

Avantages génomiques conférés à Mycobacterium abscessus pour une existence intracellulaire

Laura Laencina

► To cite this version:

Laura La
encina. Avantages génomiques conférés à Mycobacterium abscessus pour une existence intracellulaire. Bactériologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017
SACLV090 . tel-01721663

HAL Id: tel-01721663 https://theses.hal.science/tel-01721663

Submitted on 2 Mar 2018

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.



Avantages génomiques conférés à *Mycobacterium abscessus* pour une existence intracellulaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à l'Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°577 Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV) Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 29 Novembre 2017, par

Laura Laencina

Composition du Jury

Jean-Louis Gaillard PU-PH, Univ. de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (U1173, Infection et Inflammation)	Président
Howard Takiff Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris (Unité de Génétique Microbienne)	Rapporteur
Camille Locht Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Lille (UMR 8204 & U1019, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille)	Rapporteur
Laleh Majlessi Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Paris (Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée)	Examinatrice
Laurent Kremer Directeur de Recherche, INSERM, (IRIM, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier)	Examinateur
Jean-Louis Herrmann PU-PH, Univ. de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (U1173, Infection et Inflammation)	Directeur
Fabienne Misguich MCU, Univ. de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (U1173, Infection et Inflammation)	Co-Directrice

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Le Dr Howard Takiff et le Dr Camille Locht,

Pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs de ce manuscrit.

La Dr Laleh Majlessi et le Dr Laurent Kremer,

Pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant qu'examinateurs.

Le Pr Jean-Louis Gaillard,

Pour me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A mon directeur de thèse et ma co-directrice de thèse,

Le Pr Jean-Louis Herrmann et le Dr Fabienne Girard-Misguich,

Pour m'avoir fait confiance et choisie pour intégrer votre équipe de recherche, pour votre accueil dans le laboratoire, votre encadrement, votre disponibilité, vos conseils, votre expertise scientifique, vos encouragements, votre optimisme inépuisable et votre aide précieuse qui ont permis l'aboutissement de ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A nos collaborateurs,

L'équipe de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée de l'Institut Pasteur de Paris,

Merci de votre contribution pour avoir fait avancer ce travail de thèse.

Merci plus particulièrement au Dr Laleh Majlessi pour avoir été une collaboratrice toujours disponible, pour votre bienveillance, le matériel que vous avez partagé avec moi et votre expertise scientifique.

L'équipe de l'Institut de Recherche en Infectiologie du CNRS de Montpellier,

Merci de votre contribution pour avoir fait avancer ce travail de thèse.

Merci plus particulièrement au Dr Audrey Bernut et au Dr Albertus Viljoen pour les expériences, et au Dr Laurent Kremer pour avoir failli être mon directeur de thèse et finalement m'avoir présenté Jean-Louis et pour votre œil d'expert sur nos collaborations.

A tous mes collègues,

De l'équipe de Microbiologie du laboratoire EPIM,

Merci pour votre aide, votre implication dans mon travail et la gestion du laboratoire au quotidien. Merci à Violaine Dubois et au Dr Vincent Le Moigne pour leur contribution à la révision de l'article soumis à PNAS.

De l'équipe de Virologie du laboratoire EPIM,

Merci pour votre disponibilité, d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions, de la gestion quotidienne du laboratoire et des repas partagés tous les midis en votre compagnie.

Des autres équipes de l'UFR des Sciences de la Santé Simone Veil,

Merci pour votre disponibilité, d'avoir pris le temps de me conseiller sur des questions scientifiques, de m'avoir fourni des produits quand j'étais à cours et pour votre bienveillance sur mon travail.

Merci pour les formations que vous m'avez dispensées, votre aide et vos précieux conseils.

De l'UFR des Sciences de Versailles,

Merci à tous les enseignants dont je suis fière d'avoir fait partie pour votre aide, votre gentillesse, la transmission de vos connaissances, votre soutien et pour l'expérience que vous m'avez apportée.

A mes proches,

A mes amis que j'ai depuis de nombreuses années,

Merci pour toutes ces années d'amitié et de fêtes. Même si on ne s'est pas vu souvent au cours de ces dernières années, vous êtes toujours là.

Aux nouvelles personnes que j'ai rencontrées au cours de mon doctorat,

Merci de m'avoir apporté énormément scientifiquement et surtout humainement.

Merci plus particulièrement à Cassie, Camille et Marion, pour avoir été les garantes de la préservation d'une vie en dehors du laboratoire et de tous les moments que l'on a partagés.

A ma famille et famille étendue,

Merci pour votre soutien et votre compréhension, désolée d'avoir été si souvent absente.

A mes parents et mon frère,

Merci d'avoir toujours cru en moi, d'être là tout simplement, votre soutien indéfectible me donne des ailes.

A Guillaume,

Merci de partager ma vie et pour le bonheur que tu m'apportes au quotidien depuis 14 ans. Merci de toujours me soutenir dans mes choix et pour ta patience dans tous ces aller-retours en train.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. Merci à toutes et à tous, dans le bon ou le mauvais, d'avoir contribuer à me rendre meilleure.

Enfin merci à ceux que j'ai oublié malgré moi.

TABLE DES MATIERES

Index des figures	
Index des tableaux	5
Abréviations	6
Introduction	8
CHAPITRE I : LES MYCOBACTERIES	8
I. PHYLOGENIE DU GENRE MYCOBACTERIUM	8
II. ENVELOPPE ET PAROI DES MYCOBACTERIES	8
2.1. Enveloppe mycobactérienne	8
2.2. Propriété d'acido-alcoolo-résistance	9
III. CLASSIFICATION DES MYCOBACTERIES	10
CHAPITRE II : MYCOBACTERIUM ABSCESSUS	12
I. HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE <i>M. ABSCESSUS</i>	12
II. LE COMPLEXE ABSCESSUS	12
III. EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS A MNT ET PLUS PARTICULIEREMENT A M. ABSCESSUS	13
IV. PATHOLOGIES DUES A <i>M. ABSCESSUS</i>	14
4.1. Infections pulmonaires dues à <i>M. abscessus</i>	14
4.2. Infections extra-pulmonaires dues à <i>M. abscessus</i>	15
4.3. Infections disséminées dues à <i>M. abscessus</i>	16
V. MUCOVISCIDOSE, MNT ET <i>M. ABSCESSUS</i>	17
5.1. Mucoviscidose et infections bactériennes	17
5.2. Mucoviscidose et prévalence des MNT	18
VI. <i>M. ABSCESSUS</i> : UN BACILLE PSEUDO-TUBERCULEUX	20
VII. <i>M. ABSCESSUS</i> ET TRANSPLANTATION	21
VIII. CRITERES DE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS PULMONAIRES AUX MNT	21
8.1. Critères cliniques	22
8.2. Critères radiologiques	22
8.3. Critères bactériologiques	22
8.4. Concertation pluridisciplinaire pour le diagnostic, la mise sous traitement et le suivi	22
8.5. Dans le cas de la mucoviscidose	23
IX. RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES	23
CHAPITRE III : RESERVOIR ET TRANSMISSION DE <i>M. ABSCESSUS</i>	25
I. RESERVOIR ENVIRONNEMENTAL DE <i>M. ABSCESSUS</i>	25
II. TRANSMISSION INTERHUMAINE DE <i>M. ABSCESSUS</i>	25
III. RENCONTRE DE <i>M. ABSCESSUS</i> AVEC LES AMIBES	26
CHAPITRE IV : FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>M. ABSCESSUS</i>	28
I. FACTEURS DE VIRULENCE MYCOBACTERIENS	28
II. FACTEURS DE VIRULENCE NON MYCOBACTERIENS	30
CHAPITRE V : LA TRANSITION LISSE (S) RUGUEUSE (R) CHEZ <i>M. ABSCESSUS</i>	33
I. MORPHOTYPES S ET R DE <i>M. ABSCESSUS</i>	33
II. HYPERVIRULENCE DES VARIANTS RUGUEUX	34

I. CROISSANCE INTRACELLULAIRE DE M. ABSCESSUS 36 II. IMPORTANCE DE LA REPONSE LYMPHOCYTAIRE T ET B POUR LE CONTROLE DE L'INFECTION A M. ABSCESSUS 36 III. INHIBITION DE LA MATURATION ET DE L'ACIDIFICATION DU PHAGOSOME 37 IV. VIE INTRACELLULAIRE ET DEFICIT CFTR 37 V. STRATEGIES DE SURVIE AU SEIN DU MACROPHAGE DE M. ABSCESSUS 38 CHAPITRE VII : LES SYSTEMES DE SECRETION 41 I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE <i>IN VIVO DE M. ABSCESSUS</i> : IMPORTANCE DU 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. ECREME DE DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 II. SCRECTOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 <
II. IMPORTANCE DE LA REPONSE LYMPHOCYTAIRE T ET B POUR LE CONTROLE DE L'INFECTION A M. ABSCESSUS 36 III. INHIBITION DE LA MATURATION ET DE L'ACIDIFICATION DU PHAGOSOME 37 IV. VIE INTRACELLULAIRE ET DEFICIT CFTR 37 V. STRATEGIES DE SURVIE AU SEIN DU MACROPHAGE DE M. ABSCESSUS 38 CHAPITRE VII : LES SYSTEMES DE SECRETION 41 I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES (M. TUBERCULOSIS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. SCRETOME
III. INHIBITION DE LA MATURATION ET DE L'ACIDIFICATION DU PHAGOSOME 37 IV. VIE INTRACELLULAIRE ET DEFICIT CFTR 37 V. STRATEGIES DE SURVIE AU SEIN DU MACROPHAGE DE M. ABSCESSUS 38 CHAPITRE VII : LES SYSTEMES DE SECRETION 41 I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES (M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. SCRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 II. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE<
IV. VIE INTRACELLULAIRE ET DEFICIT CFTR 37 V. STRATEGIES DE SURVIE AU SEIN DU MACROPHAGE DE M. ABSCESSUS 38 CHAPITRE VII : LES SYSTEMES DE SECRETION 41 I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 51 OLOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB ₄ DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETIOM EDES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 II. SECRETIOM EDES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 <
V. STRATEGIES DE SURVIE AU SEIN DU MACROPHAGE DE M. ABSCESSUS 38 CHAPITRE VII : LES SYSTEMES DE SECRETION 41 I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. EVOLUTION DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES (M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU 51 LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT $\Delta ECCB_4$ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE PO
CHAPITRE VII : LES SYSTEMES DE SECRETION 41 I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU 10 IOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB ₄ DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. SUB DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB ₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS
I. DIVERSITE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII 41 II. STRUCTURE DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU 51 IOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB ₄ DU LOCUS ESX-4 DE 54 II. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT DECCB ₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
II. STRUCTURE DES SST7 42 III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE 1 - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU 51 PARTIE 1 - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 51 M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 IV. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB4 EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
III. EVOLUTION DES SST7 43 IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB₄ DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. Secretome des Differents mutants du locus ESX-4 54 III. Stude de La PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. Etude de La PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. Etude DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔeccB₄EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
IV. MYCOBACTERIES NON PATHOGENES/M. SMEGMATIS 44 V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. TUBERCULOSIS 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB ₄ DU LOCUS ESX-4 DE 51 M. ABSCESSUS 54 II. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 III. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB ₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
V. MYCOBACTERIES PATHOGENES/M. <i>TUBERCULOSIS</i> 45 VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. <i>ABSCESSUS</i> 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE <i>IN VIVO</i> DE <i>M. ABSCESSUS</i> : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE <i>ECCB</i> ₄ DU LOCUS ESX-4 DE <i>M. ABSCESSUS</i> 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE <i>M. ABSCESSUS</i> 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ÉTUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT <i>ΔECCB</i> ₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
VI. MYCOBACTERIES PATHOGENES OPPORTUNISTES/M. ABSCESSUS 47 Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB4EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
Objectifs 49 Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT $\triangle ECCB_4$ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
Résultats 51 PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU 51 Incus ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 DE 54 M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB4 EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
PARTIE I - IDENTIFICATION DES GENES REQUIS POUR LA CROISSANCE IN VIVO DE M. ABSCESSUS : IMPORTANCE DU 51 LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 DE 54 M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB4EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
LOCUS ESX-4 51 PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB ₄ DU LOCUS ESX-4 DE 54 M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT $\triangle ECCB_4$ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
PARTIE II - AUTRES RESULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GENE ECCB₄ DU LOCUS ESX-4 DE 54 M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
M. ABSCESSUS 54 I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT $\triangle EccB_4$ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
I. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES DES EVENTUELS SUBSTRATS DU SYSTEME ESX-4 DE M. ABSCESSUS 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
II. ARACISLS DIO INFORMATIQUES DES EVENTIOLES SUBSTITATS DU STITUME ESA 4 DE M. ABSEESSON 54 II. SECRETOME DES DIFFERENTS MUTANTS DU LOCUS ESX-4 54 III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB4 EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
III. ETUDE DE LA PROTEINE FBPC ET SON ACTIVITE MYCOLYLTRANSFERASE 56 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
III. ETODE DE LA FROTEIRE FOR ELESON ACTIVITE INTEOLITEMANSI ENASE 50 IV. ETUDE DE LA VIRULENCE DU MUTANT ΔECCB₄ EN MODELE ANIMAL CHEZ LE POISSON ZEBRE 57 PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62 Matérial et Méthodes 70
PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES 58 Discussion et Perspectives 62
Discussion et Perspectives 62
Discussion et Perspectives 62
Matérial at Méthodos
Materier et Methodes 70
I. BANQUE DE TRANSPOSON, SOUCHES MYCOBACTERIENNES, LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE 70
II. CRIBLAGE DE LA BANQUE MASB43S EN CO-CULTURE AVEC DES AMIBES 71
2.1.Confirmation de l'atténuation de croissance en amibes71
2.2. Études de la croissance in vitro72
III.CO-CULTURES EN MACROPHAGES72
IV. IDENTIFICATION DU SITE D'INSERTION DU TRANSPOSON DES MUTANTS DE LA BANQUE 72
V. CONSTRUCTION DU MUTANT KO ΔECCB4 DANS LA SOUCHE MABSCIPS ET SON COMPLEMENTE C.ΔECCB4 74
VI.Experiences d'adhesion et d'internalisation75
VII.ANALYSES DE L'ACIDIFICATION PHAGOSOMALE75
7.1. Etude de la colocalisation avec le LysoTracker et marquage de <i>M. abscessus</i> 75
7.2. Mesure du pH intraphagosomal des macrophages infectés76
VIII. ANALYSES DE LA RUPTURE PHAGOSOMALE 77
8.1. Cytométrie de flux et expérience de FRET avec le CCF-4 77
8.2. Immuno-marquage à la Galectin-3 pour détecter les dommages membranaires phagosomaux
8.3. Détermination de la sécrétion d'II -1ß et d'IFN-ß 78

IX.	Analyses des secretomes des mutants Tn du locus ESX-4	79					
9.1. Obtention du sécrétome des mutants							
9.2. Sécrétion de la protéine FbpC analysée par Western Blot							
9.3. Evaluation de l'activité enzymatique mycolyltransférase des sécrétomes							
9.4. Extractions lipidiques et analyse par chromatograpgie sur couche mince TLC							
<u>Réfé</u>	érences	82					
<u>Ann</u>	exes	115					
ANN	NEXE 1 – DUBOIS <i>et al.</i> Article MmpL <i>M. abscessus</i>	115					
ANN	IEXE 2 – ROUX <i>et al.</i> 2016 Article Comportement intracellulaire de <i>M. abscessus</i>	116					
ANN	NEXE 3 – BAKALA N'GOMA ET AL. 2015 ARTICLE INTERACTION M. ABSCESSUS ET A. CASTELLANII ET	ROLE DE LA					
PLC		117					
ANN	IEXE 4 – Generation de la banque de mutants Tn de <i>M. abscessus</i>	118					

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1. CLASSIFICATION SELON BERGEY'S DU PHYLUM ACTINOBACTERIA.	8
FIGURE 2. STRUCTURE DE L'ENVELOPPE MYCOBACTERIENNE.	8
FIGURE 3. COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN	9
FIGURE 4. ARBRE PHYLOGENIQUE CIRCULAIRE DES MCR (EN BLEUES) ET MCL (EN ROUGE).	10
FIGURE 5. ARBRE PHYLOGENETIQUE MONTRANT LES RELATIONS DES 224 ISOLATS ET LES TROIS SOUCHES TYPES DE <i>M. ABSCESSUS</i>	
sensu lato construit a partir des sequences de genes MLST concatenees	12
FIGURE 6. (A) REPRESENTATION CIRCULAIRE DU CHROMOSOME DE <i>M. ABSCESSUS</i> CIP 104536 ^T . (B) REPRESENTATION CIRCULAIRI	Ε
DU PLASMIDE DE 23 KB HEBERGEANT LE LOCUS DE RESISTANCE AU MERCURE	13
FIGURE 7. EVOLUTION DE LA PREVALENCE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES AUX DIFFERENTES BACTERIES HORS MNT DES PATIENTS A	VEC
LA MUCOVISCIDOSE ENTRE 1989 ET 2015.	17
FIGURE 8. PREVALENCE DES ESPECES MYCOBACTERIENNES ISOLEES CHEZ LES PATIENTS AVEC LA MUCOVISCIDOSE AUX ETATS-UNIS EN	1
2015	20
FIGURE 9. GRANULOME BRONCHIQUE CAUSE PAR <i>M. ABSCESSUS</i> CHEZ UN PATIENT ATTEINT DE LA MUCOVISCIDOSE (SECTION COLOF	₹EE
A L'HEMATOXYLINE-EOSINE-SAFRAN)	20
FIGURE 10. MORPHOLOGIE DE COLONIES DE <i>M. ABSCESSUS</i> VARIANT S ET R.	33
FIGURE 11. PHENOMENE DE CORDING DE VARIANTS R DE <i>M. ABSCESSUS</i>	34
FIGURE 12. PERTE DES GPL DANS LES VARIANTS ROUGH DE <i>M. ABSCESSUS</i>	35
FIGURE 13. DYNAMIQUE DE LA FONCTION PULMONAIRE, RESULTATS MICROBIOLOGIQUES, ET TRAITEMENTS ANTIMYCOBACTERIENS	
(1 ^{er} , 2 ^{eme} et 3 ^{eme})	35
FIGURE 14. HYPER-LETALITE DES VARIANTS R PAR RAPPORT AUX VARIANTS S DE DEUX SOUCHES DE <i>M. ABSCESSUS</i> DANS UN MODEL	E
MURIN D'INFECTION PAR VOIE INTRAVEINEUSE.	36
FIGURE 15. AUGMENTATION DE LA PRODUCTION DU TNF LIBERE PAR LES MACROPHAGES MURINS INFECTES AVEC DES VARIANTS R D	DE
M. ABSCESSUS.	36
FIGURE 16. MODELE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE <i>M. ABSCESSUS</i> DANS LES EMBRYONS DE ZEBRAFISH.	37
FIGURE 17. MORPHOLOGIE DE L'ETZ DE LA PAROI MYCOBACTERIENNE DE M. ABSCESSUS DANS LES PHAGOSOMES DE MACROPHAGE	S
MURINS BMDM.	38
FIGURE 18. EFFETS A LA SUITE D'UNE RUPTURE DE LA MEMBRANE PHAGOSOMALE DUE A ESX-1.	40
FIGURE 19. RECONSTRUCTION 3D DU COMPLEXE ESX-5.	42
FIGURE 20. TOPOLOGIE ET LOCALISATION DES COMPOSANTS D'ESX-5.	42
FIGURE 21. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES LOCI ESX MYCOBACTERIENS A PARTIR DE SEQUENCES CONCATENEES D'ECCB, ECCC, ET	
МүсР	43
FIGURE 22. ORGANISATION GENETIQUE ET STRUCTURALE DES SYSTEMES ESX CHEZ <i>M. TUBERCULOSIS</i>	45
FIGURE 23. CARTE DES SYSTEMES DE SECRETION DE TYPE VII DE <i>M. ABSCESSUS</i> COMPARATIVEMENT A LA SOUCHE H37RV DE	
M. TUBERCULOSIS	47
FIGURE 24. ORGANISATION GENETIQUE DES LOCI ESX CHROMOSOMIQUES A PARTIR D'UN ENSEMBLE DE DONNEES REPRESENTATIVE	S
DES MYCOBACTERIES	48
FIGURE 25. (A) REGROUPEMENT DES SUBSTRATS POTENTIELS DU SYSTEME DE SECRETION ESX-4 DE M. ABSCESSUS CODES DANS SO	N
GENOME, AA = ACIDES AMINES. (B) GENES COMPOSANT LE LOCUS ESX-4 DE <i>M. ABSCESSUS</i>	54
FIGURE 26. SECRETION, ACTIVITE ET EFFETS SUR LES LIPIDES DE LA PAROI DE LA PROTEINE FBPC.	56
FIGURE 27. EVALUATION DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DES SOUCHES MUTANTE KO $\Delta eccB_4$ et de son complemente $C.\Delta eccB_4$ dans	5
LES EMBRYONS DE POISSON ZEBRE	57
FIGURE 28. REPARTITION EN COG DES GENES CONTENANT LE TRANSPOSON CHEZ LES MUTANTS AYANT UNE SURVIE INTRACELLULAIR	E A
MOINS DE 50% EN AMIBES ET/OU MACROPHAGES.	58

