcriptase was omitted are indicated (RT-). (C) Survival curve of embryos infected with PAO1 strain expressing or not *mgtR*. PAO1Δ*mgtC* strain expressing or not *mgtR* is also included in the experiment and non-injected embryos were used as control. Approximately 600–1000 CFU of *P. aeruginosa* were microinjected into the caudal vein ($n = 24$ per group). Results are expressed as the percentage of surviving on hour post-infection (hpi). Representative results of at least three biologically independent replicates are shown. Embryos are significantly more resistant to infection with PAO1 strain expressing *mgtR* than PAO1 strain with empty vector ($P < 0.01$). (D) Behaviour of the PAO1 strain expressing *mgtR* in J774 macrophages. PAO1Δ*mgtC* strain expressing or not *mgtR* is included in the experiment. Results are normalized to 100% for the PAO1-pBBR strain and are expressed as means + SE from four independent experiments. Asterisks indicate statistical significance ** $P < 0.01$. NS, non significant.

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g008

phagocytosis was observed (S12 Fig). Taken together, these results suggest that heterologous production of the *Salmonella* MgtR peptide can lower PAO1 virulence and resistance to macrophage killing by targeting the *P. aeruginosa* MgtC. Regarding other phenotypes related to MgtC defect in *P. aeruginosa*, production of the *Salmonella* MgtR peptide did not modulate bacterial growth in magnesium deprived medium (S13 Fig). This correlates with results obtained in *Salmonella* and is consistent with the finding of a dual role for MgtC [15].

Discussion

Phylogenetic analysis indicated that the MgtC protein from the extracellular pathogen *P. aeruginosa* clustered in the same subgroup as MgtC proteins from intracellular pathogens, which are known to subvert macrophages and promote intracellular bacterial multiplication [1,16]. MgtC exhibits a sporadic distribution in *Pseudomonas* species, being mostly associated with strains that are pathogenic for humans and insects. In the present study, we show that MgtC plays a role in *P. aeruginosa* virulence in a systemic model of infection in a macrophage-dependent manner and in *P. aeruginosa* ability to escape the killing action of the macrophage. MgtC thus provides a singular example of a virulence determinant that subverts the antimicrobial behavior of macrophages both in intracellular and extracellular pathogens (Fig 9).

There is growing evidence that some cytotoxic extracellular pathogens can actually survive inside macrophages after phagocytosis to hide from the immune system [38], but little is known about the intracellular behavior of these pathogens. The zebrafish embryo model has contributed significantly to the study of an intracellular phase in phagocytic cells in the life

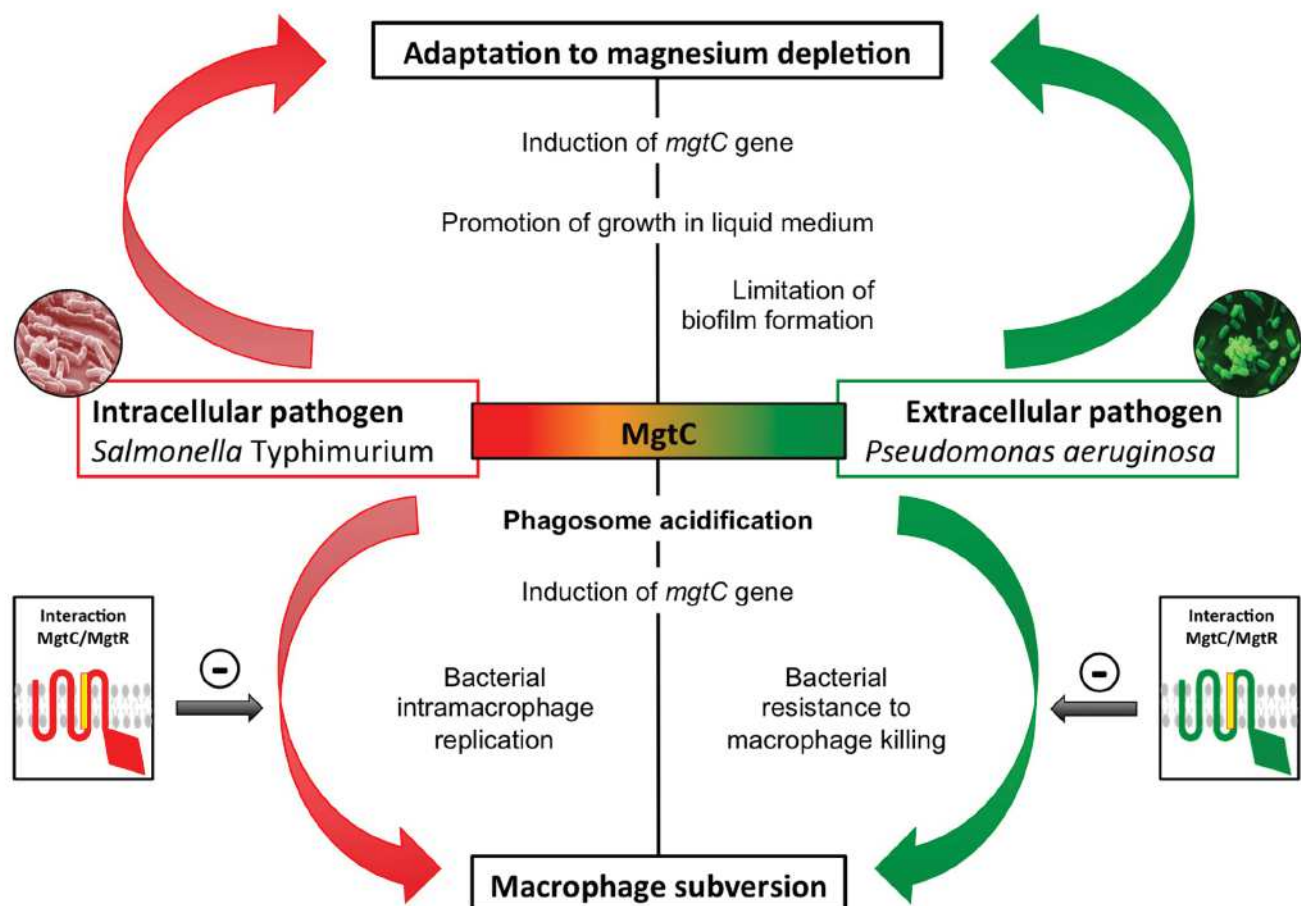


Fig 9. Role of MgtC in intracellular and extracellular pathogens. MgtC is involved in adaptation to magnesium deprivation and macrophage subversion both in intracellular and extracellular pathogens. We propose that MgtC share a similar function in intracellular and extracellular pathogens and that the bacterial lifestyle determines whether MgtC will promote intramacrophage bacterial multiplication or resistance to killing by macrophages. Expression of *mgtC* gene is induced in macrophages and phagosome acidification contributes to its optimal expression. The MgtR peptide can interfere with MgtC function, thus acting as a natural antagonist, and its production limits the macrophage subversion.

doi:10.1371/journal.ppat.1004969.g009

cycle of *Staphylococcus aureus*, a pathogen that has long been considered as an extracellular pathogen [39]. Interestingly, MgtC has been shown to promote intramacrophage survival of *Yersinia pestis* [12], which is a facultative intracellular pathogen that replicates mainly extracellularly and produces antiphagocytic factors. Our present results identify MgtC as a novel actor in *P. aeruginosa* virulence, playing a role in an intramacrophage phase of this extracellular pathogen. The ability of *P. aeruginosa* to inhibit the microbicidal mechanisms of phagocytic cells is much less documented than its cytotoxicity towards mammalian cells, which is linked to the production of exotoxins and injected effector proteins by the T3SS. We have shown that the *P. aeruginosa* *mgtC* mutant is attenuated for acute infection in zebrafish embryos, which possess professional phagocytes that can engulf and kill *P. aeruginosa* upon infection [20]. MgtC acts by protecting *P. aeruginosa* against phagocytes since macrophage depletion suppressed the difference between *mgtC* mutant and PAO1 strain. Interestingly, a T3SS mutant has been reported to have a similar behavior in zebrafish embryos [20]. However, the phenotypes of the two mutants differ in *ex vivo* experiments because, contrary to a T3SS mutant, the *mgtC* mutant is more sensitive than the wild-type strain to the bactericidal effect of J774 macrophages. In contrast, the effect of the *mgtC* mutant on cytotoxicity towards macrophages is minor relatively to the one of T3SS mutant.

Consistent with the role of *P. aeruginosa* *mgtC* within macrophages, expression of the gene is highly induced when the bacteria reside inside macrophages, which is not the case for the *mgtC*-like PA2558 and for a T3SS gene. Strong intramacrophage induction has also been reported for the *Salmonella* *mgtC* gene [40] and to our knowledge, this is the first report of a *P. aeruginosa* gene induced within phagocytic cells. It has been proposed that phagosome acidification may contribute to *Salmonella* MgtC protein production via an increased level of cytoplasmic ATP [5,7]. Our results further support an interplay between MgtC role in macrophages and the function of the V-ATPase because inhibition of the V-ATPase suppressed the difference between wild-type strain and *mgtC* mutant strain. Noticeably, *Pseudomonas* wild-type strain, but not *mgtC* mutant strain, had a reduced macrophage survival in the presence of V-ATPase inhibitor. A reduced resistance of wild-type bacteria to macrophage killing upon bafilomycin treatment has been also described for intracellular bacteria, for which acidification is important for proper expression of genes required intracellularly [41,42]. We demonstrated that phagosome acidification contributes to an optimal production of *Pseudomonas* *mgtC*, which agrees with the maximization of *mgtC* induction *in vitro* at low pH. Cumulatively, our results identify *mgtC* as a key gene for *P. aeruginosa* intramacrophage stage. Moreover, uptake by macrophages, but not epithelial cells, was enhanced with the *P. aeruginosa* *mgtC* mutant compared to the wild-type strain. A similar phenotype has been described for a *M. marinum* *mgtC* mutant, with MgtC playing a role in later steps of the internalization process rather than initial attachment events of bacteria to macrophages [14]. Further experiments will be required to investigate the fate of intracellular bacteria but we propose that *P. aeruginosa* has acquired a macrophage subversion factor to resist to killing in case of phagocytosis by macrophages. Moreover, our findings highlight the importance of macrophage subversion by *P. aeruginosa* in a model of acute infection. In agreement, *mgtC* has been recovered in a recent screen as a *Pseudomonas* gene involved in bacterial fitness in a systemic model of infection in mice [43]. It would be of interest to further explore the role of *Pseudomonas* MgtC in the mice model, both during acute and chronic infection.

Growth kinetic analyses showed that MgtC is required for optimal growth in magnesium deprived medium in *P. aeruginosa*, which is a common feature with intracellular pathogens. This result agrees with previous complementation studies showing that heterologous expression of *P. aeruginosa* *mgtC* (PA4635) in a *S. Typhimurium* *mgtC* mutant restored the growth defect in Mg²⁺ deprived medium [15]. Moreover, we have shown that *mgtC* expression in *P.*

aeruginosa is induced in conditions of Mg^{2+} starvation, which is consistent with a previous proteomic analysis [44], and implies a role of MgtC in such stressing condition. Hence, our results indicate a mechanism of convergent evolution between pathogens that have different niches in their ability to use MgtC to adapt to Mg^{2+} limitation (Fig 9). We believe that this ability does not account for *P. aeruginosa* MgtC role in macrophages because Mg^{2+} measurement in a phagosome indicated a concentration in the millimolar range [45] and because addition of extracellular Mg^{2+} did not rescue the increased sensitivity of *mgtC* mutant to macrophages.

Magnesium has been shown to influence attachment and subsequent *Pseudomonas* biofilm formation [46], which is a hallmark of *Pseudomonas* chronic infection, and biofilms are disrupted by cation chelators [18]. Moreover, Mg^{2+} is required for biofilm formation in fungal pathogens [47]. In Mg^{2+} limiting condition, the *P. aeruginosa mgtC* mutant retains the ability to form biofilm, while the wild-type strain is severely impaired for biofilm formation, indicating that MgtC limits biofilm formation. The biofilm phenotype of the *mgtC* mutant is associated with increased production of EPS, which are essential biofilm matrix components. In addition, biofilm formation could be favored by the elongated shape of the *mgtC* mutant grown under Mg^{2+} limitation, as bacterial elongation can promote biofilm formation [48]. Very interestingly, a recent report provides an unsuspected link between MgtC, cellulose (a polysaccharide associated with the formation of biofilm) and intramacrophage survival in *Salmonella* [49]. MgtC repressed cellulose biosynthesis during growth in low Mg^{2+} medium and cellulose production was shown to hinder *Salmonella* replication inside macrophages. Despite the fact that cellulose is not produced by *P. aeruginosa* strains (as PAO1), this new finding, combined to our finding of an increased EPS production by the *P. aeruginosa mgtC* mutant in low Mg^{2+} medium, suggests a potential link between EPS production and *P. aeruginosa* MgtC role in macrophages. Further studies will be required to determine the nature of the EPS involved, to investigate their production intracellularly and the putative link with intramacrophage phenotypes.

MgtC proteins consist of two structural domains, a highly conserved membrane N-terminal domain and a more divergent soluble C-terminal domain. Structural data as well as bioinformatic modeling indicate that the *P. aeruginosa* MgtC C-terminal domain adopts the same fold as the one of MgtC proteins from intracellular pathogens, and this despite a low level of sequence identity ([50]; G. Labesse, personal communication). This suggests that MgtC may share a similar function in *P. aeruginosa* and intracellular pathogens, which is supported by the common role in adaptation to Mg^{2+} deprivation. Furthermore, whereas expression of *P. aeruginosa mgtC* does not complement the macrophage replication defect of a *S. Typhimurium mgtC* mutant, a significant complementation is observed when a *P. aeruginosa* MgtC variant carrying a single amino-acid change is produced [15]. Hence, MgtC proteins from *P. aeruginosa* and *S. Typhimurium* may have evolved in a very subtle way, possibly to optimally interact with partner protein(s).

The MgtR membrane peptide has been proposed as a natural MgtC antagonist because in *S. Typhimurium*, the intramacrophage replication of a wild-type strain can be reduced upon over-production of MgtR, which plays a negative regulatory role on *mgtC* expression [8]. In the present study, we have found that the phenotypes observed with *Pseudomonas mgtC* mutant in animal and cellular infection models can be mimicked upon production of the *Salmonella* MgtR peptide in a wild-type *P. aeruginosa* strain. Experiments in *mgtC* mutant strain indicated that the peptide requires a functional MgtC protein to play a role. Hence, these results support the action of MgtR natural peptide as an antagonist of MgtC and highlight MgtC as a promising new target for anti-virulence strategies.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids are described in [S1 Table](#). *P. aeruginosa* was grown at 37°C in Luria broth (LB) or at 30°C in MM63 medium supplemented with 0.5% casamino acids, 0.2% glucose, and MgSO₄ (10 μM or 1mM) or without MgSO₄. Plasmids were introduced in *P. aeruginosa* by conjugation, using an *E. coli* strain containing pRK2013. Recombinant bacteria were selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA). *P. aeruginosa* mutants obtained by using the pKNG101 suicide vector were selected on plates containing 6% sucrose. Antibiotic concentrations (μg/ml) were: for *E. coli*: ampicillin, kanamycin, streptomycin, gentamicin, 50; tetracycline, 40; for *P. aeruginosa*: gentamicin, 50 or 125 (plates); tetracycline, 200; streptomycin, 2000.

Construction of a *P. aeruginosa* *mgtC* mutant and complemented strain

To generate a non-polar deletion of the *mgtC* (*PA4635*) gene, 526 bp upstream and 580 bp downstream of the *mgtC* gene were amplified, cloned in pCR2.1 and subcloned in pKNG101 suicide vector giving the mutator pSBC44 which was mobilized in the wild-type *P. aeruginosa* strain PAO1 to select for double recombination event ([S1 Text](#)).

Complementation by a single copy of the *mgtC*⁺ gene under its own promoter was carried out with the miniCTX integration method at *attB* region [[51](#)]. The entire *mgtC* gene with the 525 bp-upstream region, in which a σ⁷⁰ dependent promoter was predicted ([S1 Fig](#)), was amplified, cloned in the pCR2.1 giving pSBC46, which was subcloned in mini-CTX1 plasmid vector giving pSBC47. Chromosomal insertion of pSBC47 carrying *mgtC*⁺ and excision of plasmid DNA sequences resulted in an unmarked integrant ([S1 Text](#)).

Infection of *Danio rerio* embryos

Experiments were performed using the *golden* zebrafish mutant [[52](#)] or the Tg(*mpeg1::mCherry*) [[29](#)] zebrafish line and maintained under standard conditions (supplemental material). Bacterial strains, which were freshly streaked out from glycerol stocks, were grown in LB medium to mid-log phase (DO = 0.6), recovered by centrifugation and washed twice in Phosphate-Buffered Saline (PBS). Suspensions were homogenized through a 26-gauge needle and resuspended in PBS at about 10⁹ bacteria/ml added with 10% phenol red to aid visualization of the injection process. Infections were carried out by microinjection of 1–2 nL of bacterial suspensions into the caudal vein of 30 hpf embryos, which were previously dechorionated and anesthetized with 0.02% tricaine. For survival kinetics after infection, the number of dead embryos was determined visually based on the absence of heartbeat. Depletion of macrophages was carried out upon microinjection of *pu.1* morpholinos into zebrafish eggs and visualized by fluorescence microscopy ([S1 Text](#)).

Microscopic analysis of zebrafish embryos

For live imaging, anesthetized infected embryos were mounted in 35 mm dishes and immobilized with 1% low-melting point agarose. Direct visualization is performed using an Olympus MVX10 epifluorescent microscope equipped with a digital color camera (Olympus XC50). Fluorescence and bright-field images are acquired and processed with CellSens (Olympus) and assembled using GIMP 2.6 freeware to adjust levels and brightness and to remove out-of-focus background fluorescence.

For fixed samples observations, anesthetized embryos are fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde in PBS, then washed twice in PBS and transferred gradually from PBS to

50% glycerol-PBS. Fixed fishes were positioned flat onto depression transparent slides covered with a cover slip for observation with 40x Leica Apo oil 1.15 NA or 63x Leica Apo oil 1.33 NA objectives and using a Leica DM2500CSQ upright microscope equipped with a Leica TCS SPE confocal scan head and fluorescence and differential interference contrast (DIC) optics. Wide-field fluorescence and DIC images were captured and assembled by LAS-AF software (Leica Microsystems).

Ethics statement

All animal experiments described in the present study were conducted at the University Montpellier 2 according to European Union guidelines for handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and were approved by the Direction Sanitaire et Vétérinaire de l'Hérault and Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale under reference CEEA-LR-13007. The breeding of adult fish adhered to the international guidelines specified by the EU Animal Protection Directive 2010/63/EU and adult zebrafish were not sacrificed for this study. All experiments were performed before the embryos free-feeding stage and did not fall under animal experimentation law according to the EU Animal Protection Directive 2010/63/EU. For survival curves, cardiac rhythm was used as a clinical criterion to fix the endpoint at which embryos are euthanized using the anaesthetic Tricaine up to a lethal dose (500 mg/ml). Embryos that survive infection were anaesthetized with Tricaine up to a lethal dose before bleach treatment.

Cytotoxicity towards macrophages

The cytotoxicity of *P. aeruginosa* strains grown to mid-log phase in LB broth was assayed by using J774 macrophages as described in [53], except that macrophages were infected for 1.5 hr at a multiplicity of infection (MOI) of 20. The percentage of LDH release was calculated relatively to that of the uninfected control, which was set at 0% LDH release, and that of uninfected cells lysed with Triton X-100, which was set at 100% LDH release.

Macrophage-mediated bactericidal assay

The killing of *P. aeruginosa* strains by J774 macrophages was carried out essentially as described previously [54]. Mid-log phase *P. aeruginosa* grown in LB broth was centrifuged and resuspended in PBS to infect J774 macrophages grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS at a MOI of 10. After centrifugation of 24-well culture plates, bacterial phagocytosis was allowed to proceed for 30 min before washing three times with sterile PBS and adding fresh DMEM media supplemented with 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicin. Macrophages were lysed after 1 h 30 min and 2 h 30 by using 1% Triton X-100 and the number of viable bacteria was determined by subsequent plating onto LB agar plates. The percentage of survival represents the ratio between the number of bacteria at time 1.5 hr or 2.5–3 hrs and the number of bacteria internalized after phagocytosis. In case of treatment with bafilomycin A1, the inhibitor was added at a concentration of 100 nM 30 min before phagocytosis and was also added after phagocytosis. Bafilomycin does not exhibit any bacterial toxicity at the working concentration. In experiments with strains expressing *mgtR*, macrophages were lysed after 20 min or 2 hrs of gentamicin treatment and the ratio between bacteria enumerated at the two time points was calculated.

Analysis of intracellular bacteria by fluorescence microscopy

For analysis of bacteria in fixed cells, infection of J774 macrophages was carried out as described above for the CFU assay, except that macrophages were seeded on glass coverslips

and infected at a MOI of 5 to 10 with bacteria that were previously passed four times through a 26G needle. Because fluorescent bacterial strains carry a plasmid-encoded gentamycin resistant gene, amikacin ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$) was used to kill extracellular bacteria. For time 0, cells have been in contact with amikacin for 20 min. At the end of the incubation period, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for at least 1 hr. Cells were washed three times with PBS and mounted on glass slides in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Inc). The slides were examined using an upright fluorescence microscope (Axioimager Z2, Zeiss) equipped with an Apotome 1 for optical sectioning. A 63X Apochromat Objective (NA 1.4) was used, transmitted light was acquired using differential interference contrast (DIC), and m-Cherry fluorescence was acquired using a texas red filter set. Z-stacks were systematically acquired using a Z-step of 240 nm. Counting was performed taking into account a maximum projection of the Z-stack. Images were processed using ZEN blue software (Zeiss).

RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

For the study of expression of *PA4635* and *PA2558* genes, RNA was prepared from mid-logarithmic bacterial cultures grown for 1 hour in NCE-minimal medium supplemented with 0.1% casamino acids, 38 mM glycerol and 10 μM MgSO_4 or 1 mM MgSO_4 [8] at pH 7 or pH 5.7. For *mgtR* expression study, RNA was prepared from mid-logarithmic bacterial cultures grown in LB. For bacterial RNA extraction from infected J774, 4×10^6 macrophages were seeded into a 100 cm^2 tissue culture dish and infected at an MOI of 10 as described above. One hour after phagocytosis, cells were washed three times with PBS, lysed with 0.1% Triton X100 and pelleted by centrifugation at 13 000 rpm for 10 min at 15°C . Bacteria were resuspended by adding 500 μl PBS and transferred to a new tube for RNA preparation (thus discarding non resuspended cellular debris).

RNA was prepared and reverse transcribed as previously described [55] except that bacteria were incubated only 5 min with RNA protect reagent and were disrupted with lysozyme. Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out possible DNA contamination. Quantitative real-time PCR was performed using a Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix and a 480 Light Cycler instrument (Roche). PCR conditions were as follows: 3 min denaturation at 98°C , 45 cycles of 98°C for 5 sec, 60°C for 10 sec and 72°C for 10 sec. PCR conditions for *mgtR* and 16S rRNA control gene were as follows: 25 cycles of 95°C for 30 sec, 46°C (59°C for 16S rRNA) for 20 sec and 72°C for 30 sec. The sequences of primers used for RT-PCR are listed in [S1 Table](#).

Internalization in non-phagocytic cells

Invasion assay of HeLa cells were done as described [22] with mid-log phase *P. aeruginosa* grown in LB broth.

Adherence assay on inert surfaces and analysis of exopolysaccharide (EPS) production

The adherence assay was performed as previously described [56] except that the biofilm visualisation was done in glass tubes. O/N cultures were done in 2 ml of MM63 medium supplemented with glucose, Casamino acids and 1 mM MgSO_4 , cells were washed with PBS before resuspension in the same medium with various concentrations of MgSO_4 . The absorbance of the culture was measured at 600 nm (A_{600}) before attached bacteria were stained with 0.1% crystal violet for a period of 15 min and washed twice with water. The stain was then dissolved in ethanol and absorbance was measured at 600 nm.

For liquid Congo red (CR) assays, bacteria were grown as previously in a minimal medium containing 40 µg/ml CR, under vigorous agitation. At 24 h, the A_{600} (absorbance at 600 nm) was determined and the bacterial cells were pelleted by centrifugation at 15493 g. For quantification of CR binding, the A_{490} of the supernatant of each sample was determined. The ratio of A_{490}/A_{600} indicates the EPS production.

Bacterial two-hybrid analysis

The *P. aeruginosa* *mgtC* gene, amplified using PAO1 chromosomal DNA and primers PA4635-pUT18-F/PA4635-pUT18-R, was cloned at the *Hind*III and *Eco*RI sites of the pUT18 vector, to produce a fusion protein *PaMgtC*-T18. This recombinant plasmid was cotransformed with a plasmid producing a fusion protein T25-MgtR [8] into BTH101 bacteria. Quantification of interaction between fusion proteins was carried out at 30°C as described previously [8]. Values are average from at least six independent cultures. A level of β-galactosidase activity at least fivefold higher than that measured for vectors indicates an interaction.

Statistical analysis

Statistical analyses of comparisons between survival curves were performed using the logrank test with Prism 4.0 (Graphpad, Inc). Statistical significance was assumed at P values <0.05. For *ex vivo* experiments (J774 or HeLa cells), paired Student's *t* test was performed using Excel software (Microsoft). In the figures, * means P values <0.05, ** <0.01, and *** <0.001.

Supporting Information

S1 Fig. Construction of a PA4635 mutant. The genomic organization of the *mgtC* (PA4635) locus and the sequence of a predicted σ70 promoter (BProm program (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) found upstream *mgtC* are indicated. The position of oligonucleotides used in PCR experiment to check the mutant is shown.

(TIF)

S2 Fig. Visualisation of macrophage depletion in zebrafish embryos. Depiction of a transgenic (*mpeg1::mCherry*) zebrafish embryo lacking macrophages generated by the injection of *pu1* morpholino mixture at one stage cell. The absence of macrophages in morphants was confirmed after an observation by fluorescent microscopy while the load of macrophages is normal in standard control (inset). Auto-fluorescence is visible at the yolk.

(TIF)

S3 Fig. Survival curves of *pu.1* morphant embryos infected with a low bacterial dose (500 CFU). As shown by the graph, *pu.1* morphant embryos ($n = 20$ each) are sensitive to infection even at low bacterial dose (whereas non treated embryos survive when infected with such dose). No statistically significant difference is obtained between *pu.1* morphant embryos injected with PAO1 or Δ*mgtC* strain (ns: non significant).

(TIF)

S4 Fig. MgtC is involved in uptake of *P. aeruginosa* by macrophages but not by non-phagocytic cells. (A) Phagocytosis of *P. aeruginosa* strains by J774 macrophages. A ratio is calculated between bacterial CFUs counted after phagocytosis and bacterial CFUs from the inoculum. The percentage of phagocytosis is normalized to the one of PAO1. All assays were performed a minimum of three times in triplicate. Error bars represent standard deviations and asterisk indicates P value (* P <0.05, ** P <0.01). (B) Standard bacterial invasion assays in HeLa cells

upon infection with *P. aeruginosa* strains. A T6SS mutant ($\Delta clpV2$) is included as negative control. The percentage of invasion of PAO1 $\Delta clpV2$ or PAO1 $\Delta mgtC$ is normalized to the one PAO1 (that represents an average of 2.5×10^4 CFUs of internalized bacteria per well). All assays were performed a minimum of three times in triplicate. Error bars represent standard deviations and asterisk indicates *P* value ($^{***}P < 0.001$).

(TIF)

S5 Fig. Expression of *P. aeruginosa* *pcrV* and *gyrA* genes in liquid medium and intracellularly. The levels of *pcrV* (A) and *gyrA* (B) transcripts relative to those of the *rpoD* gene were measured by qRT-PCR. RNA was extracted from bacteria grown in liquid medium (*in vitro*) containing a high (1 mM) or low (10 μ M) concentration of MgSO₄ and a pH of 7 or at 5.7. Bacterial RNA was also extracted from infected J774 macrophages (*ex vivo*) that were treated (+ BAFI) or not (- BAFI) with bafilomycin A1. For all conditions, RNA were prepared two times independently. Results are expressed as means $\pm$ SD from at least three independent measurements (each performed in triplicate).

(TIF)

S6 Fig. Effect of addition of extracellular magnesium on the survival of the $\Delta mgtC$ strain in J774 macrophages. The survival of bacteria was measured from macrophages cultured with or without additional magnesium (25 mM). Addition of extracellular magnesium does not rescue the survival defect of the $\Delta mgtC$ strain. The percentage of survival is normalized to the one of PAO1. Error bars correspond to standard errors (SE) from two independent experiments.

(TIF)

S7 Fig. EPS production from *P. aeruginosa* strains. EPS production was measured by Congo Red staining from *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO1 $\Delta mgtC$, and PAO1 $\Delta mgtC$ *attB::mgtC*⁺ grown at 30°C for 24 h in minimal medium with low MgSO₄ (10 μ M) or high MgSO₄ (1 mM). Results are representatives of three independent experiments. Error bars correspond to standard errors (+ SE) from three independent experiments and the asterisks indicate *P* value (Student's *t* test, $^{***}P < 0.001$).

(TIF)

S8 Fig. PAO1 $\Delta mgtC$ mutant motility with twitching and swimming assays. *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO1 $\Delta mgtC$, and PAO1 $\Delta mgtC$ *attB::mgtC*⁺ were grown in minimal medium containing 10 μ M or 1 mM MgSO₄. For the swimming assay, the particular aspect of colonies in 1 mM MgSO₄ is not observed with the same MgSO₄ concentration when the preculture is done in LB medium (lower panel) instead of minimal medium (MM).

(TIF)

S9 Fig. PAO1 $\Delta mgtC$ mutant morphology. *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO1 $\Delta mgtC$, and PAO1 $\Delta mgtC$ *attB::mgtC*⁺ were grown at 30°C in minimal medium supplemented with 10 μ M or 1 mM MgSO₄. Strains were observed by optical microscopy at 100X, Zeiss Axioskop 40. Scale bar indicates a length of 1 μ m.

(TIF)

S10 Fig. Alignment of amino-acid sequences of MgtC proteins from *S. Typhimurium* (STM3764) and *P. aeruginosa* (PA4635). Proteins were aligned using the ClustalX program. Conservation of residues is indicated below the sequences with the following rules: "*" for residues that are identical in all sequences in the alignment; ":" for conserved substitutions; "." means for semi-conserved substitutions. Residues conserved in the phylogenetic subgroup only and subjected to site-directed mutagenesis in the present study are shaded in dark grey. Transmembrane (TM) domains are indicated above the sequence (TM1 to TM5). An Ala-coil motif,

which is an helix-helix interaction motif characterized by small residues (Ala, Gly, Ser) in heptad repeats, present in the TM4 of ST MgtC (red rectangles) is conserved in PA4635. In addition, three residues important for ST MgtC/MgtR interaction between TM3 and TM4 are indicated by red dots.

(TIF)

S11 Fig. *In vivo* interaction of PaMgtC with *Salmonella* KdpF peptide. The interaction was assayed using the BACTH system by transforming *E. coli* BTH101 cells with plasmids producing PaMgtC-T18 and T25-StKdpF. Liquid β -galactosidase assays were performed from three independent experiments in duplicate. As negative control, BTH101 bacteria were cotransformed with a plasmid expressing PaMgtC-T18 and the pKT25 vector or with the pUT18 vector and a plasmid expressing T25-MgtR. Both negative controls give similar β -galactosidase levels. Transformants with PaMgtC-T18 and T25-StKdpF give a β -galactosidase level that is not five times higher the level of negative controls, indicative of a lack of interaction between PaMgtC and StKdpF according to the BACTH protocol. Error bars represent SD.