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CLASSIFICATION DES MYCOBACTERIES PAR RUNYON	10
TABLEAU 2. REPARTITIONS DES 3 SOUS-ESPECES M. ABSCESSUS, M. MASSILIENSE ET M. BOLLETII AU SEIN DU COMPLEXE	
M. ABSCESSUS DANS 11 ETUDES DE COHORTES DE PATIENTS REPARTIS DANS LE MONDE DE 2008 A 2016	14
TABLEAU 3. RECENSEMENT DES CAS D'INFECTIONS DISSEMINEES A <i>M. ABSCESSUS</i> CHEZ DES PATIENTS AVEC OU SANS FACTEURS DE	
RISQUES D'IMMUNODEPRESSION OU IMMUNOCOMPETENTS	15
TABLEAU 4. ETUDES PROSPECTIVES DE PREVALENCE (MOYENNE ET TRANCHE DU TAUX DE PREVALENCE SI INDIQUEE DANS L'ETUDE) DE	ES
INFECTIONS PULMONAIRES A MNT DANS LA MUCOVISCIDOSE ET POUR LESQUELLES <i>M. ABSCESSUS</i> A ETE IDENTIFIE CHEZ AU	
MOINS UN PATIENT.	18
TABLEAU 5. DISTRIBUTION DU NOMBRE DE CAS DES ESPECES MYCOBACTERIENNES RECENSEES PARMI LES PREVALENCES DES MNT DA	NS
les etudes de patients avec la mucoviscidose du Tableau 4	19
TABLEAU 6. DISTRIBUTION DES PATIENTS POSITIFS AU COMPLEXE <i>M. ABSCESSUS</i> (MABS), AU COMPLEXE <i>M. AVIUM</i> (MAC), A	
D'AUTRES MNT (NTM) DIVISEE EN TRANCHES D'AGE AU MOMENT DU PREMIER ISOLEMENT DES MYCOBACTERIES	20
TABLEAU 7. SECRETOME DES MUTANTS ESX-4 OBTENUS PAR TRANSPOSITION.	55
TABLEAU 8. MUTANTS AYANT UNE SURVIE INTRACELLULAIRE A MOINS DE 50% EN AMIBES ET/OU MACROPHAGES REGROUPES PAR	
CATEGORIES COG	59

ABRÉVIATIONS

Å	Angström						
ABC	ATP binding cassette						
AC	C Acanthamoeba castellanii						
ACE Adrenal cortex extract							
ADN Acide désoxyribonucléique							
AG Arabinogalactane							
AIM2	Absent in melanoma 2						
AM	Acide mycolique						
AMP	Adénosine mono-phosphate						
ARN	Acide ribonucléique						
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal						
ARNt	Acide ribonucléique de transfert						
ATCC	American Type Culture Collection						
ATP	Adénosine triphosphate						
ATS	American Thoracic Society						
BAAR	Bacille acido-alcoolo résistant						
BCA Bicinchoninic acid assay							
BCG	Bacille de Calmette et Guérin						
BLAS tool-pr	BLAST-P/N Basic local alignment search tool-protein/nucleotide						
bp	base pair						
BPCO obstruc	BPCO Broncho-pneumopathie chronique obstructive						
BSA	Bovine serum albumin						
CCF	Coumarin cephalosporin fluorescein						
CF	Cystic fibrosis						
CFP-1	CFP-10 10 kDa culture filtrate protein						
CFTR Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator							
CFU	Colony forming unit						
cGAMP Cyclic GMP–AMP							
cGAS transfe	Cytosolic DNA sensor nucleotidyl- rase cyclic GMP–AMP synthase						

CHT	Caudal hematopoietic tissue						
CMI	MI Concentration minimale inhibitrice						
DAPI	API 4',6-diamidino-2-ohenylindol						
DCT	Distributive conjugal transfer						
DMEM Dulbecco's modified eagle medium							
DO Densité optique							
Ecc	ESX conserved component						
ELIS A assay	Enzyme linked immunosorbent						
ERK	Extracellular signal-regulated kinase						
erm	erythromycin resistance methylase						
ESAT target	-6 6 kDa early secretory antigenic						
ESX	ESAT-6 secretion system						
ESX-I	PESX-plasmide						
ETZ	Electron translucent zone						
FITC Fluorescein isothiocyanate							
FRET Fluorescence resonance energy transfer							
Gal-3	Galectin-3						
GC	Guanine cytosine						
GL	Glycolipides						
GMP	Guanosine mono-phosphate						
GPL	Glycopeptidolipide						
GTP	Guanosine triphosphate						
HEPE piperaz	HEPES Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid						
IDSA Infectious Disease Society of America							
IFN	Interféron						
Ig	Ig Immunoglobuline						
IL Interleukine							
IRF Interferon regulatory factor							

kb kilo base

kDa kilo Dalton

KO Knock out

LA Gène de M. bolletii

- LB Luria-Bertani
- MAB Mycobacterium abscessus

Mabs43S M. abscessus souche 43S

MabsCIPS M. abscessus souche type S

mAGP mycolyl-arabinogalactanepeptidoglycane

Mce Mammalian cell entry

MCL Mycobactérie à croissance lente

MCR Mycobactérie à croissance rapide

MDR-PA Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Mg Magnésium

MLST Multi-locus sequence typing

MmGI-1 M. massiliense Genomic Island-1

MmpL Mycobacterial membrane protein large

MNT Mycobactérie non tuberculeuse

MOI Multiplicity of infection

MRSA Methicillin Resistant S. aureus

MYCMA Gène de M. massiliense

NCBI National center for biotechnology information

NLRP3 NOD, LRR and pyrin domain containing 3

P24 Plaque de 24 puits

PBS Phosphate buffered saline

PCC Pearson correlation coefficient

PCR Polymerase chain reaction

PDIM Phthiocerol dimycocerosate

PE Proline-glutamate

PFA Paraformaldéhyde

- PGL Phenolic glycolipid
- PL Phospholipide
- PLC Phospholipase C
- PPE Proline-proline-glutamate

PVDF Polyvinylidene fluoride

PYG Peptone-yeast-glucose

qRT-PCR real-time reverse transcription-PCR

R Rough

RD1 Région de différence 1

RE Réticulum endoplasmique

RNAseq Séquençage de l'ARN

ROS Reactive oxygen species

RPMI Roswell Park Memorial Institute

S Smooth

- SDS Sodium dodecyl sulfate
- SNC Système nerveux central

SST1 à SST7 Système de sécrétion de type I à VII

STING Stimulation des gènes interférons associés au RE

Streptavidin-HRP Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase

SVF Sérum de veau fœtal

TAT Twin arginine translocation

- TBK Serine/threonine-protein kinase
- **TDM** Di-mycolate de tréhalose
- **TLC** Thin layer chromatography
- **TLR** Toll-like receptor
- TMM Mono-mycolate de tréhalose
- Tn Transposon
- TNF Tumor necrosis factor
- VIH Virus de l'immunodéficience humain

wt wild type

WXG Motif Trp-X-Gly







Figure 2. Structure de l'enveloppe mycobactérienne.

D'après (Marrakchi et al., 2014) adaptée de (Zuber et al., 2008).

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LES MYCOBACTÉRIES

I. Phylogénie du genre Mycobacterium

Les mycobactéries sont des bactéries classées sous le *phylum* des Actinobactéries. Elles appartiennent à l'ordre des *Actinomycetales*, au sous-ordre des *Corynebacterineae* et à la famille des *Mycobacteriaceae* (Figure 1). Cette famille comprend deux genres, le genre *Mycobacterium* qui définit les mycobactéries et le genre *Hoyosella* récemment découvert (Figure 1) (Jurado *et al.*, 2009; Laneelle *et al.*, 2012). La nouvelle espèce *Hoyosella altamirensis* se nomme ainsi en référence à la grotte d'Altamira (Cantabrie, Espagne) où la souche a été isolée, et la souche la plus proche connue est *Mycobacterium fallax* ATCC (American Type Culture Collection) 35219^T (Jurado *et al.*, 2009). Le préfixe *myco*- qui peut signifier « champignon » en latin et la croissance des actinobactéries évoquant un mycélium rudimentaire sous certaines conditions de culture pourraient faire croire à un rapprochement entre les mycobactéries et les champignons. Cependant, cette ressemblance due à une croissance sous forme de bactéries fines et allongées n'est que morphologique et le préfixe *myco*- qui signifie également « cire » en latin fait spécifiquement référence à la composition et à la nature très cireuse de leur paroi.

II. Enveloppe et paroi des mycobactéries

Les mycobactéries se présentent sous forme de bacilles longs et fins, droits ou légèrement incurvés non mobiles et non ramifiés, aérobies stricts ou micro-aérophiles, et sont dépourvus de spores, mesurant de 1 à 10 μ m de long et 0,3 à 0,6 μ m de large.

2.1. Enveloppe mycobactérienne

L'enveloppe très particulière des mycobactéries est composée de plusieurs couches (Figure 2). De l'intérieur vers l'extérieur de la bactérie, elle se détaille en :



Figure 3. Coloration de Ziehl-Neelsen.

Identification de mycobactéries en rouge sur fond bleu (http://www.institutpasteur.nc/la-tuberculose/).

- Une membrane plasmique classique constituée d'une bicouche phospholipidique délimitant le cytoplasme.
- La membrane plasmique est séparée du squelette mycolyl-arabinogalactanepeptidoglycane (mAGP) par l'espace périplasmique.
- Le mAGP est composé d'une couche de peptidoglycane (PG) reliée de façon covalente à un hétéroside l'arabinogalactane (AG) lui-même estérifié par des acides mycoliques (AM).
- Les acides mycoliques peuvent être modifiés par ajout de tréhalose (mono- ou dimycolate de tréhalose respectivement TMM ou TDM), et entourés de phospholipides (PL) (phosphatidylinositol mannosides), de glycolipides (GL) (lipomannane, lipoarabinomannane) dont l'ensemble constitue la mycomembrane.
- Une couche externe, considérée précédemment comme une capsule à structure complexe, est constituée de polyosides, de protéines et de lipides et forme la membrane externe.

L'ensemble de la paroi, ainsi constituée, peut représenter jusqu'à 60% de la matière sèche de la bactérie et est considérée comme le principal facteur responsable de la faible perméabilité des mycobactéries (Brennan and Nikaido, 1995).

2.2. <u>Propriété d'acido-alcoolo-résistance</u>

Les mycobactéries sont qualifiées de BAAR pour « bacilles acido-alcoolo-résistants » car elles résistent à l'action combinée de l'alcool et d'un acide. Cette propriété est liée à la structure même de leur enveloppe qui forme une véritable protection du fait de sa richesse exceptionnelle en acides mycoliques. Ce sont des acides gras particuliers à très longue chaine possédant entre 60 et 90 atomes de carbone et porteurs de fonctions oxygénées. Les divers lipides extractibles, polysaccharides, lipoglycanes et protéines couplées de manière non covalente aux acides mycoliques peuvent varier d'une espèce mycobactérienne à l'autre. De plus, les acides mycoliques sont également retrouvés dans des espèces proches telles que les corynébactéries.

Cette propriété a été mise à profit pour colorer les mycobactéries. Les mycobactéries se colorent très mal par les techniques conventionnelles de coloration, par la coloration de Gram par exemple, à cause de leur paroi riche en lipides complexes rendant difficile la pénétration des colorants traditionnels. La coloration de Ziehl-Neelsen, méthode de référence, permet de colorer les mycobactéries par la fuchsine phéniquée concentrée à chaud. L'effet mordant à chaud du colorant rend les mycobactéries roses, et cette coloration résiste à la décoloration par le mélange d'acide-alcool, ce qui n'est pas le cas des bactéries « dites classiques » qui seront décolorées. Une contre coloration au bleu de méthylène permettra l'observation des bacilles rouges sur un fond bleu (Figure 3). Cette technique diagnostique permet de mettre en évidence les bacilles présents au sein des expectorations. Elle reste très utilisée, notamment dans les pays en voie de développement, car elle permet de détecter les patients contagieux, *i.e.* expectorant des bacilles. Elle est simple, peu coûteuse, mais reste difficile à lire nécessitant souvent une double lecture (Akhtar *et al.*, 2000).



Figure 4. Arbre phylogénique circulaire des MCR (en bleues) et MCL (en rouge). La barre d'échelle est équivalente à 0,02 substitution par site. L'arbre est enraciné avec *Nocardia farcinica* (Dai *et al.*, 2011).

Une alternative à cette coloration, la coloration de Degommier, basée sur le même principe de résistance à l'acide-alcool des mycobactéries, utilise un colorant fluorescent : l'Auramine. Elle nécessite un microscope à fluorescence, ce qui limite son emploi dans les pays en voie de développement. Par contre, sa lecture est plus aisée car réalisée au grossissement 40, comparativement à la coloration de Ziehl-Neelsen qui s'effectue au grossissement 100.

III. Classification des mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* comprend à cette date 186 espèces (http://www.bacterio.net/mycobacterium.html). La classification de Runyon a été la première classification proposée en 1959. Elle divise les mycobactéries en quatre groupes en utilisant des critères phénotypiques que sont la vitesse de croissance et la capacité des colonies à développer une pigmentation en présence (photochromogènes) ou en absence (scotochromogènes) de lumière (Runyon, 1959, 1970) (Tableau 1).

Groupe	Nom de groupe	Description				
I	Photochromogènes	Colonies de mycobactéries à croissance lente qui développent une pigmentation à la suite d'une exposition à la lumière après avoir été cultivées à l'obscurité sur milieu solide pendant plus de 7 jours (<i>Mycobacterium marinum</i> et <i>Mycobacterium kansasii</i> par exemple)				
П	Scotochromogènes	plonies de mycobactéries à croissance lente qui développent une gmentation dans l'obscurité ou la lumière après avoir été cultivées r milieu solide pendant plus de 7 jours <i>Aycobacterium xenopi</i> et <i>Mycobacterium gordonae</i> par exemple)				
III	Non chromogènes	Colonies de mycobactéries à croissance lente qui sont non pigmentées qu'elles aient été cultivées ou non dans l'obscurité ou la lumière et prennent plus de 7 jours pour apparaitre sur milieu solide (<i>Mycobacterium avium</i> et <i>Mycobacterium intracellulare</i> par exemple)				
IV	Croissance rapide	Colonies de mycobactéries à croissance rapide qui apparaissent sur milieu solide en moins de 7 jours (<i>Mycobacterium abscessus</i> et <i>Mycobacterium chelonae</i> par exemple)				

Tableau 1. Classification des mycobactéries par Runyon.

Les mycobactéries sont également classées selon leur vitesse de croissance ; selon la capacité des espèces à former des colonies visibles à l'œil nu en plus ou moins 7 jours sur milieu solide gélosé. Le genre *Mycobacterium* se divise alors en deux groupes : les mycobactéries à croissance lente ou MCL et les mycobactéries à croissance rapide ou MCR (Figure 4).

Les MCL, ont un temps de génération de presque 20 heures, et nécessitent donc plus de 7 jours (jusqu'à 3 mois) pour former des colonies visibles sur milieu solide. Les MCR forment des colonies visibles en moins de 7 jours, leur temps de génération étant de l'ordre de 3 ou 4 heures, plus particulièrement compris entre 2 et 6 heures.

Les mycobactéries pathogènes strictes et opportunistes sont présentes au sein des MCL, contrairement aux MCR qui regroupent principalement les mycobactéries saprophytes à l'exception des pathogènes opportunistes pour l'homme tels que *M. abscessus*, *M. chelonae* ou encore *Mycobacterium fortuitum*.

La principale évolution de la classification et de la caractérisation des espèces du genre *Mycobacterium* repose sur l'analyse de la séquence du gène *rrs* codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S (Tortoli, 2003). Mais ce gène ne permet pas toujours de différencier finement certaines espèces proches à cause d'une forte homologie de séquences parmi les mycobactéries allant de 94,3% à 100% (Kim *et al.*, 1999).

Une approche combinant la comparaison de plusieurs loci avec l'analyse de nouvelles cibles génomiques permet d'obtenir une classification du genre *Mycobacterium* en arbre phylogénétique plus fine et plus robuste. Par exemple, le gène codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase *rpoB* avec une variation de séquence d'ADN parmi les mycobactéries plus modérée allant de 85 à 100% de similarité est utilisé (Kim *et al.*, 1999). Le gène *hsp65* est lui aussi utilisé dans cette approche multi-locus et permet de différencier sans ambiguïté certaines espèces non différenciées en ARNr 16S comme *M. abscessus* de *M. chelonae* (Ringuet *et al.*, 1999), deux espèces à part entière antérieurement considérées identiques et classées en une seule espèce jusqu'en 1992 (Kusunoki and Ezaki, 1992).



Figure 5. Arbre phylogénétique montrant les relations des 224 isolats et les trois souches types de *M. abscessus sensu lato* construit à partir des séquences de gènes MLST concaténées.

(**M. abscessus* CIP 104536T, ***M. massiliense* CIP 108297T, ****M. bolletii* CIP 108 541T) Les pourcentages des valeurs d'embranchement sont indiqués pour chaque nœud (Macheras *et al.*, 2014).

CHAPITRE II : MYCOBACTERIUM ABSCESSUS

I. Historique de la découverte de M. abscessus

La première découverte de *M. abscessus* s'effectue aux Etats-Unis en 1952 lors de son isolement à partir d'un abcès sous-cutané du genou d'une patiente de 63 ans qui avait contracté une infection dans sa jeunesse suite à un traumatisme et une dislocation de sa rotule gauche 48 ans auparavant (Moore and Frerichs, 1952). De cet abcès, *M. abscessus* en tire son nom et la souche type est classée à l'ATCC sous le numéro ATCC 19977, et à l'institut Pasteur (Paris) sous le numéro CIP 104536^T.

II. Le complexe abscessus

Pendant plusieurs décennies *M. abscessus* a été incluse avec *M. chelonae* dans le complexe *M. fortuitum* en tant que groupe « *chelonae-abscessus* » (Nakayama *et al.*, 1970). En 1992, grâce aux techniques de biologie moléculaire et d'hybridation ADN-ADN, *M. abscessus* fut séparée du groupe « *chelonae-abscessus* » et élevée au rang d'espèce à part entière (Kusunoki and Ezaki, 1992).

Sur la base de séquençage du gène *rpoB*, la taxonomie de cette nouvelle espèce évolua pour distinguer deux sous-espèces de *M. abscessus* : *Mycobacterium massiliense* en 2004 (Adékambi *et al.*, 2004) et *Mycobacterium bolletii* en 2006 (Adékambi *et al.*, 2006). La première souche type, dénommée *M. massiliense* (CIP 108297^T), a été isolée à partir d'un échantillon d'expectoration d'un patient ayant une pneumonie hémoptoïque, l'isolement a été réalisé après co-culture avec des amibes dans un laboratoire à Marseille (Adékambi *et al.*, 2004). Quant à la souche type de *M. bolletii*, désignée CIP 108541^T, elle a été isolée à partir d'un échantillon des voies respiratoires collecté chez une femme avec une pneumonie hémoptoïque à Marseille également (Adékambi *et al.*, 2006). Ces deux exemples introduisaient la notion d'hétérogénéité au sein de l'espèce. Une étude sur la base de polymorphismes de la séquence *hsp65* montre cette hétérogénéité similaire (Ringuet *et al.*, 1999).

De même des analyses génomiques de type « multi-locus sequence typing » ou MLST à partir des gènes *hsp65*, *sodA*, *rpoB*, ainsi que *argH*, *cya*, *glpK*, *gnd*, *murC*, *pta* et *purH* (Figure 5) permettent de différencier au sein de l'espèce *M. abscessus* les trois sous-espèces nommées *M. abscessus* (*sensu stricto*), *M. massiliense* et *M. bolletii* (Macheras *et al.*, 2009, 2014). Cependant le rassemblement de *M. massiliense* et *M. bolletii* a été proposé à cause de la forte ressemblance de leurs gènes *hsp65* et *rpoB*, regroupant ces deux sous-espèces en une seule sous-espèce nommée *M. abscessus* sous-espèce *bolletii* (Leao *et al.*, 2009, 2011). Mais très récemment, des études basées sur des résultats obtenus à partir de données de séquençage sur plusieurs gènes ont sans ambiguïté soutenu la séparation de *M. massiliense* et *M. bolletii* en tant que sous-espèces à part entière (Adekambi *et al.*, 2017), d'autres analyses confirment ces résultats (Zelazny *et al.*, 2009; Bryant *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013; Sassi and Drancourt, 2014; Dumas *et al.*, 2016; Tortoli *et al.*, 2016).



Figure 6. (A) Représentation circulaire du chromosome de *M. abscessus* CIP 104536^T. (B) Représentation circulaire du plasmide de 23 kb hébergeant le locus de résistance au mercure.

(A) De l'extérieur vers l'intérieur, les lignes bleues représentent les gènes (sens et antisens), les traits verts clairs indiquent les gènes du phage, le troisième cercle montre les 47 gènes de l'ARNt en rouge et de l'unique opéron de l'ARNr en vert foncé, le quatrième cercle montre les gènes acquis en bloc à partir d'organismes non mycobactériens en violet et les séquences d'insertion en noir. L'histogramme intérieur donne le pourcentage en GC de chaque zone.

(B) De même que pour le chromosome circulaire, les gènes et le pourcentage en GC sont représentés en code couleur. En plus, ce plasmide possède deux gènes codant pour des recombinases spécifiques *MAB_p04c* et *MAB_p10* représentées en orange. Il possède également un gène codant pour une relaxase - hélicase *MAB_p15c* représentée en jaune (Ripoll *et al.*, 2009).

Cette classification correspond à celle retrouvée par rapport à l'existence du phénotype de résistance inductible aux macrolides codée par le gène erm(41) et le polymorphisme de ce gène entre les trois sous-espèces, représentant là un intérêt thérapeutique majeur (Chapitre II. IX. Résistances aux antibiotiques).

Le génome de la souche type de *M. abscessus* a été entièrement séquencé en 2009 (Ripoll *et al.*, 2009). Il est constitué d'un chromosome circulaire de 5 067 172 paires de bases (bp) comprenant 4 920 séquences codantes prédites, d'un prophage complet de 81 kilo base (kb), de cinq séquences d'insertion et d'un plasmide de 23 319 bp (Figure 6) (Ripoll *et al.*, 2009). La teneur moyenne en GC du chromosome est d'environ 64% pour *M. abscessus sensu stricto* (Ripoll *et al.*, 2009), *M. massiliense* (Sekizuka *et al.*, 2014) et *M. bolletii* (Choi *et al.*, 2012b), et celle du plasmide de 68%.

Le plasmide de *M. abscessus* porte un opéron *mer* et des gènes codant des protéines de réductase de mercure lui conférant une résistance aux composants organo-mercures, liés à deux gènes codant pour des recombinases spécifiques *MAB_p04c* et *MAB_p10* représentées en orange sur la figure 6. Il code également une relaxase - hélicase qui peut jouer un rôle dans les phénomènes de conjugaison et de mobilité *MAB_p15c* représentée en jaune sur la figure 6. Ce plasmide circulaire de résistance au mercure de 23 kb possède une séquence nucléotidique à 99,9% identique au plasmide de résistance au mercure de 23 kb *pMM23* de *M. marinum* (souche ATCC BAA-535) (Stinear *et al.*, 2008).

III.Epidémiologie des infections à MNT et plus particulièrement à
<u>M. abscessus</u>

La prévalence des maladies pulmonaires dues aux Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) est en augmentation à l'échelle mondiale. L'épidémiologie des infections mycobactériennes aux Etats-Unis a changé sur ces 25 dernières années avec un déclin rapporté des infections pulmonaires tuberculeuses et à l'inverse une augmentation des infections pulmonaires dues à des MNT, principalement le complexe M. avium pour les MCL et le complexe M. abscessus pour les MCR (Prevots et al., 2010). En Australie, une étude a comparé les fréquences d'isolement des MNT entre 1999 et en 2005, M. abscessus était la MCR dont la fréquence d'isolement avait le plus augmenté durant cette période (Thomson, 2010). La prévalence des infections pulmonaires à M. abscessus est celle qui a également le plus augmentée en Corée entre 2007 et 2010 parmi toutes les infections pulmonaires à MNT (Kim et al., 2014). Historiquement, des études ont montré la prédominance des hommes avec une maladie des cavités pulmonaires dans les infections dues aux MCR, avec des variations d'âge et d'origine selon les espèces mycobactériennes (Ahn et al., 1979; O'Brien et al., 1987). Les facteurs de risque les plus communs associés avec les maladies causées par les MNT sont alors le tabagisme, les maladies chroniques pulmonaires, l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) et l'alcoolisme (O'Brien et al., 2000). Plus récemment, cette balance de genre s'est vu inversée avec une tendance des infections respiratoires qui évolue depuis des hommes fumeurs d'âge moyen à des femmes caucasiennes âgées de plus de 60 ans avec des maladies pulmonaires préexistantes (Prince et al., 1989; Huang et al., 1999; Freeman et al., 2007) ou présentant un morphotype particulier (longiligne, scoliose, pectus excavatum,

Tableau 2. Répartitions des trois sous-espèces *M. abscessus*, *M. massiliense* et *M. bolletii* au sein du complexe *M. abscessus* dans 11 études de cohortes de patients répartis dans le monde de 2008 à 2016.

Référence	Pays	Nb patients	M. abscessus	M. massiliense	M. bolletii
(Kim <i>et al.</i> , 2008a)	Corée du Sud	126	53%	45%	2%
(Zelazny et al., 2009)	Etats-Unis	40	67,5%	27,5%	5%
(van Ingen <i>et al.</i> , 2009)	Pays-Bas	39	64%	21%	15%
(Roux et al., 2009)	France	50	60%	22%	18%
(Koh <i>et al.</i> , 2011)	Corée du Sud	158	44%	55%	1%
(Harada <i>et al.</i> , 2012)	Japon	102	71%	26%	3%
(Huang <i>et al.</i> , 2013)	Taïwan	79	43%	56%	1%
(Yoshida <i>et al.</i> , 2013)	Japon	143	63%	35%	2%
(Lee et al., 2014)	Corée du Sud	404	50%	49%	1%
(Nakanaga <i>et al.</i> , 2014)	Japon	115	60%	37%	3%
(O'Driscoll <i>et al.</i> , 2016)	Irlande	36	78%	22%	0%

Inspiré de (Koh *et al.*, 2014). Nb patients = nombre de patients inclus dans l'étude.

prolapsus de la valve mitrale) (Kim *et al.*, 2008b). Cette prédominance des femmes âgées sans antécédent de tabagisme (Wallace *et al.*, 1997; Field and Cowie, 2006) est retrouvée dans beaucoup d'études mettant en avant *M. abscessus* en tant que MCR la plus fréquemment retrouvée dans les infections pulmonaires (Prevots *et al.*, 2010; Thomson, 2010).

IV. <u>Pathologies dues à M. abscessus</u>

M. abscessus est responsable d'infections humaines pulmonaires, d'infections cutanées, des tissus mous, d'infections osseuses, d'infections iatrogènes liées à du matériel contaminé (abcès de post-injection, infections après chirurgies cardiaques ou plastiques), d'infections disséminées et dans de rares cas d'infections du système nerveux central suite à une altération de la barrière hémato-encéphalique. De manière générale, les manifestations cliniques et le spectre d'infections humaines causées par *M. abscessus, M. massiliense* ou *M. bolletii* sont très similaires (Kim *et al.*, 2007; Viana-Niero *et al.*, 2008). *M. abscessus sensu lato* est actuellement la MCR la plus fréquemment isolée et la principale impliquée dans les infections pulmonaires avec une susceptibilité particulière des patients atteints de la mucoviscidose (Griffith *et al.*, 1993; Winthrop *et al.*, 2010; Chong *et al.*, 2014).

4.1. <u>Infections pulmonaires dues à M. abscessus</u>

Les infections pulmonaires à *M. abscessus* peuvent toucher des personnes sans facteurs de risque ou sans antécédents pulmonaires (Griffith *et al.*, 1993; Jeong *et al.*, 2004; Varghese *et al.*, 2012). Mais la majorité des infections respiratoires causées par *M. abscessus* surviennent comme pour les autres MNT chez des patients présentant une pathologie pulmonaire sousjacente (anomalies préexistantes du parenchyme pulmonaire) telle que la bronchectasie, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la pneumoconiose, la mucoviscidose (CF, Cystic Fibrosis), des séquelles de tuberculose, la fibrose pulmonaire, le cancer broncho-pulmonaire ou de manière générale toutes pathologies provoquant une dilatation et une inflammation des bronches. Dans plusieurs études, une association entre les infections pulmonaires dues aux MCR et les troubles gastroœsophagiens a également été suggérée (Hutchins and Boitnott, 1978). Dans une étude américaine portant sur 154 patients, 6% d'entre eux présentant une infection pulmonaire due à des MCR telles que *M. abscessus* et *M. fortuitum* avaient des troubles gastro-œsophagiens avec vomissements chroniques (Griffith *et al.*, 1993).

M. abscessus sensu stricto est la sous-espèce pathogène la plus rencontrée dans les études de cohortes de patients présentant des infections pulmonaires causées par les souches du complexe *M. abscessus* avec un taux de 43% à 78% des individus, suivi par *M. massiliense* avec un taux de 21% à 56%, la proportion de chaque sous-espèce variant selon la géolocalisation (Tableau 2). La plus grande proportion d'infections dues à *M. massiliense* avec un taux grimpant jusqu'à 56% est retrouvée dans l'Asie de l'Est, plus particulièrement en Corée du Sud et Taïwan (Kim *et al.*, 2008a; Koh *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). En comparaison, *M. bolletii* est un pathogène relativement rare, représentant généralement moins de 5%, taux allant de 0% (O'Driscoll *et al.*, 2016) à 18% (Roux *et al.*, 2009) des patients présentant des infections à *M. abscessus sensu lato* (Tableau 2). *M. bolletii* a été identifiée

Tableau 3. Recensement des cas d'infections disséminées à *M. abscessus* chez des patients avec ou sans facteurs de risques d'immunodépression ou immunocompétents.

(A) (1974-2008)

Référence	Pays	Patients	Contexte	AI	Dissémination
(Graybill et al., 1974)	Etats-Unis	2	Transplantation rein	Oui	Peau, os
(Speert <i>et al.</i> , 1980)	Etats-Unis	1	Prématuré, détresse respiratoire	Non	Sang
(Righter et al., 1983)	Canada	1	Alcoolisme	Non	Poumons, cœur, foie, rate
(Wallace <i>et al.</i> , 1983)	Etats-Unis	1	Maladie des reins	Non	Sang, peau,
(Bolan et al., 1985)	Etats-Unis	9	Dialyse	Non	Peau, moelle osseuse, sang
(Nelson et al., 1989)	Etats-Unis	1	Blessure profonde	Non	Peau
(Ingram <i>et al.</i> , 1993)	Etats-Unis	2	Aucun	Non Oui	Rate, peau, sang, poumons, lymphadénopathie
(Swetter et al., 1993)	Etats-Unis	1	Transplantation poumons	Oui	Peau, sang, poumons
(Colsky et al., 1999)	Etats-Unis	1	Thrombocytose	Non	Lésions cutanées
(Chetchotisakd <i>et al.</i> , 2000)	Thaïlande	10	Tub., salmonellose, pénicilliose	Non	Lymphadénopathie, poumons, foie, sinus, rate, peau, sang
(Liebeskind <i>et al.</i> , 2001)	Etats-Unis	1	Endocardite	Non	Sang, peau, SNC, foie, moelle osseuse
(Sanguinetti <i>et al.</i> , 2001)	Italie	1	Transplantation poumons (CF)	Oui	Sang, liquide pleural
(Mueller and Edson, 2001)	Etats-Unis	1	Aucun	Non	Lymphadénite intra- abdominale
(Sungkanuparph <i>et al.</i> , 2003)	Thaïlande	2	Syndrome de Sweet	Non	Peau, lymphadénopathie, os, foie, glande parotide
(Rosenzweig <i>et al.</i> , 2004)	Qatar	1	Vaccin BCG	Non	Sang, peau, lymphadénopathie, os
(Spellberg <i>et al.</i> , 2004)	Etats-Unis	1	Dermatomyosite, hépatite auto-immune	Oui	Articulation du genou, poumons
(Di Pentima <i>et al.</i> , 2004)	Etats-Unis	2	Prématurés, aspiration trachéale	Non	Sang
(Liao et al., 2004)	Taïwan	1	HIV	Non	Non détaillé
(Phowthongkum <i>et al.</i> , 2005)	Thaïlande	1	Non détaillé	Non	Colon, poumons
(Taylor and Palmer, 2006)	Etats-Unis	1	Transplantation poumons (CF)	Oui	Poumons, sein
(Hansen and Sarma, 2006)	Grande- Bretagne	1	Amputation sous le genou	Non	Sous-cutanée
(Chetchotisakd <i>et al.</i> , 2007)	Thaïlande	45	Non détaillé	Non	Lymphadénopathie
(Wang et al., 2008)	Chine	1	Faible nombre de cellules T CD4+	Non	Cutanée

AI = Agents Immunosuppresseurs. Tub. = Tuberculose. SNC = Système Nerveux Central. CF = Cystic Fibrosis (mucoviscidose). BPCO = BronchoPneupathie Chronique Obstructive. spécifiquement chez quatre patients dans une étude française de 2009 (Adékambi and Drancourt, 2009).

4.2. Infections extra-pulmonaires dues à M. abscessus

M. abscessus est aussi responsable d'infections extra-pulmonaires allant des infections de la peau et des tissus mous aux ostéomyélites en passant par les conjonctivites, kératites, péritonites, entérites, endocardites ou encore lymphadénites. Parmi toutes les MCR impliquées dans les infections de la peau et des tissus mous et les ostéomyélites, *M. abscessus* est la plus retrouvée parmi 57 patients sur une étude hospitalière de 1997 à 2003 à Taïwan (Ding *et al.*, 2006), résultats confirmés plus récemment dans une deuxième étude de prévalence menée de 2000 à 2008 sur 1 105 patients où *M. abscessus* est prédominante dans les infections de la peau et des tissus mous et les lymphadénites (Lai *et al.*, 2010). *M. abscessus* est l'agent pathogène responsable du plus grand nombre d'infections extra-pulmonaires parmi les MNT, suivi du complexe *M. avium* (Lai *et al.*, 2012).

On retrouve également de nombreux exemples d'épidémies, que l'on peut qualifier de nosocomiales, causées par M. abscessus : infections de xénogreffes cardiaques (Laskowski et al., 1977), infections au cours de procédures de lifting ou d'augmentations mammaires impliquant une solution de marquage de gentiane violette contaminée (Safranek et al., 1987), infections en podologie impliquant un injecteur à jet utilisé pour administrer de la lidocaïne (Wenger et al., 1990), de péritonites chez des patients recevant des dialyses péritonéales chroniques intermittentes avec des machines contaminées (Band et al., 1982), d'infections artérioveineuses chez des patients recevant une dialyse à haut flux dont le tuyau raccordé au dispositif de pulvérisation d'eau de retraitement était contaminé (Lowry et al., 1990), d'infections sternales après chirurgie à cœur ouvert (Hoffman et al., 1981), d'infections périprothétiques après implantations de prothèses d'augmentation mammaires (Clegg et al., 1983), d'infections de la plaie sternale et d'endocardites (Kuritsky et al., 1983), d'infections articulaires du genou suite à l'injection de corticostéroïdes (Khermosh et al., 1979) ou encore d'abcès suite à l'injection du vaccin Diphtérie-Pertussis-Tétanos-Polio chez de jeunes enfants (Borghans and Stanford, 1973). Une épidémie d'infections à M. abscessus a eu lieu chez 25 patients immunodéficients sous dialyse utilisant des hémodialyseurs contaminés (Bolan et al., 1985), et après plusieurs types d'actes chirurgicaux : implantations cutanées de contraceptifs au Canada (Alfa et al., 1995), augmentation des tissus mous (visage et fesses) par injection de dérivés d'acide hyaluronique aux Etats-Unis (Toy and Frank, 2003), injection intra-mammaire de silicone aux Etats-Unis (Fox et al., 2004), mammoplastie ou greffe de moelle osseuse ou chimiothérapie en Corée (Lee et al., 2010), laparotomie ou arthroscopie au Brésil (Leao et al., 2009; Leão et al., 2010), chirurgie assistée par vidéo au Brésil (Duarte et al., 2009), chirurgie micrographique de Mohs aux Etats-Unis (Fisher and Gloster, 2005), mésothérapie en Espagne (Galmés-Truyols et al., 2011), transplantations cardiagues aux Etats-Unis (Freudenberger and Simafranca, 2006) ou pause de prothèses ostéo-articulaires aux Etats-Unis (Eid et al., 2007).