(TIF)

S12 Fig. Phagocytosis of the PAO1 strain expressing *mgtR* by J774 macrophages. For PAO1 strain expressing or not *mgtR*, a ratio is calculated between bacterial CFUs counted after phagocytosis and 20 treatment of gentamycin and bacterial CFUs from the inoculum. Results are normalized to 100% for the PAO1-pBBR strain and are expressed as means $\pm$ SE from four independent experiments. Asterisks indicate statistical significance * $P < 0.05$.

(TIF)

S13 Fig. Growth of *P. aeruginosa* PAO1 strain expressing *mgtR* in Mg^{2+} deprived medium. PAO1 strain carrying the pBBR1MCS vector (pBBR) or a pBBR1MCS derivative that encodes *mgtR* (pMgtR) were grown at 30°C in minimal medium with 0, 10 μ M or 1 mM $MgSO_4$. OD₆₀₀ is indicated over the growth period. The experiment was independently repeated two times and a representative curve is shown.

(TIF)

S1 Table. Bacterial strains, plasmids and primers used in the study.

(DOC)

S1 Text. Supporting Protocols.

(DOC)

Acknowledgments

We thank Marian Llamas for providing plasmid pBPF-*mCherry*, Cathy Gonzalez for fish facility maintenance, Kevin Esteves for construction of plasmid pUT18-PaMgtC and the Montpellier RIO Imaging microscopy platform. We thank Georges Lutfalla for critical reading of the manuscript, Laurence Berry for discussions and cell imaging expertise, Rom   Voulhoux's team and Laurent Kremer for support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SB ABBP. Performed the experiments: CB CS AB AL SB ABBP. Analyzed the data: CB CS AB AL SB ABBP. Contributed reagents/materials/analysis tools: SB ABBP. Wrote the paper: SB ABBP.

References

1. Alix E, Blanc-Potard AB MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 252–256. PMID: [17416526](#)
2. Blanc-Potard AB, Groisman EA The *Salmonella* *selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 1997; 16: 5376–5385. PMID: [9311997](#)
3. Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, et al. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog.* 2006; 2: e11. PMID: [16518469](#)
4. Thompson JA, Liu M, Helaine S, Holden DW Contribution of the PhoP/Q regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. *Microbiology.* 2011; 157: 2084–2093. doi: [10.1099/mic.0.048926-0](#) PMID: [21511762](#)
5. Lee EJ, Pontes MH, Groisman EA A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F1Fo ATP synthase. *Cell.* 2013; 154: 146–156. doi: [10.1016/j.cell.2013.06.004](#) PMID: [23827679](#)
6. Garcia Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell.* 1996; 84: 165–174. PMID: [8548821](#)
7. Lee EJ, Groisman EA Control of a *Salmonella* virulence locus by an ATP-sensing leader messenger RNA. *Nature.* 2012; 486: 271–275. doi: [10.1038/nature11090](#) PMID: [22699622](#)
8. Alix E, Blanc-Potard AB Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J.* 2008; 27: 546–557. doi: [10.1038/sj.emboj.7601983](#) PMID: [18200043](#)
9. Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrt S, Piddington D, Riley L, et al. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by mycobacterium tuberculosis and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* 2000; 35: 1375–1382. PMID: [10760138](#)
10. Lavigne JP, O'Callaghan D, Blanc-Potard AB Requirement of MgtC for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment. *Infect Immun.* 2005; 73: 3160–3163. PMID: [15845525](#)
11. Maloney KE, Valvano MA The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infect Immun.* 2006; 74: 5477–5486. PMID: [16988222](#)
12. Grabenstein JP, Fukuto HS, Palmer LE, Bliska JB Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. *Infect Immun.* 2006; 74: 3727–3741. PMID: [16790745](#)
13. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *PLoS One.* 2009; 4: e5551. doi: [10.1371/journal.pone.0005551](#) PMID: [19436747](#)
14. Belon C, Gannoun-Zaki L, Lutfalla G, Kremer L, Blanc-Potard AB *Mycobacterium marinum* MgtC plays a role in phagocytosis but is dispensable for intracellular multiplication. *PLoS One.* 2014; 9: e116052. doi: [10.1371/journal.pone.0116052](#) PMID: [25545682](#)
15. Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L, et al. Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Mol Microbiol.* 2007; 63: 605–622. PMID: [17176255](#)
16. Blanc-Potard AB, Lafay B MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol.* 2003; 57: 479–486. PMID: [14708580](#)
17. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One.* 2009; 4: e5660. doi: [10.1371/journal.pone.0005660](#) PMID: [19543527](#)
18. Banin E, Brady KM, Greenberg EP Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 2064–2069. PMID: [16517655](#)
19. Mulcahy H, Lewenza S Magnesium limitation is an environmental trigger of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifestyle. *PLoS One.* 2011; 6: e23307. doi: [10.1371/journal.pone.0023307](#) PMID: [21858064](#)
20. Brannon MK, Davis JM, Mathias JR, Hall CJ, Emerson JC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cell Microbiol.* 2009; 11: 755–768. doi: [10.1111/j.1462-5822.2009.01288.x](#) PMID: [19207728](#)
21. Garcia-Medina R, Dunne WM, Singh PK, Brody SL *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 8298–8305. PMID: [16299327](#)
22. Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates

- internalization in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2012; 287: 27095–27105. doi: [10.1074/jbc.M112.376368](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368) PMID: [22665491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665491/)
23. Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, et al. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: D596–600. doi: [10.1093/nar/gkq869](https://doi.org/10.1093/nar/gkq869) PMID: [20929876](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20929876/)
24. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, et al. Complete genome sequence of the multi-resistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One*. 2010; 5: e8842. doi: [10.1371/journal.pone.0008842](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842) PMID: [20107499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20107499/)
25. Torraca V, Masud S, Spaik HP, Meijer AH Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Dis Model Mech*. 2014; 7: 785–797. doi: [10.1242/dmm.015594](https://doi.org/10.1242/dmm.015594) PMID: [24973749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24973749/)
26. Clatworthy AE, Lee JS, Leibman M, Kostun Z, Davidson AJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect Immun*. 2009; 77: 1293–1303. doi: [10.1128/IAI.01181-08](https://doi.org/10.1128/IAI.01181-08) PMID: [19168742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19168742/)
27. Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood*. 2001; 98: 3087–3096. PMID: [11698295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698295/)
28. Clay H, Davis JM, Beery D, Huttenlocher A, Lyons SE, et al. Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe*. 2007; 2: 29–39. PMID: [18005715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18005715/)
29. Bernut A, Herrmann JL, Kissa K, Dubremetz JF, Gaillard JL, et al. *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: E943–952. doi: [10.1073/pnas.1321390111](https://doi.org/10.1073/pnas.1321390111) PMID: [24567393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24567393/)
30. Engel J, Balachandran P Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*. 2009; 12: 61–66. doi: [10.1016/j.mib.2008.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.007) PMID: [19168385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19168385/)
31. Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 7972–7976. PMID: [2973058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2973058/)
32. Friedman L, Kolter R Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol*. 2004; 51: 675–690. PMID: [14731271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14731271/)
33. Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*. 2005; 151: 985–997. PMID: [15758243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15758243/)
34. Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, Wozniak DJ Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional *ps*/variants reveals roles for the *ps*/polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *J Bacteriol*. 2006; 188: 8213–8221. PMID: [16980452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16980452/)
35. O'Toole GA, Kolter R Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998; 30: 295–304. PMID: [9791175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9791175/)
36. Jean-Francois FL, Dai J, Yu L, Myrick A, Rubin E, et al. Binding of MgtC, a *Salmonella* transmembrane regulatory peptide, to MgtC, a *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor: a structural study. *J Mol Biol*. 2014; 426: 436–446. doi: [10.1016/j.jmb.2013.10.014](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.014) PMID: [24140750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140750/)
37. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 5752–5756. PMID: [9576956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9576956/)
38. Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, et al. The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1003016. doi: [10.1371/journal.ppat.1003016](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003016) PMID: [23209405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209405/)
39. Prajsnar TK, Hamilton R, Garcia-Lara J, McVicker G, Williams A, et al. A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cell Microbiol*. 2012; 14: 1600–1619. doi: [10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x) PMID: [22694745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22694745/)
40. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2003; 47: 103–118. PMID: [12492857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12492857/)
41. Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect Immun*. 1996; 64: 2765–2773. PMID: [8698506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8698506/)
42. Porte F, Liautard JP, Kohler S Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun*. 1999; 67: 4041–4047. PMID: [10417172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417172/)
43. Skurnik D, Roux D, Aschard H, Cattoir V, Yoder-Himes D, et al. A comprehensive analysis of in vitro and in vivo genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003582. doi: [10.1371/journal.ppat.1003582](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003582) PMID: [24039572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24039572/)

44. Guina T, Wu M, Miller SI, Purvine SO, Yi EC, et al. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2003; 14: 742–751. PMID: [12837596](#)
45. Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, et al. Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell*. 2006; 17: 498–510. PMID: [16251362](#)
46. Song B, Leff LG Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol Res*. 2006; 161: 355–361. PMID: [16517137](#)
47. Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78: 7977–7984. doi: [10.1128/AEM.01953-12](#) PMID: [22941091](#)
48. Yoon MY, Lee KM, Park Y, Yoon SS Contribution of cell elongation to the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* during anaerobic respiration. *PLoS One*. 2011; 6: e16105. doi: [10.1371/journal.pone.0016105](#) PMID: [21267455](#)
49. Pontes MH, Lee EJ, Choi J, Groisman EA *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: 5183–5188. doi: [10.1073/pnas.1500989112](#) PMID: [25848006](#)
50. Yang Y, Labesse G, Carrere-Kremer S, Esteves K, Kremer L, et al. (2012) The C-terminal domain of the virulence factor MgtC is a divergent ACT domain. *J Bacteriol* 194: 6255–6263. doi: [10.1128/JB.01424-12](#) PMID: [22984256](#)
51. Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid*. 2000; 43: 59–72. PMID: [10610820](#)
52. Lamason RL, Mohideen MA, Mest JR, Wong AC, Norton HL, et al. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*. 2005; 310: 1782–1786. PMID: [16357253](#)
53. Soscia C, Hachani A, Bernadac A, Filloux A, Bleves S Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2007; 189: 3124–3132. PMID: [17307856](#)
54. Del Porto P, Cifani N, Guarnieri S, Di Domenico EG, Mariggio MA, et al. Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2011; 6: e19970. doi: [10.1371/journal.pone.0019970](#) PMID: [21625641](#)
55. Gannoun-Zaki L, Belon C, Dupont C, Hilbert F, Kremer L, et al. Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth. *FEMS Microbiol Lett*. 2014; 359: 34–41. doi: [10.1111/1574-6968.12559](#) PMID: [25197761](#)
56. Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 6911–6916. PMID: [11381121](#)
57. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: W465–469. doi: [10.1093/nar/gkn180](#) PMID: [18424797](#)
58. Gastebois A, Blanc Potard AB, Gribaldo S, Beau R, Latge JP, et al. Phylogenetic and functional analysis of *Aspergillus fumigatus* MGTc, a fungal protein homologous to a bacterial virulence factor. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77: 4700–4703. doi: [10.1128/AEM.00243-11](#) PMID: [21602378](#)

Figure S1

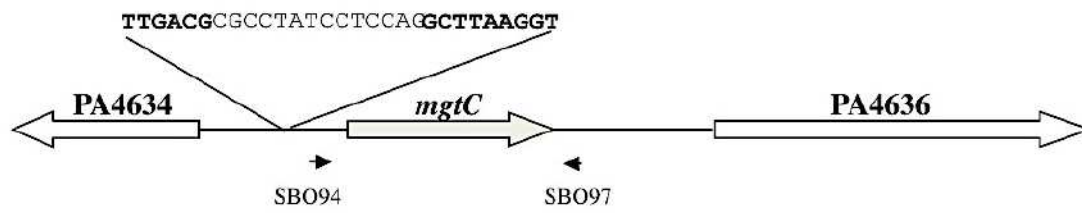


Figure S2

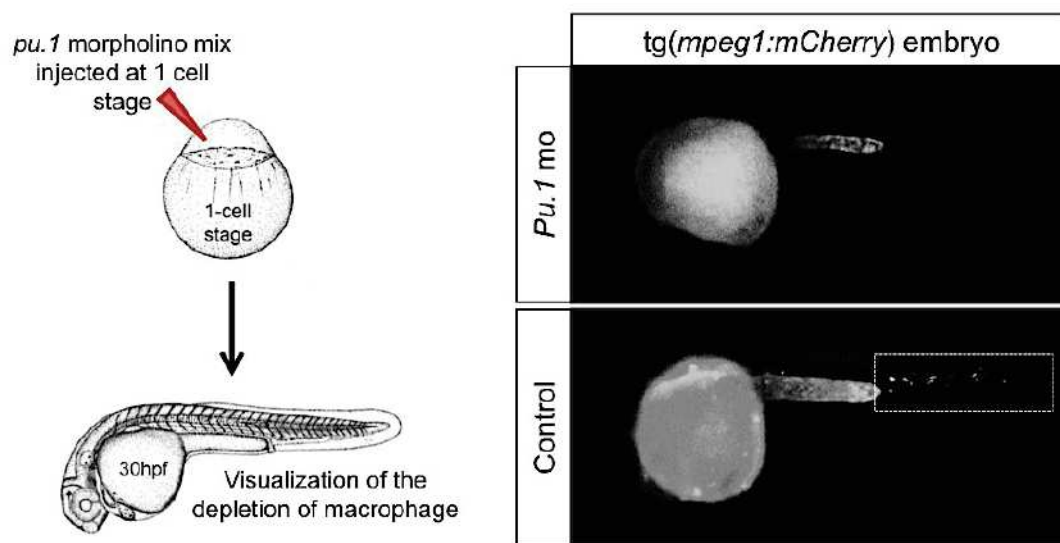


Figure S3

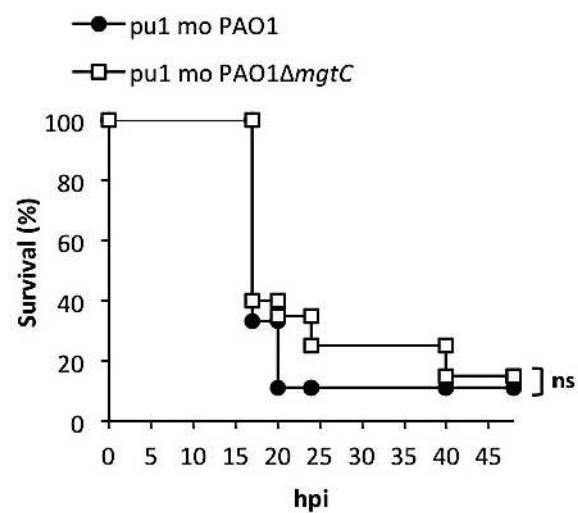


Figure S4

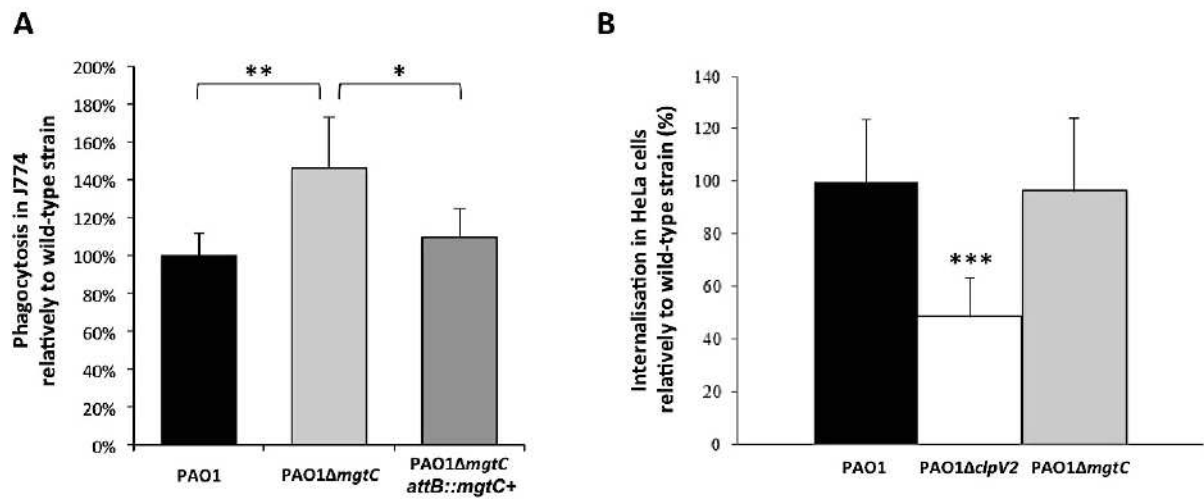


Figure S5

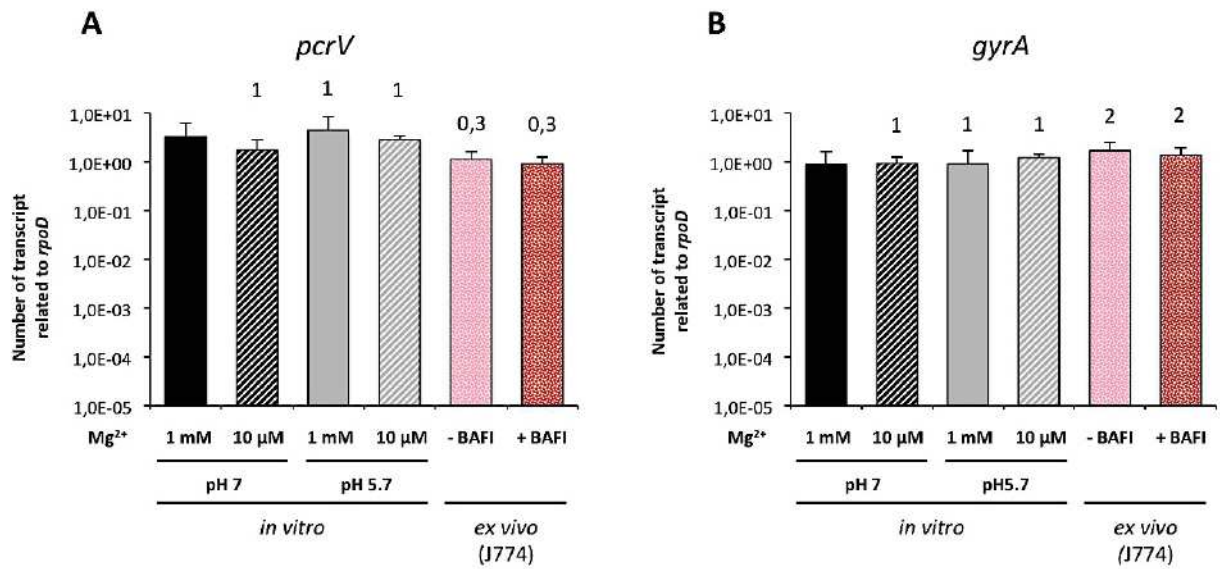


Figure S6

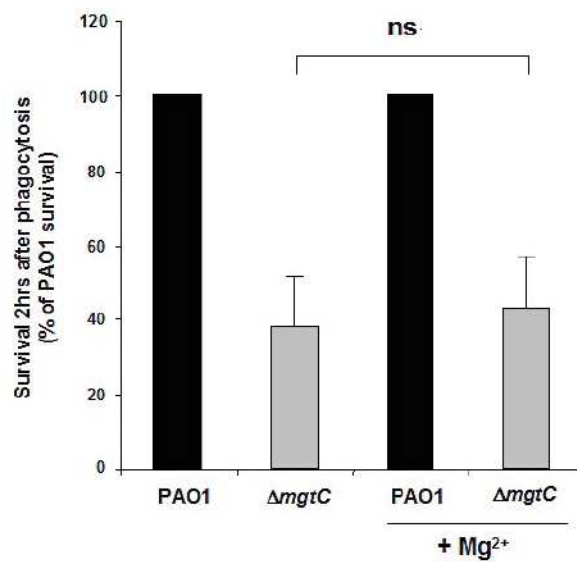


Figure S7

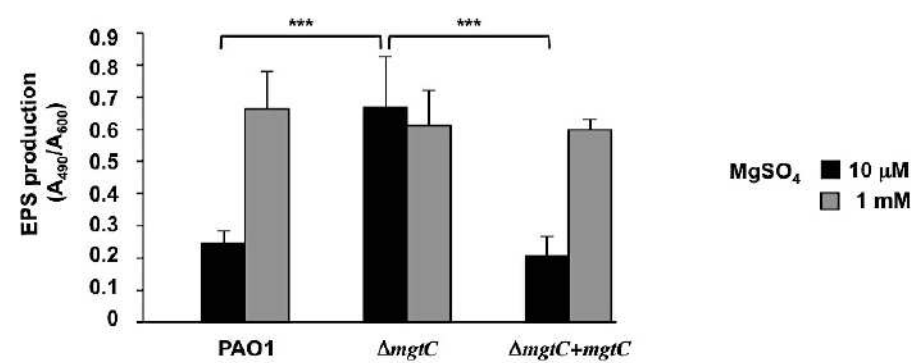


Figure S8

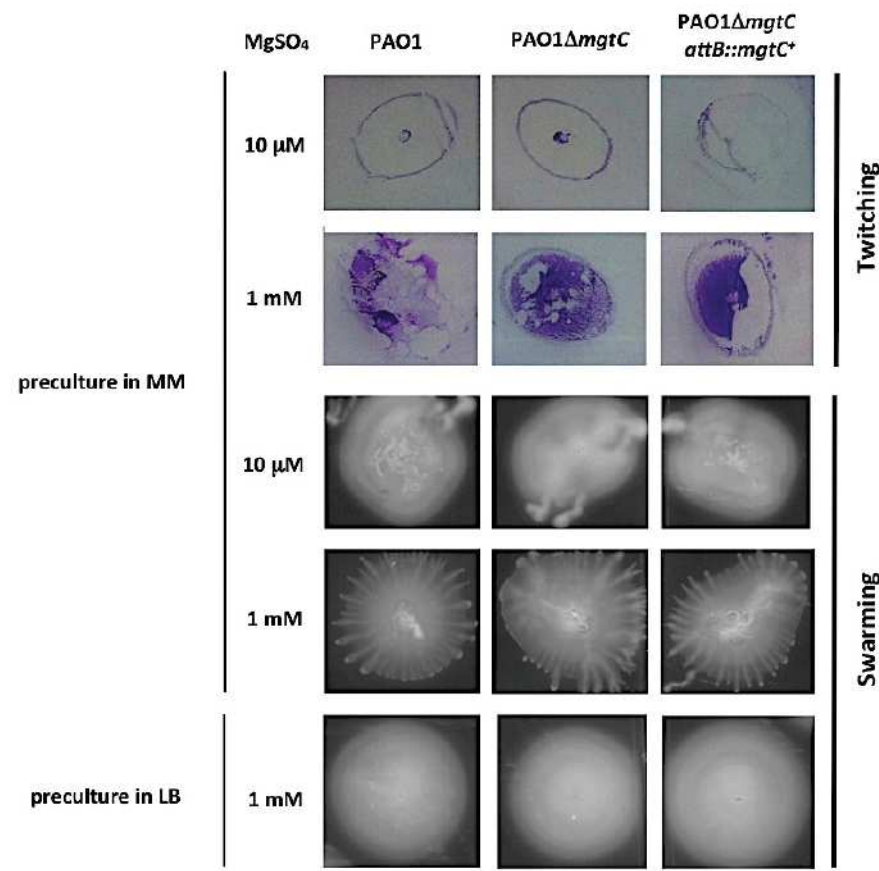


Figure S9

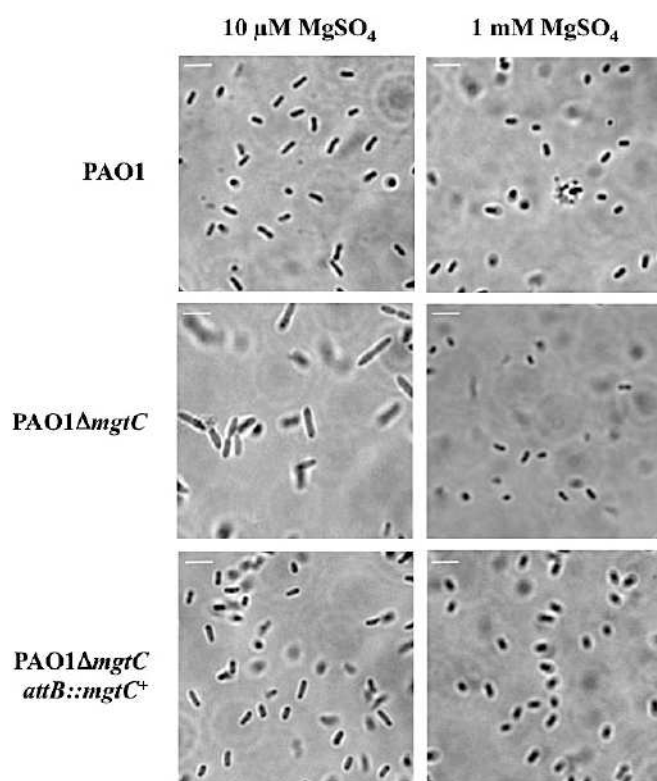


Figure S10

	TM1	TM2
<i>S. Typhimurium</i> MgtC	MEERMLMFPYILNLLAAMLGALIGAERQWRQRMAGLRTNALVATGAAVFILSSMTT-SP	
<i>P. aeruginosa</i> PA4635	---MDWKVFLLRVAVALVLGALIGAERQLRQRLTGLRTNALVSTGACLFVL--MTQGVP	
	* : : * . : . * : : *	
	TM3	TM4
<i>S. Typhimurium</i> MgtC	DSPG---RIAAQIVSGIGFLGAGVIMREGMNVRLNT	ATLWCSIGIGVLCGLGQFKNAL
<i>P. aeruginosa</i> PA4635	GLAGDASRIAAYVVSIGIGFLGGGVIMRDGLNVRGLNTAATLWCTAAIGVLC	SMGLLEAT
	. . * * * * * : * * * * * . * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	TM5	
<i>S. Typhimurium</i> MgtC	AATIIILCANILLREAAQRIN---QLPISAEGEKRYILKVTCNKEDES AVRQWLLNIVKE	
<i>P. aeruginosa</i> PA4635	LGSLVVLCANILLRDIAQRINRQDVLPAEAEQRYEVQIVCRAEDEIQVRSMLHSLGS	
	. : : : * * * * * : *	
<i>S. Typhimurium</i> MgtC	AAICLQGLGSVPAQEQQYKEIRAELVGHADYRKTR ELIISRIGDNDNITAIHWSIDSQ--	
<i>P. aeruginosa</i> PA4635	SDLRLQSLHSEDLNPAKLEVRAELLGTPEAPAQLERLVSRVSLEKGVSSVRWQVFELAA	
	: : * * . * * : : . * : * * * * : : * : * * * . : . : : * * * : .	
<i>S. Typhimurium</i> MgtC	-	
<i>P. aeruginosa</i> PA4635	D	

Figure S11

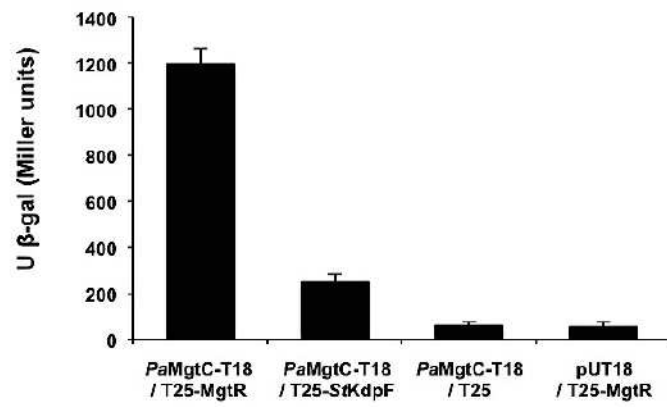


Figure S12

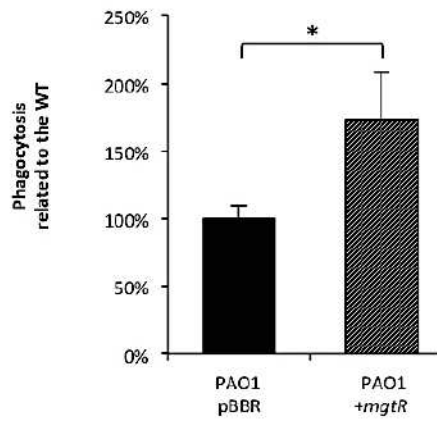


Figure S13

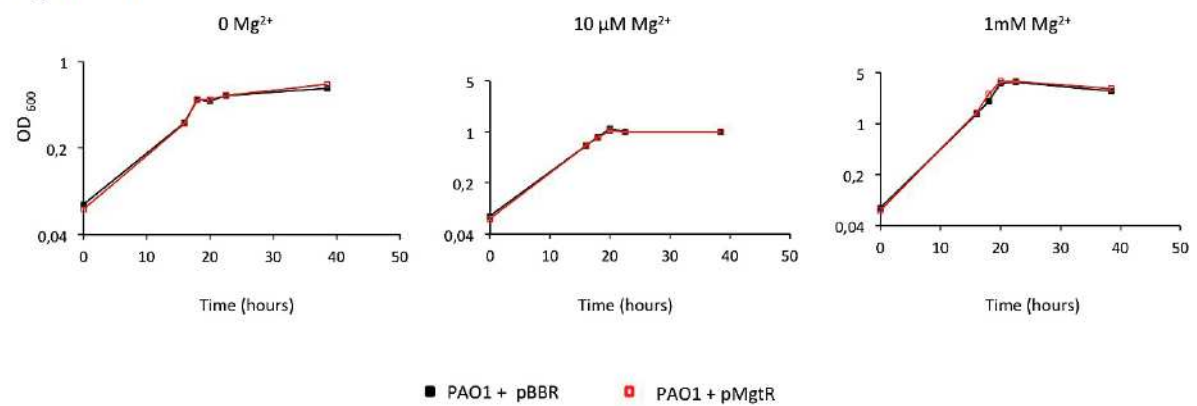


Table S1

Strain, plasmid, or oligonucleotide	Genotype, description or sequence	Source and/or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
Top10 F ⁺	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ	Laboratory collection
CC118[<i>pir</i>]	(<i>pir</i>) ⊗ (<i>ara-leu</i>), <i>araD</i> , ⊗ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA-20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>rpoB</i> , <i>Arg</i> (Am), <i>recA1</i> , Rfr (<i>pir</i>)	[1]
SM10	<i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu	Laboratory collection
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type, prototroph, <i>chl-2</i>	B. Holloway
PAO1⊗ <i>mgtC</i>	<i>mgtC</i> deletion mutant	This work
PAO1⊗ <i>mgtC</i>	complementation of the <i>mgtC</i> mutation by a <i>mgtC</i> copy inserted at the <i>attB</i> site on	This work
<i>C</i>	<i>P. aeruginosa</i> chromosome	
<i>attB</i> :: <i>mgtC</i> ⁺	<i>pseN</i> deletion mutant <i>clpV2</i>	[2]
PAO1⊗ <i>pseN</i>	deletion mutant	[3]
PAO1⊗ <i>clpV</i>		
Plasmids		
pRK2013	Tra ⁺ , Mob ⁺ , ColE1, KmR	Laboratory collection
pCR2.1	TA cloning, <i>lacZ</i> ′, ColE1, f1 ori, ApR KmR	Invitrogen
pSBC43	526 bp upstream and 580 bp downstream <i>mgtC</i> in pCR2.1	This work
pKNG101	oriR6K, mobRK2, sacBR ⁺ , SmR (suicide vector)	[4]
pSBC44	<i>mgtC</i> deletion of pSBC43 in pKNG101	This work
mini-CTX1	Ω-FRT-attP-MCS, ori, int, oriT, TcR	[5]
pFLP2	Source of Flp recombinase, ApR	[6]
pSBC46	525 bp upstream region to the last nucleotide of <i>mgtC</i> in pCR2.1	This work
pSBC47	<i>mgtC</i> gene of pSBC46 in mini-CTX1	This work
pBPF-mCherry	<i>P. aeruginosa</i> <i>oprF</i> promoter region upstream of the mCherry coding sequence, GmR	[7]
pUT18	AmpR rep _{ColE1}	[8]
pKT25	KanR rep _{p15A}	[8]
pKT25-MgtR	Fusion MgtR with T25, KanR rep _{p15A}	[9]
pKT25-StKdpF	Fusion StKdpF with T25, KanR rep _{p15A}	[10]
pUT18-PaMgtC	Fusion PaMgtC with T18, AmpR rep _{ColE1}	This work
pBBR1MCS	CmR	[11]
pMgtR	pBBR1MCS <i>mgtR</i>	[9]
Primers		
SBO94	5′-GCCGGAGAAATGTTCCACT-3′	This work
SBO95A	5′-TCAGTCGGCCGCCAGTTCCATGTTTCACCTCGT-3′	This work
SBO96A	5′-ACGAGGTGAAACATGGAACGGCGGCCGACTGA-3′	This work
SBO97	5′-AGCGGTAGCGGACCAGGG-3′	This work
SBO98	5′-CTGGGCGTACGCGACAGGT-3′	This work
SBO 99	5′-AGCGGGCGCGAGAACTGA-3′	This work
SBO100	5′-AGCGGTAGCGGACCAGGG-3′	This work
PA4635-18-HindF	5′-CCCAAGCTTGATGGATTGGAAAGTATTTC-3′	This work
PA4635-18-EcoR	5′-GGAATTCGTCGGCCGCCAGTTCGAAG-3′	This work
PA4635-F	5′-AAAGTATTTCTCCTGCGCGTC-3′	This work
PA4635-R	5′-CCGGAGACTACATAGGCGG-3′	This work
PA2558-F	5′-GGAGCGCTTCTACCAGATCA-3′	This work
PA2558-R	5′-TCTGTTCCACCAGCGAGTC-3′	This work
MgtR-F	5′-TGAATCGCTCACCCGATAAAA-3′	This work
MgtR-R	5′-GAAAACGATTTGCCAGAGGGC-3′	This work
16S-F	5′-CAAACTACTGAGCTAGAGTACG-3′	[12]
16S-R	5′-TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT-3′	[12]
pcrV-F	5′-AGTGGGATCTGCGCGAGTT-3′	
pcrV-R	5′-TGGGTCTGCAGGACATCCTT-3′	[13]
gyrA-F	5′-AACGACTGGAACAAGCCCTAC-3′	[13]
gyrA-R	5′-GCGCACGATGGTGTGTA-3′	[13]
rpoD-F	5′-GGGCGAAGAAGGAAATGGTC-3′	[13]
rpoD-R	5′-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3′	[14]

1. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-6567.
2. Soscia C, Hachani A, Bernadac A, Filloux A, Bleves S (2007) Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 3124-3132.
3. Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, et al. (2012) The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *J Biol Chem* 287: 27095-27105.
4. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109: 137-141.
5. Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43: 59-72.
6. Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range F⁺-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212: 77-86.
7. Llamas MA, van der Sar A, Chu BC, Sparrius M, Vogel HJ, et al. (2009) A Novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 5: e1000572.
8. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5752-5756.
9. Alix E, Blanc-Potard AB (2008) Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J* 27: 546-557.
10. Gannoun-Zaki L, Belon C, Dupont C, Hilbert F, Kremer L, et al. (2014) Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth. *FEMS Microbiol Lett* 359: 34-41.
11. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802.
12. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K (2007) Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 73: 32-39.
13. Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A (2011) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 13: 1666-1681.
14. Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, et al. (2003) Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* 52: 403-408.