Les épidémies les plus courantes sont celles survenues à la suite d'injections provoquant des abcès sous-cutanés et intra-musculaires, souvent dues à la contamination par *M. abscessus* du liquide injecté, de la seringue ou de l'aiguille, et pouvant mener à des lymphadénites (Petrini, 2006; Uslan *et al.*, 2006). Dans certains cas la source de l'épidémie est facilement identifiable

Tableau 3. (B) (2009-2017)

Référence	Pays	Patients	Contexte	AI	Dissémination
(Asai <i>et al.</i> , 2009)	Japon	1	Protéinose alvéolaire pulmonaire	Oui	Sang, peau, SNC, liquide pleural, poumons
(Garrison <i>et al.</i> , 2009)	Etats-Unis	1	Transplantation pancréas, foie, estomac, petit et grand intestins	Oui	Peau, sein
(van Ingen <i>et al.</i> , 2009)	Pays-Bas	1	BPCO, tub.	Non	Os, peau, plèvre
(Koh <i>et al.</i> , 2009)	Corée	1	Tub.	Non	Lymphadénopathie, liquide pleural, poumons
(Morales <i>et al.</i> , 2010)	Espagne	2	Transplantation poumons (CF), rein	Oui	Lésions cutanées, sang, poumons, moelle osseuse, foie
(Kuo <i>et al.</i> , 2011)	Taïwan	1	Syndrome de Sjögren	Non	Sang, lymphadénopathie
(Sarma et al., 2011)	Inde	1	Chirurgie cardiaque	Non	Sang
(Renaud et al., 2011)	Singapour	1	Dialyse péritonéale	Non	Sang
(Lambertucci <i>et al.</i> , 2011)	Brésil	1	VIH	Non	Lymphadénopathie, abdomen
(Knoll <i>et al.</i> , 2012)	Etats-Unis	3	Transplantation poumons	Oui	Sang, peau, poumons, os, liquide pleural
(Lee et al., 2012)	Taïwan	1	Maladie des reins, diabète type 2, stéroïde	Oui	SNC, poumons
(Colomba <i>et al.</i> , 2012)	Sri Lanka	1	Lymphocytopénie T CD4+ idiopathique	Non	Poumons, SNC, peau, organes génitaux, lymphadénopathie
(Bello <i>et al.</i> , 2012)	Espagne	1	VIH	Non	Sang, liquide d'ascite, urine, poumons
(Bax <i>et al.</i> , 2013)	Norvège	1	Déficience récepteur interféron gamma	Non	Sang, peau, lymphadénopathie, poumons, foie
(Lai et al., 2013)	Taïwan	1	Diabète, cirrhose	Non	Sang, liquide pleural
(Liu <i>et al.</i> , 2013)	Chine	4	Procédures d'injections intraveineuses	Non	Sang, poumons, foie, rein, SNC
(Su <i>et al.</i> , 2013)	Taïwan	1	Leucémie myéloïde aiguë	Non	Sang, peau, lymphadénopathie, poumons
(Richey et al., 2013)	Etats-Unis	1	Transplantation cœur, pacemaker	Oui	Sang, cœur, peau
(Fukui <i>et al.</i> , 2015)	Japon	1	Tub., syndrome des anti- synthétases	Oui	Sang, articulation du coude, poumons, liquide pleural
(Tahara <i>et al.</i> , 2016)	Japon	1	Aucun	Non	Lymphadénopathie, peau
(Pruetpongpun <i>et al.</i> , 2016)	Thaïlande	1	Diabète, accident vasculaire cérébral, anticorps anti-TNF-γ	Non	Peau, poumons, abdomen
(Liu <i>et al.</i> , 2016)	Taïwan	1	Anticorps anti-TNF-γ	Non	Lymphadénopathie associée à l'IgG4 de type III, peau
(Mooren <i>et al.</i> , 2017)	Pays-Bas	1	Dialyse péritonéale	Non	Sang

AI = Agents Immunosuppresseurs. Tub. = Tuberculose. SNC = Système Nerveux Central. CF = Cystic Fibrosis (mucoviscidose). BPCO = BronchoPneupathie Chronique Obstructive. comme en Colombie pour des patients avec des lésions cutanées apparues suite à l'injection de solutions contenues dans des ampoules (i.e. xylocaïne) probablement contaminées (Camargo et al., 1996; Rodriguez et al., 1997), ou comme aux Etats-Unis où 87 personnes ont développé des abcès suite à l'injection d'un médicament par ailleurs non autorisé qui était contaminé (médicament injectable vendu comme extrait de cortex surrénalien (ACE, Adrenal Cortex Extract) (Galil et al., 1999), ou encore pour 47 autres personnes ayant développé des abcès au site de l'injection dû à l'administration intra-musculaire de préparations d'ACE contaminées par M. abscessus (Miller et al., 1996). L'épidémie la plus importante a eu lieu en Colombie où 205 patients ont développé des abcès sous-cutanés suite à des injections de lidocaïne contaminée par M. abscessus dans le cabinet d'un seul médecin (Villanueva et al., 1997). Des lésions cutanées locales à M. abscessus peuvent également survenir dans des procédures sans injection d'aucune substance telle que l'acupuncture avec des exemples d'épidémies reportées en Corée (Ryu et al., 2005; Song et al., 2006; Koh et al., 2010; Lee et al., 2010; Choi et al., 2011) et au Canada (Tang et al., 2006). De même pour tout ce qui est des actes de chirurgie esthétique telle que la liposuccion, les signes cliniques d'infection passent au stade supérieur avec la description d'état inflammatoire, des micro-abcès et des drainages purulents de la plaie (Murillo et al., 2000; Furuya et al., 2008).

De manière générale, les infections de la peau et des tissus mous surviennent après un traumatisme pénétrant de la barrière tissulaire et l'inoculation dans le tissu de *M. abscessus* chez des personnes immunocompétentes, par exemple lors d'un tatouage. Les infections cutanées sont caractérisées le plus souvent par l'apparition de nodules pourpres au niveau du site d'inoculation. Si elle est superficielle, l'infection peut se résorber naturellement mais si elle est plus profonde, elle peut nécessiter un acte chirurgical comprenant l'excision des abcès et un traitement antibiotique.

4.3. Infections disséminées dues à M. abscessus

Les infections disséminées dues à *M. abscessus* sont beaucoup plus rares que les infections pulmonaires ou cutanées et surviennent généralement chez les patients avec des blessures graves dans les barrières tissulaires ou les patients présentant une prédisposition immunitaire de type congénitale ou acquise, tels que les patients transplantés d'organe ou en hémodialyse, les patients infectés par le VIH, les patients sous traitement immunosuppresseur, ou les patients présentant un déficit mendélien en IL-12 et IFN- γ (Tableaux 3A et B).

M. abscessus peut de manière exceptionnelle traverser la barrière hémato-encéphalique et causer de graves lésions du système nerveux central (SNC). Seulement cinq études rapportent des infections du SNC causées par *M. abscessus*. Le premier cas concerne un homme de 35 ans avec une méningite et une endocardite complexes dues à *M. abscessus* (Liebeskind *et al.*, 2001). Le deuxième cas signalé concerne une femme de 59 ans souffrant d'une méningite chronique causée par *M. abscessus* suite à une blessure au cou (Maniu *et al.*, 2001). Le troisième cas concerne une femme âgée de 28 ans qui présentait une infection post-orbitaire complexe à *M. abscessus* et qui a ensuite développé une infection du SNC (Talati *et al.*, 2008). Le quatrième cas d'un patient Sri Lankais présentant une infection disséminée à *M. bolletii* avec atteinte du SNC (Colomba *et al.*, 2012). Le dernier cas reporte les caractéristiques cliniques de huit patients dont sept avec une infection du SNC causée par *M. abscessus* et pour la première fois une



Figure 7. Evolution de la prévalence des infections respiratoires aux différentes bactéries hors MNT des patients avec la mucoviscidose entre 1989 et 2015.

S. aureus = Staphylococcus aureus, P. aeruginosa = Pseudomonas aeruginosa, MRSA = Methicillin Resistant S. aureus, H. influenzae = Haemophilus influenzae, S. maltophilia = Stenotrophomonas maltophilia, MDR-PA = Multidrug-Resistant P. aeruginosa, B. cepacia = Burkholderia cepacia (Alexander et al., 2015) infection du SNC due exclusivement à *M. massiliense* (Lee *et al.*, 2012). Très récemment deux cas d'infections de dérivations ventriculo-péritonéales (du liquide cérébro-spinal) causées par *M. abscessus* ont été reportés : chez un homme de 30 ans souffrant d'hydrocéphalie néonatale (Montero *et al.*, 2016) et chez une femme de 67 ans immunocompétente (Levy *et al.*, 2016).

V. Mucoviscidose, MNT et M. abscessus

5.1. <u>Mucoviscidose et infections bactériennes</u>

La mucoviscidose est une maladie génétique létale de transmission autosomique récessive qui détruit progressivement les poumons et le système digestif entravant la vie des patients qui en sont atteints. C'est la maladie génétique la plus fréquente en France et en Europe. Elle touche environ un enfant sur 2 500 naissances en Europe ainsi qu'en Amérique du Nord (Ratjen and Döring, 2003). En France, selon les chiffres de l'association Vaincre la Mucoviscidose, un enfant naît avec la mucoviscidose tous les 3 jours, 7 500 personnes en sont atteintes, et il y a 2 millions de porteurs hétérozygotes sains. Cette maladie est liée à des mutations du gène cftr qui code pour la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). La mutation la plus commune au monde est de classe 2, correspondant à un adressage défectueux du CFTR qui n'atteint pas la membrane de surface apicale où il est destiné à fonctionner. Cette mutation est liée à la délétion d'une phénylalanine en position 508 (F508del) de la protéine CFTR (Kerem et al., 1989; Ratjen and Döring, 2003). La principale fonction du CFTR consiste à agir comme un canal par lequel les ions chlorure peuvent traverser la membrane et sortir de la cellule. La manifestation clinique la plus sévère de la mucoviscidose est l'atteinte pulmonaire. Suite au dysfonctionnement de la protéine CFTR, une anomalie du liquide périciliaire qui tapisse les voies aériennes apparait, favorisant une inflammation et une stase du liquide périciliaire, conduisant à une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires.

Les patients atteints de la mucoviscidose sont sujets à de multiples infections respiratoires par de multiples espèces bactériennes, et constitue un groupe à risque d'infection à MNT.

Historiquement, parmi les bactéries identifiées hors MNT infectant les patients mucoviscidosiques, *Pseudomonas aeruginosa* est la plus fréquemment isolée, suivie par *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Stenotrophomonas maltophilia* (Figure 7).

On assiste actuellement à une augmentation alarmante de la prévalence des infections pulmonaires des adultes et enfants mucoviscidosiques causées par les MNT à la fois en Europe et en Amérique du Nord. Si bien que la Cystic Fibrosis Foundation aux Etats-Unis et l'European Cystic Fibrosis Society en Europe ont édité des directives qui recommandent que les individus atteints de la mucoviscidose et qui sont capables d'expectorer soient contrôlés pour des infections à MNT de manière annuelle (Floto *et al.*, 2016). Le complexe *M. avium* et le complexe *M. abscessus* sont les MNT les plus fréquemment isolées chez les patients atteints de la mucoviscidose (Olivier *et al.*, 2003a; Roux *et al.*, 2009).

Tableau 4. Etudes prospectives de prévalence (moyenne et tranche du taux de prévalence si indiquée dans l'étude) des infections pulmonaires à MNT dans la mucoviscidose et pour lesquelles *M. abscessus* a été identifié chez au moins un patient.

Référence	Pays	Période	Nb patients	Tranche/moyenne âge	Prévalence	
(Fauroux et al., 1997)	France	1995-1996	106	1-18 ans/9,7 ans	6,6%	
(Sermet-Gaudelus <i>et al.</i> , 2003)	France	1996-1999	298	2 mois-32 ans/11,3 ans	9,8%	
(Pierre-Audigier <i>et al.</i> , 2005)	France	3 CRCM	385	1-24 ans/12 ans	8,1%	
(Dailloux et al., 2006)	France	2001-2003	262	< 30 ans	6,1%	
(Roux et al., 2009)	France	41 CRCM sur 49	1582	4 mois-82 ans/18,9 ans	6,6% 3,7-9,6%	
(Cavalli et al., 2017)	France	2009-2014	401	401 18,9±7,4 ans		
(Kilby et al., 1992)	Etats-Unis	1992	87	87 Tous les âges		
(Olivier <i>et al.</i> , 2003a)	Etats-Unis	21 centres	986	>10 ans/23±9 ans	13% 7-24%	
(Esther et al., 2005)	Etats-Unis	1999-2002	114	<12 ans	6,1%	
(Rodman et al., 2005)	Etats-Unis	1992-2004	55	>40 ans	32,7%	
(Esther et al., 2010)	Etats-Unis	2000-2007	1216	Tous les âges	11%	
(Adjemian <i>et al.</i> , 2014)	Etats-Unis	2010-2011	18003	>12 ans	14% 0-28%	
(Salsgiver et al., 2016)	Etats-Unis	2006-2012	33653	Tous les âges	12%	
(Radhakrishnan <i>et al.</i> , 2009)	Canada	2004	98	6-18 ans	6,1%	
(Girón <i>et al.</i> , 2005)	Espagne	1997-2001	28	25,3±6,7 ans	25%	
(Girón <i>et al.</i> , 2008)	Espagne	2 ans	220	6-74 ans/22,62 ans	7,72%	
(Campos-Herrero <i>et al.</i> , 2016)	Espagne	2002-2012	44	3-62 ans	14,1% 0-33,3%	
(Hjelt et al., 1994)	Danemark	1987-1988	185	2,2-38,5 ans/15,3 ans	1,6%	
(Jönsson et al., 2007)	Suède	1997-2005	140	Tous les âges	10%	
(Qvist et al., 2015)	Scandinavie	2000-2012	1411	Tous les âges	11%	
(Qvist et al., 2016)	Danemark	1974-2014	432	0-35,5 ans/12,3 ans	13,4%	
(Bange et al., 2001)	Allemagne	1997-1999	214	21-35 ans	7%	
(Paschoal et al., 2007)	Brésil	2003-2004	54	41,8±17,2 ans	11%	
(Candido et al., 2014)	Brésil	2009-2012	129	2-18 ans	7,75%	
(Mussaffi et al., 2005)	Israël	1997-2002	139	2-52 ans	8,6%	
(Levy et al., 2008)	Israël	2001-2003	186	>5 ans	22,6%	
(Bar-On et al., 2015)	Israël	2002-2011	90	0-59 ans/16,9 ans	14,5%	
(Satana <i>et al.</i> , 2014)	Turquie	2003-2008	130	5-17 ans/12,1±3,1 ans	6,15%	

Nb patients = nombre de patients. CRCM = Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose. Scandinavie = Danemark, Norvège, Suède.

5.2. <u>Mucoviscidose et prévalence des MNT</u>

Les estimations de la prévalence des MNT dans la population des patients mucoviscidosiques ont évoluées de 1,3% dans l'étude la plus ancienne publiée en 1984 (Smith *et al.*, 1984) à 32,7% dans une étude plus récente de 2005 incluant des personnes âgées de plus de 40 ans (Rodman *et al.*, 2005). En comparaison, l'incidence des infections pulmonaires à MNT chez les patients séronégatifs a été estimée à 0,74, 0,73 et 0,72 cas pour 100 000 habitants en 2001, 2002 et 2003, respectivement (Dailloux *et al.*, 2006).

Dès 1980, des cas de patients mucoviscidosiques présentant des infections pulmonaires à MCR sont rapportés dans la littérature (Boxerbaum, 1980). En 2003 une étude de 10 ans et plus, menée dans 21 centres de soins aux Etats-Unis incluant 986 sujets, rapporte une prévalence d'infections pulmonaires de 13% aux MNT (variant de 7% à 24% selon les centres de recensement où se rendent les patients) (Olivier et al., 2003a) ; une autre étude américaine de 2010 menée pendant 8 ans et incluant 1 216 sujets rapporte une prévalence de 11% de culture positive aux MNT (Esther et al., 2010); une étude scandinave de 2015 portant sur 1 411 patients rapporte également une prévalence de 11% (Qvist et al., 2015) ; et enfin une étude de 2009 menée en France incluant 1 582 individus rapporte une prévalence de 6,6% de culture positive aux MNT (variant de 3,7% à 9,6% selon la région de France) (Roux et al., 2009) (Tableau 4). De manière générale aux Etats-Unis, la Cystic Fibrosis Foundation donne un taux moyen de prévalence d'infections aux MNT de 12%, estimation basée sur une étude regroupant toutes les données rapportées à la fondation et incluant 33 653 patients atteints de la mucoviscidose sur plusieurs années (Salsgiver et al., 2016) avec une variation entre les états américains, jusqu'à 28% pour l'Alaska par exemple (Adjemian et al., 2014). Ce taux de 12% est également retrouvé dans la dernière étude française (Cavalli et al., 2017) (Tableau 4).

En Europe et en Amérique du Nord, parmi les infections pulmonaires causées par les MNT, les MCL les plus retrouvées appartiennent au complexe *M. avium* comprenant *M. avium*, *M. intracellulare* et *Mycobacterium chimaera* avec un taux pouvant atteindre 72% (Olivier *et al.*, 2003a). En ce qui concerne les MCR, les plus retrouvées appartiennent au complexe *M. abscessus* comprenant les 3 sous-espèces *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* et *M. bolletii*, qui dans beaucoup de centres sont maintenant devenues les MNT les plus fréquemment isolées chez les patients mucoviscidosiques (Tableau 5).

Référence	MABSC	MAC	M.gor	M.for	M.sim	M.kan	M.che	M.xen	Autres
(Fauroux <i>et al.</i> , 1997)	1			1			2	3	
(Sermet-Gaudelus <i>et al.</i> , 2003)	15	6	7	1		1			
(Pierre-Audigier <i>et al.</i> , 2005)	13	7	6			2	1	1	1M.len/1M.scr 1M.szu
(Dailloux <i>et al.</i> , 2006)	12	2							
(Roux <i>et al.</i> , 2009)	50	23	16	2	1		8	2	2M.per/1M.imm 1M.len/1M.man
(Cavalli et al., 2017)	18	27	1						1M.len/1M.par
(Kilby et al., 1992)	3	11		1			2		
(Olivier <i>et al.</i> , 2003a)	21	94	5			2			2M.len/2M.per 1M.mal/1M.ter
(Esther et al., 2005)	8	10	1						
(Rodman <i>et al.</i> , 2005)	3	15		1	1		1		1M.scr
(Esther et al., 2010)	298	190	15	3					30 autres
(Adjemian <i>et al.</i> , 2014)	554	831							
(Salsgiver <i>et al.</i> , 2016)	1606	2215							262 autres
(Radhakrishnan <i>et al.</i> , 2009)	2	4							
(Girón et al., 2005)	3	2			1				
(Girón et al., 2008)	6	10		1					
(Campos-Herrero <i>et al.</i> , 2016)	7	1		2	7				1M.per
(Hjelt et al., 1994)	5	2	4	1					
(Jönsson et al., 2007)	9	5							1M.len
(Qvist et al., 2015)	70	51		1		1			2M.len/2M.mal
(Qvist et al., 2016)	44	14							
(Bange et al., 2001)	5	8	1		2				1 M.int
(Paschoal <i>et al.</i> , 2007)									9 non distingué
(Candido et al., 2014)	30			1					1M.tim
(Mussaffi <i>et al.</i> , 2005)	8	1	1	1	1				
(Levy et al., 2008)	13	6		4	17				
(Bar-On <i>et al.</i> , 2015)	9	4		1	2		2		
(Satana <i>et al.</i> , 2014)	14								9M.len

Tableau 5. Distribution du nombre de cas des espèces mycobactériennes recensés parmiles prévalences des MNT dans les études de patients avec la mucoviscidose du Tableau 4.

MABSC = complexe *M. abscessus.* MAC = complexe *M. avium* (incluant *M. intracellulare*). M.gor = *M. gordonae.* M.for = *M. fortuitum.* M.sim = *Mycobacterium simiae.* M.kan = *M. kansasii.* M.che = *M. chelonae.* M.xen = *M. xenopi.* M.len = *Mycobacterium lentiflavum.* M.scr = *Mycobacterium scrofulaceum.* M.szu = *Mycobacterium szulgai.* M.per = *Mycobacterium peregrinum.* M.imm = *Mycobacterium immunogenum.* M.man = *Mycobacterium manitobense.* M.par = *Mycobacterium terrae.* M.int = *Mycobacterium interjectum.* M.tim = *Mycobacterium timonense.*



Figure 8. Prévalence des espèces mycobactériennes isolées chez les patients avec la mucoviscidose aux Etats-Unis en 2015.

(Alexander et al., 2015)

Tableau 6. Distribution des patients positifs au complexe *M. abscessus* (MABS), au complexe *M. avium* (MAC), à d'autres MNT (NTM) divisée en tranches d'âge au moment du premier isolement des mycobactéries.