Supporting Protocols

Construction of a *P. aeruginosa* *mgtC* mutant and complemented strain

To generate the *mgtC* deletion, 526 bp upstream and 580 bp downstream of the *mgtC* gene were amplified by overlapping PCR with High Fidelity DNA polymerase (ROCHE) using SBO94, SBO95A, SBO96A, and SBO97 primers (S1 Table) [1]. The PCR product was cloned in pCR2.1 (TA-cloning KIT, Invitrogen) giving pSBC43, which was then sequenced (GATC) and subcloned in pKNG101 suicide vector giving the mutator pSBC44. pSBC44, maintained in the *E. coli* CC118[pir strain, was mobilized in the wild-type *P. aeruginosa* strain PAO1. The mutants, with a double recombination event resulting in the non-polar deletion of the *mgtC* gene, were verified by PCR using external primers SBO98-SBO100.

Complementation by a single copy of the *mgtC*⁺ gene under its own promoter was carried out with the miniCTX integration method at *attB* region [2]. The entire *mgtC* gene with the 525 bp-upstream region in which a $\int^{70}$ dependent promoter was predicted (S1 Fig) was amplified with SBO94 and SBO99, cloned in the pCR2.1 giving pSBC46, which was then sequenced and subcloned in mini-CTX1 plasmid vector giving pSBC47. Chromosomal insertion of the mini-CTX construct pSBC47 carrying *mgtC*⁺ was obtained via a mating between the recipient PAO1 Δ *mgtC* (grown O/N at 42 °C), and *E. coli* SM10 pSBC47, with selection on PIA for tetracycline. Finally, excision of the unwanted plasmid DNA sequences was achieved by producing the Flp recombinase from a conjugative plasmid, pFLP2. This step results in an unmarked integrant. The pFLP2 plasmid was cured on sucrose 6%.

Swimming and twitching motility assays

For motility assays, O/N cultures were done in MM63 medium supplemented with glucose, Casamino acids and 1mM MgSO₄. For twitching motility, plates containing 1.5% agar were inoculated by stabbing the agar plates. After 24 h growth at 30 °C, the agar was removed and the plates were stained with 1% crystal violet for 10 min and washed with water. Spreading of

bacteria from the inoculation point could be observed by the size of the stained surface on the plastic. For swimming assays, 0.3% agar plates were inoculated and were incubated 5 h at 37°C. The spreading of the colony on the agar could readily be observed.

Zebrafish maintenance

Zebrafish experiments were performed using the *golden* zebrafish mutant [3] purchased from a local company (Antinea SARL, Montpellier, France) and maintained according to standard described procedures [4]. The Tg(*mpeg1::mCherry*) zebrafish line, which was generated as described below, was used for antisense experiments. Eggs were obtained by natural spawning and incubated at 28.5 °C in “fish water” (water with NaCl 60 µg/mL). Ages of the embryos are expressed as hours post fertilization (hpf).

Generation of transgenic (*mpeg1::mCherry*) line

The Mpeg1 promoter is used to drive the specific expression of membrane targetted redfluorescent protein in macrophages. Amplificating primers for fragment of Mpeg1 promoter were zMpeg1P4 (TTGGAGCACATCTGAC) and zMpeg1E2N2 (TTATAGCGGCCGCGAAATGCTCTTGACTTCATGA), digested by NotI and ligated to the coding phase of the farnesylated mCherry protein so that the Mpeg1 AUG would be in phase with the downstream mCherry-F open reading frame on a Tol2 derived vector. The resulting plasmid was injected together with the Transposase mRNA in one cell stage embryos.

Microinjection of Morpholinos into embryos

A mix of splice-blocking (GGTCTTTCTCCTTACCATGCTCTCC) and ATG (CCTCCATTCTGTACGGATGCAGCAT) morpholinos (MO) against *pu.1* gene were purchased from Gene Tools and combined as described [5] [6]. MO mix were prepared in MO

buffer containing 10 % phenol red and injected (3 nl) into one cell stage *tg(mpeg1::mCherry)* using a Tritech Research digital microINJECTOR (MINJ-D). The correct depletion of macrophages cells in *pu.1* morphants was confirmed by fluorescent microscopy observation.

Fluorescence Microscopy

Fluorescence live microscopy of embryos are using an Olympus MVX10 epifluorescent microscope equipped with a X-Cite[®] 120Q (Lumen Dynamics) 120W mercury light source. Images are acquired with a digital color camera (Olympus XC50) and processed using CellSens (Olympus). Fluorescence filters cubes TRITC-MVX10 are used for detection of red light. Final images analysis and visualization are performed using GIMP 2.6 freeware to adjust levels and brightness and to remove out-of-focus background fluorescence.

1. Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A (2005) The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* 151: 985-997.
2. Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP (2000) Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43: 59-72.
3. Lamason RL, Mohideen MA, Mest JR, Wong AC, Norton HL, et al. (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310: 1782-1786.
4. Westerfield M (2007) In: The zebrafish book: a guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*). 5th edition, Eugene, University of Oregon Press. Paperback.
5. Clay H, Davis JM, Beery D, Huttenlocher A, Lyons SE, et al. (2007) Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe* 2: 29-39.
6. Bernut A, Herrmann JL, Kissa K, Dubremetz JF, Gaillard JL, et al. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E943-952.

1.2.3 Résultats complémentaires

Dans cette partie, je vais présenter les résultats complémentaires qui n'ont pas été inclus lors de la soumission de l'article 2 mais dont certains ont été ajoutés dans la version révisée et publiée de cet article. Ces résultats ont pour but de décrypter les mécanismes impliqués dans les phénotypes observés avec le mutant *mgtC*, de préciser la régulation de MgtC et d'analyser le rôle de MgtC dans la phagocytose.

1.2.3.1 Etude de la résistance au stress oxydatif

Le stress oxydatif est un mécanisme important de défense de l'hôte contre les bactéries. Une augmentation de la sensibilité du mutant *mgtC* au stress oxydatif aurait pu expliquer pourquoi le mutant *mgtC* est plus sensible à l'effet bactéricide des macrophages.

Des tests de sensibilité au stress oxydatif ont été réalisés *in vitro*, par ajout d'H₂O₂ dans les milieux de culture aux concentrations de 5 et 10 mM. Le pourcentage de survie a été calculé après 20, 30, 40 min ou 1h d'incubation. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une sensibilité du mutant *mgtC* différente de celle de la souche sauvage.

1.2.3.1 Régulation de MgtC

Un autre mécanisme important de défense de l'hôte contre les bactéries est l'acidification du phagosome. Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les souches dans la sensibilité au stress acide (G. Accard et A. Blanc-Potard). Mais nous avons étudié l'effet du pH acide sur la régulation de MgtC couplé à l'étude de la régulation par le magnésium. Dans l'article 2, une RT-PCR montre que l'expression de l'homologue MgtC PA4635 est induite par une faible concentration en Mg²⁺ contrairement à l'homologue PA2558 (figure S4).

Pour aller plus loin dans la compréhension de la régulation de MgtC par le magnésium et par le pH acide, des expériences de qRT-PCR ont été faites sur différents niveaux.

La régulation a été étudiée *in vitro* en comparant l'expression de *mgtC* à partir de cultures en milieu à pH neutre (pH7) et en milieu à pH acide (pH 5,7), en condition de carence en Mg²⁺ ou avec une concentration normale de Mg²⁺.

Dans l'article, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ATPase vacuolaire (Bafilomycine A1) suggère que l'acidification phagosomale pourrait contribuer à l'expression de *mgtC*. Pour tester cette hypothèse nous avons aussi évalué l'expression de *mgtC* lors d'une infection de macrophage en comparant cette expression en présence et en absence de l'inhibiteur. Les résultats des qRT-PCR sont représentés dans la figure 40.

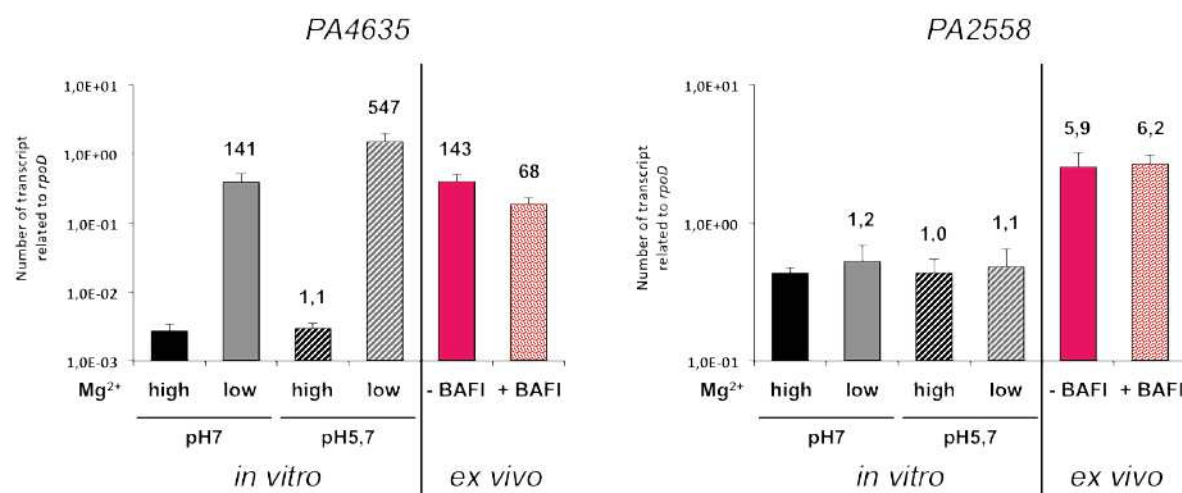


Figure 40 – Expression des gènes *mgtC* de *P. aeruginosa* dans différentes conditions. Les nombres au-dessus des histogrammes indiquent le facteur d'induction par rapport à l'expression de *mgtC* dans les conditions high Mg^{2+} et pH7. Le gène *rpoD* est utilisé comme contrôle interne. Les expériences *ex vivo* ont été réalisées dans des macrophages J774.

In vitro, on remarque tout d'abord que l'expression de l'homologue PA4635 est fortement induite (141 fois) par une carence en Mg^{2+} . Cette induction est majorée en pH acide (547 fois). L'effet du pH acide n'est cependant pas visible en condition high Mg^{2+} (1,1 fois). En revanche, pour PA2558, on observe que son expression n'est ni régulé par le Mg^{2+} , ni par le pH avec des taux d'induction autour de 1.

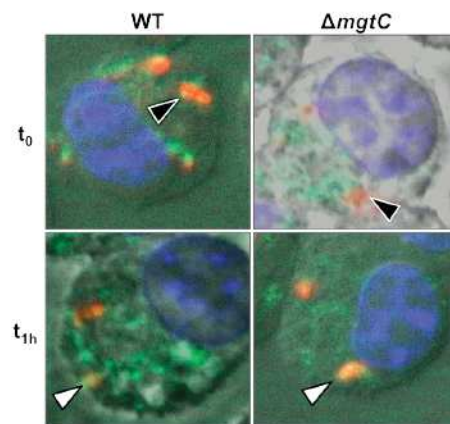
Ex vivo, l'expression intracellulaire de PA4635 est fortement induite (143 fois) par rapport à celle de PA2558 (5,9 fois). Pour PA4635, l'induction est similaire à celle observée *in vitro* en condition de carence en Mg^{2+} . Enfin, alors que l'expression intracellulaire de PA4635 est diminuée de moitié en présence d'inhibiteur de la V-ATPase, l'expression de PA2558 est identique en présence ou en absence de cet inhibiteur. Ces expériences doivent être répétées pour déterminer si l'effet observé est significatif mais les résultats obtenus sont en faveur de l'hypothèse proposée dans l'article 2 et la forte induction de PA4635 dans le macrophage est en accord avec le rôle intracellulaire proposé pour ce gène.

1.2.3.2 Visualisation de l'infection dans le macrophage

Une analyse microscopique préliminaire a également été réalisée après infection de macrophages J774 dans les conditions décrites dans l'article. Les souches bactériennes utilisées expriment le marqueur fluorescent mCherry. Après infection, les cellules sont fixées au PAF aux temps 0, 1h et 2h. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu) et un marquage LAMP2 est également utilisé pour visualiser les lysosomes (vert). Le marquage LAMP2 est réalisé après perméabilisation des cellules à l'aide d'un anticorps spécifique (procuré par M. Vidal et A. Bonhoure). Les résultats obtenus montrent des bactéries internalisées dont certaines colocalisent avec LAMP2. Au temps 0, on observe peu de colocalisation bactérie/lysosome. Aux temps 1h et 2h, on observe une dégradation des

bactéries associée avec une colocalisation avec les lysosomes. Une quantification serait nécessaire pour établir s'il y a une différence entre la souche sauvage et le mutant *mgtC* car les images fournies lors de cette analyse préliminaire n'ont pas permis de voir une différence évidente (figure 41).

Figure 41 – Visualisation de l'infection de macrophages J774 par la souche sauvage et le mutant *mgtC* de *Pseudomonas aeruginosa*. Les bactéries apparaissent en rouge, le noyau des cellules en bleu et les lysosomes en vert. Les triangles noirs indiquent des bactéries internalisées au temps 0 (t_0). Les triangles blancs pointent des bactéries en cours de dégradation et qui colocalisent avec les lysosomes au temps 1h (t_{1h}).



1.2.3.3 Étude de la phagocytose

L'effet de MgtC sur la phagocytose n'avait pas été abordé jusqu'à mon étude chez *M. marinum*. J'ai donc évalué cet effet chez *P. aeruginosa* dans le cadre de l'étude avec MgtR. Les infections ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'article. Le pourcentage de phagocytose est déterminé après l'incubation initiale à laquelle s'ajoute une incubation en présence de gentamycine pour éliminer les bactéries extracellulaires. On calcule ensuite le pourcentage de phagocytose en faisant le rapport entre le nombre de CFU après phagocytose et l'inoculum. Cette analyse a été réalisée avec la souche sauvage exprimant ou non MgtR et le mutant *mgtC* exprimant ou non MgtR.

Les résultats indiquent que le mutant *mgtC* a une phagocytose significativement augmentée par rapport à la souche sauvage. La souche sauvage exprimant MgtR présente le même phénotype que le mutant *mgtC* ce qui renforce l'hypothèse d'un effet anti-virulence de MgtR sur MgtC de *P. aeruginosa*. De plus, l'effet de MgtR n'apparaît dans un contexte mutant *mgtC* (figure 42).

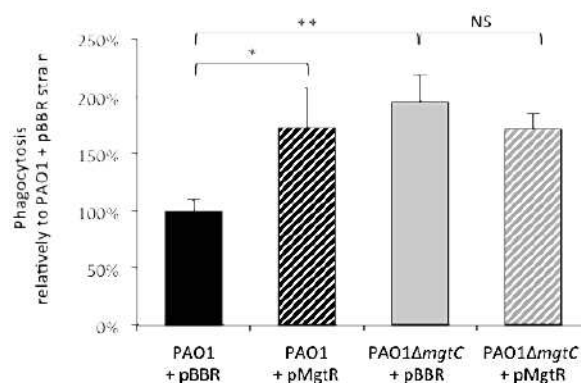


Figure 42 – Effets du mutant *mgtC* et de l'expression de MgtR sur la phagocytose lors d'une infection de macrophage. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; NS: Non Significatif.

2 Les peptides régulateurs de la virulence

2.1 Potentialités anti-virulence du peptide MgtR chez les mycobactéries

2.1.1 Résumé de l'article 3

L'interférence avec la virulence bactérienne est une stratégie puissante qui pourrait engendrer une moindre pression de sélection pour le développement de résistances bactériennes que les stratégies antimicrobiennes traditionnelles.

Le facteur de virulence MgtC a été proposé comme une cible attractive pour les stratégies anti-virulence parce qu'il est présent chez plusieurs pathogènes bactériens intracellulaires majeurs, notamment *Salmonella enterica* et *Mycobacterium tuberculosis*. De plus, un peptide naturel antagoniste, MgtR, qui interagit avec MgtC et module sa stabilité, a été identifié chez *Salmonella*, ce qui fournit une base pour cibler MgtC chez d'autres pathogènes.

Nous avons montré que le peptide MgtR de *Salmonella* pouvait interagir avec la protéine MgtC de *M. tuberculosis* (MgtC Tb), *in vivo*, dans un système de double hybride bactérien. La mutagenèse de motifs supposés intervenir dans les interactions hélice/hélice suggère que les interactions moléculaires entre MgtR et MgtC Tb diffèrent de celles proposées pour MgtC de *Salmonella*.

L'expression hétérologue de MgtR de *Salmonella* chez *M. bovis* BCG entraîne une augmentation de la phagocytose et une diminution de la survie intramacrophagique. Or ces deux phénotypes ont été décrits lors de l'inactivation du gène *mgtC* chez les mycobactéries. Chez *M. bovis* BCG, aucune modulation du niveau d'expression de MgtC n'a été détectée en présence de MgtR mais nous avons mis en évidence que du peptide MgtR synthétique pouvait réduire la dimérisation de MgtC Tb.

L'ensemble des résultats indique donc que l'expression de MgtR chez *M. bovis* BCG réduisait la virulence et nous proposons que MgtR pourrait agir à travers son interaction avec la protéine MgtC mycobactérienne en empêchant sa dimérisation et/ou son interaction avec d'autres partenaires.

2.1.2 Article 3 - Anti-virulence properties of the *Salmonella* MgtR peptide expressed in mycobacteria

Anti-virulence properties of the *Salmonella* MgtR peptide expressed in mycobacteria

Running title: MgtR as anti-virulence peptide in mycobacteria

Claudine Belon^{1,2}, Laurent Kremer^{1,2,3,\$} and Anne Blanc-Potard^{1,2,#}

¹Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France.

²CNRS, UMR5235, 34095 Montpellier Cedex 05, France.

³INSERM, DIMNP, CNRS-UMR5235, Montpellier, France.

^{\$}Present address : Centre d'étude des Pathogènes pour la Biotechnologie et la Santé (CPBS), 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

#Corresponding author:

Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Universités de Montpellier 2 et 1, CNRS UMR 5235, case 107, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France.

ABBP: Tel:(+33) 4 67 14 47 26, Fax: (+33) 4 67 14 42 86, E-mail: anne.blanc-potard@univ-montpl.fr

25 **Abstract**

26

27 Interference with bacterial virulence is a compelling strategy, that may apply less selective
28 pressure for the development of bacterial resistance than traditional antimicrobial strategies.
29 The MgtC virulence factor has been proposed as an attractive target for anti-virulence
30 strategies because it is shared by several important intracellular bacterial pathogens, including
31 *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Moreover, a natural antagonistic
32 peptide, MgtR, that interacts with MgtC and modulates its stability, has been identified in
33 *Salmonella*, thus providing a basis to target MgtC in other pathogens. In this study, we show
34 that the *Salmonella* MgtR peptide can interact with the *Mtb* MgtC protein in an *in vivo*
35 bacterial two-hybrid system. Site-directed mutagenesis of putative helix-helix interacting
36 motifs suggests that the molecular interaction between MgtR and *Mtb* MgtC differs from the
37 one proposed for *Salmonella* MgtC. Heterologous expression of *Salmonella* MgtR in
38 *Mycobacterium bovis* BCG resulted in increased phagocytosis and reduced intramacrophage
39 survival, both phenotypes being reminiscent to those previously described upon inactivation
40 of *mgtC* gene in mycobacteria. In *M. bovis* BCG, we failed to detect a modulation in the
41 expression level of MgtC in the presence of MgtR, but we provide evidence that synthetic
42 MgtR peptide can reduce the dimerization of *Mtb* MgtC. Cumulatively, our present results
43 indicate that MgtR expression in *M. bovis* BCG reduces virulence and we propose that MgtR
44 acts through its interaction with mycobacterial MgtC by preventing dimerization and/or
45 interaction with partners. This work provides a promising new scaffold for the development
46 of anti-virulence compounds.

47

48

49

50 **Introduction**

51 Recent efforts in genomics and natural product discovery have led to a tremendous
52 increase in the number and diversity of small proteins (size below 50 amino-acids, called
53 hereafter peptides) produced by bacteria (1). A few studies have highlighted the regulatory
54 role of bacterial membrane peptides (2, 3). These peptides may act by interacting with protein
55 partners at the membrane, thereby modulating protein partner's activity and/or stability. Some
56 peptides, such as MgrB and SafA, have been shown to interact with the PhoQ sensor kinase
57 (4–6), thus being able to modulate the expression of genes under the control of the
58 corresponding two-component system. Other peptides, as KdpF or AcrZ, are supposed to
59 interact with transporter or efflux pump, respectively (7, 8). We have recently shown that
60 overexpression of the 30 amino-acid-long KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis*
61 BCG resulted in altered cording morphology and reduced intramacrophage growth(7).

62 MgtR is a membrane peptide identified in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
63 (*S. Typhimurium*), encoded by the *mgtCBR* operon, that regulates the MgtC virulence factor
64 (9). MgtR has been shown to directly interact with MgtC and promotes its degradation (9).
65 *Salmonella* MgtC is a membrane protein that harbors five transmembrane (TM) domains.
66 Based on site-directed mutagenesis, the fourth TM domain as well as the loop between TM3
67 and TM4 have been implicated in the interaction between MgtR and *Salmonella* MgtC (9).
68 An Ala-coil motif (characterized by three small residues in heptad repeat), known to promote
69 interaction between helices, present in both MgtR and TM4 MgtC has been proposed to play a
70 role in the interaction. MgtC is required for *Salmonella* intramacrophage multiplication and
71 systemic infection in mice (10–12) and promotes pathogenicity by inhibiting the *Salmonella's*
72 own F_1F_o ATP synthase (13). Deletion of the *mgtR* gene did not have a significant impact on
73 the ability of *Salmonella* to replicate in macrophages or to kill mice (9, 14). However,

74 overexpression of MgtR reduces intramacrophage survival of a wild-type *Salmonella* strain,
75 thus indicating that MgtR can lower *Salmonella* virulence (9). Besides its effect on MgtC
76 stability, MgtR has also been reported to negatively control expression of the MgtA Mg^{2+}
77 transporter (15). On the other hand, MgtR does not modulate expression of the related MgtB
78 protein (9, 14).

79 The increasing understanding of bacterial pathogenesis has revealed potential
80 strategies to develop novel drugs against infectious bacteria (16, 17). Interference with
81 bacterial virulence is a promising approach alternative or complementary to traditional
82 antibiotherapy. Because this approach does not directly kill the bacteria, at least *in vitro*, it is
83 thought to apply less selective pressure for resistance and to preserve gut microbiota. MgtC is
84 a singular virulence factor that has been proposed as a suitable target for anti-virulence
85 strategies because it is conserved in several intracellular pathogens (18). It has been described
86 as a critical factor for the intramacrophage growth of *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*
87 *suis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia cenocepacia* and *Salmonella enterica* serovar Typhi (19–
88 23). Recently, a contribution for MgtC in phagocytosis has been uncovered in *Mycobacterium*
89 *marinum* (24). In addition, MgtC has been involved in adaptation to low Mg^{2+} environments
90 in these pathogens (18).

91 The aim of the present study is to address whether the *Salmonella* MgtR peptide
92 modulates the virulence of mycobacterial strains. MgtR is not found in other species that
93 encode MgtC homologues. A recent structural study has shown that a purified MgtR peptide
94 can bind the isolated TM4 fragment of *M. tuberculosis* MgtC protein and a model for
95 interaction has been proposed (25). In the present study, we investigated the *in vivo*
96 interaction between MgtR peptide and the entire *M. tuberculosis* MgtC protein and we
97 analyzed the effect of MgtR overexpression on the behaviour of *Mycobacterium bovis* BCG

98 in macrophages. Our results indicate a strong interaction between *Mtb* MgtC and MgtR and,
99 importantly, we provide evidence that heterologous expression of MgtR can mimic
100 phenotypes reported for mycobacterial *mgtC* deletion mutants. Moreover, we provide clues to
101 understand MgtR action in mycobacteria.

102

103 **Material and methods**

104 **Bacterial strains and growth conditions**

105 *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 strain was grown on Middlebrook 7H10 agar
106 (Difco) plates supplemented with Oleic Acid-Dextrose-Catalase (OADC) enrichment or in
107 Sauton's medium containing 0.025% tyloxapol (Sigma), in the presence of kanamycin (25
108 µg/ml) when required. Plates were incubated at 37°C for 2-3 weeks prior to visual counting of
109 the colony forming units (CFU). Low magnesium medium was obtained by replacing the
110 magnesium sulfate in the Sauton's medium by a similar concentration of potassium sulfate.
111 *Escherichia coli* (DH5α) was used for cloning and was grown in LB medium with kanamycin
112 (25 µg/ml) at 37°C. *E. coli* BTH101 (26) was used for BACTH experiments (see below).

113

114 **Bacterial two-hybrid analysis**

115 The Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid (BACTH) system (26) was used to evaluate the
116 interaction between MgtC and MgtR and the effect of purified MgtR peptide on MgtC
117 dimerization. The fusion protein T25-MgtR is produced by the pKT25-MgtR plasmid (9),
118 whereas *Mtb* MgtC-T18 is produced by pUT18-*Mtb*MgtC (27). To evaluate *Mtb* MgtC
119 dimerization, we have used the pKNT25-*Mtb* MgtC plasmid (27). To investigate the role of
120 specific *Mtb* MgtC residues in the interaction, site-directed mutagenesis was performed on
121 pKNT25-*Mtb* MgtC plasmid using the Quickchange® II kit (Stratagene), according to

122 manufacturer's instructions. Recombinant plasmids carrying both T18 and T25 derivatives
 123 were co-transformed into BTH101 bacteria. Transformants were plated on LB broth with
 124 ampicillin and kanamycin (100 µg/ml, 25 µg/ml respectively) containing 50 µg/ml 5-bromo-
 125 4-chloro-3-indolyl-®-D-galactopyranoside (X-gal) at 30°C for 30 hrs. To quantify the
 126 interaction between hybrid proteins, bacteria were grown overnight at 30°C in LB broth
 127 containing 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin supplemented with 0.5 mM IPTG.
 128 To evaluate the effect of MgtR on *Mtb* MgtC dimerization, purified peptide (PolyPeptide,
 129 Strasbourg, 5 mM in 50 % isopropanol) was added to the O/N culture at a final concentration
 130 of 100 µM (equivalent volume of 50 % isopropanol was added to non treated cultures).
 131 Plasmids pT18-zip and pT25-zip encoding leucine zipper fused to T18 and T25 were used as
 132 control for the effect of MgtR on interaction between cytoplasmic proteins. The assays were
 133 carried out as described previously (28) with activities expressed in arbitrary Miller units.
 134 Values are average from at least four independent cultures. A level of ®-galactosidase activity
 135 at least five-fold higher than the one of the control vectors indicates an interaction between
 136 the protein partners (29).

137

138 **Construction of a *M. bovis* BCG strain expressing MgtR**

139 The *mgtR* gene was PCR-amplified from *S. Typhimurium* chromosomal DNA using the
 140 primers MgtR-blunt-F and MgtR-Hind-R (Table 1) and cloned into the pMV261 (30) at the
 141 *MscI* and *HindIII* sites. The resulting recombinant plasmid, pMV-*mgtR*, was checked by
 142 sequencing and introduced, along with the empty pMV261 vector, by electroporation into
 143 wild-type *M. bovis* BCG. Recombinant strains were selected on Middlebrook 7H10
 144 containing 25 µg/ml kanamycin after 3 weeks of incubation at 37°C and subsequently grown
 145 in liquid medium. Wild-type *M. bovis* BCG expressing *kdpF* gene was constructed earlier (7)
 146 and is included in the study.

147

148 **RNA extraction and RT-PCR**

149 RNA and cDNA were prepared as described previously (7). Controls without reverse
150 transcriptase were done to rule out possible DNA contamination. Reverse transcription-PCR
151 (RT-PCR) was carried out with the GoldStar Master mix (EurogentecTM), and denaturation
152 was followed by 25 cycles of 95°C for 30 sec, 46°C for 20 sec and 72°C for 30 sec. The *sigA*
153 gene (*rv2703*) was used as internal control. The sequences of primers used for RT-PCR are
154 listed in Table 1.

155

156 **Macrophage infection assays**

157 J774 cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium
158 (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). J774 cells were
159 allowed to adhere in a 24-well plate at a density of 5.10⁴ cells/ well for 24 h at 37°C in 5%
160 CO₂. For infection, *M. bovis* BCG cultures grown exponentially in Sauton's medium (OD₆₀₀
161 around 0.8 to 1) were centrifuged, washed in phosphate buffer saline (PBS) and bacterial
162 clumps were disrupted by 8 successive passages through a 26G needle. The remaining
163 aggregates were then eliminated with a short spin (1 min at 1,100 rpm). Macrophages were
164 infected at a multiplicity of infection (MOI) of approximately 2. The infection was allowed to
165 proceed for 3 hrs at 37°C in 5% CO₂. Infected cells were then washed three times with PBS to
166 eliminate the remaining extracellular bacteria. Cells were then lysed with 0.1 ml of 1% Triton
167 X-100 in PBS and the number of intracellular mycobacteria counted by plating appropriate
168 dilutions onto Middlebrook 7H10 agar plates. To evaluate the numbers of phagocytosed
169 bacteria, the ratio between the count of internalized bacteria and the count of bacteria in the
170 inoculum was determined. To evaluate the multiplication rate, infected cells were incubated
171 for 5 days in DMEM medium at 37°C in 5% CO₂ prior to cell lysis and bacterial enumeration.

172 The ratio between the number of internalized bacteria at day 5 and the number of internalized
173 bacteria after 3 h infection was calculated. All results are derived from a least three
174 independent experiments where strains are tested in triplicate.

175

176 **Preparation of bacterial lysates and Western blot analysis**

177 Five ml of bacterial culture grown in Sauton's medium were harvested, resuspended in 500 µl
178 of phosphate-buffered saline (PBS), and disrupted using a bead beater (Retsch). The protein
179 concentration was determined on total lysates using the bicinchoninic acid (BCA) protein
180 assay reagent kit (Pierce). Expression of MgtC was investigated by Western blotting
181 following migration of the crude extracts. Bacterial lysates equivalent to 40 µg of total
182 proteins were separated by electrophoresis on a 15% SDS-PAGE gel, transferred to a
183 membrane, probed with rabbit anti-MgtC antibodies (1:1,000 dilution) (27), and subsequently
184 incubated with anti-rabbit antibodies conjugated to alkaline phosphatase (1:7,500 dilution;
185 Promega). An unrelated membrane protein, OmpATb, was used as a control and probed with
186 rabbit anti-OmpATb₇₃₋₃₂₆ antibodies (1:6,000 dilution)(31).

187

188 **Statistical analysis**

189 For macrophage infection assays, averages were compared by using an unpaired Student *t*-
190 test. Only *P*-values < 0.05 were considered as statistically significant.

191

192 **Results and discussion**

193 **Interaction of *Salmonella* MgtR peptide with the entire *Mtb* MgtC protein in an *in vivo*** 194 **two-hybrid system**

195 For *Salmonella* MgtC protein, residues in the loop between TM3 and TM4 (especially residue
196 G85) and in the TM4 domain have been involved in the interaction with MgtR (9). As shown

8

197 in the alignment in Fig. 1A, this part of the protein is well conserved in *Mtb* MgtC. The TM4
198 domain *St* MgtC harbors an Ala-coil motif and mutation of the third position (G108) was the
199 only one that significantly decreased interaction with MgtR upon mutagenesis (9). An Ala-
200 coil motif, which harbors a A (A107) instead of G at the third position, is also present in *Mtb*
201 MgtC TM4. In addition, a second consecutive Ala-coil motif is present in *Mtb* MgtC TM4.
202 This has led to two structural interacting models for the interaction between MgtR and the
203 isolated TM4 domain of *Mtb* MgtC (Fig.1B) (25).

204 The previous analysis of *Mtb* MgtC / MgtR interaction has been done with synthetic peptides
205 fragments that includes only the isolated *Mtb* MgtC TM4 domain (25). To evaluate the
206 interaction of MgtR with the entire *Mtb* MgtC protein, we have used the bacterial two-hybrid
207 (BACTH) system that has been previously validated for detecting interactions between inner-
208 membrane proteins in living bacteria (29). Plasmids encoding the T18 or T25 fragment of
209 adenylate cyclase fused to *Mtb* MgtC and MgtR, respectively, were introduced in an *E. coli*
210 *cya* mutant (BTH101) and functional complementation was determined by measuring β -
211 galactosidase activity (Fig. 2A). A basal level of β -galactosidase activity was measured with
212 the negative control (T18 / MgtR-T25). A high level of β -galactosidase activity (47-fold the
213 value of negative control) was observed when BTH101 was co-transformed with *Mtb* MgtC-
214 T18 and MgtR-T25 plasmids, indicative of a robust interaction between the two proteins. The
215 interaction appears of similar magnitude as the one observed with *Salmonella* MgtC, which is
216 slightly stronger (64-fold the value of negative control).

217

218 To test the contribution of Ala-coil motifs in MgtC-MgtR interaction, we have substituted
219 small residues of the motif by large hydrophobic residues. Individual replacements of the
220 three residues in the MgtR Ala-Coil motif (A10L, S17I, A24L) resulted in slight decreases in
221 the interaction with *Mtb* MgtC as compared to wild-type MgtR (Fig. 2B). This contrasts with

222 *St* MgtC for which the interaction with MgtR S17I was abrogated (Fig. 2B). To test the
223 contribution of the two consecutive Ala-coil motifs of TM4 MgtC, we mutagenised the third
224 residue of the motif, which has been shown to contribute to the interaction with *St* MgtC.
225 However, none of these mutations lowered the interaction level (Fig. 2C). In addition,
226 mutation of the G84 residue in the loop does not modulate the interaction with MgtR (Fig.
227 2C).

228

229 Cumulatively, these results indicate a strong interaction between MgtR and *Mtb* MgtC protein
230 in the bacterial two-hybrid system, albeit to a lesser extent than the one reported with *St* MgtC
231 protein. Because each three mutations in the Ala-coil motif of MgtR displayed a similar
232 effect, this supports the implication of this Ala-coil motif in the interaction. However, the
233 minor effect of these mutations on the interaction comparatively to what has been reported
234 with *St* MgtC suggests that the molecular interactions differ between MgtR and *Mtb* MgtC or
235 *St* MgtC. Alternatively, the lower strength of the interaction with *Mtb* MgtC could explain the
236 mild effect of mutations in MgtR Ala-coil. Two models have been proposed for the
237 interaction between MgtR and the TM4 domain of *Mtb* MgtC based on interaction with
238 isolated domains (25). Our mutagenesis analysis did not allow to further validate any of the
239 two structural models and raises the hypothesis that residues additional to TM4 are likely to
240 participate in the interaction.

241

242 **Heterologous expression of MgtR in *M. bovis* BCG increases phagocytosis and reduces** 243 **intramacrophage survival**

244 The *Salmonella mgtR* gene has been ectopically expressed in *M. bovis* BCG. The *mgtR* gene
245 was first cloned in the pMV261 multicopy plasmid under the control of the *hsp60* promoter

246 and the resulting plasmid, pMV-*mgtR*, was introduced into *M. bovis* BCG Pasteur.

247 Heterologous expression of *mgtR* gene has been verified by RT-PCR (Fig. 3A).

248

249 We investigated the behaviour of *M. bovis* BCG expressing or not *mgtR* in J774 macrophages
250 over a 5-day period. As a control, we have used a strain overexpressing the *kdpF* gene, a
251 peptide that has been shown previously to reduce *M. bovis* BCG intramacrophage replication
252 (7). Results shown in Fig. 3B indicate that the bacterial multiplication is significantly lower in
253 a strain overexpressing *mgtR*, to a similar extent as the one observed for *kdpF*. In addition,
254 overexpression of *mgtR* but not of *kdpF*, increases the phagocytic rate (Fig. 3C). The growth
255 defect of *mgtR*-overexpressing strain within macrophages is not due to an inherent growth
256 defect of the strain because this strain grows similarly to the control strain carrying the
257 pMV261 in Sauton's medium (Fig. 4A). Because MgtC has been involved for optimal growth
258 in media with limiting magnesium in mycobacteria (19, 24), we have tested the growth of the
259 two strains in Sauton's medium depleted from magnesium. Both strains exhibited similar
260 growth in such medium (Fig. 4B).

261

262 In mycobacteria, MgtC has been involved in phagocytosis and intramacrophage
263 replication (19, 24). Hence, the phenotypes observed in a *M. bovis* BCG strain upon
264 expression of MgtR are consistent with phenotypes observed in *mgtC* mutants from
265 mycobacteria. On the other hand, MgtR expression has no major effect on the growth in
266 liquid medium with limiting magnesium, which is consistent with results obtained upon
267 overexpression of MgtR in *S. Typhimurium* (9). This finding emphasizes the idea that the role
268 of MgtC differs in low magnesium environment and towards macrophages (32) and further
269 suggests that MgtR may interfere only with the function of MgtC towards macrophages.

270

271 **Heterologous expression of MgtR in *M. bovis* BCG does not modulate the level of MgtC**
272 **protein**

273 In *Salmonella*, expression of MgtC is tightly regulated. The transcription level of *mgtC* gene
274 and amount of MgtC protein are increased in inducing conditions (as magnesium deprivation)
275 and MgtR has been proposed as a negative regulator to prevent excess of MgtC protein (9,
276 14). The mechanism that drives *St* MgtC degradation remains unknown but a modification of
277 *St* MgtC conformation upon interaction with MgtR may facilitate accessibility for the FtsH
278 protease (9). On the other hand, the level of *Mtb* MgtC expression is rather low (27). To
279 investigate the effect of MgtR expression on *Mtb* MgtC protein level, bacterial lysates were
280 assayed to monitor MgtC protein expression. We failed to detect any difference in the amount
281 of *Mtb* MgtC protein from strains expressing or not MgtR as shown by Western blot analysis
282 on crude bacterial extract using specific anti-MgtC antibodies (Fig. 5A). This could be related
283 to differential molecular interactions between MgtR and *Mtb* MgtC or *St* MgtC that may
284 induce diverse conformational changes.

285

286 **Purified MgtR peptide can interfere with *Mtb* MgtC dimerization**

287 Because we failed to detect changes in the MgtC protein level upon MgtR heterologous
288 expression in *M. bovis* BCG, we hypothesized that MgtR may have other effect on *Mtb* MgtC.
289 One hypothesis, which derives from the known role of other membrane peptides, may be
290 related to the interference of MgtR with protein-protein interaction. We have previously
291 shown using the BACTH system that *Mtb* MgtC dimerizes (27). To test whether MgtR may
292 alter *Mtb* MgtC dimerization, we have added synthetic MgtR peptide in the culture medium
293 (Fig. 5B). A significant decrease (40 % reduction) of beta-galactosidase activity was

294 measured, indicative of a decreased interaction. On the other hand, no effect is seen with
295 control proteins (Zip) that also strongly interact together but are located in the cytoplasm.

296 The addition of synthetic peptide suggests that MgtR can interfere with *Mtb* MgtC
297 dimerization. As a consequence, one can imagine that MgtR has also the ability to interfere
298 with other MgtC partner(s). One suitable candidate is the AtpB submit which has been shown
299 to interact with the *St* MgtC protein (13). Alternatively, differences may exist in the MgtC
300 interacting partner(s) in the different species and additional work is required to address this
301 point.

302

303 **Conclusion**

304 We propose that the MgtR membrane peptide has an anti-virulence effect in mycobacteria
305 through a direct binding with *Mtb* MgtC. This interaction may prevent interaction of *Mtb*
306 MgtC with itself or with other protein(s) that are essential for MgtC to be functional in
307 macrophages. This work provides a promising new scaffold for the development of anti-
308 virulence strategies. Because hydrophobic peptides are difficult to handle, we consider our
309 results as a proof of concept for the pertinence of targeting MgtC. Screening for other
310 molecules may provide more potent inhibitors.

311

312

313 **Acknowledgments**

314 We thank Daniel Ladant (Pasteur Institute, Paris) for BACTH vectors and Zip plasmids. This
315 work is supported by Vaincre La Mucoviscidose (IC0902). CB is supported by a MRT
316 fellowship from the French Ministry of Research and the Fondation for Medical Research
317 (FRM FDT20140930905).

318

319 **References**

- 320 1. **Flaherty RA, Freed SD, Lee SW.** 2014. The wide world of ribosomally encoded
321 bacterial peptides. *PLoS Pathog* **10**:e1004221.
- 322 2. **Alix E, Blanc-Potard A-B.** 2009. Hydrophobic peptides: novel regulators within
323 bacterial membrane. *Mol. Microbiol.* **72**:5–11.
- 324 3. **Hobbs EC, Fontaine F, Yin X, Storz G.** 2011. An expanding universe of small
325 proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**:167–173.
- 326 4. **Lippa AM, Goulian M.** 2009. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system
327 by a membrane peptide. *PLoS Genet.* **5**:e1000788.
- 328 5. **Eguchi Y, Ishii E, Yamane M, Utsumi R.** 2012. The connector SafA interacts with the
329 multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **85**:299–313.
- 330 6. **Eguchi Y, Itou J, Yamane M, Demizu R, Yamato F, Okada A, Mori H, Kato A,**
331 **Utsumi R.** 2007. B1500, a small membrane protein, connects the two-component
332 systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
333 **104**:18712–18717.
- 334 7. **Gannoun-Zaki L, Alibaud L, Carrère-Kremer S, Kremer L, Blanc-Potard A-B.**
335 2013. Overexpression of the KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG
336 results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology. *PLoS ONE*
337 **8**:e60379.
- 338 8. **Hobbs EC, Yin X, Paul BJ, Astarita JL, Storz G.** 2012. Conserved small protein
339 associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic
340 resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:16696–16701.
- 341 9. **Alix E, Blanc-Potard A-B.** 2008. Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC
342 virulence factor. *EMBO J.* **27**:546–557.

- 343 10. **Blanc-Potard A-B.** 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island
344 mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16**:5376–5385.
- 345 11. **Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM.** 2006.
346 Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of
347 the mouse. *PLoS Pathog* **2**:e11.
- 348 12. **Thompson JA, Liu M, Helaine S, Holden DW.** 2011. Contribution of the PhoP/Q
349 regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in
350 macrophages. *Microbiology* **157**:2084–2093.
- 351 13. **Lee E-J, Pontes MH, Groisman EA.** 2013. A bacterial virulence protein promotes
352 pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F₁F₀ ATP synthase. *Cell* **154**:146–156.
- 353 14. **Lee E-J, Groisman EA.** 2010. An antisense RNA that governs the expression kinetics
354 of a multifunctional virulence gene. *Mol. Microbiol.* **76**:1020–1033.
- 355 15. **Choi E, Lee K-Y, Shin D.** 2012. The MgtR regulatory peptide negatively controls
356 expression of the MgtA Mg²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.
357 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**:318–323.
- 358 16. **Rasko DA, Sperandio V.** 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated
359 disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**:117–128.
- 360 17. **Heras B, Scanlon MJ, Martin JL.** 2015. Targeting virulence not viability in the search
361 for future antibacterials. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**:208–215.
- 362 18. **Alix E, Blanc-Potard A-B.** 2007. MgtC: a key player in intramacrophage survival.
363 *Trends Microbiol.* **15**:252–256.
- 364 19. **Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrt S, Piddington D, Riley L, Groisman EA.** 2000.
365 A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and
366 *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **35**:1375–1382.

- 367 20. **Lavigne J-P, O'Callaghan D, Blanc-Potard A-B.** 2005. Requirement of MgtC for
 368 *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella*
 369 *enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment.
 370 *Infect. Immun.* **73**:3160–3163.
- 371 21. **Maloney KE, Valvano MA.** 2006. The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is
 372 required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in
 373 macrophages. *Infect. Immun.* **74**:5477–5486.
- 374 22. **Grabenstein JP, Fukuto HS, Palmer LE, Bliska JB.** 2006. Characterization of
 375 phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival
 376 of *Yersinia pestis* in macrophages. *Infect. Immun.* **74**:3727–3741.
- 377 23. **Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC.** 2009. Characterization of MgtC, a virulence
 378 factor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *PLoS ONE* **4**:e5551.
- 379 24. **Belon C, Gannoun-Zaki L, Lutfalla G, Kremer L, Blanc-Potard A-B.** 2014.
 380 *Mycobacterium marinum* MgtC plays a role in phagocytosis but is dispensable for
 381 intracellular multiplication. *PLoS ONE* **9**:e116052.
- 382 25. **Jean-Francois FL, Dai J, Yu L, Myrick A, Rubin E, Fajer PG, Song L, Zhou H-X,**
 383 **Cross TA.** 2014. Binding of MgtR, a *Salmonella* transmembrane regulatory peptide, to
 384 MgtC, a *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor: a structural study. *J. Mol. Biol.*
 385 **426**:436–446.
- 386 26. **Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D.** 1998. A bacterial two-hybrid system
 387 based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
 388 **95**:5752–5756.
- 389 27. **Yang Y, Labesse G, Carrère-Kremer S, Esteves K, Kremer L, Cohen-Gonsaud M,**
 390 **Blanc-Potard A-B.** 2012. The C-terminal domain of the virulence factor MgtC is a
 391 divergent ACT domain. *J. Bacteriol.* **194**:6255–6263.

- 392 28. **Miller J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold
393 Spring Harbor, NY.
- 394 29. **Karimova G, Dautin N, Ladant D.** 2005. Interaction network among *Escherichia coli*
395 membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid
396 analysis. J. Bacteriol. **187**:2233–2243.
- 397 30. **Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal**
398 **GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SB, Barletta RG, Jacobs WR, Bloom**
399 **BR.** 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. Nature **351**:456–460.
- 400 31. **Veyron-Churlet R, Brust B, Kremer L, Blanc-Potard A-B.** 2011. Expression of
401 OmpATb is dependent on small membrane proteins in *Mycobacterium bovis* BCG.
402 Tuberculosis **91**:544–548.
- 403 32. **Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L, Blanc-Potard A-B.** 2007. Dual role of the
404 MgtC virulence factor in host and non-host environments. Mol. Microbiol. **63**:605–622.
405

406 **Figure legends**

407

408 **FIG 1 Alignment of MgtC proteins from *S. Typhimurium* and *M. tuberculosis* and**
409 **model of interaction between MgtR and the isolated *M.tb* MgtC TM4 domain. (A)**

410 Alignment of *S. Typhimurium* MgtC (Accession Number AAL22622.1) and *M. tuberculosis*
411 MgtC (Accession Number NP_216327.1) was done using ClustalW. The upper lines indicate
412 the five transmembrane domains (TM1 to TM5). The Ala-coil motif in *St* MgtC TM4 and the
413 G85 residue in the loop that has been implicated in the interaction between MgtR and *St*
414 MgtC are indicated. (B) Structural models proposed for the MgtR (residues 7-26) and *Mtb*
415 MgtC TM4 (residues 92-112) heterodimer implying the two putative successive Ala-coils
416 (A93, A100, A107 and A94, A101, S108) present in *Mtb* MgtC TM4 (25). In the left model,
417 the Ala-coil correspond to the one present in *St* MgtC TM4 but the favorite structural model
418 based on the interface scores of scatter plots is the one shown in the right (25). The residues
419 mutagenized in the present study to adress the models are within circles.

420

421 **FIG 2 Analysis of *in vivo* interaction between MgtC and MgtR using the BACHT system**
422 **and role of Ala-coil motifs in the interaction.** The *E. coli* BTH101 strain was co-

423 transformed with plasmids encoding MgtC-T18 and T25-MgtR fusions. The basal level of β -
424 galactosidase activity measured with vector is approximately 50 Miller units. (A) Interaction
425 of *Mtb* MgtC/MgtR is compared with *St* MgtC/MgtR. (B) The role of MgtR Ala-coil is
426 adresssed by introducing three mutations, A10L, S17I and A24L, in the T25-MgtR fusion.
427 Each mutated peptide was tested for interaction with *Mtb* MgtC. As a control, the mutated
428 peptide S17I was used in interaction with *St* MgtC. (C) The role of the two consecutive Ala-
429 coil motifs present in *Mtb* MgtC TM4 is adresssed by introducing two mutations, A107I and

430 S108I in the *Mtb* MgtC-T18 fusion. In addition, the G84 residue of *Mtb* MgtC (corresponding
431 to G85 residue in *St* MgtC) has been mutated.

432

433 **FIG 3 Phagocytosis and replication in J774 macrophages of *M. bovis* BCG strain**
434 **expressing *mgtR*.** (A) RT-PCR experiment with *mgtR* primers on RNA isolated from wild-
435 type *M. bovis* BCG expressing or not *mgtR*. The *sigA* gene is used as an internal control.
436 Reactions where the reverse transcriptase was omitted are indicated by RT -. (B) Replication
437 of the WT+*mgtR* and WT+*kdpF* strains by J774 macrophages normalized to 100 % for the
438 wild-type strain with pMV261. Results are expressed as means + SE from three independent
439 experiments (WT+*mgtR* and WT+*kdpF*) or four independent experiments (WT). Asterisks
440 indicate statistical significance (* $P < 0.05$). (C) Phagocytosis of the WT+*mgtR* and
441 WT+*kdpF* strains by J774 macrophages normalized to 100 % for the wild-type strain with
442 pMV261. Results are expressed as means + SE from three independent experiments.

443

444 **FIG 4 Growth of *M. bovis* BCG expressing *mgtR* in liquid medium.** (A) Growth curves of
445 *M. bovis* BCG strains expressing or not *mgtR* grown in Sauton's medium (B) or Sauton's
446 medium without magnesium. OD₆₀₀ is indicated over the growth period. Results are expressed
447 as means ± SE from at least two independent experiments.

448

449 **FIG 5 Effect of MgtR on *Mtb* MgtC stability and dimerization.** (A) Analysis of the
450 amount of *Mtb* MgtC protein by Western blotting in *M. bovis* BCG strains expressing or not
451 *mgtR*. Bacterial lysates equivalent to 40 µg of total proteins were separated by 15% SDS-
452 PAGE. Membrane was incubated with rabbit anti-*Mtb* MgtC antibodies and rabbit anti-
453 OmpATb antibodies, as control. (B) Effect of synthetic MgtR peptide on *Mtb* MgtC
454 dimerization using the BACHT system. The *E. coli* BTH101 strain was co-transformed with

455 plasmids encoding MgtC-T18 and T25-MgtC fusions. Controls included an experiment with
456 pT25-zip and pT18-zip plasmids that encode cytoplasmic interacting proteins. The synthetic
457 MgtR peptide (100 μ M) was added to the cultures when indicated (+). Asterisks indicate
458 statistical significance (** $P < 0.001$).

459

460

461

462

463

TABLE 1. Plasmids and primers used in this study

pUT18	(26)
pUT18- <i>St</i> MgtC	(9)
pUT18- <i>Mtb</i> MgtC	(27)
pKNT25- <i>Mtb</i> MgtC	(27)
pKT25-MgtR	(9)
pKT25-MgtR A10L	(9)
pKT25-MgtR S17I	(9)
pKT25-MgtR A24L	(9)
pUT18- <i>Mtb</i> MgtC G84A	This study
pUT18- <i>Mtb</i> MgtC A107I	This study
pUT18- <i>Mtb</i> MgtC S108I	This study
pT18-zip	(26)
pT25-zip	(26)
pMV261	(30)
pMV- <i>mgtR</i>	This study
MgtR-blunt-F	ATCGCTCACCCGATAAAATC
MgtR-Hind-R	CCCAAGCTTTTAGAAAACGATTGCCAG
MgtCTb-G84A-F	CATCCTGCGGGAGGCGTTCAACGTCCGCGG
MgtCTb-G84A-R	CCGCGGACGTTGAACGCCTCCCGCAGGATG
MgtCTb-A107I-FI	GCGGTCGGAGTGCTGGCCATCTCCGGGCATCTGGTGTT
MgtCTb-A107I-RI	AACACCAGATGCCCCGAGATGGCCAGCACTCCGACCGC
MgtCTb-S108I-F	TCGGAGTGCTGGCCGCCATCGGGCATCTGGTGTTTAC
MgtCTb-S108I-R	GTGAACACCAGATGCCCCGATGGCGGCCAGCACTCCGA

489	MgtR-RT-F	CGGAGGAATCACTTCGCAATG
490	MgtR-RT-R	GAAAACGATTTGCCAGAGGGC
491	SigA-L-new	CCTACGCTACGTGGTGGATTC
492	SigA-R-new	CTGGATTTCAGCACCTTCTC
493	-	

Figure 1

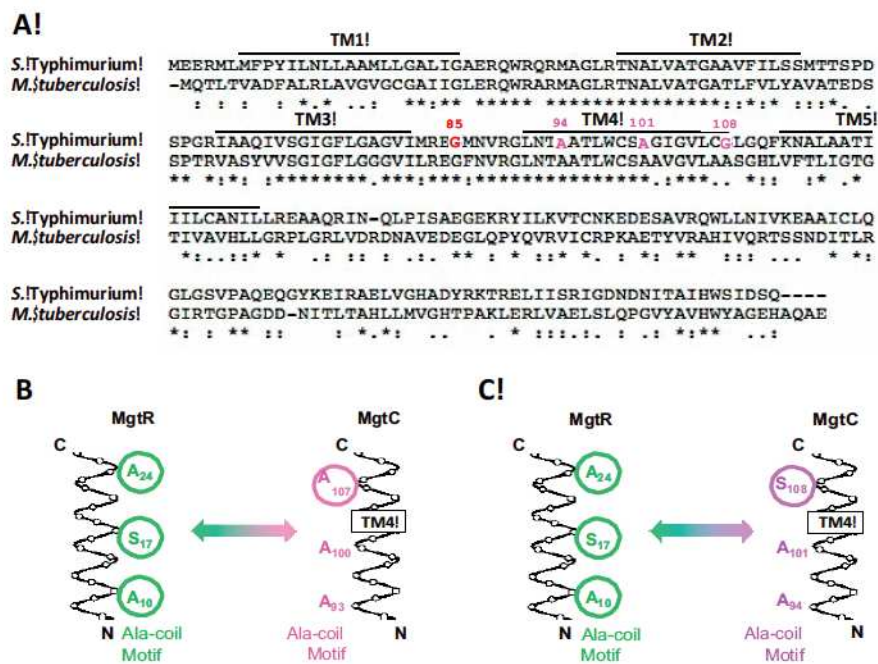


Figure 2

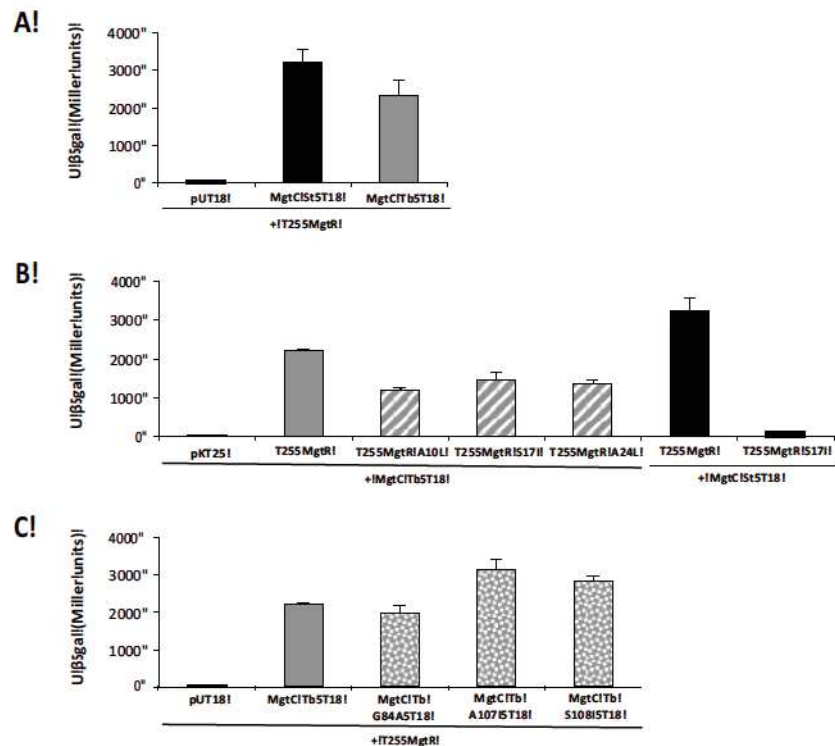


Figure 3

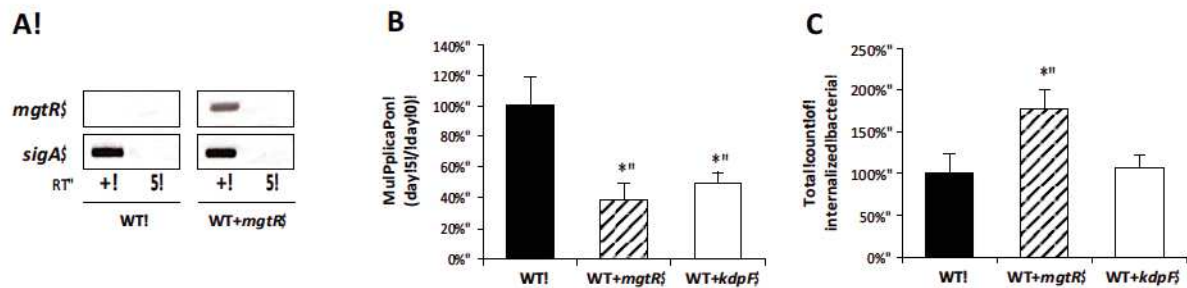


Figure 4

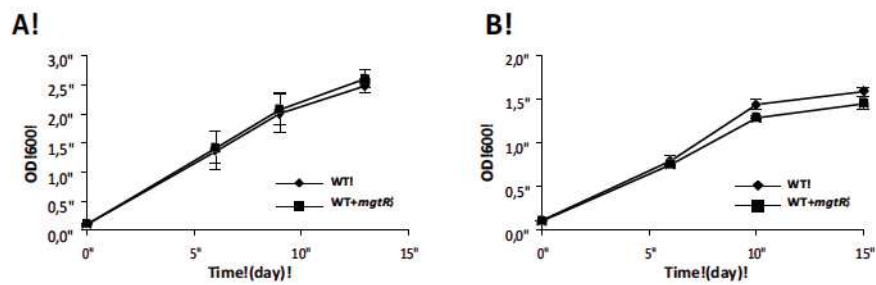
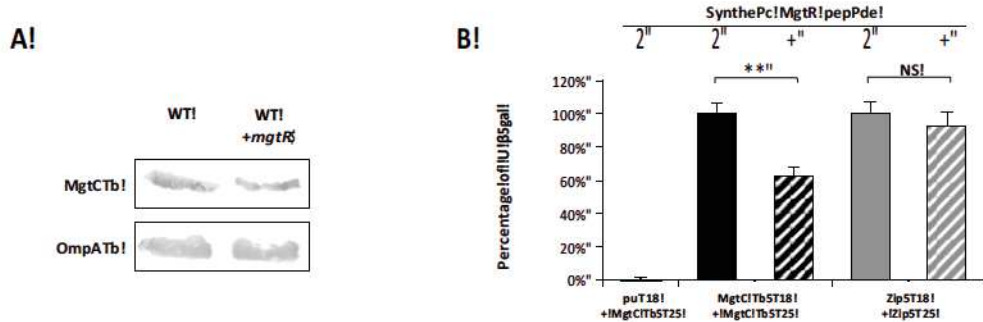


Figure 5



2.1.3 Résultats annexes

2.1.3.1 Interaction MgtC Mma / MgtR St

Un aspect principal de mon travail a été de tester les potentialités anti-virulence du peptide MgtR de *S. Typhimurium* sur des protéines MgtC hétérologues. Concernant les mycobactéries, cette étude a été faite avec la protéine MgtC de *M. bovis* BCG qui n'est pas le meilleur modèle pour étudier la virulence.