(Roux et al., 2009)

11_15 yr				
(n = 260)	(n = 321)	21-25 yr (n = 257)	>25 yr (n = 367)	Total $(n = 1.582)$
$ \begin{array}{c} 15 \ (5.8)^d \\ 5 \ (1.9)^d \\ 8 \ (3) \end{array} $	14 (4.4) 6 (1.9) 3 (0.9)	9 (3.5) 3 (1.2) 7 (2.7)	5 (1.4) 8 (2.2) 7 (1.9)	50 (3.2) 23 (1.5) 34 (2.1)
	$ \begin{array}{c} (n = 260) \\ 15 (5.8)^d \\ 5 (1.9)^d \\ 8 (3) \\ 27 (10.4) \end{array} $	$\begin{array}{cccc} (n = 260) & (n = 321) \\ \hline 15 (5.8)^d & 14 (4.4) \\ 5 (1.9)^d & 6 (1.9) \\ 8 (3) & 3 (0.9) \\ 27 (10.4) & 22 (6.9) \end{array}$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$

^a Two different mycobacterial species were isolated from three patients (M. massiliense and M. peregrinum, M. abscessus and M. simiae, or M. chelonae and M. gordonae).

^b The youngest patient was 4 months old.

^c This patient was 9 years old. ^d P = 0.02 for MABSC versus MAC.



Figure 9. Granulome bronchique causé par *M. abscessus* chez un patient atteint de la mucoviscidose (section colorée à l'hématoxyline-éosine-safran).

Les flèches noires indiquent des cellules géantes multinucléées (Medjahed et al., 2010).

Dans toutes les études de cohortes de patients atteints de la mucoviscidose, comme évoqué précédemment, on remarque des différences géographiques entre les pays mais également entre les états/régions d'un même pays pour les taux de prévalence aux MNT et pour les pourcentages d'identification de chaque espèce (Tableau 3 et Tableau 4). De manière générale, en France le complexe M. abscessus est prépondérant chez les patients atteints de la mucoviscidose alors que dans les études nord-américaines, le complexe M. avium (Tableau 4 et Tableau 5) est placé en premier (Alexander et al., 2015) (rapport de la Cystic Fibrosis Foundation) (Figure 8). Les colonisations et infections à M. avium et M. intracellulare apparaissent à l'adolescence et sont le plus souvent retrouvées chez les adultes de plus de 25 ans, avec un terrain pulmonaire moyennement altéré par la mucoviscidose, que ce soit en France (Sermet-Gaudelus et al., 2003; Roux et al., 2009; Catherinot et al., 2013), dans les pays scandinaves (Qvist et al., 2015) ou en Amérique du Nord (Olivier et al., 2003a; Rodman et al., 2005). Alors que le complexe *M. abscessus* est isolé dans les sécrétions des voies respiratoires à tout âge mais survient avec une plus grande prévalence chez les enfants et adolescents avec une forme déjà sévère de la maladie, et avec un pic de détection dans la tranche 10-15 ans pour ces patients (Tableau 6) (Esther et al., 2005; Pierre-Audigier et al., 2005; Roux et al., 2009; Catherinot et al., 2013; Qvist et al., 2015; Campos-Herrero et al., 2016).

Les six premières lignes du Tableau 4 regroupe les études de cohortes de patients en France, celle de 1997 est la première étude française où un cas d'infection pulmonaire à *M. abscessus* chez un patient atteint de la mucoviscidose a été identifié (Fauroux *et al.*, 1997).

Une infection à *M. abscessus* chez les patients atteints de la mucoviscidose est associée à un déclin des fonctions respiratoires comme le montre une étude récente (Qvist *et al.*, 2016) où sur 432 patients atteints de la mucoviscidose, sur une étude menée pendant 40 ans entre 1974 et 2014, *M. abscessus* représente le facteur ayant le plus mauvais impact sur les fonctions respiratoires, comparativement aux autres mycobactéries telles que celles du complexe *M. avium* et aux espèces bactériennes retrouvées dans les poumons des patients atteints de la mucoviscidose telles que *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans* et *P. aeruginosa*. Le déclin du volume expiratoire forcé est plus important avec *M. abscessus* avec moins 2,22% par an. L'élément essentiel de cette étude est que l'éradication de *M. abscessus* par un traitement efficace permet de rattraper ce déclin, qui se rapproche alors de celui lié à la maladie mucoviscidosique des patients non infectés (Qvist *et al.*, 2016).

VI. <u>*M. abscessus*</u> : un bacille pseudo-tuberculeux</u>

Bien qu'appartenant au groupe des MCR, *M. abscessus* a tendance à se comporter comme un bacille pseudo-tuberculeux (Roux *et al.*, 2016). *M. abscessus* a la capacité d'induire des infections pulmonaires persistantes et sévères associées à des lésions granulomateuses (une caractéristique des infections à *Mycobacterium tuberculosis*) organisées avec des cellules géantes épithélioides (Figure 9), et voir même dans quelques cas une évolution vers des nécroses caséeuses (Tomashefski *et al.*, 1996). En dehors des infections pulmonaires, dans une étude de 1997, *M. abscessus* est aussi responsable de lésions inflammatoires sévères impliquant le derme et l'hypoderme, consécutives à l'injection de xylocaïne contaminée et ayant trois principaux modèles histopathologiques : des nodules granulomateux ou une inflammation

diffuse avec différents granulomes, des abcès majeurs avec une réaction granulomateuse légère, ou des inflammations granulomateuses dermiques profondes et sous-cutanées (Rodriguez *et al.*, 1997).

VII. <u>M. abscessus et transplantation</u>

Il existe une controverse sur l'infection par M. abscessus et la pertinence de la transplantation pulmonaire chez les patients présentant une pathologie respiratoire nécessitant une greffe, du fait qu'il est difficile d'éradiquer totalement l'infection avant transplantation et de par le risque d'infection disséminée post-transplantation. Dans une enquête internationale regroupant 62 centres de transplantation, 17 receveurs de transplantation pulmonaire ont été identifiés comme infectés par M. abscessus post-transplantation. Seulement 2 étaient infectés avant transplantation, ils avaient reçu au préalable une thérapie antibiotique de 12 mois et n'étaient plus considérés comme activement infectés au jour de la transplantation. Ils ont développé des infections récurrentes à M. abscessus post-transplantation mais cela n'a pas été la cause de leur décès. Pour les 15 autres receveurs pour lesquels M. abscessus a été identifié post-transplantation, seulement deux sont décédés dus à l'infection par M. abscessus, un est décédé d'une autre cause, un n'a pas été traité car son infection n'était pas active et les 10 derniers ont bien répondu au traitement (Chernenko et al., 2006). D'autres études confirment la difficulté d'impliquer M. abscessus dans les infections sévères voire mortelles posttransplantation (Malouf and Glanville, 1999; Lobo et al., 2013; Qvist et al., 2013; Roux et al., 2015).

Malgré tout, quelques cas existent (Sanguinetti *et al.*, 2001; Taylor and Palmer, 2006; Jönsson *et al.*, 2007; Tortoli *et al.*, 2008) pouvant faire discuter l'indication d'une transplantation (Taylor and Palmer, 2006; Floto *et al.*, 2016). Un cas d'infection pulmonaire mortelle causée par *M. abscessus* chez un jeune patient atteint de la mucoviscidose qui avait subi une transplantation pulmonaire a montré cette possibilité d'une dissémination de l'infection mycobactérienne post-transplantation avec des isolements de bactéries dans les échantillons sanguins (Sanguinetti *et al.*, 2001). De même, une étude plus récente montre que deux patients colonisés par *M. abscessus* ont développé des infections disséminées post-transplantation (Jönsson *et al.*, 2007). Il est à noter que la greffe pulmonaire n'est pas la seule en cause. *M. abscessus* a été responsable d'infections disséminées et de lésions cutanées et respiratoires à l'issue de transplantations de reins, cœur ou moelle osseuse (Morales *et al.*, 2010).

VIII. <u>Critères de diagnostic des infections pulmonaires aux MNT</u>

L'ATS et l'IDSA ont publié des recommandations cliniques, radiologiques, et microbiologiques pour pallier à la difficulté d'établir un diagnostic d'infections pulmonaires aux MNT (Griffith *et al.*, 2007). Contrairement à *M. tuberculosis*, où une seule culture positive est significative pour le diagnostic d'une tuberculose pulmonaire ; une expectoration positive à MNT ne signifie pas une mycobactériose pulmonaire, les patients doivent remplir la totalité des
critères définis par l'ATS/IDSA.

8.1. <u>Critères cliniques</u>

Les symptômes respiratoires sont généralement d'installation progressive (Griffith *et al.*, 2007). La toux/expectoration (expulsion par la toux de sécrétions provenant des voies aériennes inférieures) et la dyspnée (difficulté respiratoire de sensation de manque d'air) sont les plus fréquemment observées. D'autres symptômes respiratoires tels que des douleurs thoraciques ou l'hémoptysie (expectoration de sang au cours d'un effort de toux), ou généraux tels qu'un amaigrissement, une asthénie (fatigue physique), une anorexie, ou de la fièvre peuvent être présents.

8.2. Critères radiologiques

Les critères radiologiques sont basés sur la visualisation d'opacités nodulaires ou cavitaires sur une radiographie thoracique ou au scanner avec une bronchiectasie multifocale et de multiples nodules, en excluant ainsi d'autres diagnostics. Les formes nodulaires sont caractérisées par des bronchiectasies, nodules, micronodules branchés qui sont généralement situés dans le lobe moyen et la lingula (partie du lobe supérieur du poumon gauche) (Koh *et al.*, 2005). Une étude a montré des anomalies radiologiques différentes de *M. abscessus* par rapport aux autres MNT (Han *et al.*, 2003).

8.3. Critères bactériologiques

Les critères bactériologiques requis pour affirmer une mycobactériose pulmonaire sont basés sur à la fois un examen microscopique positif des échantillons cliniques associés à plusieurs cultures positives. Par exemple, il faut obtenir soit des résultats d'examen microscopique et/ou de culture positifs aux MNT à partir d'au moins deux expectorations, soit des résultats d'examen microscopique et/ou de culture positifs à partir d'au moins un lavage bronchique, ou une biopsie pulmonaire (transbronchique ou autre) positive en culture et pouvant également présenter des caractéristiques histopathologiques compatibles (inflammation granulomateuse) (Koh *et al.*, 2014; Floto *et al.*, 2016).

8.4. <u>Concertation pluridisciplinaire pour le diagnostic, la mise sous</u> <u>traitement et le suivi</u>

Une consultation d'experts cliniques et microbiologistes devrait être faite pour aider tout clinicien quant au diagnostic, à la mise sous traitement et au suivi thérapeutique. Les patients suspects à cause d'un culture positive à MNT par exemple, donc ne présentant pas les critères de diagnostic de l'ATS/IDSA, doivent être suivis afin que le diagnostic soit solidement établi ou exclu. Etablir un diagnostic d'infection pulmonaire à MNT n'entraine pas systématiquement

l'instauration d'une antibiothérapie. C'est une décision prise en réunion de concertation pluridisciplinaire en se basant sur les risques potentiels et les avantages du traitement pour chaque patient.

8.5. Dans le cas de la mucoviscidose

En ce qui concerne les patients atteints de la mucoviscidose, il est plus difficile d'établir un diagnostic fiable et spécifique car ils présentent souvent les mêmes symptômes qu'ils soient infectés ou non par une MNT (Griffith, 2003; Olivier et al., 2003b; Wyrostkiewicz et al., 2014). L'interprétation des images radiologiques ou tomodensitométriques est également plus délicate. Les critères cliniques de diagnostic comme la toux, les expectorations, l'amaigrissement ou la fatigue restent alors des symptômes peu spécifiques pour ces patients atteints de la mucoviscidose. La fièvre avec des pics inexpliqués ou la persistance de symptômes malgré un traitement antibiotique adapté aux germes habituels peuvent représenter des alertes, entrainant la recherche de MNT dans les expectorations. Les anomalies radiologiques liées à une infection sont difficiles à dissocier des lésions préexistantes liées à la mucoviscidose. L'amélioration des d'isolement bactériologiques a augmenté le rendement des cultures techniques mycobactériennes permettant avec succès la récupération des MNT chez les patients atteints de la mucoviscidose, notamment grâce à la mise au point d'une méthode de décontamination efficace pour P. aeruginosa utilisant l'acide oxalique (Whittier et al., 1997). Cependant pour la recherche de M. abscessus la technique de décontamination reste trop drastique pour ces MCR pouvant entrainer des résultats de culture faussement négatifs (Ferroni et al., 2006). L'identification moléculaire (hsp65, rpoB, erm(41) par exemple) ou par spectrométrie de masse (Fangous et al., 2014) est dorénavant obligatoire pour obtenir l'identification à l'échelle de l'espèce et de la sous-espèce, étant donné les implications thérapeutiques pour certains complexes (Floto et al., 2016).

IX. <u>Résistances aux antibiotiques</u>

M. abscessus présente de multiples résistances aux antibiotiques et est probablement la plus résistante des MCR (Brown-Elliott and Wallace, 2002; Ripoll *et al.*, 2009; Medjahed *et al.*, 2010; Nessar *et al.*, 2012). La plupart des souches de *M. abscessus* sont naturellement résistantes aux antituberculeux classiques tels que l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol ou le pyrazinamide, et à beaucoup d'antibiotiques disponibles tels que les bêta-lactamines à l'exception de l'imipénème et la céfoxitine, l'érythromycine, les cyclines, certaines fluoroquinolones (ofloxacine, ciprofloxacine) ou les sulfamides (Swenson *et al.*, 1982, 1985; Brown *et al.*, 1992; Herdman and Steele, 2004; Griffith *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Ballarino *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2009; Chopra *et al.*, 2011). Des directives pour tester la sensibilité des MCR ont été publiées avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) définies et normées pour évaluer la sensibilité ou la résistance des souches aux antibiotiques recommandés (Woods *et al.*, 2003, 2011; Floto *et al.*, 2016). Les antibiotiques actuels à tester pour la susceptibilité des isolats de *M. abscessus* sont l'amikacine, la céfoxitine, l'imipénème, la moxifloxacine, la clarithromycine, l'azithromycine, la ciprofloxacine, la doxycycline ou minocycline, le

linézolide, le triméthoprime-sulfaméthoxazole et la tobramycine (uniquement pour séparer de *M. chelonae*) (Woods *et al.*, 2011; Brown-Elliott and Philley, 2017). Récemment, la tigécycline a également été proposée pour être ajoutée à cette liste (Singh *et al.*, 2014).

Dans les années 1990, la clarithromycine était l'antibiotique de prédilection pour traiter les infections à M. abscessus et des succès thérapeutiques ont été rapportés avec ce macrolide (Griffith et al., 1993; Maxson et al., 1994; Mushatt and Witzig, 1995). Avec la clarithromycine, la majorité des CMI des souches du complexe M. abscessus se retrouvent dans la gamme sensible après trois jours d'incubation mais deviennent résistantes après une incubation prolongée de 14 jours. En effet, il a été récemment découvert que M. abscessus sensu stricto possède un gène de résistance naturelle inductible aux macrolides erm(41) qui méthyle le site de liaison entre l'ARNr 23S et les macrolides, conférant une résistance inductible à la clarithromycine (Nash et al., 2009; Choi et al., 2012a). Ce gène erm(41) est présent sous forme également active chez M. bolletii mais sous forme tronquée non fonctionnelle chez M. massiliense (Kim et al., 2010; Bastian et al., 2011) conservant ainsi une sensibilité à la clarithromycine contrairement à 80% des isolats de M. abscessus sensu stricto (Brown-Elliott et al., 2015). Des études cliniques récentes ont montré que les patients infectés par M. massiliense répondaient plus favorablement au traitement que ceux infectés par M. abscessus sensu stricto du fait de l'absence d'induction in vivo de la résistance à la clarithromycine (Koh et al., 2011; Harada et al., 2012; Kim et al., 2012; Lyu et al., 2014; Roux et al., 2015). La présence de ce gène explique les échecs cliniques observés dans le traitement des infections à M. abscessus sensu stricto (Yang et al., 2003), la résistance à la clarithromycine pénalisant l'efficacité thérapeutique de la poly-chimiothérapie anti-M. abscessus (Tanaka et al., 2002). Ainsi le « Clinical and Laboratory Standards Institute » a recommandé que la lecture finale des CMI de la clarithromycine soit évaluée à 14 jours pour détecter cette résistance inductible (Woods et al., 2003, 2011; Griffith et al., 2015). Des tests moléculaires ont été mis au point permettant un diagnostic rapide de cette résistance (Hanson et al., 2014). Le séquençage du gène erm(41) permettant également l'identification précise de la sous-espèce est essentiel pour prédire l'efficacité thérapeutique du traitement antibiotique indiqué (Lichtenstein and MacGregor, 1983; Bryant et al., 2013; Knoll, 2014; Lee et al., 2014; Brown-Elliott et al., 2015; Shallom et al., 2015; Floto et al., 2016).

CHAPITRE III : RÉSERVOIR ET TRANSMISSION DE M. ABSCESSUS

I. <u>Réservoir environnemental de M. abscessus</u>

Les MNT sont des organismes environnementaux ubiquitaires. Des études rapportent la présence du complexe *M. abscessus* dans l'environnement, le sol, l'eau, les plantes (Falkinham *et al.*, 2001; Smibert *et al.*, 2016) mais, dans les faits, *M. abscessus* est plus souvent retrouvée au sein d'un environnement médicalisé, et plus rarement dans l'environnement naturel eau, sol, poussières... Un exemple simple : l'étude des réseaux d'eau parisiens n'a pas permis de mettre en évidence *M. abscessus*, alors que *M. chelonae* et *Mycobacterium llatzerentse* étaient retrouvées en grande quantité selon les réservoirs étudiés (Konjek *et al.*, 2016). De même, une étude démontrant l'existence des clones identiques de *M. abscessus* et *M. massiliense* entre patients atteints de la mucoviscidose traités dans le même centre de soin, faisant l'hypothèse d'une transmission interhumaine (Chapitre III. II. Transmission interhumaine de *M. abscessus*), n'a jamais pu mettre en évidence *M. abscessus* dans l'environnement des patients (Bryant *et al.*, 2013, 2016).

M. abscessus résiste aux principaux désinfectants organo-mercuriels, au chlore et au glutaraldéhyde, expliquant sa transmission par des matériels et la survenue d'infections nosocomiales (Duarte *et al.*, 2009). On constate donc essentiellement une présence dans un environnement lié aux soins. Une seule étude décrit la présence de *M. abscessus* dans l'environnement (Brisbane, Australie) (Thomson *et al.*, 2013).

II. Transmission interhumaine de M. abscessus

Contrairement à la tuberculose pulmonaire, il n'y a pas de transmission interhumaine des MNT responsables de mycobactériose pulmonaire (Griffith *et al.*, 2007). Deux études récentes sur *M. abscessus* remettent en cause cette affirmation et rapportent une transmission interhumaine, directe ou indirecte, entre les patients atteints de la mucoviscidose infectés par *M. abscessus* (Bryant *et al.*, 2013, 2016). En utilisant le séquençage complet du génome, 168 isolats provenant de 31 adultes fréquentant un centre de patients atteints de la mucoviscidose ont été examinés entre 2007 et 2011 au Royaume-Uni (Bryant *et al.*, 2013). Deux groupes d'épidémies ont été identifiés chez 11 patients présentant une infection à *M. massiliense*, les isolats issus de différents patients présentant moins de variation génétique que ceux issus d'un seul individu. Cependant il s'agit d'une étude rétrospective et une contamination par une source hospitalière en tant que composante de la chaine de transmission n'est pas à exclure (Böttger, 2013; Smibert *et al.*, 2016). Dans la deuxième étude, les auteurs montrent que la majorité des infections pulmonaires à *M. abscessus* sont acquis par transmission via des fomites ou des aérosols (Bryant *et al.*, 2016). Mais à aucun moment, l'isolement dans l'environnement des patients infectés de *M. abscessus* n'a pu être démontré. Une étude de 2012 a tout de même

décrit une épidémie d'infections pulmonaires à *M. massiliense* entre plusieurs patients sans pouvoir identifier de source environnementale dans le centre de prise en charge de la mucoviscidose (probablement du matériel médical) (Aitken *et al.*, 2012), la similarité des isolats suggérant une transmission indirecte entre patients plutôt qu'une acquisition environnementale. D'autres études, y compris une étude sur génome entier, n'ont trouvé aucune preuve d'une transmission de patient à patient (Bange *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2003a; Harris *et al.*, 2014). Le mode de transmission le plus probable reste indirect par une source commune tel qu'un bronchoscope ou autre équipement contaminé lié aux soins ou à l'environnement du patient.