Nous avons donc cherché à savoir si la protéine MgtC de *M. marinum* (Mma) interagissait avec le peptide MgtR. Pour cela, des expériences *in vivo* de double hybride bactérien ont été réalisées et ont montré que MgtC Mma n'interagissait pas avec MgtR malgré la conservation du domaine d'interaction supposé. Suite à ce résultat, MgtR n'a pas été testé par expression hétérologue chez *M. marinum* d'autant qu'il s'est avéré que ce pathogène n'était pas non plus un bon modèle pour étudier la virulence de MgtC chez les mycobactéries.

2.2 Surexpression du peptide membranaire KdpF chez *Salmonella*: modulation de l'expression des gènes *kdp* et de la croissance intramacrophagique

Initialement, j'ai été mise à contribution dans le projet concernant KdpF pour évaluer les propriétés anti-virulence de ce peptide chez *M. marinum* dans le modèle d'infection d'embryons de danio. J'ai donc testé dans ce modèle d'infection la souche de *M. marinum* surexprimant le peptide KdpF. La souche testée n'a pas présenté de phénotype atténué concernant la virulence contrairement au phénotype observé avec *M. bovis* BCG dans un modèle d'infection cellulaire de macrophage. Cependant, j'ai poursuivi des recherches sur le peptide KdpF en étudiant la régulation des gènes *kdpA* et *kdpD* dans un contexte de surexpression de ce peptide membranaire chez *Salmonella*.

2.2.1 Résumé de l'article 4

Les peptides membranaires apparaissent comme une classe émergente de molécules régulatrices des bactéries qui peuvent interagir avec des protéines membranaires tels que des transporteurs et des kinases senseurs. Le peptide KdpF, qui est co-transcrit avec les gènes *kdpABC* et régulé par le système à deux composants KdpDE, est supposé stabiliser le complexe transporteur de potassium KdpABC mais pourrait aussi avoir une fonction régulatrice innatendue. Le KdpF mycobactérien peut interagir avec l'histidine kinase KdpD et la surexpression de *kdpF* chez *Mycobacterium bovis* BCG a montré qu'elle réduisait la réplication intramacrophagique.

Nous avons donc voulu savoir si KdpF avait un comportement similaire chez un autre pathogène intracellulaire, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Dans un premier temps nous avons montré que KdpF de *Salmonella* pouvait interagir avec KdpD dans un système de double hybride bactérien. Une souche de *Salmonella* surexprimant *kdpF* a été construite pour étudier à la fois l'expression du régulon *kdp* et la survie intramacrophagique. Ainsi j'ai montré que la surexpression de *kdpF* réduisait l'expression des gènes *kdpA* et *kdpD* en condition de carence en potassium alors qu'un gène de contrôle non régulé par le potassium n'est pas affecté. De plus, nous avons montré que la surexpression de *kdpF* augmentait la multiplication intramacrophagique de *S. Typhimurium*.

Ces résultats indiquent que KdpF joue un rôle dans la régulation de *S. Typhimurium* en modulant l'expression de gènes *kdp* et la survie intramacrophagique mais d'une manière différente de celle décrite pour *M. bovis* BCG.

2.2.2 Article 4 – Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth



RESEARCH LETTER

Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth

Laila Gannoun-Zaki¹, Claudine Belon¹, Christian Dupont¹, Friederike Hilbert², Laurent Kremer^{1,3} & Anne-Béatrice Blanc-Potard¹

¹Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Universités de Montpellier 2 et 1, CNRS-UMR5235, Montpellier, France; ²Institute of Meat Hygiene, Meat Technology and Food Science, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria; and ³INSERM, DIMNP, CNRS-UMR5235, Montpellier, France

Correspondence: Anne-Béatrice Blanc-Potard, Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Universités de Montpellier 2 et 1, CNRS UMR 5235, case 107, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France. Tel: (+33) 4 67 14 47 26; fax: (+33) 4 67 14 42 86; e-mail: anne.blanc-potard@univ-montp2.fr

Received 16 May 2014; revised 9 July 2014; accepted 25 July 2014. Final version published online 8 September 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12559

Editor: Klaus Hantke

Keywords

KdpF; *Salmonella*; membrane peptide; macrophage; potassium.

Abstract

Membrane peptides appear as an emerging class of regulatory molecules in bacteria, which can interact with membrane proteins, including transporters and sensor kinases. The KdpF peptide, which is cotranscribed with *kdpABC* genes and regulated by the KdpDE two-component system, is supposed to stabilize the KdpABC potassium transporter complex but may also exhibit unsuspected regulatory function(s). The mycobacterial KdpF can interact with the KdpD histidine kinase, and *kdpF* overexpression has been shown to reduce intramacrophage replication of *Mycobacterium bovis* BCG. In this study, we investigated whether KdpF displays similar behavior in another intracellular pathogen, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. We show that *Salmonella* KdpF can interact with KdpD in a bacterial two-hybrid assay. We have constructed a *Salmonella* strain overexpressing *kdpF*, and we have investigated expression of the *kdp* regulon, as well as intramacrophage survival. We show that *kdpF* overexpression reduces expression of *kdpA* and *kdpD* genes under potassium limitation. Moreover, *kdpF* overexpression increases intramacrophage multiplication of *S. Typhimurium*. Hence, our results indicate that KdpF can play a regulatory role in *S. Typhimurium*, modulating *kdp* gene expression and intramacrophage survival, but in a way that differs from the one reported for *M. bovis* BCG.

Introduction

Recent studies have highlighted the regulatory role of small membrane proteins (size below 50 amino acids, called hereafter peptides) in bacteria (Alix & Blanc-Potard, 2009; Hobbs *et al.*, 2011). These peptides seem to play a regulatory role by interacting with protein partners at the membrane, thereby modulating protein partner's activity and/or stability. Some peptides, such as MgrB and SafA, have been shown to interact with the PhoQ sensor kinase (Eguchi *et al.*, 2007, 2012; Lippa & Goulian, 2009), thus being able to modulate the expression of genes under the control of the corresponding two-component system. Other peptides, as KdpF or AcrZ, are supposed to interact with transporter or efflux pump,

respectively (Hobbs *et al.*, 2012; Gannoun-Zaki *et al.*, 2013). A *Salmonella* peptide, MgtR, has been involved in the degradation of the MgtC virulence factor and thus contributes to *Salmonella* pathogenicity (Alix & Blanc-Potard, 2008; Lee & Groisman, 2010). Subtle phenotypes are associated with the inactivation or overexpression of small membrane ORFs, suggesting that such peptides might play a role for bacterial fitness under certain conditions or in specific environments, being otherwise involved in subtle regulatory mechanisms that are not essential to bacterial growth.

We have recently shown that overexpression of the 30 amino acid-long KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG resulted in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology (Gannoun-Zaki

et al., 2013). Hence, KdpF appeared as an attractive membrane peptide because it displayed antivirulence functions upon overexpression in mycobacteria. The *kdpF* gene is the first gene of the *kdpFABC* operon, which is conserved among bacteria. Expression of the *kdpFABC* operon is dependent on external K^+ concentration and is regulated by the KdpDE two-component system (Greie & Altendorf, 2007; Heermann & Jung, 2010). The Kdp system, which has been extensively studied in *E. coli*, is a P-type ATPase that transports K^+ with high affinity (Greie & Altendorf, 2007; Greie, 2011). In *E. coli*, the KdpF peptide has been proposed to be a subunit involved in the stabilization of the KdpABC complex *in vitro*, possibly acting as a kind of lipid-like peptide for the holoenzyme (Gassel *et al.*, 1999). However, the role of KdpF *in vivo* remains elusive because it is not essential for the function of the Kdp transporter (Gassel *et al.*, 1999). The mechanism by which *kdpF* overexpression reduces bacterial cording and intramacrophage growth in *M. bovis* BCG is unknown, but it may be related to the fact that mycobacterial KdpF can interact with the KdpD sensor and a lipid transporter, which is supported by bacterial two-hybrid experiments (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013). Moreover, the KdpDE two-component system, which appears to play a role in the virulence of several bacterial pathogens (Freeman *et al.*, 2013), is involved in *M. tuberculosis* pathogenicity because a *M. tuberculosis* strain deleted for the *kdpDE* genes displayed increased virulence (Parish *et al.*, 2003).

Similar to *M. tuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is an intracellular pathogen that has the ability to replicate within macrophages. The KdpDE two-component system plays also a role in *Salmonella* pathogenicity because a *S. Typhimurium* strain deleted for the *kdpDE* genes is attenuated in the nematode model and exhibits reduced survival in macrophages (Alegado *et al.*, 2011). The *kdp* operon, whose expression is dependent on external K^+ concentration (Frymier *et al.*, 1997), is the only operon regulated by

the KdpDE system identified so far in *S. Typhimurium*. A *Salmonella enterica* serovar enteritidis *kdpA* mutant has been very recently described, but its role in virulence has been only studied in combination with a mutation in other Trk or Kup potassium transporters, suggesting that the single *kdpA* mutant does not have a relevant phenotype (Liu *et al.*, 2013). To determine whether the results obtained with mycobacterial KdpF are also observed with another intracellular pathogen, we have investigated the potential interaction between KdpF and KdpD proteins from *S. Typhimurium* using a bacterial two-hybrid system and we have tested the phenotypes displayed upon *kdpF* overexpression in *S. Typhimurium*.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Salmonella enterica serovar Typhimurium strains are derived from wild-type 14028s (gift from E.A. Groisman). *Escherichia coli* DH5a (Hanahan, 1983) was used as host in cloning experiments. Plasmids were introduced into *Salmonella* by electroporation using a Bio-Rad apparatus and into *E. coli* by chemical transformation using standard procedures. Plasmids used in this study are listed in Table 1, and primers are listed in Supporting Information, Table S1. Bacteria were grown in Luria broth (LB). Kanamycin and ampicillin were used at concentration of 25 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Growth in liquid medium with defined K^+ concentration was carried out by adding indicated concentration of KCl to the previously described potassium-deprived K0 medium (Epstein & Kim, 1971).

Overexpression of *kdpF* in wild-type *S. Typhimurium*

The *kdpF* gene was amplified from 14028s chromosomal DNA using pNM11-kdpF-F and kdpF-25-Eco-R primers

Table 1. Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Reference
pBR322	Ap ^R Tc ^R rep _{MB1}	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
pUT18	Amp ^R rep _{ColE1} (pBluescript II KS derivative)	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pKT25	Kan ^R rep _{p15A} (pACYC184 derivative)	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18-MgtC	MgtC-T18	Alix & Blanc-Potard (2008)
pNM11	pBR322/ <i>mgtC</i> regulatory sequences	Rang <i>et al.</i> (2007)
pNM11- <i>kdpF</i>	pNM11 expressing <i>kdpF</i> gene (<i>mgtC</i> promoter)	This study
pBR- <i>kdpF</i>	pBR322 expressing <i>kdpF</i> gene (<i>kdpF</i> promoter)	This study
pUT18-KdpD	KdpD-T18	This study
pKT25-KdpF	T25-KdpF	This study
pKT25-KdpF G4L-G8L	T25-KdpF G4L-G8L	This study
pKT25-KdpF A22V-A26V	T25-KdpF A22V-A26V	This study

(Table S1) and cloned into the pNM11 plasmid (Rang *et al.*, 2007) to express *kdpF* from the *mgtC* promoter, which is known to be highly induced in macrophages (Eriksson *et al.*, 2003). The pNM11-*kdpF* plasmid (also named *pkdpF*) was transformed into 14028s wild-type strain. In addition, the *kdpF* gene and its promoter were amplified using pBR322-prom+*kdpF*-F and *kdpF*-25- Eco-R primers (Table S1), and the PCR fragment was cloned in pBR322 to produce the pBR-*kdpF* plasmid that expresses *kdpF* from its own promoter.

RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

RNA was prepared from mid-logarithmic bacterial cultures grown in K0.1 or K1 medium containing 20 mM magnesium. Seven-hundred and fifty microliter of bacterial cultures was added to 1.5 mL of RNA protect reagent (Qiagen) and incubated 5 min at room temperature. Bacteria were centrifuged and resuspended in 100 µL of TE buffer containing 1 mg mL⁻¹ lysozyme, incubated 5 min at room temperature. Three-hundred and fifty microliter of RLT (Qiagen) and 250 µL of 100% ethanol was added. RNA was purified with the RNA easy kit according to the manufacturer's instructions. DNA was further removed using DNaseI (Invitrogen). cDNA was produced using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Controls without reverse transcriptase were carried out on each RNA sample to rule out possible DNA contamination. Quantitative real-time PCR was performed using an in-house SYBR Green mix (Lutfalla *et al.*, 2006) and a 480 light cycler instrument (Roche). PCR conditions were as follows: 3-min denaturation at 98 °C, 45 cycles of 98 °C for 5 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 10 s. The 16S rRNA gene was used as internal control. The sequences of primers used for qRT-PCR are listed in Table S1.

Bacterial two-hybrid analysis of KdpF–KdpD interaction

The bacterial adenylate cyclase two-hybrid (BACTH) system (Karimova *et al.*, 1998) was used to evaluate the interaction between KdpF and KdpD. The *kdpF* gene was PCR-amplified using 14028s chromosomal DNA as template and primers *kdpF*-25-Bam-F and *kdpF*-25-Eco-R (Table S1). The PCR fragment was cloned at the BamHI and EcoRI sites of pKT25, to produce a fusion protein, KdpF-T25, where the T25 fragment is fused at the N-terminus of KdpF. To generate the pKT18-*kdpD* construct, the *kdpD* gene was PCR-amplified using primers *kdpD*-18-Hind-F and *kdpD*-18-Bam-R using 14028s genomic DNA. The amplicon was then restricted by HindIII–BamHI and ligated into the pKT18 vector to

produce a fusion protein, KdpD-T18. All constructs were verified by DNA sequencing.

Recombinant plasmids derived from pUT18 and pKT25 genes were cotransformed into BTH101 bacteria. Transformants were plated on LB with ampicillin and kanamycin containing 50 µg mL⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) at 30 °C for 30 h. To quantify the interaction between hybrid proteins, bacteria were grown overnight at 30 °C in LB Amp Kan broth supplemented with 0.5 mM IPTG. The assays were carried out as described previously (Miller, 1972) with activities expressed in arbitrary Miller units. Values are average from at least four independent cultures. A level of (β-galactosidase activity at least fivefold higher than the one of the control vectors indicates an interaction between the protein partners (Karimova *et al.*, 2005).

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was conducted on pKT25-KdpF plasmid using the Quickchange® II kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Sets of primers were designed for each engineered mutation including sufficiently long flanking regions (Table S1). Sequencing was conducted to confirm the presence of the desired mutation.

Swarming motility

Swarming experiments were performed in LB (Oxoid) with 0.2% agar (Difco) at 37 °C. Swarming agars were used immediately after solidification. Overnight cultures of *Salmonella* strains were diluted 1 : 100 and grown to OD_{600 nm} 0.2. Exact bacterial counts were determined by colony counting of serial dilutions. Twenty microliters of the culture was spotted in the center of the swarming agar. Swarming zone diameter was determined after 7-h and 9-h growth at 37 °C.

Macrophage infection experiments

The rate of intramacrophage replication after 18-h infection was performed in J774 mouse macrophages as described previously (Rang *et al.*, 2007).

Results and discussion

Salmonella KdpF interacts with *Salmonella* KdpD in a bacterial two-hybrid system

The *kdpF* gene is the first gene of the *kdpFABC* operon, in both *S. Typhimurium* (Fig. 1a) and *M. tuberculosis* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). In *S. Typhimurium*,

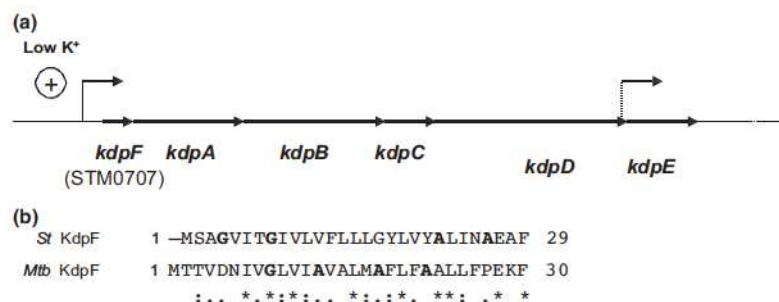


Fig. 1. Genomic context of *Salmonella* *kdpF* gene and measurement of *kdpF* expression. (a) Genomic organization of the *kdpFABC* and *kdpDE* genes in *S. Typhimurium*. The *Salmonella* *kdpFABCDE* genes form a single transcriptional unit with a potential internal transcription start upstream *kdpE* (<http://bioinf.gen.tcd.ie/cgi-bin/salcom.pl>, Kröger *et al.*, 2013). (b) Alignment of KdpF sequences from *S. Typhimurium* and *Mycobacterium tuberculosis*. The putative helix interacting motifs are indicated in bold. Alignment was performed with CLUSTALW software (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). *Identical residues among the two sequences.

the *kdpFABC* and *kdpDE* operons are organized in tandem, which contrasts to the gene organization in *M. tuberculosis* where both operons are transcribed in the opposite direction (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013). The KdpF peptides of *S. Typhimurium* and *M. tuberculosis* share only 30% identity (41% similarity) (Fig. 1b), which is lower than the conservation found for the structural KdpA, KdpB, and KdpC proteins (46–64% identity and 61–77% similarity).

We have previously shown that KdpF peptide from *M. tuberculosis* interacts with KdpD sensor from *M. tuberculosis* (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013). To test whether the KdpF peptide from *S. Typhimurium* could interact with the *S. Typhimurium* KdpD sensor kinase, we have used the BACTH system that has been previously validated for detecting interactions between inner-membrane proteins in living bacteria (Karimova *et al.*, 2005). Constructs were made to fuse the T18 or T25 fragment of adenylate cyclase to KdpD and KdpF, respectively. The T18 fragment has been fused at the cytoplasmic C-terminal of KdpD (pUT18 vector). We have made the hypothesis that *S. Typhimurium* KdpF had a similar topological orientation as *M. tuberculosis* KdpF [cytoplasmic N-terminal extremity (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013)], and we have therefore cloned the T25 fragment at the KdpF N-terminal end (KdpF-T25). Plasmids encoding the T18 and T25 fusion proteins were introduced in an *E. coli* *cya* mutant (BTH101), and functional complementation was determined by measuring β -galactosidase activity (Fig. 2a). A high level of β -galactosidase activity (1100 Miller units) was observed when BTH101 was cotransformed with KdpD-T18 and KdpF-T25 plasmids, indicating a robust interaction between both proteins, whereas a basal level of β -galactosidase activity was measured with the negative control (T18/KdpF-T25). The level of interaction is of similar magnitude to the one reported for *Mycobacterium* KdpF and KdpD proteins (Gannoun-Zaki

et al., 2013). On the other hand, *Salmonella* KdpF does not interact with another *S. Typhimurium* membrane protein that harbors five transmembrane segments, MgtC (Fig. 2a), indicating that KdpF does not bind to transmembrane segments in a nonspecific way.

Natural hydrophobic peptides with a single transmembrane domain offer opportunities to decipher motifs that drive the interaction between transmembrane helices. The GxxxG motif (where Gly can also be replaced by Ala or Ser) has been reported to favor close contact between transmembrane helices (Senes *et al.*, 2004). The KdpF peptide harbors one GxxxG motif (G4-G8) and one AxxxA motif (A22-A26) (Fig. 1b). We have carried out site-directed mutagenesis of both motifs to investigate their role in the interaction between KdpF and KdpD. The amino acids of the motifs are converted to hydrophobic amino acids (G4L-G8L or A22V-A26V) to preserve transmembrane segment hydrophobicity and minimize side effects on protein level and/or membrane insertion. Whereas mutagenesis of the first motif failed to alter the interaction, mutagenesis of the second motif resulted in a twofold decrease in β -galactosidase activity (Fig. 2b), indicating that this AxxxA motif may contribute to the interaction, at least to some extent.

Taken together, these results indicate that *S. Typhimurium* KdpF can interact with *S. Typhimurium* KdpD in the BACTH system, similar to what has been found previously with the KdpF and KdpD proteins from *M. tuberculosis*.

Construction of *S. Typhimurium* strains that overexpress *kdpF*

To investigate the regulatory role of KdpF in *S. Typhimurium*, we have first constructed a strain that harbors a plasmid-encoded additional copy of *kdpF* under the control of the *mgtC* promoter (pNM11-*kdpF*), which is

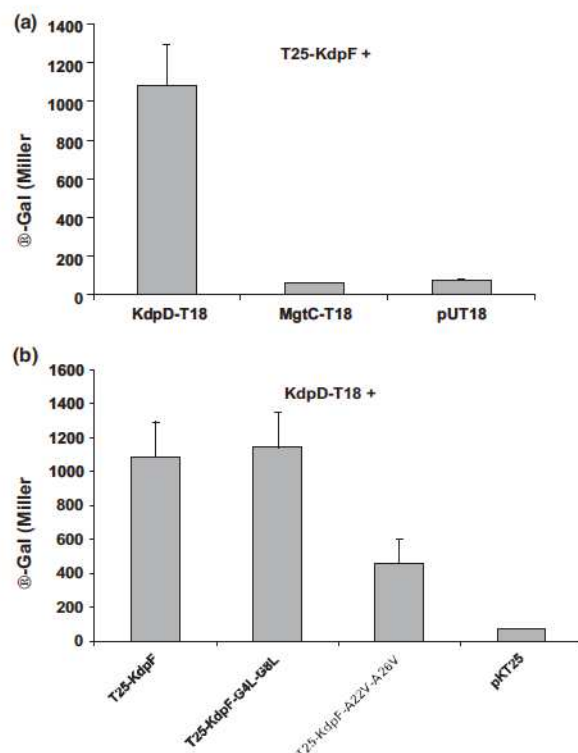


Fig. 2. *In vivo* interaction of KdpF with KdpD and effect of mutations in transmembrane interaction motifs. (a) The interaction between KdpF and KdpD was assayed using the BACTH system by transforming *Escherichia coli* BTH101 cells with KdpF-T25 and KdpD-T18 plasmids. Liquid b-galactosidase assays were performed from three independent experiments. Error bars represent SD. (b) Interaction of KdpD with KdpF peptide mutated in putative GxxxG and AxxxA motifs. Liquid b-galactosidase assays were performed from three independent experiments. Error bars represent SD.

known to be highly induced in macrophages and in low magnesium medium (Vescovi *et al.*, 1996; Eriksson *et al.*, 2003). We have verified by qRT-PCR that *kdpF* is overexpressed when bacteria are grown in 20 mM Mg^{2+} in both 0.1 mM and 1 mM potassium (Fig. 3a). In liquid culture with 20 mM Mg^{2+} , this strain grows similarly than a control strain that does not overexpress *kdpF* (Fig. S1). We have also constructed a *S. Typhimurium* strain that harbors a plasmid-encoded additional copy of *kdpF* under its own promoter (pBR-*kdpF*). Overexpression of *kdpF* for strains grown in K1 medium has been checked by qRT-PCR (eightfold overexpression, data not shown).

Role of KdpF in regulation of *kdp* gene expression

The interaction between KdpF and KdpD proteins implies that KdpF may modulate the K^+ regulation mediated by

the KdpDE two-component system. To further investigate a putative regulatory role of KdpF on *kdp* gene expression, we have carried out qRT-PCR experiments to compare expression of the *kdpA* and *kdpD* genes in a strain overexpressing *kdpF* relatively to the wild-type strain. As expected, expression of *kdpA* and *kdpD* is induced in 0.1 mM K^+ comparatively to 1 mM K^+ (Fig. 3b and c). A significant reduction in *kdpA* and *kdpD* expression in K 0.1 medium is seen in the strain overexpressing *kdpF*. Such a reduction in transcript levels upon *kdpF* overexpression is not seen with a control gene (*mgtB*) that is not regulated by potassium (Fig. 3d). Hence, the reduced expression of *kdp* genes upon *kdpF* overexpression may be mediated by the ability of KdpF to interact with the KdpD sensor.

Role of KdpF in intramacrophage survival

Potassium transporters have been recently reported to play a role in *Salmonella* motility (Liu *et al.*, 2013), and we have first investigated whether a strain that overexpresses *kdpF* differs in swarming motility comparatively to the wild-type strain. However, no difference in motility was observed at 37 °C (data not shown).

We have previously reported a decrease in intramacrophage replication of wild-type *M. bovis* BCG that carries a plasmidic copy of *kdpF* expressed under the control of a constitutive promoter (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013). To investigate whether a similar effect may occur with *S. Typhimurium*, we have tested strains overexpressing *kdpF* for their ability to replicate in the murine J774 macrophage cell line. Results in Fig. 4a indicate that overexpression of *kdpF* from the *mgtC* promoter correlated with a significant increase in intracellular replication. A similar result was obtained when *kdpF* is overexpressed on a plasmid under the control of its own promoter (Fig. 4b). Hence, *kdpF* overexpression modified the *Salmonella* intramacrophage replication rate, but the effect differs from the phenotype observed in *M. bovis* BCG. An increased intramacrophage replication is not a general feature observed upon overexpression of a membrane peptide in *Salmonella*, because overexpression of the MgtR membrane peptide resulted in a decrease in intramacrophage replication (Alix & Blanc-Potard, 2008).

Conclusion

In the present study, we have investigated phenotypes upon overexpression of the *Salmonella* KdpF peptide, which has the propensity to interact with both the KdpABC transporter and, as shown in the present study, the KdpD kinase. Our results indicate that *kdpF* overexpression slightly reduced *kdp* transcription in low

Fig. 3. Effect of *kdpF* overexpression on the regulation of *kdp* genes by K^+ . K^+ -regulated expression of *kdp* genes from *S. Typhimurium* strains carrying or not the pNM11-*kdpF* plasmid (*pkdpF*) grown in 20 mM Mg medium containing 0.1 mM (K0.1) or 1 mM (K1) potassium. The levels of *kdpF* (a), *kdpA* (b) and *kdpD* (c) transcripts relative to those of the 16S rRNA gene were measured by qRT-PCR. Results are expressed as means $\pm$ SD from at least three (*kdpF*, *kdpA*) or two (*kdpD*) independent experiments (each performed in triplicate). The decrease of *kdpA* and *kdpD* transcripts in K0.1 medium upon *kdpF* overexpression is statistically significant (Student's *t*-test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). (d) The expression of *mgtB*, a gene not regulated by K^+ , is shown as control.

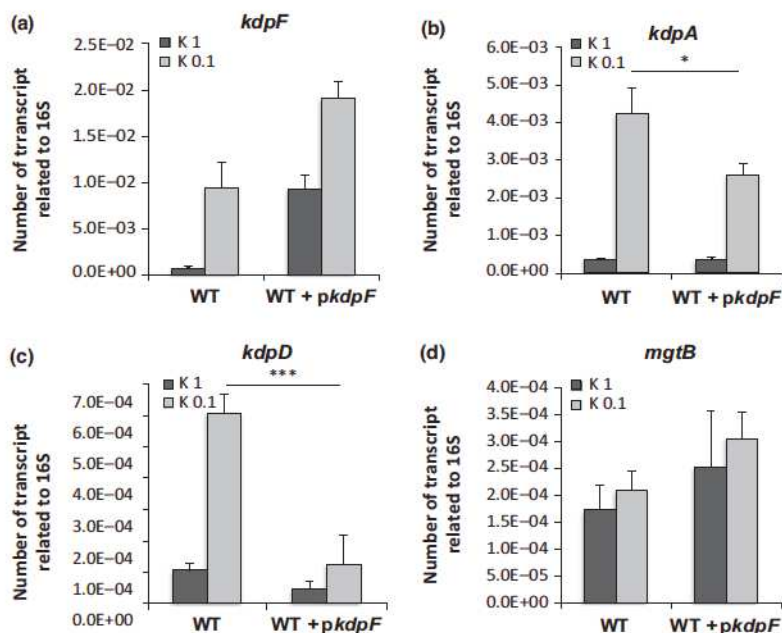


Fig. 4. Effect of *kdpF* overexpression on *Salmonella* replication in J774 macrophages. The bacterial replication was determined after 18 h. The *kdpF* gene is overexpressed from the pNM11-*kdpF* plasmid (*pkdpF*) (a) or the pBR-*kdpF* plasmid (b). Values presented are the percentage relative to that of the control strain: wild-type 14028s carrying pNM11 plasmid in (a) and wild-type 14028s carrying pBR322 plasmid in (b). Data represent the mean values $\pm$ SD from at least three independent experiments.

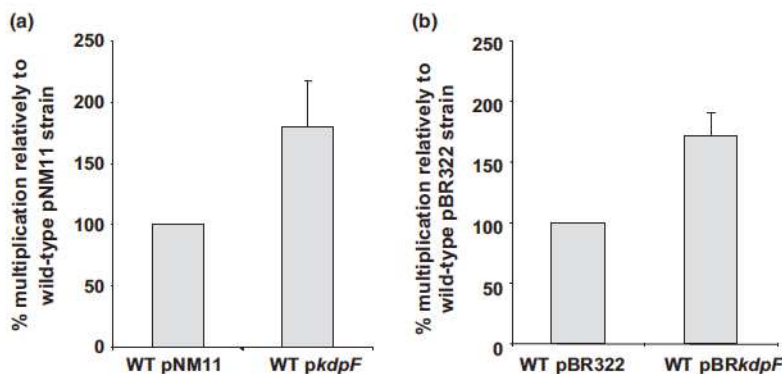
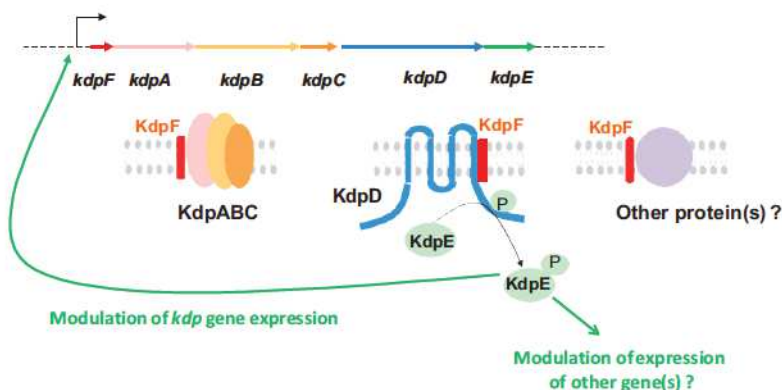


Fig. 5. Model for the regulatory effect of KdpF in *S. Typhimurium*. The KdpF peptide is drawn as a red rectangle. The modulation of *kdp* gene expression may be linked to the interaction between KdpD and KdpF. The effect of KdpF on intramacrophage multiplication could be due to the modulation of expression of genes regulated by the KdpDE system or to the interaction of KdpF with other protein(s) than KdpD.



potassium conditions and increased intramacrophage multiplication. It is currently unclear whether these phenotypes are linked to the interaction between KdpF and KdpD or to interaction(s) between KdpF and other protein(s) (Fig. 5). The effect of *kdpF* overexpression on *Salmonella* intramacrophage growth thus differs with the one reported for mycobacteria. Hence, the antivirulence properties displayed upon overexpression of KdpF in mycobacteria are not observed with the intracellular pathogen *S. Typhimurium*. This may be related to opposite phenotypes reported for mutations in *kdpDE* two-component system genes in the virulence of both bacteria. Alternatively, the regulatory role of KdpF in macrophages may be driven by the interaction with distinct/additional proteins in *Salmonella* and *Mycobacterium* species.

Acknowledgements

We thank Daniel Ladant (Paris, France) for providing plasmids. This work was supported by the CNRS and the French ministry of research (MRT fellowship for C.B.).

Authors' contribution

L.G.-Z. and C.B. contributed equally to this work.

References

- Alegado RA, Chin C-Y, Monack DM & Tan M-W (2011) The two-component sensor kinase KdpD is required for *Salmonella typhimurium* colonization of *Caenorhabditis elegans* and survival in macrophages. *Cell Microbiol* 13: 1618–1637.
- Alix E & Blanc-Potard AB (2008) Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J* 27: 546–557.
- Alix E & Blanc-Potard AB (2009) Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol Microbiol* 72: 5–11.
- Bolivar F, Rodriguez R, Greene P, Betlach M, Heyneker H, Boyer H, Crosa J & Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95–113.
- Eguchi Y, Itou J, Yamane M, Demizu R, Yamato F, Okada A, Mori H, Kato A & Utsumi R (2007) B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *P Natl Acad Sci USA* 104: 18712–18717.
- Eguchi Y, Ishii E, Yamane M & Utsumi R (2012) The connector SafA interacts with the multi-sensing domain of PhoQ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 85: 299–313.
- Epstein W & Kim BS (1971) Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 108: 639–644.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M & Hinton JCD (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47: 103–118.
- Freeman ZN, Dorus S & Waterfield NR (2013) The KdpD/KdpE Two-component system: integrating K⁺ homeostasis and virulence. *PLoS Pathog* 9: e1003201.
- Frymier JS, Reed TD, Fletcher SA & Csonka LN (1997) Characterization of transcriptional regulation of the *kdp* operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 179: 3061–3063.
- Gannoun-Zaki L, Alibaud L, Carrère-Kremer S, Kremer L & Blanc-Potard AB (2013) Overexpression of the KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology. *PLoS One* 8: e60379.
- Gassel M, Mollenkamp T, Puppe W & Altendorf K (1999) The KdpF subunit is part of the K⁺-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex *in vitro*. *J Biol Chem* 274: 37901–37907.
- Greie Jr-C (2011) The KdpFABC complex from *Escherichia coli*: a chimeric K⁺ transporter merging ion pumps with ion channels. *Eur J Cell Biol* 90: 705–710.
- Greie Jr-C & Altendorf K (2007) The K⁺-translocating KdpFABC complex from *Escherichia coli*: a P-type ATPase with unique features. *J Bioenerg Biomembr* 39: 397–402.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557–580.
- Heermann R & Jung K (2010) The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 304: 97–106.
- Hobbs EC, Fontaine F, Yin X & Storz G (2011) An expanding universe of small proteins. *Curr Opin Microbiol* 14: 167–173.
- Hobbs EC, Yin X, Paul BJ, Astarita JL & Storz G (2012) Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *P Natl Acad Sci USA* 109: 16696–16701.
- Karimova G, Pidoux J, Ullmann A & Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *P Natl Acad Sci USA* 95: 5752–5756.
- Karimova G, Dautin N & Ladant D (2005) Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* 187: 2233–2243.
- Kroeger C, Colgan A, Srikumar S et al. (2013) An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14: 683–695.
- Lee E-J & Groisman EA (2010) An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. *Mol Microbiol* 76: 1020–1033.
- Lippa AM & Goulian M (2009) Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet* 5: e1000788.
- Liu Y, Ho KK, Su J, Gong H, Chang AC & Lu S (2013) Potassium transport of *Salmonella* is important for type III secretion and pathogenesis. *Microbiology* 159: 1705–1719.

- Lutfalla G, Uze G, Alan K & Brian O (2006) Performing quantitative reverse transcribed polymerase chain reaction experiments. *Meth Enzy* 410: 386–400.
- Miller J (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ & Stoker NG (2003) Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 71: 1134–1140.
- Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L & Blanc-Potard AB (2007) Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Mol Microbiol* 63:605–622.
- Senes A, Engel DE & DeGrado WF (2004) Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14: 465–479.
- Vescovi EG, Soncini FC & Groisman EA (1996) Mg^{2+} as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84: 165–174.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Effect of *kdpF* overexpression on *S. Typhimurium* growth in liquid cultures.

Table S1. Primers list used in this study.

2.2.1 Rôle du peptide KdpF dans la virulence de *Salmonella*

KdpF apparaît comme un peptide attractif du fait de ses fonctions anti-virulences chez les mycobactéries même si le mécanisme est inconnu.

Tout comme chez les mycobactéries, chez *S. Typhimurium*, le peptide KdpF peut interagir avec le transporteur KdpABC et nous avons montré qu'il pouvait également interagir avec la kinase KdpD.

J'ai montré que la surexpression de *kdpF* réduisait sensiblement la transcription de *kdp* en condition de carence en potassium. Il a été montré par ailleurs que cette surexpression augmentait la répllication intramacrophagique. Nous n'avons pas pu définir clairement si ces phénotypes étaient liés à l'interaction entre KdpF et KdpD ou aux interactions entre KdpF et d'autres protéines.

L'effet de la surexpression de *kdpF* sur la croissance intramacrophagique de *Salmonella* est donc à l'opposé de l'effet décrit pour les mycobactéries. Par conséquent, les propriétés anti-virulences affichées par la surexpression de KdpF chez les mycobactéries ne sont pas observées chez le pathogène intracellulaire *S. Typhimurium*. Cela pourrait être relié aux phénotypes opposés observés lors de la mutation des gènes *kdpDE* du système à deux composants dans la virulence de ces deux bactéries. Par ailleurs, l'hypothèse concernant les différences dans le (ou les) partenaire(s) interagissant avec MgtC entre différentes espèces, pourrait être appliquée dans le cas de KdpF dans la mesure où son rôle régulateur dans les macrophages pourrait solliciter son interaction avec des protéines différentes ou additionnelles entre les deux espèces, *Salmonella* et *Mycobacterium*.

Un schéma récapitulatif des effets régulateurs de KdpF chez *Salmonella* est présenté dans la figure 43 ci-après.

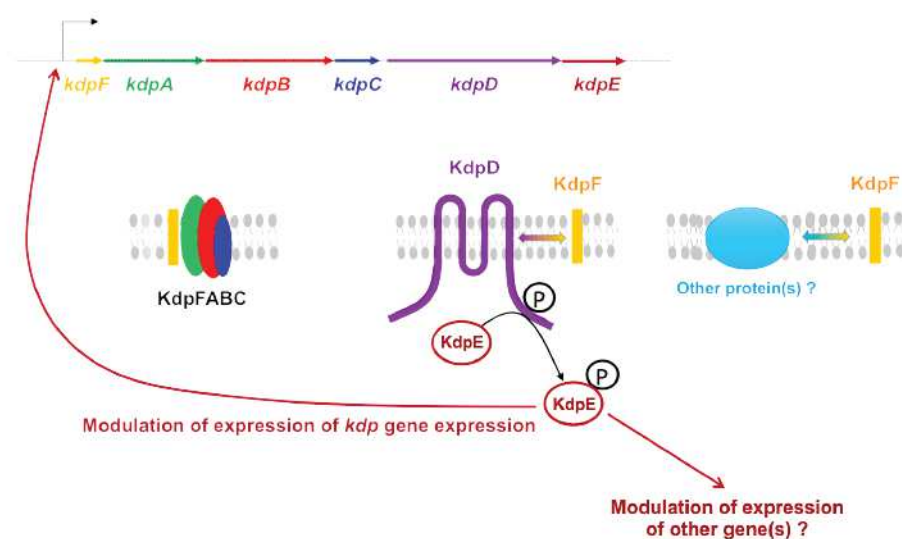


Figure 43 – Schéma récapitulatif des effets régulateurs de KdpF chez *Salmonella*.

IV DISCUSSION



*Dans la recherche en commun par la discussion, celui qui est vaincu gagne plus,
dans la mesure où il a accru son savoir.*

Epicure

Il ne peut y avoir de discussion sans contradiction.

Montaigne

Mes travaux de thèse m'ont conduits à étudier la régulation et la fonction de MgtC chez différentes bactéries. J'ai également étudié les potentialités anti-virulence du peptide MgtR chez ces bactéries. Concernant les articles en co-1^{er} auteur, la discussion portera principalement sur les expériences que j'ai réalisées.

1 Régulation de MgtC chez les mycobactéries et chez *Pseudomonas aeruginosa*

Chez *S. Typhimurium*, MgtC est régulé de manière particulièrement complexe. En effet, MgtC est régulé positivement par le système à deux composants PhoP-PhoQ mais aussi par un ARNm senseur d'ATP (Lee and Groisman, 2012). Par ailleurs MgtC est régulé négativement par un ARN antisens et par le peptide MgtR (Alix and Blanc-Potard, 2008; Lee and Groisman, 2010). Il a été suggéré que cette complexité était liée au mécanisme d'action de MgtC qui cible la propre F₁F_o ATP synthase du pathogène (Lee et al., 2013a).

1.1 Régulation par le magnésium

Chez *S. Typhimurium*, la régulation de MgtC par le magnésium intervient via le système à deux composants PhoP-PhoQ puisqu'une faible concentration extracellulaire en Mg²⁺ est l'un des signaux activateur du système. Chez *S. Typhimurium* et *Y. pestis*, une carence en Mg²⁺ induit fortement l'expression du gène *mgtC* (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Grabenstein et al., 2006) alors que l'induction est très faible chez *M. tuberculosis* (Walters et al., 2006; Yang et al., 2012b). Les gènes *mgtC* de *Salmonella* et de *Y. pestis* sont co-transcrits avec *mgtB* qui code pour un transporteur de magnésium, contrairement à *mgtC* de *M. tuberculosis*. Pour expliquer cette différence de régulation, il a été suggéré que *mgtC* était régulé par le magnésium uniquement lorsqu'il était co-transcrit avec un transporteur de magnésium.

Chez *M. marinum* et pour l'homologue PA4635 de MgtC de *P. aeruginosa* (Pa), les expériences ont révélé une très forte induction de l'expression du gène *mgtC* par une carence en Mg²⁺. De plus, des études préliminaires menées chez *M. abscessus* montrent également que l'expression de *mgtC* est fortement induite par une carence en Mg²⁺ (G. Accard, C. Belon). Cette régulation est donc similaire à celle observée chez *S. Typhimurium* et *Y. pestis* mais elle diffère de la régulation de *mgtC* chez *M. tuberculosis*. Pourtant chez *M. marinum*, *P. aeruginosa* et *M. abscessus* il n'y a pas de co-transcription avec un transporteur de magnésium. Cela indique que cette régulation est indépendante de la présence d'une telle organisation génomique. Par ailleurs, il faut noter que l'expression de l'homologue PA2558 de MgtC Pa reste constante quelque soit la concentration en Mg²⁺.

Concernant le mécanisme de régulation, des études plus poussées sont nécessaires pour le décrypter. Chez *Salmonella*, le magnésium contrôle l'expression de *mgtC*. En effet, MgtC est régulé au niveau transcriptionnel via le système à deux composants PhoP-PhoQ activé par une carence en Mg²⁺ (Véscovi et al., 1996). On pourrait donc imaginer qu'il existe un

équivalent du système à deux composants PhoP-PhoQ chez les pathogènes dont MgtC est régulé par le magnésium. Le transporteur de Mg^{2+} MgtA est également régulé par le Mg^{2+} via PhoP-PhoQ. Mais il existe une régulation de MgtA par le magnésium indépendante de PhoP-PhoQ. Cette régulation se fait au niveau post-transcriptionnel par un riboswitch Mg^{2+} localisé dans la région 5' non traduite (5'UTR) de *mgtA*. Il semblerait que l'ARN senseur de Mg^{2+} contrôle l'expression de *mgtA* en ciblant son transcrit pour une dégradation par l'intermédiaire de la RNase E. Les 5'UTR de *mgtA* mais aussi de *mgtCB* sont responsables d'un ajustement dépendant du Mg^{2+} de la régulation de ces gènes (Spinelli et al., 2008). On pourrait donc également envisager une régulation de MgtC par riboswitch Mg^{2+} chez d'autres pathogènes.

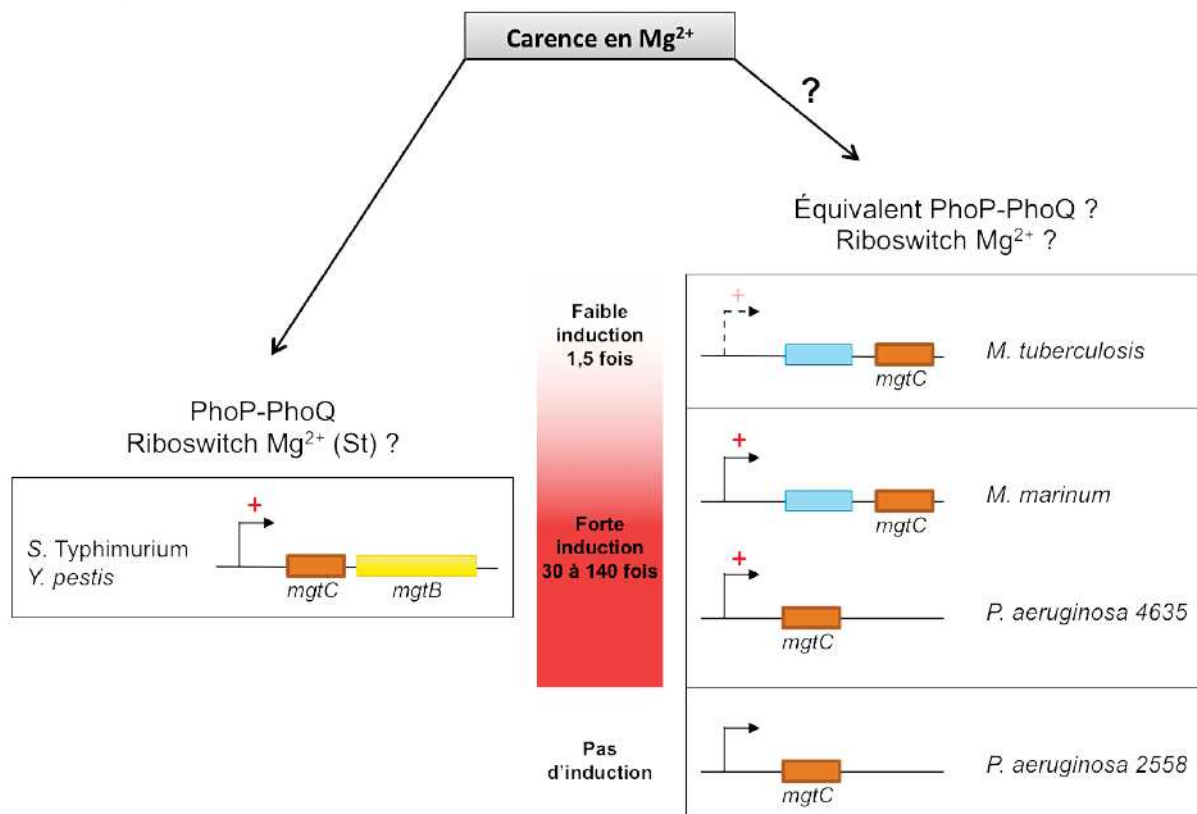


Figure 44 – Régulation de MgtC par le magnésium. Les signes + indiquent une forte (rouge) ou une faible (rosé) induction de l'expression de *mgtC* par une carence en Mg^{2+} et sont positionnés au-dessus de flèches indiquant l'emplacement du promoteur. La flèche en pointillé indique que le promoteur n'est pas forcément situé à ce niveau. Les carrés bleus représentent les gènes en amont de *mgtC* sous contrôle du même promoteur.

Bien que ces espèces bactériennes soient phylogénétiquement éloignées, la régulation par une carence en magnésium est conservée. Cette conservation de la régulation est probablement liée à la conservation de la fonction de MgtC dans l'adaptation aux fluctuations en magnésium. Les protéines MgtC des différents pathogènes cités précédemment sont nécessaires, *in vitro*, à une croissance optimale en milieu carencé en magnésium (Buchmeier et al., 2000). Le fait que *mgtC* de *M. tuberculosis* soit faiblement régulé par le magnésium suggère que la régulation de *mgtC* aurait évolué différemment

pour cette espèce. Cela pourrait s'expliquer par le fait que *M. tuberculosis* est un pathogène avec une niche écologique strictement restreinte à l'homme contrairement à *S. Typhimurium*, *Y. pestis*, *M. marinum* ou *P. aeruginosa*. *M. tuberculosis* est donc uniquement exposé à des conditions environnementales où les concentrations en magnésium fluctuent peu alors que les autres pathogènes seraient soumis à des variations des concentrations en magnésium inhérentes aux différents environnements auxquels ils sont confrontés. Les études préliminaires menées chez *M. abscessus* confirment ce phénomène puisque l'expression de *mgtC* de ce pathogène environnemental est fortement induite par une carence en Mg^{2+} .

1.2 Régulation par le pH et activation intracellulaire chez *P. aeruginosa*

Chez *S. Typhimurium* la régulation de *MgtC* par le pH intervient via le système à deux composants PhoP-PhoQ et indirectement, via un ARN messager senseur d'ATP. Pour le premier, un pH acide est l'un des signaux activateur du système (Prost et al., 2007). Pour le second, le pH acide produit un gradient de protons à travers la membrane interne ce qui a pour effet d'augmenter le niveau d'ATP intracellulaire. Lorsque l'ARNm senseur d'ATP capte un niveau élevé d'ATP, les séquences adjacentes adoptent une structure particulière permettant l'expression de *mgtC* (Lee and Groisman, 2012).

J'ai étudié cette régulation chez *P. aeruginosa*. *In vitro* le gène *mgtC* (PA4635) est fortement induit dans un milieu carencé en Mg^{2+} . Cet effet est amplifié à pH acide. En revanche, l'effet à pH acide dans des conditions normales en Mg^{2+} est quasi nul. L'expression de *mgtC* a également été étudiée *ex vivo* dans des macrophages traités ou non avec un inhibiteur de la V-ATPase qui permet de bloquer l'acidification phagosomale. Les résultats indiquent une induction très importante de PA4635 dans le macrophage. Le gène *mgtC* de *Salmonella* est également très induit dans le macrophage (Eriksson et al., 2003). Par ailleurs, lors d'une réduction de l'acidification phagosomale, l'expression de *mgtC* (PA4635) est diminuée d'un facteur 2. Cela suggère que l'expression de ce gène est partiellement dépendante de l'acidification phagosomale. L'expression du gène *mgtC* (PA2558) n'est pas régulée par le pH acide dans les conditions étudiées.

Comme pour la régulation par le magnésium, des études plus poussées sont nécessaires pour comprendre le mécanisme de régulation par le pH. Il n'est pas exclu qu'il puisse exister un ARN messager senseur d'ATP chez *P. aeruginosa*. Concernant le système à deux composants PhoP-PhoQ de *P. aeruginosa*, on sait qu'il répond à une carence en Mg^{2+} (McPhee et al., 2006). La réponse au pH acide n'a pas été étudiée. Il est donc possible que l'expression de *MgtC* (PA4635) soit régulée par ce système.

2 Rôle (intra)macrophagique de MgtC et étude de la virulence dans le modèle *Danio rerio*

Le rôle de MgtC dans la virulence se caractérise par son implication dans la croissance et la survie intracellulaire. Les études ayant évalué ce rôle chez différents pathogènes (*S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *B. cenocepacia*, *B. suis*, *Y. pestis* et *M. tuberculosis*) ont montré que MgtC était nécessaire à la survie intra-macrophagique (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Buchmeier et al., 2000; Grabenstein et al., 2006; Lavigne et al., 2005; Maloney and Valvano, 2006; Retamal et al., 2009). Cette fonction de MgtC est donc très conservée entre les espèces. *In vivo*, l'implication de MgtC dans la virulence a été démontrée dans des modèles d'infection murins chez *S. Typhimurium*, *B. cenocepacia* et *M. tuberculosis* (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Buchmeier et al., 2000; Hunt et al., 2004). Le rôle de MgtC dans la virulence *in vivo* est donc également conservé entre les espèces étudiées.

2.1 Réplication intramacrophagique et virulence dans le modèle d'infection d'embryons de *Danio* chez *M. marinum*

Bien que *M. marinum* et *M. tuberculosis* soit deux pathogènes qui partagent de nombreuses similarités dans leurs caractéristiques de virulence, l'étude de MgtC de *M. marinum* a montré que la protéine ne contribuerait pas significativement à la réplication intramacrophagique, ni à la virulence de la bactérie *in vivo* dans un modèle d'infection d'embryons de danio. Ces résultats sont donc en contradiction avec le rôle de MgtC dans la virulence décrit pour *M. tuberculosis* mais également pour les autres pathogènes pour lesquels l'implication de MgtC dans la virulence a été étudié (Alix and Blanc-Potard, 2007).

Concernant l'absence de phénotype fort du mutant *mgtC* pour la réplication intramacrophagique et pour l'infection d'embryons de danio plusieurs hypothèses peuvent être développées.

Tout d'abord, cela pourrait être associé à la niche intracellulaire de *M. marinum*. Même si *M. marinum* et *M. tuberculosis* ont de nombreuses caractéristiques de virulence communes, les deux pathogènes présentent aussi des différences notables telle que la capacité de *M. marinum* à promouvoir la formation d'une queue d'actine dans le cytoplasme, probablement pour favoriser sa propagation de cellule à cellule (Stamm et al., 2003). Par ailleurs, *M. marinum* est capable de s'échapper du phagosome de manière rapide et fréquente ce qui pourrait expliquer le manque de contribution de MgtC de *M. marinum* dans la réplication intramacrophagique (Collins et al., 2009). Certaines études ont montré que *M. tuberculosis* était également capable d'un tel échappement (Simeone et al., 2012; van der Wel et al., 2007). Cependant, la rapidité et surtout la fréquence de ce type d'évènement serait très probablement inférieur à ce qui se passe chez *M. marinum*. De plus, la contribution

physiologique d'échappement du phagosome vers le cytosol reste controversée chez *M. tuberculosis* (Welin and Lerm, 2012).

Ensuite, la divergence de phénotype pourrait être liée au background génétique de *M. tuberculosis*. En effet, le mutant *mgtC* pour lequel un défaut de réplication intramacrophagique est observé a été construit dans un background Erdman (Buchmeier et al., 2000). Une revue indique que des travaux non publiés (Smith, 2003) n'ont pas permis de détecter un défaut de croissance intracellulaire pour un mutant *mgtC* construit dans le background H37Rv. Or, il existe des différences de virulence entre ces souches. Certaines études suggèrent que la souche Erdman serait plus virulente que la souche H37Rv dans certaines conditions (Dunn and North, 1995).

Par ailleurs, concernant *M. marinum* il existe également différents background génétiques qui déterminent notamment le développement d'une pathologie aigüe ou chronique chez le Danio et donc une pathogénèse différente (Van der Sar et al., 2004). Dans notre étude nous avons utilisé la souche M qui est couramment utilisée en laboratoire et à l'origine d'infections aigües chez le danio. L'absence de phénotype du mutant *mgtC* de *M. marinum* dans le modèle d'infection d'embryons de danio pourrait donc être associé au background génétique utilisé.

Malgré l'absence de phénotype clair du mutant *mgtC* chez l'embryon de danio en terme de survie, la moindre charge bactérienne observée est associée à une absence de neutropénie qui est un marqueur de sévérité de l'infection, suggérant une virulence moindre du mutant *mgtC*. Le modèle danio était prometteur pour décortiquer le rôle de MgtC lors d'une infection mycobactérienne en temps réel, mais l'absence d'effet significatif sur la virulence, probablement liée au manque de phénotype dans le macrophage, ne m'a pas permis de mettre à profit tous les avantages du modèle. Cependant, il m'a permis de mettre en évidence un nouveau phénotype qui sera décrit dans le paragraphe suivant.

2.2 Mise en évidence d'un nouveau rôle du facteur de virulence MgtC dans la phagocytose en utilisant le modèle *Mycobacterium marinum*

Dans la littérature, les études sur MgtC ne s'intéressent pas aux étapes précoces de l'infection et notamment à la phagocytose. Chez *M. marinum*, bien que MgtC ne soit pas indispensable à la réplication intramacrophagique, la protéine jouerait un rôle dans la phase précoce d'infection.

Dans le modèle d'infection d'embryons de danio, les neutrophiles ne phagocytent pas les mycobactéries dans la circulation sanguine (Yang et al., 2012a) mais sont capables de phagocyter *E. coli* dans le compartiment sous-cutané (Colucci-Guyon et al., 2011). J'ai montré que dans le compartiment sous-cutané, les neutrophiles étaient également capables de phagocyter les mycobactéries.

De manière inattendue, j'ai observé que le mutant *mgtC* est plus efficacement phagocyté que la souche sauvage par les neutrophiles dans le cas d'une infection sous-cutanée. Un phénotype équivalent est observé dans différents modèles d'infection cellulaire de macrophages. Ce phénotype semble spécifique des cellules phagocytaires puisque aucune différence n'est retrouvée dans l'internalisation par des cellules épithéliales contrairement à un mutant déficient en LOS qui montre clairement une augmentation de l'internalisation par les macrophages et les cellules épithéliales. De plus, aussi bien les cinétiques de phagocytose que les infections de macrophages à 4°C, indiquent que MgtC ne joue pas un rôle dans les étapes initiales d'attachement des bactéries aux macrophages mais aurait un rôle plus tardif dans le processus d'internalisation. Enfin, des infections de macrophages menées en présence d'un inhibiteur de polymérisation de l'actine, confirment que le phénotype est associé à un processus actine dépendant.

Pour tenter d'élucider le mécanisme d'action mis en jeu chez *M. marinum*, nous sommes intéressés aux composants de la surface et de la paroi cellulaire mycobactérienne. Il a été montré que des molécules tels que les LOS, PAT/DAT, DIM et PGL étaient capables de moduler la phagocytose mycobactérienne (Astarie-Dequeker et al., 2010). La partie externe riche en glycanes de la paroi cellulaire de *M. tuberculosis* peut servir de capsule antiphagocytaire (Stokes et al., 2004). Cependant cet effet est limité par l'association de la bactérie aux macrophages contrairement à l'effet impliquant MgtC. Dans les cellules non-phagocytaires, les phénotypes distincts des mutants *mgtC* et LOS indique qu'il semble peu probable que les différences impliquent ces glycolipides. Concernant les PAT/DAT, leur présence conditionne la liaison et l'entrée de *M. tuberculosis* à la fois dans les cellules phagocytaires et non-phagocytaires, profil qui diffère encore du phénotype observé avec le mutant *mgtC* (Rousseau et al., 2003). L'analyse chromatographique par TLC des PAT/DAT des souches sauvage et du mutant *mgtC* n'a pas révélé de différence entre elles dans les conditions testées. En revanche, l'absence de DIM réduit l'internalisation de *M. tuberculosis* par les macrophages en utilisant un processus dépendant de l'actine (Astarie-Dequeker et al., 2009). Cependant, ici encore, l'analyse par TCL des DIM n'a pas permis de déceler de différence entre les souches. Finalement, l'absence de différence dans les profils de TLC pourrait être imputé aux conditions expérimentales qui ne seraient peut-être pas optimisées pour détecter des différences quantitatives de ces lipides ou d'autres molécules de surface qui pourraient être impliquées. Une autre hypothèse serait que le phénotype de prise en charge pourrait être dû à un mécanisme déclenché par des voies de signalisation de récepteurs phagocytaires et/ou par le trafic précoce sans modification notable de la surface bactérienne.

Par ailleurs, il faut noter que ce phénotype de phagocytose ne se limite pas à *M. marinum* comme le montre les résultats obtenus chez *P. aeruginosa* (voir paragraphe 2.3). Les résultats obtenus chez *M. bovis* BCG suggèrent également qu'il pourrait y avoir un phénotype similaire

chez ce pathogène (voir paragraphe 3.1.2). Cependant, le mécanisme d'action reste inconnu à ce jour mais son étude serait très bénéfique pour la compréhension globale du rôle et de la fonction précise de MgtC.

Les résultats obtenus avec le mutant *mgtC* de *M. marinum* sont schématisés dans le tableau suivant. Malgré les phénotypes observés dans l'embryon de danio, il n'y a pas d'impact sur la survie de l'embryon.

Comportement du mutant <i>mgtC</i> de <i>Mycobacterium marinum</i> par rapport à la souche sauvage	
Macrophage <i>Ex vivo</i>	Embryon de <i>Danio rerio</i> <i>In vivo</i>
Phagocytose ↗	↗ Phagocytose (Neutrophiles)
Multiplication ↘	↘ Charge bactérienne
	↘ Neutropénie
	≈ Survie de l'embryon

Tableau 4 – Comparatif des phénotypes observés pour le mutant *mgtC* de *M. marinum* par rapport à la souche sauvage dans les modèles d'infection de macrophage et d'embryon de danio.

2.3 Subversion macrophagique chez *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène extracellulaire. Pourtant, il possède une protéine MgtC dont la fonction principale est de permettre la survie intracellulaire. La protéine MgtC de *P. aeruginosa* étudiée est cependant phylogénétiquement proche de celles de pathogènes intracellulaires tels que *S. Typhimurium* ou *M. tuberculosis*. Cette proximité suggère donc une fonction potentielle commune entre ce pathogène extracellulaire et les pathogènes intracellulaires. De plus une étape intracellulaire dans les cellules épithéliales des voies aériennes pourrait avoir lieu lors de la phase aiguë de l'infection avant la formation de biofilms (caractéristique de la phase chronique de l'infection à *Pseudomonas*) (Garcia-Medina et al., 2005; Sana et al., 2012).

Bien qu'il semblerait que quelques pathogènes extracellulaires cytotoxiques peuvent survivre dans les macrophages après la phagocytose pour échapper au système immunitaire (Geiger et al., 2012), le comportement intracellulaire de ces pathogènes est peu connu.

Les travaux auxquels j'ai contribué ont permis d'identifier MgtC comme un nouvel acteur jouant un rôle dans la phase intracellulaire du pathogène extracellulaire *P. aeruginosa*, vraisemblablement en favorisant sa résistance face à l'effet bactéricide du macrophage. En ce qui me concerne j'ai essentiellement contribué à ce projet par l'étude du mécanisme mis en jeu.

La cytotoxicité de *P. aeruginosa* envers les cellules de mammifères est liée à la production d'exotoxines et de protéines effectrices injectées via le système de sécrétion de type 3 (T3SS). Un mutant T3SS a le même comportement que le mutant *mgtC* dans l'embryon de *Danio*, à savoir, une atténuation dépendante de la présence de macrophages (Brannon et al., 2009). Cependant, les phénotypes divergent dans un modèle cellulaire de macrophage. Alors que le mutant *mgtC* est sensible à l'effet bactéricide des macrophages, le mutant T3SS ne l'est pas. Nous proposons que le T3SS agisse vis-à-vis du macrophage (cytotoxicité) lorsque les bactéries sont extracellulaires alors que le rôle de *MgtC* est important lorsque les bactéries sont dans le macrophage.

Le phénotype observé du mutant *mgtC* dans les macrophages n'est pas lié à une sensibilité accrue au stress oxydatif qui est l'un des stress intramacrophagique majeur. Aucune différence n'ayant été observée vis-à-vis du stress oxydatif, nous nous sommes intéressés à un autre grand mécanisme de défense de l'hôte contre les bactéries: la baisse de pH du phagosome. C'est ce qui nous a permis de montrer que *MgtC* de *P. aeruginosa* était régulé par le pH puisque l'abaissement de pH accentue fortement l'induction de *mgtC* observée dans des conditions de carence en Mg^{2+} (paragraphe 1.2).

Des expériences préliminaires de visualisation des bactéries dans les macrophages ont montré des bactéries localisées dans les compartiments acides des cellules (colocalisation avec le marquage LAMP2). Nous n'avons pour le moment pas effectué de quantification qui nous permettrait de distinguer la souche sauvage et le mutant *mgtC* vis-à-vis de leur localisation dans le compartiment acide.