Cela n'empêche pas la mise en place de politique de prévention comme par exemple la séparation des patients avec une infection à *M. abscessus* dans les centres de transplantation (Cystic Fibrosis Trust, 2011; Saiman *et al.*, 2014). Des précautions pour limiter le risque de contamination sont également à prendre au domicile du patient : limiter le nombre de plantes, pas d'aquarium, désinfecter les robinets et pommeaux de douche (Harris *et al.*, 2014).

III. <u>Rencontre de M. abscessus avec les amibes</u>

De par sa présence supposée et récemment démontrée (Thomson *et al.*, 2013) dans le sol et les différents réseaux d'eau, *M. abscessus* interagit sûrement avec les protozoaires environnementaux telles que les amibes libres.

Sur le terrain, l'interaction entre les mycobactéries et les amibes est peu documentée (Yu *et al.*, 2007; White *et al.*, 2010; Delafont *et al.*, 2014). Le premier article qui recense la preuve d'une association entre des mycobactéries et des amibes dans l'environnement est sorti en 2014, cette étude concernait une analyse d'un réseau d'eau potable (Delafont *et al.*, 2014). Une autre étude en 2007, montre l'interaction entre une amibe *Acanthamoeba lugdunensis* et une mycobactérie dans une solution de rinçage de lentilles oculaires, cette mycobactérie s'est multipliée en amibe pendant 6 ans sans qu'aucun effet cytopathologique sur les amibes ait pu être observé (Yu *et al.*, 2007).

La mise au point d'une technique de co-culture d'amibes auxquelles on ajoute des prélèvements environnementaux a permis de démontrer cette interaction amibes-mycobactéries sans ambiguïté (Greub and Raoult, 2004). Ainsi, des mycobactéries ont pu être isolées à partir de lysats co-cultivés en présence d'amibes dans une station de traitement des eaux (Thomas *et al.*, 2008), et *M. massiliense* à partir d'un crachat de patient après co-culture avec des amibes alors que la culture seule n'avait pas permis d'isoler cette mycobactérie (Adékambi *et al.*, 2004). Les amibes sont de plus en plus considérées comme un incubateur à mycobactéries (Bakala N'Goma *et al.*, 2015) et *Acanthamoeba sp.* comme un hôte naturel environnemental pour beaucoup de MNT. Les systèmes de co-culture amibes plus mycobactéries sont de plus en plus proposés comme des modèles simples et rapides pour caractériser des facteurs impliqués dans la croissance intracellulaire des mycobactéries (Lamrabet *et al.*, 2012).

Expérimentalement, la capacité de *M. chelonae*, *M. abscessus* et *M. immunogenum* à survivre dans les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba polyphaga* a été décrite (Adékambi *et al.*, 2006). En laboratoire, la capacité de *M. abscessus* à survivre mais également à se

multiplier dans les amibes a également été montrée (Adékambi *et al.*, 2004; Bakala N'Goma *et al.*, 2015). Cela contribue aussi à la virulence des mycobactéries opportunistes telles que *M. avium* (Cirillo *et al.*, 1997) et *M. abscessus* (Bakala N'Goma *et al.*, 2015), ce qui supporte l'argument que les amibes ont « éduqué » ces mycobactéries comme de futures bactéries pathogènes pour l'homme (Cirillo *et al.*, 1994; Barker, 1999; Gomez-Valero and Buchrieser, 2013). Dans le même contexte, après avoir confirmé la survie intracellulaire de *M. abscessus* au sein des amibes, il a été montré que leur co-culture augmentait la virulence de *M. abscessus* chez la souris (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

CHAPITRE IV : FACTEURS DE VIRULENCE DE M. ABSCESSUS

I. Facteurs de virulence mycobactériens

M. abscessus est un pathogène opportuniste, comparativement à *M. tuberculosis* pathogène strict pour l'homme et l'animal. *M. abscessus* possède un génome qui évolue encore, avec une possibilité d'acquisition d'ADN étranger par transfert horizontal (Pawlik *et al.*, 2013; Choo *et al.*, 2014). L'analyse du génome de *M. abscessus* révèle la présence de nombreux facteurs de virulence putatifs auparavant identifiés chez les MCL pathogènes strictes, et pouvant faciliter la capacité de *M. abscessus* à interagir avec des hôtes et un environnement intracellulaire (Ripoll et al. 2009). Les facteurs de virulence d'origine mycobactéries et présents chez *M. abscessus* sont :

- Les gènes codant pour les familles PE (Proline-Glutamate), PPE (Proline-Proline-Glutamate) et ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target) hautement immunogènes avec leurs motifs caractéristiques souvent associés aux opérons de gènes ESX et connus pour jouer un rôle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* (Sørensen *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1998; Gey van Pittius *et al.*, 2006; Sayes *et al.*, 2012). En collaboration avec Wilbert Bitter, nous avons identifié cinq gènes avec un motif PE, six gènes avec un motif PPE et 13 gènes contenant le motif WXG100 du facteur sécrété de 6 kDa (kilo Dalton) ESAT-6 dans le génome de *M. abscessus* (Figure 25A. Résultats. Partie II. I.).
- Les gènes mce (mammalian cell entry) et yrbE (oxidoreductase) qui codent pour des protéines permettant aux mycobactéries et plus généralement aux actinomycètes d'envahir les cellules hôtes (Arruda et al., 1993; Flesselles et al., 1999; Rodríguez et al., 2015). Les sept opérons mce de M. tuberculosis sont impliqués dans sa virulence (Chitale et al., 2001; Shimono et al., 2003; Gioffré et al., 2005), le transport des lipides (Forrellad et al., 2014), la reconnaissance et l'invasion cellulaires en favorisant son internalisation dans les cellules de mammifères (El-Shazly et al., 2007) et en initiant une induction rapide de la transcription des gènes impliqués dans le trafic des substrats (Stavrum et al., 2012). Chez M. abscessus, ces gènes sont également regroupés de façon similaire en sept opérons. Chez Mycobacterium smegmatis, ils sont au nombre de quatre et l'un est interrompu par un élément de séquence d'insertion (Ripoll et al., 2009). Chez M. massiliense, il a été montré que l'opéron MmGI-1 (M. massiliense Genomic Island-1) serait le résultat de transferts horizontaux ou de recombinaisons génétiques qui auraient eu lieu entre lui et le complexe M. avium (Sekizuka et al., 2014). Il a également été suggéré que le nombre d'opérons mce peut être un indicateur de pathogénicité chez les actinomycètes : il y en a six dans le génome de N. farcinica agent provoquant la

nocardiose mais seulement un chez *Streptomyces avermitilis* et *Streptomyces coelicolor*, bactéries non pathogènes (Ishikawa *et al.*, 2004).

- Les gènes codant pour les protéines de type LpqH, également connus sous le nom de lipoprotéine de 19 kDa, jouant un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire, régulant la réponse des cytokines, et agonistes des TLR-2 (Toll Like Receptor-2), reconnus par les lymphocytes T et les sérums de patients avec la tuberculose (Garbe *et al.*, 1993; Thoma-Uszynski *et al.*, 2001; Pennini *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2012). Chez *M. tuberculosis*, ces protéines sont impliquées dans la reconnaissance bactérienne par le système immunitaire et l'activation des macrophages (Roux *et al.*, 2011; Sekizuka *et al.*, 2014). *M. abscessus* possède quatre gènes codant pour ces lipoprotéines de type LpqH dispersés dans tout le génome MAB_0885c, MAB_2379, MAB_3261c et MAB_4074c, suggérant une implication dans la pathogénicité par modification de la réponse de l'hôte (Ripoll *et al.*, 2009).
- Par comparaison entre *M. tuberculosis, M. smegmatis* et *M. abscessus*, des régulateurs transcriptionnels connus pour contrôler des facteurs de virulence ont été identifiés. *M. abscessus* possède des homologues des cinq facteurs sigma de *M. tuberculosis* (SigA, SigC, SigD, SigE et SigH) impliqués dans sa virulence, alors que *M. smegmatis* n'en possède que quatre. Le facteur SigA est par exemple connu chez *M. tuberculosis* pour moduler l'expression de gènes contribuant à sa virulence et augmentant sa croissance dans les macrophages humains (Wu *et al.*, 2004). *M. abscessus* possède également une protéine homologue au facteur de transcription de virulence VirS de *M. tuberculosis*, alors que *M. smegmatis* non.
- *M. abscessus* possède également deux loci ESX (ESX-3 et ESX-4) appartenant au système de sécrétion de type VII retrouvé chez *M. tuberculosis* qui possède cinq loci (ESX-1 à ESX-5) et impliqué dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* (Chapitre VII. Les systèmes de sécrétion).
- Le génome de *M. abscessus* comprend aussi une famille de transporteurs transmembranaires les Mycobacterial membrane protein Large (MmpL) qui représentent une sous-classe des transporteurs RND (Résistance-Nodulation-Division) (Viljoen *et al.*, 2017). L'étude de ces transporteurs spécifiques aux mycobactéries émerge depuis quelques années pour plusieurs raisons (*i*) ce sont des acteurs clés dans l'élaboration de l'enveloppe mycobactérienne (notamment dans le transport et/ou la maturation des lipides) et donc indirectement les MmpL participent à la pathogénèse puisque l'enveloppe mycobactérienne est protectrice vis-à-vis de l'hôte. Le KO des gènes *mmpl4, mmpl5, mmpl7, mmpl8, mmpl10* ou *mmpl11* chez *M. tuberculosis* conduit à une diminution significative de la virulence chez la souris (Converse *et al.*, 2003; Domenech *et al.*, 2005; Lamichhane *et al.*, 2005). A nouveau chez *M. tuberculosis*, MmpL7 est responsable du transport des PDIM et PGL, MmpL8 des sulfolipides,

MmpL10 du tréhalose, MmpL11 du monomeromycolyl diacylglycerol, MmpL3 du tréhalose. Par comparaison, chez les MNT seules MmpL4a et MmpL4b chez *M. abscessus* et *M. bolletii* ont été étudiées et sont responsables du transport des GPL à la surface des bactéries (Medjahed and Reyrat, 2009; Bernut *et al.*, 2014, 2016) (*ii*) ce sont aussi des pompes responsables de l'efflux de molécules anti-mycobactériennes dont la bédaquiline pour MmpL5 de *M. tuberculosis* (Hartkoorn *et al.*, 2014). Le génome de *M. abscessus* comprend 27 MmpL alors que le génome de *M. tuberculosis* ne compte que 13 MmpL, de même parmi les MNT, le clade *M. abscessus* est le clade qui contient le plus de MmpL (Viljoen *et al.*, 2017). Il y a un véritable enjeu pour comprendre le rôle de cette abondance des MmpL chez *M. abscessus* pour peut-être expliquer la singularité de cette MCR atypique.

II. Facteurs de virulence non mycobactériens

Comme mentionné précédemment, *M. abscessus* semble avoir acquis par transfert horizontal des gènes de virulence provenant de bactéries environnementales pour la plupart des Actinobactéries avec un pourcentage en GC élevé telles que *Rhodococcus spp* ou *Streptomyces spp* mais également des Pseudomonades en partageant sûrement le même écosystème. Par comparaison avec ce qui est absent dans le génome de *M. smegmatis*, d'autres régions métaboliques provenant d'une acquisition par ces bactéries environnementales ont été identifiées chez *M. abscessus*. Des facteurs de virulence d'origine non mycobactérienne trouvés chez *M. abscessus* sont également présents dans les deux autres agents pathogènes les plus fréquemment isolés chez les patients avec la mucoviscidose *P aeruginosa* et *B. cepacia*. Tous ces gènes de virulence acquis par *M. abscessus* au cours de son évolution le dotent d'un arsenal de gènes caractéristiques de bactéries intracellulaires et contribuent à sa survie intracellulaire dans les cellules environnementales ou humaines. Parmi les gènes d'origine non mycobactérienne retrouvés chez *M. abscessus* nous retrouvons :

MAB_0555 code une phospholipase C (PLC) absente de la plupart des autres MCR. Les PLC bactériennes sont reconnues comme facteurs de virulence clés permettant aux pathogènes intracellulaires d'échapper des vacuoles phagosomales en perturbant les membranes eucaryotes (Titball, 1993). *M. tuberculosis* possède quatre gènes codant la PLC : *plcABC* et *plcD*, et la délétion de ces gènes engendre une faible activité enzymatique et une virulence atténuée dans la souris (Raynaud *et al.*, 2002), mais contredit récemment (Le Chevalier *et al.*, 2015). La PLC de *M. abscessus* ressemble beaucoup aux protéines de *Streptomyces spp, Chromobacterium violaceum*, et *P. aeruginosa* (Ripoll *et al.*, 2009). Il a été montré qu'un mutant dépourvu de PLC chez *M. abscessus*, perdait sa capacité de survie intracellulaire dans les amibes. De plus, la PLC de *M. abscessus* n'est exprimée qu'en présence d'amibes, et une culture de cette mycobactérie en présence de ces trophozoïtes environnementaux a permis d'engendrer une infectivité pulmonaire augmentée chez la souris par rapport à une souche cultivée en milieu liquide classique (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

- MAB_3593 code une protéine MgtC absente de M. smegmatis mais présente chez M. chelonae (Ripoll et al., 2009) et utilisée par les bactéries pathogènes pour capter le Mg²⁺ dans la cellule et faciliter ainsi leur survie intracellulaire. Cela a été montré en premier chez Salmonella où MgtC est essentiel pour sa croissance dans les phagocytes professionnels tels que les macrophages (Moncrief and Maguire, 1998). De même, un gène délété chez M. tuberculosis atténue fortement sa virulence dans les macrophages et chez la souris (Buchmeier et al., 2002). Ce gène mgtC semble avoir été acquis par transfert génétique horizontal chez M. abscessus probablement d'autres Actinobactéries et est important pour son mode de vie intracellulaire (Le Moigne et al., 2016). L'annotation du génome de M. abscessus révèle un second gène MAB_0146 codant une protéine MgtC putative.
- MAB_0120 code une méthionine sulfoxyde réductase MsrA. Cette protéine intervient chez *M. tuberculosis* pour le protéger des dommages oxydatifs causés par les intermédiaires d'azote réactifs produits par les macrophages (St John *et al.*, 2001). Chez *M. abscessus*, le gène *msrA* est situé à proximité de *sodA* qui code une superoxyde dismutase, enzyme dont la fonction est la désintoxication des ROS (Reactive Oxygen Species, dérivés réactifs de l'oxygène) par conversion d'O₂ en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (stress oxydatif) (Fridovich, 1995). La protéine MsrA de *M. abscessus* ressemble étroitement à celle de *Rhodococcus spp* fournissant une preuve supplémentaire pour l'acquisition par transfert horizontal d'un pool de gènes non mycobactériens. L'annotation du génome de *M. abscessus* révèle également les gènes *MAB_1050c* et *MAB_2979* codant respectivement une méthionine sulfoxyde réductase.
- MAB_1501, MAB_1502, MAB_1503 et MAB_1504, groupe de quatre gènes similaires, codent un transporteur ABC du fer chez un certain nombre de bactéries pathogènes telles que *Rhodococcus spp*, *Salmonella spp* et *Burkholderia spp*. Ces agents bactériens ont développé des systèmes d'acquisition du fer qui est présent en concentration limitée dans les hôtes vivants (Ripoll *et al.*, 2009; Letek *et al.*, 2010).
- Facteurs liés à la biosynthèse de la phénazine (MAB_0295, MAB_0296, MAB_0297, MAB_0298), métabolites secondaires avec une activité antibiotique à large spectre contre les bactéries, les champignons, et les parasites produits par *Pseudomonas spp* et *Streptomyces spp*. Par exemple la pyocyanine, phénazine bleue synthétisée par *P. aeruginosa* est impliquée dans sa persistance et sa virulence chez les patients atteints de la mucoviscidose (Lau *et al.*, 2004).
- Facteurs liés à une voie catabolique pour la biosynthèse de pyomélanine, pigment clé dans les étapes de colonisation des voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose par *P. aeruginosa* et soupçonné de faciliter l'acquisition du fer (Ernst *et al.*, 2003).

- Facteurs liés à la dégradation de l'acide phénylacétique (*MAB_0906*, *MAB_0907*, *MAB_0908*, *MAB_0909*, *MAB_0910*) également présents chez *B. cepacia* et chez qui l'homologue de *MAB_0910* est essentiel pour sa survie dans un modèle d'infection pulmonaire chronique chez le rat (Hunt *et al.*, 2004).
- Facteurs liés à la dégradation de l'ADN présents en grande quantité dans le mucus bronchique des patients atteints de la mucoviscidose et pouvant constituer une importante source de nutriments pour *M. abscessus*, tels que les gènes du locus *dnd* (*MAB_1093c*, *MAB_1094*, *MAB_1095*, *MAB_1096*, *MAB_1097*, *MAB_1098*) codant pour des cystéines désulfurases. Le génome de *Streptomyces lividans* possède également un locus *dndA-E* codant pour une cystéine désulfurase impliquée dans le phénotype dit « Dnd » de dégradation de l'ADN observé *in vitro* (Zhang *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005).



Figure 10. Morphologie de colonies de M. abscessus variant S et R.

(A) Morphologie d'une colonie du variant S de *M. abscessus* à gauche et du variant R à droite. Ce sont des colonies de 7 jours cultivées sur milieu solide 7H11 (Byrd and Lyons, 1999).

(B) Morphologie de colonies de *M. abscessus* après 5 jours d'incubation à 37°C sur milieu solide de sang de cheval. A gauche, souche présentant des colonies lisses S ; à droite, souche présentant des colonies rugueuses R provenant d'un patient atteint de la mucoviscidose (Jönsson *et al.*, 2007).

CHAPITRE V : LA TRANSITION LISSE (S) RUGUEUSE (R) CHEZ M. ABSCESSUS

I. Morphotypes S et R de M. abscessus

M. abscessus a la particularité de présenter deux morphotypes différents facilement identifiables sur milieu de culture solide : le morphotype S pour Smooth (lisse) et le morphotype R pour Rough (rugueux) (Byrd and Lyons, 1999). A l'œil nu sur milieu de culture solide, le variant S forme des colonies bien rondes d'aspect lisse et brillant, le variant R forme des colonies irrégulières d'aspect sec et rugueux (Figure 10). Le variant S est doté d'une mobilité par glissement et d'une capacité à former des biofilms (Williams *et al.*, 2009). Quant au variant R, il possède la propriété de s'agréger et de former des cordes donnant un agencement de mycobactéries très caractéristique en milieu liquide (Sánchez-Chardi *et al.*, 2011), ce phénomène de cording étant également observé chez *M. tuberculosis* (Figure 11).

Ces différences de morphotype et de comportement entre les deux variants S et R de *M. abscessus* sont associées à une caractéristique qui est la présence à la surface de la bactérie de glycopeptidolipides (GPL), en grande proportion dans la paroi des variants S mais totalement absent chez les variants R. Les GPL sont un des composés les plus abondants de la surface externe de la paroi mycobactérienne chez la majorité des MNT (Howard et al., 2006; Ripoll et al., 2007). La perte de ces GPL de surface peut s'observer par chromatographie sur couche mince après extraction lipidique (Figure 12). Cette transition est considérée comme irréversible et toujours dans le sens S vers R. Elle survient exclusivement in vivo, les formes R n'étant pas retrouvées dans l'environnement extérieur. De nombreux cas de patients avec des infections pulmonaires persistantes à M. abscessus sont reportés comme arborant à la fois des colonies de morphologies S et R (Jönsson et al., 2007; Gilljam et al., 2010; Rüger et al., 2014). Une étude décrit même l'émergence de morphotypes R chez un patient atteint de la mucoviscidose initialement infecté avec un morphotype S de M. abscessus, les deux morphotypes identifiés comme étant issus de la même souche (Figure 13) (Catherinot et al., 2009). Chez la souris, à l'issue d'un challenge intraveineux avec la souche type de M. abscessus de morphotype S, des colonies de variant R ont été isolées 45 jours plus tard (Rottman et al., 2007). Cette capacité à passer du morphotype S vers R in vivo pourrait ainsi représenter une stratégie permettant à *M. abscessus* d'évoluer d'une forme colonisatrice vers une forme virulente capable de moduler la réponse du système immunitaire et garantir sa survie dans l'hôte.