D'une façon très intéressante, l'ajout d'un inhibiteur de la V-ATPase (Bafilomycine A1), dont l'effet est de limiter l'acidification du phagosome, supprime la différence de phénotype entre la souche sauvage et le mutant *mgtC*. Les deux souches deviennent aussi sensibles l'une que l'autre à l'effet bactéricide des macrophages. On observe deux effets :

- (1) une augmentation de la sensibilité de la souche sauvage. Ceci pourrait être dû au fait que l'acidification contribue à l'expression de gènes importants pour cette étape intramacrophagique. J'ai montré que *mgtC* serait un de ces gènes car son induction est potentialisée par le pH. En cohérence avec cela, l'expression de *mgtC* dans les macrophages est diminuée après ajout de Bafilomycine.
- (2) une diminution de la sensibilité du mutant *mgtC*. Bien que, *in vitro*, le mutant *mgtC* ne semble pas être plus sensible que la souche sauvage au stress acide, *ex vivo*, l'acidification phagosomale contribue à une élimination accrue du mutant *mgtC*.

Les expériences d'infection de macrophages ont également mis en évidence un phénotype dans la phagocytose. Comme cela a été montré chez *M. marinum*, la phagocytose du mutant *mgtC* de *P. aeruginosa* est augmentée.

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence un rôle de *MgtC* dans la subversion macrophagique par *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection aiguë.

Un parallèle entre les protéines MgtC de *S. Typhimurium*, pathogène intracellulaire et *P. aeruginosa*, pathogène extracellulaire est résumé dans la figure 45. Chez *S. Typhimurium*, l'acidification phagosomale contribuerait à l'expression de la protéine MgtC via une augmentation du niveau d'ATP cytoplasmique (Lee and Groisman, 2012; Lee et al., 2013a).

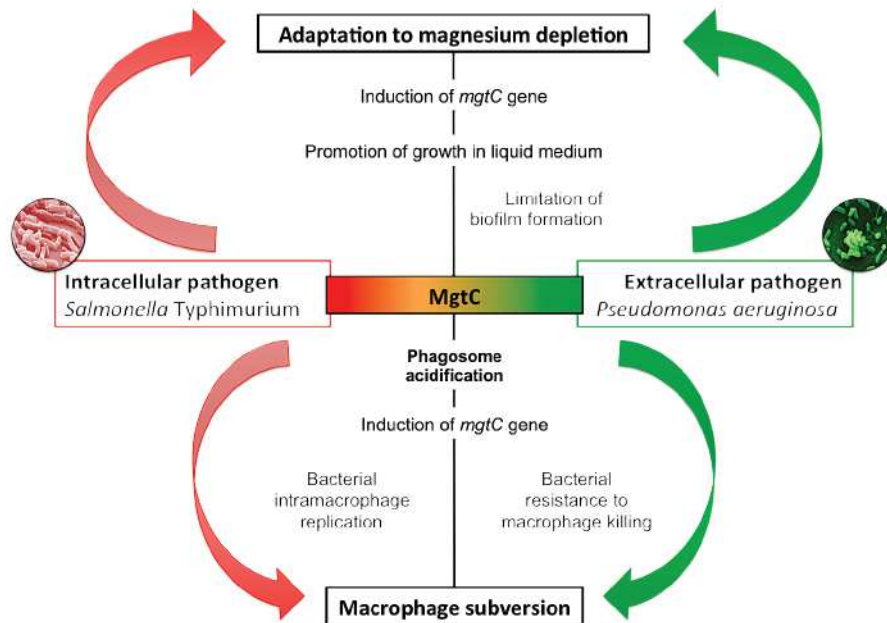


Figure 45 – Schéma comparatif de la subversion macrophagique entre pathogènes intracellulaire et extracellulaire.

3 Propriétés anti-virulence de peptides membranaires

3.1 MgtR comme potentielle molécule thérapeutique dans les infections à *P. aeruginosa* et mycobactériennes

MgtR est un peptide membranaire identifié chez *S. Typhimurium* pour réguler négativement le facteur de virulence MgtC par interaction directe, ce qui favoriserait sa dégradation par une protéase FtsH. Bien qu'aucun homologue de MgtR ne soit connu à ce jour, nous avons cherché à utiliser MgtR comme potentielle molécule antagoniste de MgtC de *P. aeruginosa* et des mycobactéries. Notre objectif était de tester les propriétés « anti-virulence » de MgtR.

3.1.1 Interactions MgtR/MgtC

Chez *S. Typhimurium* (St), le 4^{ème} domaine transmembranaire (TM4) et la boucle entre les domaines TM3 et TM4 de MgtC ont été impliqués dans l'interaction avec MgtR. De manière plus spécifique, les motifs Ala-coil présents dans MgtR et dans le domaine TM4 de MgtC, joueraient un rôle dans cette interaction.

Une analyse de l'interaction entre MgtR et MgtC de *M. tuberculosis* (MgtC Tb) a été réalisée en utilisant uniquement le domaine TM4 de MgtC (Jean-Francois et al., 2014). Nous avons évalué l'interaction *in vivo* de MgtR avec les protéines entières de *M. tuberculosis*, de *M. marinum* et de *P. aeruginosa* grâce à un système de double hybride bactérien (BACTH) (figure 46). Le peptide MgtR interagit de manière significative avec les protéines MgtC de *M. tuberculosis* et de *P. aeruginosa*. En revanche, le peptide n'interagit pas avec MgtC de *M. marinum* (MgtC Mma) ce qui est surprenant si on considère la conservation du domaine TM4 chez ce pathogène. Cela suggère que l'interaction MgtR/MgtC Tb pourrait impliquer d'autres résidus que ceux présents dans le domaine TM4. Une hypothèse alternative serait que la topologie de la protéine MgtC Mma pourrait être différente de celle de MgtC Tb et être inadaptée pour l'analyse BACTH. Aucune de ces deux hypothèses n'a été testée expérimentalement.

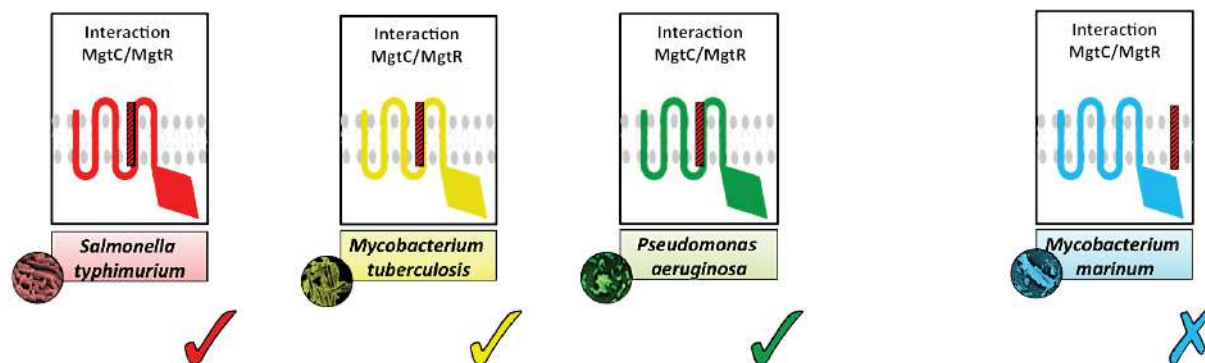


Figure 46 – Interactions MgtR/MgtC de différents pathogènes.

L'interaction de MgtR/MgtC Tb a été comparée à l'interaction MgtR/MgtC St. Bien que l'interaction MgtR/MgtC Tb soit moins forte qu'avec MgtC St, l'ampleur de l'interaction reste similaire. Cependant, les interactions moléculaires semblent différer puisque des mutations du motif Ala-coil de MgtR ont un effet mineur sur l'interaction avec MgtC Tb en comparaison avec ce qui a été décrit avec MgtC St où l'interaction est abolie par mutagenèse d'un seul résidu du motif. Ceci pourrait être imputé à la plus faible force d'interaction avec MgtC Tb. Cependant, il serait intéressant de tester l'interaction avec une triple mutagenèse du motif Ala-coil de MgtR. En effet, seules des mutagenèses simples ont été réalisées. Il est possible que malgré une interaction un peu moins forte avec MgtC Tb, le motif Ala-coil de MgtR soit nécessaire dans son intégralité pour une interaction optimale.

Par ailleurs, nos expériences de mutagenèse menées sur le motif Ala-coil de MgtC Tb ne nous permettent pas de valider l'un ou l'autre des modèles structuraux proposés pour l'interaction de MgtR avec le domaine TM4 de MgtC Tb. En effet, les interactions restent similaires en présence des deux mutations effectuées pour tester l'un et l'autre des modèles. L'hypothèse déjà émise ci dessus que d'autres domaines TM pourraient être impliqués dans l'interaction, pourrait expliquer ce résultat.

3.1.2 Expression hétérologue de MgtR chez les mycobactéries et chez *Pseudomonas aeruginosa* et effet anti-virulence

Chez *Salmonella*, l'expression de MgtC est très finement régulée et la transcription du gène *mgtC* est très importante en condition d'induction telle que la carence en magnésium. Cependant, la quantité de protéine MgtC reste faible et MgtR a donc été proposé comme un régulateur négatif important pour prévenir un excès de protéine MgtC (Alix and Blanc-Potard, 2008; Lee and Groisman, 2010). Chez *M. tuberculosis*, la transcription du gène *mgtC* en conditions d'induction reste limitée et l'expression de MgtC est plutôt basse (Yang et al., 2012b).

Mon objectif initial était d'étudier l'effet « anti-virulence » de MgtR chez la bactérie pathogène *M. marinum* et d'utiliser les modèles d'infection que j'utilisais pour l'analyse du mutant *mgtC* de *M. marinum*. Du fait de l'absence d'interaction entre MgtR et MgtC Mma dans le système BACTH, je me suis concentrée sur l'étude de MgtC Tb. J'ai utilisé pour les tests de virulence, la bactérie *M. bovis* BCG qui n'est pas le modèle le plus pertinent mais qui a régulièrement été utilisé pour décrypter certains aspects de la pathogenèse mycobactérienne. De plus, *M. bovis* BCG possède une protéine MgtC strictement identique à celle de *M. tuberculosis*. Il serait tout de même important de tester les effets chez *M. tuberculosis*. Pour simplifier, je nommerai MgtC Tb la protéine MgtC de *M. bovis* BCG.

Chez les mycobactéries, MgtC est impliqué dans la phagocytose (Belon et al., 2014) et dans la réplication intramacrophagique (Buchmeier et al., 2000). Nous avons pu montrer que la souche de *M. bovis* BCG dans laquelle MgtR a été exprimé, présente des phénotypes

similaires à ceux de mutants *mgtC* de mycobactéries. En effet, dans un modèle d'infection cellulaire de macrophage, la souche exprimant MgtR présente une diminution de la survie intramacrophagique et une augmentation de la phagocytose. Par extrapolation, la protéine MgtC de *M. tuberculosis*, qui est strictement identique à celle de *M. bovis* BCG, pourrait également être responsable d'une limitation de la phagocytose du pathogène.

Chez *S. Typhimurium*, bien que le mécanisme qui conduit à la dégradation de MgtC St reste inconnu, une modification de la conformation de MgtC St sous l'effet de l'interaction avec MgtR pourrait faciliter l'accès à une protéase FtsH. La protéine MgtC Tb ne semble pas soumise à une dégradation lors de l'expression du peptide MgtR puisque qu'aucune différence dans la quantité de protéine provenant de souches exprimant MgtR n'a été montrée par une analyse de Western blot. Cette différence pourrait être associée à la différence d'interaction moléculaire entre MgtR et MgtC St ou MgtC Tb qui pourrait induire des changements conformationnels divers.

L'effet de MgtR sur la protéine MgtC Tb n'étant pas la dégradation de la protéine, nous avons émis l'hypothèse que MgtR pourrait interférer dans des interactions de type protéine/protéine. Des expériences d'interaction utilisant le système de double hybride bactérien ont montré que MgtC Tb pouvait dimériser (Yang et al., 2012b). Dans un premier temps, nous avons essayé de réaliser des expériences de triple hybride bactérien pour évaluer l'effet de MgtR de manière endogène, mais sans succès. Nous n'avons jamais réussi à cloner les gènes *mgtR* et *mgtC* dans un même vecteur. Nous avons émis l'hypothèse que MgtR pouvait être toxique pour la bactérie dans les conditions expérimentales utilisées. Cependant, nous avons montré que l'ajout de peptide synthétique MgtR de manière exogène permettait d'interférer dans la dimérisation de MgtC Tb. Bien que l'interaction protéine-protéine soit perturbée par ajout de peptide synthétique, elle n'est pas pour autant supprimée. Des expériences préliminaires indiquent cependant que l'effet de MgtR serait dose-dépendant mais le peptide est ajouté dans le milieu à des concentrations relativement importantes et la quantité de peptide qui s'insère à la membrane pour interagir avec MgtC est inconnue.

Puisque MgtR est capable d'interférer dans la dimérisation de MgtC, il est envisageable que MgtR puisse interférer dans les interactions de MgtC avec d'autres protéines. C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'interaction de MgtC Tb avec la protéine AtpB (sous-unité de la F-ATP synthase) connue pour interagir avec MgtC St (Lee et al., 2013a). Cependant, aucune interaction n'a été détectée entre MgtC Tb et AtpB Tb dans un système de double hybride bactérien (A. Blanc-Potard). L'ATP synthase étant composée de plusieurs sous-unités, il est possible que l'interaction *in vivo* soit dépendante de la présence du complexe. Par ailleurs, des différences pourraient exister dans le (ou les) partenaire(s) interagissant avec MgtC entre les différentes espèces.

De la même manière, une souche sauvage de *P. aeruginosa* exprimant le peptide MgtR a été construite et mime les phénotypes de virulence du mutant *mgtC* de *P. aeruginosa*. En effet, la souche exprimant MgtR est atténuée dans un modèle d'infection d'embryon de danio. Dans un modèle d'infection cellulaire de macrophage, la phagocytose est augmentée tout comme l'élimination intramacrophagique. Une souche contrôle a été construite en exprimant le peptide MgtR dans le mutant *mgtC* pour évaluer si les phénotypes observés étaient dépendants de l'interaction spécifique de MgtR avec MgtC Pa. Aucun effet additionnel n'ayant été observé pour cette souche contrôle par rapport au mutant *mgtC*, cela indique que les phénotypes observés sont bien dépendants de l'interaction MgtR/MgtC Pa.

La figure 47 résume les effets « anti-virulence » par expression hétérologue de MgtR chez *M. bovis* BCG et *P. aeruginosa*.

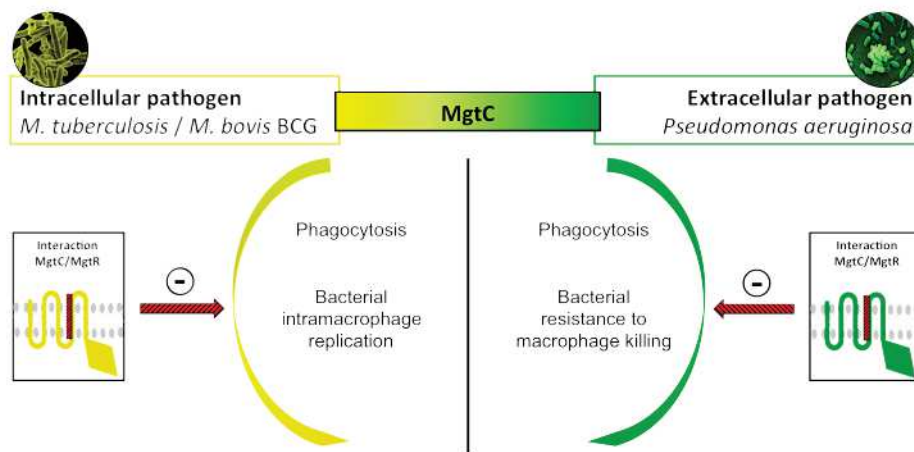


Figure 47 – Effets « anti-virulence » par expression hétérologue de MgtR chez *M. bovis* BCG et *P. aeruginosa*.

Les effets « anti-virulence » ont été observés après expression endogène de MgtR. À terme, l'objectif serait d'avoir une molécule inhibitrice ajoutée de façon exogène. Du peptide synthétique a déjà pu être utilisé dans le cadre d'expériences de BACTH mais une synthèse plus importante permettra d'effectuer des tests avec du peptide ajouté de manière exogène dans les expériences d'infection.

3.2 Applications: utilisation de peptides synthétiques comme adjuvant des traitements antibiotiques

Un des objectifs de mon travail de thèse était d'envisager MgtC comme cible thérapeutique. Un premier aspect abordé a été de mettre à profit l'interaction décrite entre MgtC et la F_1F_0 ATP synthase chez *S. Typhimurium* et la disponibilité de drogues anti-ATP synthase chez *M. tuberculosis*.

La F_1F_0 ATP synthase mycobactérienne est d'ores et déjà validée comme cible anti-tuberculeuse (Andries et al., 2005). La Bedaquiline (TMC207) est une drogue anti-

tuberculeuse membre de la classe des diarylquinolines qui cible cette enzyme et qui a spécifiquement été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) américaine pour le traitement de la tuberculose multirésistante. Malgré une efficacité prouvée, cette drogue s'accompagne de nombreux effets indésirables (Andries et al., 2005; Khan et al., 2013; Koul et al., 2007; Matteelli et al., 2010; 2012, 2013). Très récemment, une étude a présenté de nouveaux inhibiteurs sélectifs de l'ATP synthase mycobactérienne actifs contre *M. tuberculosis* et non cytotoxiques (Singh et al., 2015).

Nous avons mis à profit le mutant *mgtC* de *M. marinum* pour tester sa sensibilité à la bédaquiline par rapport à celle de la souche sauvage (collaboration avec N. Veziris INSERM U1135 – CIMI). Aucune différence n'a été observée mais il serait pertinent de répéter les expériences en condition de carence en Mg^{2+} et avec d'autres inhibiteurs sélectifs.

L'ensemble de ces données conforte notre projet de cibler le facteur de virulence MgtC puisque chez *Salmonella*, il a été montré que sa fonction était de réguler négativement cette ATP synthase bactérienne (sous réserve que chez les mycobactéries et chez *Pseudomonas*, MgtC interagisse aussi avec l'ATP synthase).

Les deux approches ont pour conséquence la perturbation de l'homéostasie de l'ATP mais la stratégie que nous proposons diffère de celle décrite pour l'inhibiteur. Alors que les molécules inhibent l'ATP synthase mycobactérienne, nous voulons au contraire bloquer la régulation négative de l'ATP synthase en inhibant MgtC par des antagonistes naturels à large spectre d'action.

De plus, malgré le fait que les peptides hydrophobes soient particulièrement difficiles à manipuler, l'ensemble des résultats obtenus, à la fois chez *P. aeruginosa* et chez les mycobactéries, est une preuve supplémentaire de la pertinence dans le choix de MgtC en tant que nouvelle cible thérapeutique dans le cadre d'une stratégie anti-virulence et le criblage d'autres molécules pourrait fournir des inhibiteurs potentiels plus simples à manipuler. De manière générale, certains obstacles s'opposent encore à l'utilisation de peptides anti-microbiens comme molécule thérapeutique. Tout d'abord, ces peptides, qui ont une demi-vie courte *in vivo*, pourraient perdre leur activité dans des conditions physiologiques. Ensuite, ils ont généralement une taille supérieure à celle des antibiotiques classiques. Enfin, leur hydrophobicité (Ryan et al., 2013) est un phénomène qui pourrait entraver les applications cliniques. Malgré tout, des stratégies sont mises en oeuvre pour générer des peptides avec de meilleures activités anti-microbiennes et surmonter ces obstacles (Teng et al., 2015; Wan et al., 2013).

Dans la lutte contre la tuberculose, la combinaison de drogues anti-mycobactériennes avec des peptides anti-mycobactériens permet de prévenir la résistance aux drogues et d'augmenter l'action bactéricide (Devocelle, 2012; Li et al., 2012; Yan et al., 2013). Bien que ces stratégies soient récentes, l'utilisation de peptides synthétiques comme adjuvant des traitements antibiotiques semble être très prometteuse.

V CONCLUSION



Une conclusion, c'est quand vous en avez assez de penser.

H. A. L. Fisher

À l'heure actuelle, parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques développées pour contrer l'émergence et la propagation des résistances aux antibiotiques, certaines ont pour but de cibler la virulence bactérienne. Pour cela, deux aspects doivent être envisagés, d'une part, trouver une cible pertinente, d'autre part, développer des molécules thérapeutiques efficaces.

Mes travaux de thèse reposent sur cette approche innovante. En effet, je me suis intéressée au facteur de virulence MgtC afin de valider cette protéine comme cible potentielle dans le cadre d'une stratégie anti-virulence. Pour cela, j'ai étudié le rôle et la régulation de MgtC chez des pathogènes majeurs, les mycobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.

MgtC est impliqué dans la survie intramacrophagique de nombreux pathogènes intracellulaires. Chez *Salmonella* l'expression de la protéine MgtC est très finement régulée. L'aspect fondamental de mes recherches m'a permis de mettre en évidence un nouveau rôle de MgtC dans la phagocytose. J'ai également contribué à une étude sur le rôle de MgtC chez un pathogène extracellulaire, *P. aeruginosa*. Dans cette étude, j'ai abordé la régulation de MgtC dans les macrophages et cherché à décrypter la contribution intracellulaire de MgtC. L'ensemble des résultats obtenus a permis de découvrir un rôle non suspecté de MgtC à une étape précoce de l'infection macrophagique et de montrer que, d'une façon inattendue, MgtC joue un rôle lors d'une étape intramacrophagique chez *P. aeruginosa*. Ces travaux constituent donc une avancée dans la compréhension des fonctions de virulence impliquant MgtC.

Une seconde partie de mon travail de thèse repose sur l'étude d'un peptide naturel antagoniste de MgtC. Il s'agit de MgtR dont j'ai évalué les potentialités anti-virulence chez les mycobactéries et *P. aeruginosa*. Des résultats très prometteurs ont été obtenus avec la mise en évidence de propriétés « anti-virulence » du peptide MgtR, dont l'expression mime les phénotypes observés suite à l'inactivation du gène *mgtC*. Cependant, les expériences ont été réalisées en utilisant du peptide exprimé de manière endogène par les bactéries et l'objectif futur est d'avoir une molécule exogène efficace. Malgré les contraintes techniques qu'entraînerait l'utilisation exogène de ce type de molécule, les résultats obtenus confirment le choix de cibler le facteur de virulence MgtC et nous encouragent à envisager d'utiliser MgtR ou d'autres molécules inhibitrices de MgtC pour développer de nouvelles molécules thérapeutiques.

VI BIBLIOGRAPHIE



A

Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J.M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., and Winter, N. (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106, 1843–1850.

Alegado, R.A., Chin, C.-Y., Monack, D.M., and Tan, M.-W. (2011). The two-component sensor kinase KdpD is required for *Salmonella typhimurium* colonization of *Caenorhabditis elegans* and survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* 13, 1618–1637.

Alibaud, L., Pawelczyk, J., Gannoun-Zaki, L., Singh, V.K., Rombouts, Y., Drancourt, M., Dziadek, J., Guérardel, Y., and Kremer, L. (2014). Increased phagocytosis of *Mycobacterium marinum* mutants defective in lipooligosaccharide production. *J. Biol. Chem.* 289, 215–228.

Alix, E., and Blanc-Potard, A.-B. (2007). MgtC: a key player in intramacrophage survival. *Trends Microbiol.* 15, 252–256.

Alix, E., and Blanc-Potard, A.-B. (2008). Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. *EMBO J.* 27, 546–557.

Alix, E., and Blanc-Potard, A.-B. (2009). Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol. Microbiol.* 72, 5–11.

Alix, E., Godreuil, S., and Blanc-Potard, A.-B. (2006). Identification of a Haarlem genotype-specific single nucleotide polymorphism in the *mgtC* virulence gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2093–2098.

Allen, R.C., Popat, R., Diggle, S.P., and Brown, S.P. (2014). Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 300–308.

Amiel, E., Lovewell, R.R., O'Toole, G.A., Hogan, D.A., and Berwin, B. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. *Infect. Immun.* 78, 2937–2945.

Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H.W.H., Neefs, J.-M., Winkler, H., Gestel, J.V., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., et al. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 307, 223–227.

Appelberg, R. (2006). Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1117–1128.

Arnoulet, C., and Sebahoun, G. (2005). Neutropénie. In *Hématologie Clinique et Biologique*, (Sebahoun), pp. 135–139.

Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F.-K., Chalut, C., Lopez, A., and Guilhot, C. (2009). Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog* 5, e1000289.

Astarie-Dequeker, C., Nigou, J., Passemar, C., and Guilhot, C. (2010). The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 7, e33–e41.

B

Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le Moual, H., and Miller, S.I. (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 122, 461–472.

Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2006). ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends Biochem. Sci.* 31, 647–653.

- Barczak, A.K., and Hung, D.T. (2009). Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 490–496.
- Belon, C., Gannoun-Zaki, L., Lutfalla, G., Kremer, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2014). *Mycobacterium marinum* MgtC plays a role in phagocytosis but is dispensable for intracellular multiplication. *PLoS ONE* 9, e116052.
- Bernut, A., Hermann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014). *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E943–E952.
- Berón, W., Alvarez-Dominguez, C., Mayorga, L., and Stahl, P.D. (1995). Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol.* 5, 100–104.
- Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., et al. (2011). Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Crit. Care Med.* 39, 2113–2120.
- Bittar, F., Richet, H., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., Stremler, N., Sarles, J., Raoult, D., and Rolain, J.-M. (2008). Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS ONE* 3, e2908.
- Blanc-Potard, A.-B., and Groisman, E.A. (1997). The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 16, 5376–5385.
- Blanc-Potard, A.-B., and Lafay, B. (2003). MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J. Mol. Evol.* 57, 479–486.
- Blanc-Potard, A.-B., Solomon, F., Kayser, J., and Groisman, E.A. (1999). The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 181, 998–1004.
- Bold, T.D., and Ernst, J.D. (2009). Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? *Cell* 136, 17–19.
- Borregaard, N., Sørensen, O.E., and Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28, 340–345.
- Botella, H., Stadthagen, G., Lugo-Villarino, G., de Chastellier, C., and Neyrolles, O. (2012). Metallobiology of host–pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol.* 20, 106–112.
- Brannon, M.K., Davis, J.M., Mathias, J.R., Hall, C.J., Emerson, J.C., Crosier, P.S., Huttenlocher, A., Ramakrishnan, L., and Moskowitz, S.M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cell. Microbiol.* 11, 755–768.
- Brennan, P.J., and Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., et al. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3684–3689.
- Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrh, S., Piddington, D., Riley, L., and Groisman, E.A. (2000). A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 35, 1375–1382.
- Buddenkotte, J., Stroh, C., Engels, I.H., Moormann, C., Shpacovitch, V.M., Seeliger, S., Vergnolle, N., Vestweber, D., Luger, T.A., Schulze-Osthoff, K., et al. (2005). Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J. Invest. Dermatol.* 124, 38–45.

C

- Cegelski, L., Marshall, G.R., Eldridge, G.R., and Hultgren, S.J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 17–27.
- Chan, J., Fan, X.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J., and Bloom, B.R. (1991). Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 59, 1755–1761.
- Chen, null, Langer, null, and Edwards, null (1997). A film tension theory of phagocytosis. *J. Colloid Interface Sci.* 190, 118–133.
- Cho, U.S., Bader, M.W., Amaya, M.F., Daley, M.E., Klevit, R.E., Miller, S.I., and Xu, W. (2006). Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J. Mol. Biol.* 356, 1193–1206.
- Choi, E., Lee, K.-Y., and Shin, D. (2012). The MgtR regulatory peptide negatively controls expression of the MgtA Mg²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 318–323.
- Chua, J., and Deretic, V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. *J. Biol. Chem.* 279, 36982–36992.
- Clatworthy, A.E., Lee, J.S.-W., Leibman, M., Kostun, Z., Davidson, A.J., and Hung, D.T. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect. Immun.* 77, 1293–1303.
- Clay, H., Davis, J.M., Beery, D., Huttenlocher, A., Lyons, S.E., and Ramakrishnan, L. (2007). Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe* 2, 29–39.
- Clemens, D.L., and Horwitz, M.A. (1996). The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J. Exp. Med.* 184, 1349–1355.
- Coggan, K.A., and Wolfgang, M.C. (2012). Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr. Issues Mol. Biol.* 14, 47–70.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544.
- Collins, C.A., De Maziere, A., van Dijk, S., Carlsson, F., Klumperman, J., and Brown, E.J. (2009). Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. *PLoS Pathog.* 5, e1000430.
- Colucci-Guyon, E., Tinevez, J.-Y., Renshaw, S.A., and Herbomel, P. (2011). Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J. Cell Sci.* 124, 3053–3059.
- Corleis, B., Korb, D., Wilson, R., Bylund, J., Chee, R., and Schaible, U.E. (2012). Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cell. Microbiol.* 14, 1109–1121.
- Coutinho, H.D.M., Falcão-Silva, V.S., and Gonçalves, G.F. (2008). Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *Int. Arch. Med.* 1, 24.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R. (1999). Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402, 79–83.

Cruz, A., Fraga, A.G., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Torrado, E., Saraiva, M., Pereira, D.R., Randall, T.D., Pedrosa, J., Cooper, A.M., et al. (2010). Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 207, 1609–1616.

Cystic Fibrosis Foundation (2011). Patient Registry 2011 Annual Report (Bethesda, MD, USA: Cystic Fibrosis Foundation).

D

Daffé, M., and Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203.

Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog.* 7, e1002093.

Datta, A.B., Roy, S., and Parrack, P. (2005). Role of C-terminal residues in oligomerization and stability of lambda CII: implications for lysis-lysogeny decision of the phage. *J. Mol. Biol.* 345, 315–324.

Davey, M.S., Tamassia, N., Rossato, M., Bazzoni, F., Calzetti, F., Bruderek, K., Sironi, M., Zimmer, L., Bottazzi, B., Mantovani, A., et al. (2011). Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. *Nat. Immunol.* 12, 1017–1018.

Davis, J.M., and Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 136, 37–49.

Davis, J.M., Clay, H., Lewis, J.L., Ghori, N., Herbomel, P., and Ramakrishnan, L. (2002). Real-time visualization of *Mycobacterium*-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* 17, 693–702.

Devocelle, M. (2012). Targeted antimicrobial peptides. *Front. Immunol.* 3.

Devulder, G., Montclos, M.P. de, and Flandrois, J.P. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 293–302.

Domenech, P., Reed, M.B., and Barry, C.E. (2005). Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* 73, 3492–3501.

Döring, G., Flume, P., Heijerman, H., and Elborn, J.S. (2012). Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. *J. Cyst. Fibros.* 11, 461–479.

Dougan, D.A., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K., and Bukau, B. (2002). AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett.* 529, 6–10.

Dulon, S., Leduc, D., Cottrell, G.S., D'Alayer, J., Hansen, K.K., Bunnett, N.W., Hollenberg, M.D., Pidard, D., and Chignard, M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 411–419.

Dunn, P.L., and North, R.J. (1995). Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect. Immun.* 63, 3428–3437.

E

Engel, J., and Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 61–66.

Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J.C.D. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 47, 103–118.

F

Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832.

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

Fialkow, L., Wang, Y., and Downey, G.P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 153–164.

Fine, M., Smith, M., Carson, C., Mutha, S., Sankey, S., Weissfeld, L., and Kapoor, W. (1996). Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia: A meta-analysis. *JAMA* 275, 134–141.

Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 61–98.

Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H.K., Ciofu, O., Høiby, N., and Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 841–851.

Fortier, A., Min-Oo, G., Forbes, J., Lam-Yuk-Tseung, S., and Gros, P. (2005). Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. *J. Leukoc. Biol.* 77, 868–877.

Fratti, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.* 154, 631–644.

Freeman, Z.N., Dorus, S., and Waterfield, N.R. (2013). The KdpD/KdpE two-component system: integrating K⁺ homeostasis and virulence. *PLoS Pathog.* 9, e1003201.

Froschauer, E.M., Kolisek, M., Dieterich, F., Schweigel, M., and Schweyen, R.J. (2004). Fluorescence measurements of free [Mg²⁺] by use of mag-fura 2 in *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 49–55.

Frymier, J.S., Reed, T.D., Fletcher, S.A., and Csonka, L.N. (1997). Characterization of transcriptional regulation of the *kdp* operon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 179, 3061–3063.

Fu, L.M. (2003). The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 7, 1027–1032.

G

Gagneux, S., and Small, P.M. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect. Dis.* 7, 328–337.

Gannoun-Zaki, L., Alibaud, L., Carrère-Kremer, S., Kremer, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2013). Overexpression of the KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology. *PLoS ONE* 8, e60379.

- Gao, L.-Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N., and Brown, E.J. (2004). A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol. Microbiol.* 53, 1677–1693.
- García-Contreras, R., Martínez-Vázquez, M., Guadarrama, N.V., Pañeda, A.G.V., Hashimoto, T., Maeda, T., Quezada, H., and Wood, T.K. (2013). Resistance to the quorum-quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Pathog. Dis.* 68, 8–11.
- Garcia-Medina, R., Dunne, W.M., Singh, P.K., and Brody, S.L. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infect. Immun.* 73, 8298–8305.
- Gaßel, M., Möllenkamp, T., Puppe, W., and Altendorf, K. (1999). The KdpF subunit is part of the K⁺-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 274, 37901–37907.
- Gastebois, A., Potard, A.-B.B., Gribaldo, S., Beau, R., Latgé, J.P., and Mouyna, I. (2011). Phylogenetic and functional analysis of *Aspergillus fumigatus* MgtC, a fungal protein homologous to a bacterial virulence factor. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4700–4703.
- Geiger, T., Francois, P., Liebeke, M., Fraunholz, M., Goerke, C., Krismer, B., Schrenzel, J., Lalk, M., and Wolz, C. (2012). The stringent response of *Staphylococcus aureus* and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. *PLoS Pathog.* 8, e1003016.
- Gennaro, R., and Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 31–49.
- Gilljam, M., Scherstén, H., Silverborn, M., Jönsson, B., and Ericsson Hollsing, A. (2010). Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and *Mycobacterium abscessus* infection. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 9, 272–276.
- Gokhale, R.S., Saxena, P., Chopra, T., and Mohanty, D. (2007). Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids. *Nat. Prod. Rep.* 24, 267–277.
- Gordon, S.V., Bottai, D., Simeone, R., Stinear, T.P., and Brosch, R. (2009). Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants. *BioEssays* 31, 378–388.
- Grabenstein, J.P., Fukuto, H.S., Palmer, L.E., and Bliska, J.B. (2006). Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. *Infect. Immun.* 74, 3727–3741.
- Greie, J.-C. (2011). The KdpFABC complex from *Escherichia coli*: A chimeric K⁺ transporter merging ion pumps with ion channels. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 705–710.
- Greie, J.-C., and Altendorf, K. (2007). The K⁺-translocating KdpFABC complex from *Escherichia coli*: A P-type ATPase with unique features. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 397–402.
- Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Nasser Eddine, A., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., et al. (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J. Clin. Invest.* 115, 2472–2479.
- Guirado, E., Schlesinger, L.S., and Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin. Immunopathol.* 35, 563–583.
- Günzel, D., Kucharski, L.M., Kehres, D.G., Romero, M.F., and Maguire, M.E. (2006). The MgtC virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Bacteriol.* 188, 5586–5594.

H

Hagedorn, M., Rohde, K.H., Russell, D.G., and Soldati, T. (2009). Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* 323, 1729–1733.

ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., and Khedher, M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 69, 393–403.

Hamann, K., Zimmann, P., and Altendorf, K. (2008). Reduction of turgor is not the stimulus for the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 2360–2367.

Hauser, A.R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 654–665.

Hemm, M.R., Paul, B.J., Schneider, T.D., Storz, G., and Rudd, K.E. (2008). Small membrane proteins found by comparative genomics and ribosome binding site models. *Mol. Microbiol.* 70, 1487–1501.

Hemm, M.R., Paul, B.J., Miranda-Ríos, J., Zhang, A., Soltanzad, N., and Storz, G. (2010). Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *J. Bacteriol.* 192, 46–58.

Hobbs, E.C., Astarita, J.L., and Storz, G. (2010). Small RNAs and small proteins involved in resistance to cell envelope stress and acid shock in *Escherichia coli*: analysis of a bar-coded mutant collection. *J. Bacteriol.* 192, 59–67.

Hogardt, M., and Heesemann, J. (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 557–562.

Højby, N., Ciofu, O., and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 5, 1663–1674.

Hoshino, Y., Hoshino, S., Gold, J.A., Raju, B., Prabhakar, S., Pine, R., Rom, W.N., Nakata, K., and Weiden, M. (2007). Mechanisms of polymorphonuclear neutrophil-mediated induction of HIV-1 replication in macrophages during pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 195, 1303–1310.

Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2006). Two peptide sequences can function cooperatively to facilitate binding and unfolding by ClpA and degradation by ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 909–914.

Houben, D., Demangel, C., van Ingen, J., Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., Caleechurn, L., Bottai, D., van Zon, M., de Punder, K., et al. (2012). ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell. Microbiol.* 14, 1287–1298.

Hu, J., Qin, H., Li, C., Sharma, M., Cross, T.A., and Gao, F.P. (2007). Structural biology of transmembrane domains: efficient production and characterization of transmembrane peptides by NMR. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 16, 2153–2165.

Hung, D.T., Shakhnovich, E.A., Pierson, E., and Mekalanos, J.J. (2005). Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670–674.

Hunt, T.A., Kooi, C., Sokol, P.A., and Valvano, M.A. (2004). Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival *in vivo*. *Infect. Immun.* 72, 4010–4022.

I

Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessi eres, P., Bolotin, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2007). A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiol. Read. Engl.* 153, 3631–3644.

Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 211–231.

J

Jain, K., and Smyth, A.R. (2012). Current dilemmas in antimicrobial therapy in cystic fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 6, 407–422.

Jankowski, A., and Grinstein, S. (2002). Modulation of the cytosolic and phagosomal pH by the NADPH oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 61–68.

Jankowski, A., Scott, C.C., and Grinstein, S. (2002). Determinants of the phagosomal pH in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 277, 6059–6066.

Jean-Francois, F.L., Dai, J., Yu, L., Myrick, A., Rubin, E., Fajer, P.G., Song, L., Zhou, H.-X., and Cross, T.A. (2014). Binding of MgtR, a *Salmonella* transmembrane regulatory peptide, to MgtC, a *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor: a structural study. *J. Mol. Biol.* 426, 436–446.

K

Kaisho, T., and Akira, S. (2000). Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit. Rev. Immunol.* 20, 393–405.

Kan-Sutton, C., Jagannath, C., and Hunter, R.L. (2009). Trehalose 6,6'-dimycolate on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 11, 40–48.

Khan, S.R., Singh, S., Roy, K.K., Akhtar, M.S., Saxena, A.K., and Krishnan, M.Y. (2013). Biological evaluation of novel substituted chloroquinolines targeting mycobacterial ATP synthase. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41, 41–46.

Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 781–795.

Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., and Liautard, J.-P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15711–15716.

Koul, A., Dendouga, N., Vergauwen, K., Molenberghs, B., Vranckx, L., Willebrords, R., Ristic, Z., Lill, H., Dorange, I., Guillemont, J., et al. (2007). Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nat. Chem. Biol.* 3, 323–324.

Kreda, S.M., Davis, C.W., and Rose, M.C. (2012). CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.

Krieg, D.P., Helmke, R.J., German, V.F., and Mangos, J.A. (1988). Resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to nonopsonic phagocytosis by alveolar macrophages in vitro. *Infect. Immun.* 56, 3173–3179.

L

Lavigne, J.-P., O'Callaghan, D., and Blanc-Potard, A.-B. (2005). Requirement of MgtC for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment. *Infect. Immun.* 73, 3160–3163.

Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R., and Monack, D.M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2, e11.

Lawrence, J.G., and Ochman, H. (2002). Reconciling the many faces of lateral gene transfer. *Trends Microbiol.* 10, 1–4.

- Lee, E.-J., and Groisman, E.A. (2010). An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. *Mol. Microbiol.* 76, 1020–1033.
- Lee, E.-J., and Groisman, E.A. (2012). Control of a *Salmonella* virulence locus by an ATP-sensing leader messenger RNA. *Nature* 486, 271–275.
- Lee, E.-J., Pontes, M.H., and Groisman, E.A. (2013a). A bacterial virulence protein promotes pathogenicity by inhibiting the bacterium's own F₁F_o ATP synthase. *Cell* 154, 146–156.
- Lee, W., VanderVen, B.C., Fahey, R.J., and Russell, D.G. (2013b). Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* exploits host-derived fatty acids to limit metabolic stress. *J. Biol. Chem.* 288, 6788–6800.
- Leto, T.L., and Geiszt, M. (2006). Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1549–1561.
- Leung, J.M., and Olivier, K.N. (2013). Nontuberculous mycobacteria: the changing epidemiology and treatment challenges in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 19, 662–669.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., and Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37, 207–215.
- Lippa, A.M., and Goulian, M. (2009). Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* 5, e1000788.
- López, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., Barrera, L., Kremer, K., Hernandez-Pando, R., Huygen, K., et al. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 30–37.
- Lovewell, R.R., Collins, R.M., Acker, J.L., O'Toole, G.A., Wargo, M.J., and Berwin, B. (2011). Step-wise loss of bacterial flagellar torsion confers progressive phagocytic evasion. *PLoS Pathog.* 7, e1002253.
- Lovewell, R.R., Patankar, Y.R., and Berwin, B. (2014). Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 306, L591–L603.
- Lowe, D.M., Redford, P.S., Wilkinson, R.J., O'Garra, A., and Martineau, A.R. (2012). Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol.* 33, 14–25.
- Lukacs, G.L., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. (1990). Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H⁺-ATPase in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 265, 21099–21107.
- Lukacs, G.L., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. (1991). Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H⁺-ATPase activity, counterion conductance, and H⁺ "leak." *J. Biol. Chem.* 266, 24540–24548.
- Luong, M.-L., Morrissey, O., and Husain, S. (2010). Assessment of infection risks prior to lung transplantation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23, 578–583.
- Luzar, M.A., Thomassen, M.J., and Montie, T.C. (1985). Flagella and motility alterations in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: relationship to patient clinical condition. *Infect. Immun.* 50, 577–582.
- Lyons, M.J., Yoshimura, T., and McMurray, D.N. (2004). Interleukin (IL)-8 (CXCL8) induces cytokine expression and superoxide formation by guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 84, 283–292.

M

Maeda, T., García-Contreras, R., Pu, M., Sheng, L., García, L.R., Tomás, M., and Wood, T.K. (2012). Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME J.* 6, 493–501.

Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S., and Hornig, D.H. (2007). Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br. J. Nutr.* 98 Suppl 1, S29–S35.

Maloney, K.E., and Valvano, M.A. (2006). The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in macrophages. *Infect. Immun.* 74, 5477–5486.

Manca, C., Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J.M., Barry, C.E., Freedman, V.H., and Kaplan, G. (2001). Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5752–5757.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531.

Martineau, A.R., Newton, S.M., Wilkinson, K.A., Kampmann, B., Hall, B.M., Nawroly, N., Packe, G.E., Davidson, R.N., Griffiths, C.J., and Wilkinson, R.J. (2007). Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J. Clin. Invest.* 117, 1988–1994.

Martin-Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M.L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., Finlay, B.B., Gros, P., and Grinstein, S. (2006). Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol. Biol. Cell* 17, 498–510.

Matteelli, A., Carvalho, A.C., Dooley, K.E., and Kritski, A. (2010). TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. *Future Microbiol.* 5, 849–858.

Mattila, J.T., and Thomas, A.C. (2014). Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.* 5.

McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., and Hancock, R.E.W. (2006). Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 3995–4006.

Meijer, A.H., van der Vaart, M., and Spaik, H.P. (2014). Real-time imaging and genetic dissection of host–microbe interactions in zebrafish. *Cell. Microbiol.* 16, 39–49.

Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. (1989). A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5054–5058.

Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S., and Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell. Microbiol.* 14, 95–106.

Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 210, 1283–1299.

Moncrief, M.B.C., and Maguire, M.E. (1998). Magnesium and the role of *mgtC* in growth of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 66, 3802–3809.

Moraes, T.J., Martin, R., Plumb, J.D., Vachon, E., Cameron, C.M., Danesh, A., Kelvin, D.J., Ruf, W., and Downey, G.P. (2008). Role of PAR2 in murine pulmonary pseudomonal infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L368–L377.

Myrvik, Q.N., Leake, E.S., and Wright, M.J. (1984). Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129, 322–328.

N

Nandi, B., and Behar, S.M. (2011). Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* 208, 2251–2262.

Narasimhan, M., and Cohen, R. (2011). New and investigational treatments in cystic fibrosis. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 5, 275–282.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.

Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2012). *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 810–818.

Nguyen, L., and Pieters, J. (2005). The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 15, 269–276.

Nordenfelt, P., and Tapper, H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 271–284.

Nourshargh, S., Hordijk, P.L., and Sixt, M. (2010). Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 366–378.

Nunes, P., Demaurex, N., and Dinayer, M.C. (2013). Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic* 14, 1118–1131.

O

Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. (2006). An AAA protease FtsH can initiate proteolysis from internal sites of a model substrate, apo-flavodoxin. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 11, 261–268.

Oliver, A.M., and Weir, D.M. (1985). The effect of *Pseudomonas* alginate on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. *Clin. Exp. Immunol.* 59, 190–196.

P

Palmer, K.L., Mashburn, L.M., Singh, P.K., and Whiteley, M. (2005). Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa*. *Physiology. J. Bacteriol.* 187, 5267–5277.

Parish, T., Smith, D.A., Kendall, S., Casali, N., Bancroft, G.J., and Stoker, N.G. (2003). Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 71, 1134–1140.

Peyron, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., Daffé, M., Emile, J.-F., Marchou, B., Cardona, P.-J., et al. (2008). Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 4, e1000204.

Pieters, J. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* 3, 399–407.

Pitt, A., Mayorga, L.S., Stahl, P.D., and Schwartz, A.L. (1992). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J. Clin. Invest.* 90, 1978–1983.

Pozos, T.C., and Ramakrishnan, L. (2004). New models for the study of *Mycobacterium*-host interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 499–505.

Prost, L.R., Daley, M.E., Le Sage, V., Bader, M.W., Le Moual, H., Klevit, R.E., and Miller, S.I. (2007). Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Mol. Cell* 26, 165–174.

R

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.

Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 352–366.

Rang, C., Alix, E., Felix, C., Heitz, A., Tasse, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2007). Dual role of the MgtC virulence factor in host and non-host environments. *Mol. Microbiol.* 63, 605–622.

Rasko, D.A., and Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 117–128.

Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li, D.R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., et al. (2008). Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* 321, 1078–1080.

Ratjen, F.A. (2009). Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir. Care* 54, 595–605.

Ratjen, F., Munck, A., Kho, P., and Angyalosi, G. (2010). Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial. *Thorax* 65, 286–291.

Rau, M.H., Hansen, S.K., Johansen, H.K., Thomsen, L.E., Workman, C.T., Nielsen, K.F., Jelsbak, L., Høiby, N., Yang, L., and Molin, S. (2010). Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environ. Microbiol.* 12, 1643–1658.

Reiner, N.E. (1994). Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol. Today* 15, 374–381.

Ren, H., Dover, L.G., Islam, S.T., Alexander, D.C., Chen, J.M., Besra, G.S., and Liu, J. (2007). Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Mol. Microbiol.* 63, 1345–1359.

Renshaw, S.A., Loynes, C.A., Trushell, D.M.I., Elworthy, S., Ingham, P.W., and Whyte, M.K.B. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 108, 3976–3978.

Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., and Mora, G.C. (2009). Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *PLoS ONE* 4, e5551.

Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T.X., Look, A.T., and Kanki, J.P. (2005). Interplay of *pu.1* and *gata1* determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev. Cell* 8, 97–108.

Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., Macheras, E., Heym, B., Herrmann, J.-L., Daffé, M., et al. (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS ONE* 4.

Roberts, T., Beyers, N., Aguirre, A., and Walzl, G. (2007). Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- γ production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- β , and interleukin-4 mRNA levels. *J. Infect. Dis.* 195, 870–878.

Roth, M.G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol. Rev.* 84, 699–730.

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

Roux, A.-L., Catherinot, E., Ripoll, F., Soismier, N., Macheras, E., Ravilly, S., Bellis, G., Vibet, M.-A., Roux, E.L., Lemonnier, L., et al. (2009). Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J. Clin. Microbiol.* 47, 4124–4128.

Rubin, E.J. (2009). The granuloma in tuberculosis — friend or foe? *N. Engl. J. Med.* 360, 2471–2473.

Russell, D.G. (2011). The galvanizing of *Mycobacterium tuberculosis*: an antimicrobial mechanism. *Cell Host Microbe* 10, 181–183.

Russell, D.G., Dant, J., and Sturgill-Koszycki, S. (1996). *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J. Immunol.* 156, 4764–4773.

Ryan, G., Singh, M., and Dwan, K. (2011). Inhaled antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001021.

Ryan, L., Lamarre, B., Diu, T., Ravi, J., Judge, P.J., Temple, A., Carr, M., Cerasoli, E., Su, B., Jenkinson, H.F., et al. (2013). Anti-antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 288, 20162–20172.

Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D.J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 644–648.

S

Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., and Blevess, S. (2012). The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 287, 27095–27105.

van der Sar, A.M., Abdallah, A.M., Sparrius, M., Reinders, E., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Bitter, W. (2004). *Mycobacterium marinum* strains can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence. *Infect. Immun.* 72, 6306–6312.

Sawicki, G.S., Signorovitch, J.E., Zhang, J., Latremouille-Viau, D., von Wartburg, M., Wu, E.Q., and Shi, L. (2012). Reduced mortality in cystic fibrosis patients treated with tobramycin inhalation solution. *Pediatr. Pulmonol.* 47, 44–52.

Scandurra, G.M., Britton, W.J., and Triccas, J.A. (2008). Inactivation of the *Mycobacterium tuberculosis* *fadB4* gene results in increased virulence in host cell and mice. *Microbes Infect.* 10, 38–44.

Schapiro, J.M., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2003). Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8496–8501.

Schelstraete, P., Haerynck, F., Van dale Sabine, Deseyne, S., and De Baets, F. (2013). Eradication therapy for *Pseudomonas aeruginosa* colonization episodes in cystic fibrosis patients not chronically colonized by *P. aeruginosa*. *J. Cyst. Fibros.* 12, 1–8.

Schlesinger, L.S., and Horwitz, M.A. (1991). Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1031–1038.

Schneider, D., Finger, C., Prodöhl, A., and Volkmer, T. (2007). From interactions of single transmembrane helices to folding of alpha-helical membrane proteins: analyzing transmembrane helix-helix interactions in bacteria. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8, 45–61.

Schobert, M., and Jahn, D. (2010). Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 549–556.

- Seddon, P., Fidler, K., Raman, S., Wyatt, H., Ruiz, G., Elston, C., Perrin, F., Gyi, K., Bilton, D., Drobniewski, F., et al. (2013). Prevalence of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis clinics, United Kingdom, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1128–1130.
- Shafeeq, S., Yesilkaya, H., Kloosterman, T.G., Narayanan, G., Wandel, M., Andrew, P.W., Kuipers, O.P., and Morrissey, J.A. (2011). The *cop* operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 81, 1255–1270.
- Shigenaga, T., Dannenberg, A.M., Lowrie, D.B., Said, W., Urist, M.J., Abbey, H., Schofield, B.H., Mounts, P., and Sugisaki, K. (2001). Immune responses in tuberculosis: antibodies and CD4-CD8 lymphocytes with vascular adhesion molecules and cytokines (chemokines) cause a rapid antigen-specific cell infiltration at sites of bacillus Calmette-Guérin reinfection. *Immunology* 102, 466–479.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 652–680.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* 8, e1002507.
- Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M.L., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015). Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence *in vivo*. *PLoS Pathog* 11, e1004650.
- Singh, S., Roy, K.K., Khan, S.R., Kashyap, V.K., Sharma, A., Jaiswal, S., Sharma, S.K., Krishnan, M.Y., Chaturvedi, V., Lal, J., et al. (2015). Novel, potent, orally bioavailable and selective mycobacterial ATP synthase inhibitors that demonstrated activity against both replicating and non-replicating *M. tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 742–752.
- Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 463–496.
- Smith, L.M., and May, R.C. (2013). Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 475–490.
- Smith, R.L., and Maguire, M.E. (1998). Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol. Microbiol.* 28, 217–226.
- Smith, J., Manoranjan, J., Pan, M., Bohsali, A., Xu, J., Liu, J., McDonald, K.L., Szyk, A., LaRonde-LeBlanc, N., and Gao, L.-Y. (2008). Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect. Immun.* 76, 5478–5487.
- Smith, M.A., Coinçon, M., Paschos, A., Jolicoeur, B., Lavallée, P., Sygusch, J., and Baron, C. (2012). Identification of the binding site of *Brucella* VirB8 interaction inhibitors. *Chem. Biol.* 19, 1041–1048.
- Snively, M.D., Florer, J.B., Miller, C.G., and Maguire, M.E. (1989). Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: expression of cloned genes for three distinct Mg²⁺ transport systems. *J. Bacteriol.* 171, 4752–4760.
- Snively, M.D., Miller, C.G., and Maguire, M.E. (1991). The *mgtB* Mg²⁺ transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J. Biol. Chem.* 266, 815–823.
- Soehnlein, O. (2009). Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 87, 1157–1164.
- Solomons, N.W. (2007). Malnutrition and infection: an update. *Br. J. Nutr.* 98 Suppl 1, S5–S10.
- Soncini, F.C., Vescovi, E.G., Solomon, F., and Groisman, E.A. (1996). Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.* 178, 5092–5099.

Sousa, A.M., and Pereira, M.O. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs—A Review. *Pathogens* 3, 680–703.

Spinelli, S.V., Pontel, L.B., Vescovi, E.G., and Soncini, F.C. (2008). Regulation of magnesium homeostasis in *Salmonella*: Mg^{2+} targets the *mgtA* transcript for degradation by RNase E. *FEMS Microbiol. Lett.* 280, 226–234.

Sriramulu, D.D., Lünsdorf, H., Lam, J.S., and Römling, U. (2005). Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* 54, 667–676.

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

Steinberg, B.E., Huynh, K.K., and Grinstein, S. (2007). Phagosomal acidification: measurement, manipulation and functional consequences. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1083.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., and Boman, H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246–248.

Steyn, A.J.C., Joseph, J., and Bloom, B.R. (2003). Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol. Microbiol.* 47, 1075–1089.

Stinear, T.P., Seemann, T., Harrison, P.F., Jenkin, G.A., Davies, J.K., Johnson, P.D.R., Abdellah, Z., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Churcher, C., et al. (2008). Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 18, 729–741.

Stokes, R.W., Norris-Jones, R., Brooks, D.E., Beveridge, T.J., Doxsee, D., and Thorson, L.M. (2004). The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect. Immun.* 72, 5676–5686.

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., and Russell, D.G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678–681.

Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U.E., and Russell, D.G. (1996). *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 15, 6960–6968.

Sugawara, I., Udagawa, T., and Yamada, H. (2004). Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect. Immun.* 72, 1804–1806.

T

Tabouret, G., Astarie-Dequeker, C., Demangel, C., Malaga, W., Constant, P., Ray, A., Honore, N., Bello, N.F., Perez, E., Daffe, M., et al. (2010). *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog.* 6, e1001159.

Tailleux, L., Neyrolles, O., Honoré-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.-P., Lagrange, P.H., Gluckman, J.C., Rosenzweig, M., and Herrmann, J.-L. (2003). Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 170, 1939–1948.

Tan, T., Lee, W.L., Alexander, D.C., Grinstein, S., and Liu, J. (2006). The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell. Microbiol.* 8, 1417–1429.

Teng, T., Liu, J., and Wei, H. (2015). Anti-mycobacterial peptides: from human to phage. *Cell. Physiol. Biochem.* 35, 452–466.

Tjelle, T.E., Lovdal, T., and Berg, T. (2000). Phagosome dynamics and function. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 22, 255–263.

Tobin, D.M., and Ramakrishnan, L. (2008). Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 10, 1027–1039.

Turner, A.K., Barber, L.Z., Wigley, P., Muhammad, S., Jones, M.A., Lovell, M.A., Hulme, S., and Barrow, P.A. (2003). Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. *Infect. Immun.* 71, 3392–3401.

U

Unoson, C., and Wagner, E.G.H. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 70, 258–270.

V

Vergne, I., Fratti, R.A., Hill, P.J., Chua, J., Belisle, J., and Deretic, V. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol. Biol. Cell* 15, 751–760.

Véscovi, E.G., Soncini, F.C., and Groisman, E.A. (1996). Mg^{2+} as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84, 165–174.

Véscovi, E.G., Ayala, Y.M., Di Cera, E., and Groisman, E.A. (1997). Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg^{2+} and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 272, 1440–1443.

Veyron-Churlet, R., Brust, B., Kremer, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2011). Expression of OmpATb is dependent on small membrane proteins in *Mycobacterium bovis* BCG. *Tuberculosis* 91, 544–548.

Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., and Deretic, V. (1997). Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 272, 13326–13331.

Vieira, O., Botelho, R., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366 689–704.

Vilcheze, C., Molle, V., Carrere-Kremer, S., Leiba, J., Mourey, L., Shenai, S., Baronian, G., Tufariello, J., Hartman, T., Veyron-Churlet, R., et al. (2014). Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 10, e1004115.

W

Walters, R.F.S., and DeGrado, W.F. (2006). Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13658–13663.

Walters, S.B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffe, M., and Smith, I. (2006). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 60, 312–330.

Wan, Y., Han, J., Fan, G., Zhang, Z., Gong, T., and Sun, X. (2013). Enzyme-responsive liposomes modified adenoviral vectors for enhanced tumor cell transduction and reduced immunogenicity. *Biomaterials* 34, 3020–3030.

Wassing, G.M., Bergman, P., Lindbom, L., and van der Does, A.M. (2014). Complexity of antimicrobial peptide regulation during pathogen–host interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents*.

Waters, L.S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615–628.

Watkins, R.R., and Lemonovich, T.L. (2012). Evaluation of infections in the lung transplant patient. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 193–198.

Welin, A., and Lerm, M. (2012). Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 92, 113–120.

van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., and Peters, P.J. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287–1298.

White, S.H., Wimley, W.C., and Selsted, M.E. (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 521–527.

WHO (2006). OMS | Stratégie Halte à la tuberculose.

WHO (2014). WHO | Global tuberculosis report 2014.

Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rüsch-Geddes, S., Locht, C., Brisse, S., et al. (2008). Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathog* 4, e1000160.

Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., and Av-Gay, Y. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19371–19376.

X

Xu, L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M.S., and Luo, Z.-Q. (2010). Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathog* 6, e1000822.

Y

Yan, J., Wang, K., Dang, W., Chen, R., Xie, J., Zhang, B., Song, J., and Wang, R. (2013). Two hits are better than one: membrane-active and DNA binding-related double-action mechanism of NK-18, a novel antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 220–228.

Yang, C.-T., Cambier, C.J., Davis, J.M., Hall, C.J., Crosier, P.S., and Ramakrishnan, L. (2012a). Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. *Cell Host Microbe* 12, 301–312.

Yang, Y., Labesse, G., Carrère-Kremer, S., Esteves, K., Kremer, L., Cohen-Gonsaud, M., and Blanc-Potard, A.-B. (2012b). The C-terminal domain of the virulence factor MgtC is a divergent ACT domain. *J. Bacteriol.* 194, 6255–6263.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., and Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707–17712.

Z

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.

Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31, 761–771.

Zhou, D., Han, Y., Qiu, J., Qin, L., Guo, Z., Wang, X., Song, Y., Tan, Y., Du, Z., and Yang, R. (2006). Genome-wide transcriptional response of *Yersinia pestis* to stressful conditions simulating phagolysosomal environments. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 8, 2669–2678.

Zuber, P. (2001). A peptide profile of the *Bacillus subtilis* genome. *Peptides* 22, 1555–1577.

2

(2012). Anti-Infective Drugs Advisory Committee Meeting Report (The U.S. Food and Drug Administration).

(2013). The Use of Bedaquiline in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis: Interim Policy Guidance (Geneva: World Health Organization).

(2014). Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2012. (Paris: Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques (Ined)).

ADRESSE DU LABORATOIRE

CNRS UMR5235 – Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques
Université Montpellier 2 – Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5

RÉSUMÉ**Rôle du facteur de virulence MgtC chez les mycobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* et son inhibition par un peptide naturel**

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur en santé publique qui mène à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment en ciblant des facteurs de virulence bactériens. MgtC est un facteur de virulence impliqué dans la survie intra-macrophagique chez plusieurs pathogènes intracellulaires. La protéine MgtC est également présente chez le pathogène extracellulaire *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, un peptide MgtR a été identifié comme étant un antagoniste naturel potentiel de MgtC.

Pour étudier le rôle de MgtC dans la virulence des mycobactéries, j'ai analysé un mutant *mgtC* de *Mycobacterium marinum* dans les modèles d'infection d'embryons de danio et de macrophages en culture. Cela a permis de mettre en évidence un nouveau rôle de MgtC au niveau de l'étape de phagocytose qui est augmentée avec le mutant *mgtC*. Chez *P. aeruginosa*, nous avons montré qu'un mutant *mgtC* est atténué dans l'embryon de danio et présente une sensibilité accrue à l'action bactéricide du macrophage. Par ailleurs, j'ai montré que les gènes *mgtC* de *M. marinum* et de *P. aeruginosa* sont régulés par le magnésium. De plus, l'expression de *mgtC* de *P. aeruginosa* est fortement induite dans les macrophages.

Enfin, concernant les propriétés antagonistes de MgtR, des souches de *Mycobacterium bovis* BCG ou de *P. aeruginosa* exprimant *mgtR* semblent se comporter de la même manière que les mutants *mgtC*, suggérant des propriétés anti-virulence prometteuses pour MgtR et confirmant le choix de MgtC en tant que cible dans le cadre d'une stratégie anti-virulence.

ABSTRACT**Role of MgtC virulence factor in mycobacteria and *Pseudomonas aeruginosa* and its inhibition with a natural peptide**

Antibiotic resistance is a major problem in public health, which leads to develop new therapeutics strategies, including strategies targeting bacterial virulence factors. MgtC is a virulence factor involved in intramacrophage survival in several intracellular pathogens. MgtC protein is also present in extracellular pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, a peptide MgtR has been identified as a potential and natural antagonist of MgtC.

To study the role of MgtC in mycobacterial virulence, I have analysed a *Mycobacterium marinum* *mgtC* mutant in zebrafish embryo and macrophage infection models. This approach allowed us to uncover a new role of MgtC in phagocytosis, which is increased with *mgtC* mutant. In *P. aeruginosa*, we have shown that a *mgtC* mutant is attenuated in zebrafish embryos. In ex vivo experiments, *mgtC* mutant is more sensitive to macrophage killing. In parallel, I have shown that *M. marinum* and *P. aeruginosa* *mgtC* genes are regulated by magnesium. In addition, expression of *P. aeruginosa* *mgtC* is highly induced in macrophages.

Finally, regarding MgtR antagonistic properties, *Mycobacterium bovis* BCG or *P. aeruginosa* strains expressing *mgtR* appear to mimic the behaviour of *mgtC* mutants, suggesting promising anti-virulence properties for MgtR and supporting the choice of MgtC as a suitable target of an anti-virulence strategy.

MOTS-CLEFS

Mycobactéries – *Pseudomonas aeruginosa* – MgtC – MgtR – *Danio rerio* – phagocytose

SPÉCIALITÉ

Microbiologie

JURY

Mme Catherine ASTARIE-DEQUEKER
M. Jean-Louis HERRMANN
Mme Estelle JUMAS-BILAK
Mme Emma COLUCCI-GUYON
Mme Anne BLANC-POTARD

CNRS Toulouse
Université de Versailles St Quentin
Université de Montpellier
Institut Pasteur Paris
Université de Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur (Invitée)
Directeur de thèse