Figure 11. Phénomène de cording de variants R de M. abscessus.

Au grossissement moyen à gauche (échelle 7,5 μm) et à fort grossissement au milieu (échelle 1,9 μm), et colorés au Ziehl-Neelsen à droite (échelle 20 μm) (Sánchez-Chardi *et al.*, 2011).

(A, C, D, E) Différentes souches de M. abscessus.

(B) Souche BCG de *Mycobacterium bovis*.

II. <u>Hypervirulence des variants rugueux</u>

Les premières comparaisons ont été faites chez la souris (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007; Rottman *et al.*, 2007). Les morphotypes R provoquent une infection persistante avec apparition de lésions caséeuses, ils ont la capacité de se multiplier dans les poumons de souris, et ils sont associés à une mortalité élevée ainsi qu'à une production accrue du TNF (Tumor Necrosis Factor) par les macrophages murins issus de moelle osseuse au cours de l'infection (Figure 14 et Figure 15).

Chez l'homme les variants R sont retrouvés dans les infections sévères, persistantes, notamment chez les patients atteints de la mucoviscidose infectés depuis de nombreuses années (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007, 2009; Jönsson *et al.*, 2007; Gilljam *et al.*, 2010).

L'augmentation de la virulence des variants R résulte principalement d'une réponse inflammatoire intense, liée au démasquage de ligands TLR-2 à l'issue de la perte des GPL, avec une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (Rhoades *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2011; Roux *et al.*, 2011).

La relation entre le défaut d'expression des GPL en surface et l'hypervirulence des formes R de *M. abscessus* reste beaucoup étudiée. Les GPL possèdent une propriété antiphagocytaire (Villeneuve *et al.*, 2003). Les formes lisses possèdent des propriétés proinflammatoires, mais moindre que les formes R. L'ajout de GPL natifs ou dé-acétylés dans le milieu de culture d'une infection de macrophages par le variant R de *M. abscessus* ne modifie pas la réponse pro-inflammatoire induite par les variants R (Catherinot *et al.*, 2007).

Les GPL sont codés par de nombreux gènes présents sur le chromosome de M. abscessus et organisés pour la plupart en opéron (Ripoll et al., 2007). Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires derrière les différences de morphotypes S et R, une comparaison des génomes et transcriptomes des variants S et R de trois souches isogéniques de *M. abscessus* a révélé la présence de polymorphisme nucléotidique, de délétions et insertions (indels) au sein du cluster de gènes *mps1-mps2-gap* (peptide synthase non-ribosomale) ou dans les gènes mmpL4b et pstA respectivement impliqués dans la synthèse ou le transport des GPL chez les variants R, en cohérence avec les différences transcriptionnelles identifiées dans ces loci (Pawlik et al., 2013). Ces gènes nécessaires à la biosynthèse des GPL étaient fortement réprimés chez le variant R contrairement à d'autres gènes tels que lpd et nrd impliqués respectivement dans la résistance au stress oxydatif et la réparation de l'ADN dont l'expression était modifiée et qui pourraient jouer un rôle dans la persistance. Auparavant il avait été montré qu'une inactivation du gène mmpL4b dans le morphotype S de M. abscessus par insertion d'une cassette de résistance antibiotique entrainait la perte des GPL de surface, l'augmentation de la synthèse et l'exposition des lipoprotéines à la surface, et donnait un morphotype R très similaire au variant R sauvage (Medjahed and Reyrat, 2009; Pawlik et al., 2013; Roux et al., 2016).



Figure 12. Perte des GPL dans les variants Rough de M. abscessus.

Analyse par chromatographie sur couche mince des extraits lipidiques bruts des souches CIP104536^T (T) et 390S, variants Smooth ; CIP104536^T-R (T-R) et 390R, variants Rough. La position des GPL est indiquée à droite. E : phase exponentielle, S : phase stationnaire (Catherinot *et al.*, 2007).



Figure 13. Dynamique de la fonction pulmonaire, résultats microbiologiques, et traitements antimycobactériens (1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème}).

(a) Clarithromycine, ciprofloxacine, et doxycycline. (b) Clarithromycine, imipenème (5 mois), amikacine (4 mois et demi) et amikacine nébulisée (6 mois). Les ronds vides et remplis représentent respectivement les résultats de culture négatifs et positifs, les lettres en-dessous indiquent le morphotype de *M. abscessus* identifié. PB : échantillon de biopsie pulmonaire, BAL : liquide de lavage broncho-alvéolaire, VESM : volume expiratoire forcé (Catherinot *et al.*, 2009).

Un autre élément important jouant un rôle dans la virulence du morphotype R est sa capacité à s'agréger et à former des cordes *in vitro* (Howard *et al.*, 2006; Sánchez-Chardi *et al.*, 2011) mais surtout *in vivo* (Bernut *et al.*, 2014). Une taille excessive de ces cordes empêche leur phagocytose par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles comme démontré *in vivo* au sein du poisson zèbre (Bernut *et al.*, 2014) et également *ex vivo* sur des cellules mononuclées circulantes (Jönsson *et al.*, 2012). Le phénomène de cording déclenche une formation d'abcès conduisant à la mort rapide des embryons de zébrafish, et joue un rôle crucial dans la physiopathologie de l'infection à *M. abscessus in vivo*. Cette étude met en avant la formation de cordes en tant que mécanisme d'évasion du système immunitaire de l'hôte et propose un modèle de processus d'infection pour les embryons de zébrafish (Figure 16) (Bernut *et al.*, 2014).

Plus récemment, notre équipe a montré que la nature agrégative des variants R de M. *abscessus* engendrait une différence dans l'internalisation M. *abscessus* par les macrophages (Roux *et al.*, 2016).



Figure 14. Hyper-létalité des variants R par rapport aux variants S de deux souches de *M. abscessus* dans un modèle murin d'infection par voie intraveineuse.

(Catherinot et al., 2007)



Figure 15. Augmentation de la production du TNF libéré par les macrophages murins infectés avec des variants R de *M. abscessus*.

(Catherinot et al., 2007)

CHAPITRE VI : M. ABSCESSUS ET CELLULES PHAGOCYTAIRES

I. <u>Croissance intracellulaire de M. abscessus</u>

Depuis de nombreuses années, *M. abscessus* a été montré comme possédant la capacité de persister mais également de se multiplier au sein de plusieurs types cellulaires, comportement habituellement observé chez les MCL mais pas chez les MCR comme *M. fortuitum*, et *M. smegmatis* (Byrd and Lyons, 1999). *M. abscessus* est également capable de survivre et de se multiplier dans les cellules endothéliales (Baltierra-Uribe *et al.*, 2014), les fibroblastes, et les cellules présentatrices d'antigènes tels que les macrophages et cellules dendritiques humaines et murines (Oberley-Deegan *et al.*, 2009; Nessar *et al.*, 2011; Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Roux *et al.*, 2016). *M. abscessus* résiste également à l'action des polynucléaires neutrophiles, avec un défaut d'activation de ces derniers en réponse à une infection à *M. abscessus* comparativement à une infection à *S. aureus* (Malcolm *et al.*, 2013).

II. <u>Importance de la réponse lymphocytaire T et B pour le contrôle de</u> <u>l'infection à *M. abscessus*</u>

La majorité des MCR est éliminée par le système immunitaire mais ce n'est pas le cas de *M. abscessus* qui comme mentionné précédemment persiste et se multiplie chez l'homme (Griffith *et al.*, 1993). Les lymphocytes B quant à eux sont également nécessaires et jouent un rôle dans la persistance de la charge bactérienne dans le foie chez la souris et dans le contrôle de la transition S vers R puisque chez des souris KO pour la chaîne μ des Ig et infectées par le morphotype S, une transition vers le phénotype R est observée (Rottman *et al.*, 2007).

En plus du recrutement des cellules de l'immunité, le contrôle de l'infection à *M. abscessus* repose sur la production d'IFN- γ et de TNF. Suite à l'internalisation des mycobactéries, les phagocytes vont développer, en réponse à une stimulation des cytokines, tout un arsenal de mécanismes dans le but de détruire les bacilles. Les mycobactéries étant phagocytées par les macrophages, ces derniers s'activent et produisent des interleukines qui vont alors stimuler la production d'IFN- γ par les lymphocytes T. L'IFN- γ active à son tour les neutrophiles et les macrophages. Ce rétrocontrôle positif entre les interleukines et l'IFN- γ permet de contrôler l'infection en stimulant la synthèse du TNF pour éliminer les mycobactéries (Shin *et al.*, 2008). La phagocytose efficace de *M. abscessus* et les productions de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les macrophages sont liées à l'activation de la kinase ERK1/2 et à la coopération entre les récepteurs Dectine-1 et TLR-2 (Shin *et al.*, 2008). De plus, l'infection de modèles murins KO déficients en TNF, ainsi que le modèle poisson zèbre (Bernut *et al.*, 2016) montre que ce médiateur est essentiel pour le contrôle de l'infection à *M. abscessus* car sinon l'infection est létale pour les souris KO en moins de quatre semaines (Rottman *et al.*, 2007).





Après l'injection dans la circulation sanguine (1), *M. abscessus* est rapidement engloutie par les macrophages (2) (3). Ces macrophages infectés migrent du système vasculaire vers les tissus nerveux, deviennent fortement infectés (4), et éventuellement meurent (5). L'apoptose des cellules conduit à la libération des variants S (suivre les flèches et l'écriture bleues) qui sont ensuite phagocytés par des macrophages nouvellement recrutés pour former des agrégats cellulaires (6). La multiplication bactérienne est contrôlée et l'infection chronique est établie. Pour les variants R de *M. abscessus* (suivre les flèches et l'écriture rouges), l'apoptose est associée à l'apparition des cordes extracellulaires (6), empêchant la phagocytose par les macrophages ou neutrophiles (7), menant à un phénomène de cording libre, la formation d'abcès avec destruction des tissus, et la mort de l'embryon (8) (Bernut *et al.*, 2014).

III. <u>Inhibition de la maturation et de l'acidification du phagosome</u>

La maturation et l'acidification du phagosome sont des éléments essentiels de la cellule pour inhiber la croissance bactérienne. Les bactéries, et notamment les mycobactéries, vont essayer de contrecarrer les évènements et les interactions entre organites cellulaires et la vacuole de phagocytose, ces évènements ayant lieu sous le contrôle de beaucoup de protéines appartenant notamment à la famille des Rab GTPases.

Les mycobactéries pathogènes, contrairement aux mycobactéries saprophytes, sont capables de contrer la maturation phagosomale, d'inhiber la fusion phagolysosomale, et ainsi de se maintenir dans un environnement qui n'est que légèrement acidifié de l'ordre de 6,2-6,4, stratégie clé pour survivre et se répliquer intracellulairement. C'est le cas pour des phagosomes contenant *M. abscessus* et *M. marinum* qui ne s'acidifient pas dans les macrophages exactement comme cela avait déjà été montré pour les phagosomes contenant *M. tuberculosis* et *M. avium* (Frehel *et al.*, 1991; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994; de Chastellier *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 1997; Mwandumba *et al.*, 2004; de Chastellier, 2009; Roux *et al.*, 2016). Par l'approche de double marquage par un fluorochrome pH sensible et un fluorochrome pH résistant (Pethe *et al.*, 2004), le pH intraphagosomal de phagosomes contenant *M. abscessus* dans des macrophages est évalué aux alentours de 6,3 et dans les cellules dendritiques aux alentours de 6,4 ce qui est très similaire au pH obtenu avec les MCL pathogènes comme *M. tuberculosis* (Clemens and Horwitz 1995; Tailleux et al., Roux et al. 2016).

M. abscessus possède ainsi le potentiel d'inhiber la maturation et l'acidification du phagosome dans lequel il se trouve et ce dernier n'est pas transformé en phagolysosome suite à l'infection de macrophages. De même il est capable d'inhiber la maturation phagosomale dans les cellules endothéliales (Baltierra-Uribe *et al.*, 2014). La tendance peut être inversée et la croissance intracellulaire de *M. abscessus* peut alors être stoppée par l'ajout de métalloporphyrine MnTE-2-PyP, antioxydant large inducteur de la fusion phagolysosomale promouvant la survie des macrophages humains infectés et augmentant la fusion des phagosomes contenant *M. abscessus* avec les lysosomes (Oberley-Deegan *et al.*, 2009). A la différence du morphotype S de *M. abscessus*, le variant R n'est pas capable d'inhiber l'acidification du phagosome dans lequel il se trouve, sa maturation et la fusion phagosome-lysosome (Roux *et al.*, 2016).

IV. <u>Vie intracellulaire et déficit CFTR</u>

Un lien presque mendélien existe entre mucoviscidose et *M. abscessus* au regard de la prévalence des infections à *M. abscessus* chez ces patients. Il était donc intéressant de tester s'il existait une différence dans la croissance intracellulaire de *M. abscessus* dans les macrophages murins ou humains sauvages ou déficients pour la protéine CFTR.

Auparavant, il a été montré qu'en cas d'infection par des levures ou par *P. aeruginosa*, la protéine CFTR contribue à l'acidification phagosomale dans les macrophages alvéolaires et qu'en son absence les phagolysosomes ne sont que très peu acidifiés fournissant un environnement propice à la réplication microbienne. Ce rôle de CFTR dans la fonction des macrophages alvéolaires suggère que la mutation dans la protéine CFTR de la mucoviscidose



Figure 17. Morphologie de l'ETZ de la paroi mycobactérienne de *M. abscessus* dans les phagosomes de macrophages murins BMDM.

(Roux et al., 2016)

(a) Pour une infection avec le variant S, l'ETZ est épaisse et apposée tout autour de la membrane lisse du phagosome (flèches).

(b) Pour une infection avec le variant R et donc une absence de production de GPL dans l'enveloppe mycobactérienne, l'ETZ a disparu et la membrane phagosomale a une apparence ondulée avec à certains endroits un contact étroit (flèche et fenêtre).

(c) Pour une infection avec le mutant *mmpL4b* complémenté, les mêmes observations sont faites que pour la souche sauvage.

(d) Lors d'une infection avec le mutant *mmpL4b* non complémenté donc ne produisant pas de GPL, l'ETZ est fine comme pour le variant R.

compromet un régulateur essentiel des défenses de l'hôte dans les poumons. Il a été alors suggéré une coopération entre la protéines CFTR lysosomale et l'ATPase protonique vacuolaire dans l'acidification : mécanisme probable d'acidification dépendant de CFTR où le chlorure est délivré dans les lysosomes à travers la protéine CFTR permettant à la V-ATPase vacuolaire de maintenir un plus grand gradient de protons à travers les membranes lysosomales. Ce mécanisme ainsi décrit reste controversé. Mais cela n'a été montré que dans le cas de macrophages alvéolaires, pas pour les macrophages péritonéaux (Di *et al.*, 2006; Swanson, 2006).

Mycobactéries et défaut d'acidification pourraient jouer de concert pour favoriser la vie intracellulaire des bacilles. Nous avons pu montrer que *M. abscessus* variants S ou R se multipliaient de manière similaire à l'intérieur des macrophages sauvages ou déficients pour la protéine CFTR, confirmant le statut de pathogène intracellulaire de *M. abscessus*. *M. abscessus* résiste à l'activité bactéricide des macrophages murins ou humains et cela suggère qu'un canal chlorure CFTR déficient n'est pas « un plus » pour favoriser cette croissance intracellulaire de *M. abscessus* (Roux *et al.*, 2016).

V. Stratégies de survie au sein du macrophage de M. abscessus

Plusieurs éléments permettent d'expliquer la survie et la croissance intracellulaire de *M. abscessus*, notamment le défaut d'acidification du phagosome mais également la sortie potentielle du phagosome dans le cytoplasme et/ou la dégradation de la membrane phagosomale.

L'échappement du phagosome est une stratégie utilisée par de nombreux pathogènes intracellulaires : *Shigella flexneri* ou *Listeria monocytogenes* (Page *et al.*, 1999; Birmingham *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2011; Czuczman *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015), *Legionella pneumophila* (Isberg *et al.*, 2009), *Chlamydia trachomatis* (Scott *et al.*, 2003).

Chez *M. abscessus*, une différence de morphologie dans les phagosomes a été observée entre les variants S et R. Cette différence concerne l'apparence de l'enveloppe mycobactérienne et son interaction avec la membrane phagosomale (Roux et al., 2016). Dans le cas d'une infection de macrophages par le morphotype S de M. abscessus les phagosomes présentent une zone translucide d'électron externe (ETZ, Electron Translucent Zone), épaisse et apposée tout autour sur la membrane du phagosome. Par contre dans le cas d'une infection de macrophages par le morphotype R de M. abscessus, cette ETZ n'est plus présente, la membrane phagosomale n'est plus fermement apposée à la paroi mycobactérienne et elle semble même rentrer en contact avec la bactérie à certains endroits (Figure 17). Cette ETZ est dépendante de la production de GPL comme le montre la perte de cette zone avec le mutant mmpL4b (Figure 17). Une interférence ou une abrogation de l'apposition étroite entre la membrane du phagosome et la surface mycobactérienne induit la poursuite de maturation du phagosome et la fusion avec les lysosomes, phénomène non observé en temps normal avec des bacilles classiques comme ceux de M. avium (de Chastellier et al., 2009). Les mycobactéries semblent pouvoir prévenir la maturation du phagosome et par conséquent la fusion avec les lysosomes par une interaction étroite avec les constituants de la membrane phagosomale (de Chastellier and Thilo, 1997; Pietersen et al., 2004).

Un autre argument en faveur d'une croissance intracellulaire efficace de M. abscessus pourrait demeurer dans sa capacité à imiter les mycobactéries pathogènes intracellulaires et à passer du phagosome environnement bactéricide au cytosol environnement plus propice à sa survie. Le développement et l'utilisation d'une expérience de rupture phagosomale basée sur la technique de transfert d'énergie par résonance fluorescence (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) et sur le clivage de la coumarin-cephalosporin-fluorescein-4 (CCF-4, cephalosporin core linking 7-hydroxycoumarin to fluorescein) par la β-lactamase mycobactérienne, permet de montrer la présence ou non d'un contact cytosolique entre une mycobactérie et une cellule phagocytaire. Ce contact est rapidement détectable par lecture en cytométrie en flux, et cette technique permet de distinguer de manière fiable les souches bactériennes établissant un contact cytosolique et celles restant emprisonnées dans un phagosome intact, mais ne fournit cependant pas d'indication précise sur la localisation intracellulaire du pathogène. Cette stratégie basée sur l'utilisation d'un composé chimique piégé dans le cytoplasme du phagocyte avait auparavant été mise en place pour investiguer la rupture des vacuoles d'endocytose par les bacilles pathogènes à Gram négatif tels que S. flexneri (Ray et al., 2010). Puis cette technique avait été adaptée pour étudier l'évasion cytoplasmique de M. tuberculosis (Simeone et al., 2012, 2015b). Cette expérience appliquée à M. abscessus a permis de montrer que le morphotype S s'échappait du phagosome ou du moins qu'il y avait une rupture ou détérioration de la membrane phagosomale lors d'une infection de macrophages et que des contacts et échanges se faisaient avec le cytosol. Comparativement, le variant R n'établit pas de communication entre le phagosome et le cytosol (Roux et al., 2016). Vu que les membranes des phagosomes contenant le morphotype S de M. abscessus montrent des signes d'altération tels que des cassures ou des dégradations partielles, il est évident que la forme lisse est capable de provoquer une communication entre l'intérieur du phagosome et le cytosol et cela tend à confirmer le caractère de vrai pathogène intracellulaire de M. abscessus.

M. tuberculosis fait partie de ces pathogènes qui ont mis en place une stratégie de résistance par la fuite et d'échappement du phagosome vers le cytosol pour se protéger du caractère bactéricide du milieu intraphagosomal dans les macrophages. Cette théorie de la sortie de phagosome a été proposée pour la première fois pour *M. tuberculosis* en 2007 et est soutenue depuis par de nombreuses études (van der Wel *et al.*, 2007; Houben *et al.*, 2012a; Simeone *et al.*, 2012). A la fois *ex vivo* et *in vivo*, de nombreux travaux démontrent que *M. tuberculosis* et *M. marinum* induisent des ruptures dans la membrane du phagosome et établissent une communication phagosome-cytosol avant de provoquer la mort de la cellule hôte (Stamm *et al.*, 2003; van der Wel *et al.*, 2007; Simeone *et al.*, 2012).

Le système de sécrétion de type VII : ESX-1 (ESAT-6 secretion system 1) joue un rôle central dans le processus de rupture phagosomale et de translocation de *M. tuberculosis* du phagosome vers le cytosol (van der Wel *et al.*, 2007).

Comme expliqué précédemment, le rôle de ESX-1 dans la lyse phagosomale a beaucoup été étudié et semble être médié par la protéine sécrétée EsxA (ESAT-6). EsxA est capable de perturber les bicouches lipides du phagosome et les membranes plasmiques des globules rouges, et lyse les liposomes (Hsu *et al.*, 2003; de Jonge *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). Les deux hélices de EsxA mesurent environ 50 Å de longueur, ce qui correspond approximativement à l'épaisseur des membranes biologiques et suggère donc que le motif hélice-tour-hélice de EsxA pourrait former des insertions qui s'étendent sur la membrane du





Un rôle fondamental de ESX-1 de *M. tuberculosis* dans l'infection de macrophages est la rupture membranaire du phagosome qui conduit à un contact entre les composants mycobactériens et les composants du cytosol de la cellule hôte. Le système immunitaire inné de l'hôte détecte alors des composants bactériens tel que l'ADN, et des cascades de signalisation s'en suivent dans la cellule infectée (Gröschel *et al.*, 2016). Ub : ubiquitine, IRF3 = interferon regulatory factor 3, TBK1 = serine/threonine-protein kinase, cGAMP = cyclic GMP-AMP, cGAS = cytosolic DNA sensor nucleotidyltransferase cyclic GMP-AMP synthase.

phagosome (Ma *et al.*, 2015). Cet effet, non observé avec la souche vaccinale BCG, dépourvue d'EsxA, va entrainer une réponse toute particulière des cellules à l'infection, confirmant ainsi la présence au sein du cytoplasme de la bactérie elle-même ou de composants bactériens.

Après la rupture phagosomale, le contact avec des composants bactériens (ADN par exemple) ou le bacille lui-même conduit à une détection par le système immunitaire inné et à l'activation des mécanismes de défense de l'hôte associés (Figure 18) (Gröschel et al., 2016). L'ADN bactérien est détecté par la GMP-AMP synthase cyclique (cGAS) qui synthétise le second messager cyclique GMP-AMP (cGAMP) à partir d'ATP et de GTP. cGAMP active la voie de stimulation des gènes interférons associée au réticulum endoplasmique (STING) et l'axe de signalisation TBK1-IRF3 en aval (serine/threonine-protein kinase - Interferon Regulatory Factor 3), conduisant à la production d'interféron de type I tels que l'IFN-B. La production d'IFN-β est stratégique pour *M. tuberculosis* car les IFN de type I sont préjudiciables à l'hôte pendant l'infection mycobactérienne. En effet, des expériences d'infection chez la souris ont révélé une diminution de la charge bactérienne en l'absence de signalisation IFN de type I, et les patients atteints de tuberculose sur-régule le profil transcriptionnel des IFN de type I en corrélation avec la gravité de l'infection ou le sous-régule suite à un traitement réussi. L'activation de TBK1 peuvent également initier un processus d'autophagie du pathogène à travers le recrutement de LC3-II (isoforme lipide associée aux autophagosomes de la chaîne légère de la protéine 1 associée aux microtubules) et l'ubiquitination des mycobactéries ou des fragments de phagosome (Manca et al., 2001; Stanley et al., 2007; Romagnoli et al., 2012; Watson et al., 2012, 2015; Collins et al., 2015; Majlessi and Brosch, 2015; McNab et al., 2015; Wassermann et al., 2015). Mis à part cGAS, l'ADN mycobactérien peut également être détecté par AIM2 (Absent In Melanoma 2) qui conduit à l'activation l'inflammasome NLRP3 (NOD, LRR and Pyrin domain containing 3), entrainant l'activation de la caspase 1, le clivage des précurseurs de cytokines protectrices telles que l'IL-1β, et leur sécrétion (Mishra et al., 2010; Tschopp and Schroder, 2010; Wong and Jacobs Jr, 2011; Dorhoi et al., 2012). Le contact cytosolique médié par ESX-1 est également essentiel pour la sécrétion d'IL-18 par les cellules immunitaires via l'activation de l'inflammasome NLRP3, ce qui conduit à la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules Natural Killer (Kupz et al., 2016). Le système ESX-1 a ainsi été associé à l'activation et à la manipulation des réponses cytokines des macrophages infectés pour sécuriser la survie intracellulaire des mycobactéries et provoquer une réponse inflammatoire accrue favorisant la propagation bactérienne (Koo et al., 2008; Carlsson et al., 2010).

CHAPITRE VII : LES SYSTÈMES DE SÉCRÉTION

Les bactéries possèdent de nombreux systèmes de sécrétion remplissant le rôle de transporteurs de toxines et d'effecteurs de l'intérieur de la bactérie vers le milieu extérieur ou vers le cytoplasme d'une cellule cible. Les plus connus sont le système SEC indispensable aux archées, eubactéries et eucaryotes, et le système TAT (Twin Arginine Translocation). Les bactéries à Gram négatif ont différents appareils de sécrétion numérotés de I à VI (SST1 à SST6, Système de Sécrétion de Type I à VI) auxquels s'ajoute le système de sécrétion de type VII (SST7) chez les bactéries à Gram positif et les mycobactéries. Nous nous concentrerons, dans le cadre de ce travail, sur ce dernier système.

I. Diversité des systèmes de sécrétion de type VII

Le SST7 est présent chez les actinobactéries, de nombreuses bactéries à Gram positif, et chez les mycobactéries (Bitter *et al.*, 2009b; Houben *et al.*, 2014).

Il existe cinq différents SST7 nommés ESX-1 à ESX-5. Ces systèmes jouent des rôles essentiels dans la virulence des mycobactéries pathogènes, leur physiologie, leur interaction avec les cellules hôtes, leur sortie du phagosome, l'acquisition du fer, les phénomènes de conjugaison, l'intégrité de leur enveloppe mycobactérienne, le transfert génétique entre souches et leur migration de cellule en cellule. Le génome des mycobactéries peut contenir jusqu'à cinq paralogues de loci ESX différents. Chaque locus ESX code des composants de son propre SST7 composé de transporteurs membranaires, de substrats de sécrétion, d'ATPase (adénosine triphosphate) et d'autres protéines contribuant aux fonctions structurelles et régulatrices. Bien qu'ils soient homologues, les composants conservés entre chaque locus ESX-1 à ESX-5 sont spécifiques à leur appareil de sécrétion individuel et ne sont pas fonctionnellement redondants (Abdallah *et al.*, 2007). Les interactions entre les substrats sécrétés et les molécules hôtes commencent à peine à devenir claires et aident à mieux comprendre la persistance de ces agents pathogènes énigmatiques.

Les systèmes ESX mycobactériens sont connus pour être associés avec la pathogénicité et les interactions hôte-pathogène depuis leur découverte, bien que des analyses de génomes entiers montrent que ces systèmes sont aussi largement présents chez les espèces actinobactériennes non pathogènes (Guinn *et al.*, 2004; Abdallah *et al.*, 2006, 2009; Dumas *et al.*, 2016). Ainsi les systèmes ESX sont retrouvés chez les mycobactéries et d'autres divers genres dans le phylum Actinobactéries, telles que *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia* ou *Gordonia*, et des systèmes ESX-like cousins lointains aussi existent chez les bactéries à Gram positif dans le phylum Firmicutes, y compris dans *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* (Burts *et al.*, 2005, 2008; Way and Wilson, 2005; Garufi *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2013; Huppert *et al.*, 2014).



Figure 19. Reconstruction 3D du complexe ESX-5.

(a) Vues orthogonales de la carte tridimensionnelle reconstruite, montrant une structure de 28 × 16 nm avec un canal central avec un diamètre de ~ 5 nm. La carte est affichée dans les vues supérieure, latérale et inférieure.

(b) Coupe transversale du centre du complexe illustrant le pore interne de la membrane (Beckham *et al.*, 2017).



Figure 20. Topologie et localisation des composants d'ESX-5.

(a) Analyse de segmentation du volume de microscopie électronique mettant en évidence la position d'EccB5 (orange et jaune en alternance) selon le consensus des deux approches d'ancrage dans le complexe (blanc) en vue latérale et supérieure.

(b) Une section transversale de la carte montre une densité sur le côté périplasmique du complexe qui ne peut être attribuée à EccB₅, indiquant la position possible d'EccE₅ (indiqué par crochets). L'emplacement de la membrane interne est représenté en gris sombre.

(c) Modèle du complexe de membrane ESX-5 composé d'EccB₅ (B), EccC₅ (C), EccD₅ (D) et EccE₅ (E) ; la localisation périplasmique (PP) de EccE₅ et la flexibilité de la région d'EccC₅ dans le cytoplasme (CP) sont indiquées (Beckham *et al.*, 2017).

II. <u>Structure des SST7</u>

Ces systèmes ESX (ESAT-6 secretion system) ont été nommés d'après le premier substrat identifié, la cible antigénique de sécrétion précoce de 6 kDa (ESAT-6), et plus récemment ont été appelés systèmes de sécrétion de type VII (Brodin et al., 2004; Abdallah et al., 2007). L'appareil typique de sécrétion ESX est constitué d'un complexe lié à la membrane d'au moins quatre composants conservés ESX (EccB, EccC, EccD et MycP), des protéines associées spécifiques ESX (EspA, EspB, EspC, EspG, etc.), et des protéines sécrétées telles que les protéines ESAT-6 et CFP-10 (10 kDa Culture Filtrate Protein) ou encore les PE et PPE (Malen et al., 2007; Majlessi et al., 2015). Deux caractéristiques unifient tous les loci esx : (i) la présence de gènes codant pour de petites protéines sécrétées d'environ 100 acides aminés qui possèdent un motif Trp-X-Gly (WXG) conservé contribuant à la formation de structures hélicetour-hélice ; (ii) la présence de gènes codant pour des protéines transmembranaires de la famille ATPase FtsK-SpoIIIE (Pallen, 2002; Renshaw et al., 2005). La variation dans l'organisation génétique des systèmes ESX individuels définit cinq sous-types ESX tous présents chez M. tuberculosis qui sont appelés ESX-1 à ESX-5 (Gey Van Pittius et al., 2001; Bitter et al., 2009a). Récemment, en plus des cinq types de loci ESX chromosomiques classiques connus, un nouveau modèle mycobactérien proche du locus ESX-4 a été identifié et nommé ESX-4-bis (Dumas et al., 2016).

Récemment, la structure du complexe ESX-5 a été obtenue par cristallisation. Les quatre protéines identifiées comme cœur du complexe ESX-5, EccB₅, EccC₅, EccD₅ et EccE₅ s'assemblent avec une stœchiométrie équimolaire en un ensemble oligomérique présentant une symétrie par six, arrangement hexamérique autour d'un axe central (Figure 19). Ce complexe cœur de ESX-5 s'assemble de manière indépendante des substrats. Il est associé à la membrane et semble être incorporé exclusivement dans la membrane interne, ce qui indique que des composants additionnels sont requis pour transférer les substrats à travers la membrane externe mycobactérienne. EccC₅ semble être le composant de couplage qui fait la médiation entre la reconnaissance des protéines effectrices et qui fournit l'énergie de la translocation à travers le canal. Le composant périplasmique prédominant est EccB₅. A la fois EccC₅ et EccD₅ ont une partie protubérante de masse minimale dans le périplasme. EccE5 est un composant qui semble être localisé à la périphérie du complexe cœur de ESX-5 avec son domaine C-terminal résident dans le périplasme (Figure 20). En l'absence de EccE5, la formation et/ou la stabilité du complexe est sérieusement affectée (Beckham et al., 2017). Les composants principaux de ESX-5 partageant une grande identité en acides aminés avec les paralogues des autres systèmes ESX, cela suggère que la structure présumée des autres complexes ESX-1, ESX-2, ESX-3 et ESX-4 pourrait ressembler à celle indiquée pour ESX-5 (Gröschel et al., 2016).

A côté des quatre composants cœur Ecc se trouve toujours une autre protéine conservée des systèmes de sécrétion ESX : MycP. MycP₁ appelée mycosine 1 a bien été caractérisée comme étant une sérine protéase de type subtilisine avec une architecture de domaine qui comprend une séquence signal canonique suivie par un domaine protéase et une région Cterminale transmembranaire (Solomonson *et al.*, 2013). La délétion de MycP₁ chez *M. tuberculosis* entraine la perte des fonctions de sécrétion des substrats de ESX-1, alors qu'une mutagénèse des sites actifs et la perte en conséquence de l'activité protéase entraine une augmentation dans cette sécrétion, suggérant un double rôle de MycP₁ dans le traitement des substrats et la régulation du système ESX-1 chez *M. tuberculosis* (Ohol *et al.*, 2010).



Figure 21. Arbre phylogénétique des loci ESX mycobactériens à partir de séquences concaténées d'EccB, EccC, et MycP.

Cercles rouges : types ESX à base de plasmide. Cercle rouge pointillé : plasmides putatifs contenant des ESX. Carrés verts : *N. farcinica* et *Gordonia bronchialis*. Arbre construit avec une méthode de vraisemblance maximale avec 250 réplications de bootstrap. Valeurs > 70% sont indiquées. Notez que pour certaines espèces, seuls les systèmes ESX chromosomiques sélectionnés sont indiqués. RGM = MCR, SGM = MCL (Dumas *et al.*, 2016).

Fait intéressant, les gènes PE et PPE précédemment évoqués ne se limitent pas aux loci des systèmes SST7 mais se retrouvent dispersés dans tout le génome des mycobactéries (Gey van Pittius *et al.*, 2006). Une situation quelque peu similaire est observée pour les gènes *esx* car plusieurs répétitions en tandem des paralogues *esx* sont codées en dehors des loci ESX (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). La démonstration que des quantités étendues de protéines PE et PPE sont sécrétées par ESX-5 indiquent que les systèmes SST7 ont une plus grande gamme de substrats que prévu initialement (Abdallah *et al.*, 2009).

Enfin, certains systèmes ESX ont des gènes spécifiques à la région, les gènes *esp*. Il a récemment été montré qu'un certain nombre de protéines Esp étaient en fait également des substrats SST7 tels que EspB, EspE, EspF, EspK pour le système ESX-1, amplifiant la flexibilité des SST7 encore plus loin (McLaughlin *et al.*, 2007; Carlsson *et al.*, 2009; Champion *et al.*, 2009; Sani *et al.*, 2010). Un cluster génétique non lié au locus ESX-1 code pour EspA, EspC et EspD, ces protéines respectivement homologues de EspE, EspF et EspH sont également sécrétées d'une manière dépendante de ESX-1 (Fortune *et al.*, 2005; Millington *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

III. <u>Evolution des SST7</u>

Les systèmes ESX ont été façonnés par un long processus d'évolution impliquant des duplications et diversification des gènes ainsi que le transfert de gènes entre chromosomes et plasmides de différentes espèces bactériennes, avec notamment un rôle dans la conjugaison mycobactérienne (Gray *et al.*, 2016). En effet, en plus des loci ESX chromosomiques, l'existence de systèmes ESX codés par des plasmides a récemment été rapportée. L'analyse de ces loci ESX de plasmides a montré une diversification étendue avec au moins sept nouveaux profils ESX identifiés nommés ESX-P, trois d'entre eux ont été trouvés dans de multiples plasmides, tandis que quatre correspondaient à des singletons. Ces systèmes ESX-P font partie de groupes phylogénétiques dérivés d'un ancêtre commun qui en se diversifiant ont donné les différents systèmes ESX grâce à des réarrangements génétiques étendus (Figure 21) (Dumas *et al.*, 2016).

De tous les systèmes ESX identifiés, ESX-4 est le plus largement distribué chez les espèces mycobactériennes (Tekaia *et al.*, 1999; Gey Van Pittius *et al.*, 2001; Dumas *et al.*, 2016). Les autres systèmes tels que ESX-1 et ESX-3 sont également très présents dans diverses espèces, contrairement aux systèmes ESX-2 et ESX-5 qui sont restreints aux MCL pathogènes et au sous-groupe du complexe *M. terrae* (Gey van Pittius *et al.*, 2006; Bitter *et al.*, 2009a; Bottai *et al.*, 2014; Dumas *et al.*, 2016). ESX-4 et ESX-3 sont omniprésents dans le genre *Mycobacterium* dans presque toutes les espèces de MCR et de MCL. Le système ESX-1 est également fréquemment trouvé chez les MCL et chez un sous-groupe de MCR comme *M. smegmatis* par exemple.

Chez *M. tuberculosis*, le locus ESX-4 possède le plus petit nombre de gènes des cinq loci ESX.

Des analyses phylogénétiques utilisant différentes méthodes et données sur les familles de protéines des systèmes ESX suggèrent que les duplications des gènes ont eu lieu dans l'ordre ESX-4, ESX-1, ESX-3, ESX-2 et ESX-5 (Gey Van Pittius *et al.*, 2001).

L'emplacement dans la phylogénie de ESX-2 fournit un exemple du rôle de ces processus dans l'évolution des systèmes ESX. Bien que la région génomique qui code pour ESX-2 soit très semblable à ESX-1 chez *M. tuberculosis*, ESX-2 ne correspond pas à une duplication ancienne du locus ESX-1. Au lieu de cela, les analyses phylogénétiques suggèrent que les MCL ont acquis ESX-2 par transfert horizontal médié par un plasmide après l'émergence de ESX-1. Un scénario similaire a peut-être également conduit à l'acquisition d'ESX-5 qui de la même manière que ESX-2, mais contrairement à d'autres systèmes ESX, est limité aux MCL (Gröschel *et al.*, 2016).

Pour finir, une analyse mycobactérienne récente de pan-génome a identifié un sousgroupe de systèmes ESX-4, ESX-4-bis, qui se ramifie plus profondément dans la phylogénie que les systèmes précédemment décrits et qui est présent dans certaines Actinobactéries non mycobactériennes telles que *N. farcinica* et *G. bronchialis* en plus d'un sous-ensemble d'espèces mycobactériennes (Figure 21). La distinction entre les systèmes de sécrétion ESX-4 classique et ESX-4-bis a été faite sur des critères concernant l'ordre et l'orientation des gènes. Alors que les systèmes mycobactériens ESX-4 montrent un ordre typique de gènes *eccB/mycP/eccD/eccC/esx*, les profils ESX-4-bis contiennent deux variantes de gènes codant pour EccD situés en amont et en aval de *eccC* et donnant ainsi un ordre de gènes jusque-là inconnu *eccE/eccB/eccD/eccC/eccD/mycP*.

IV. <u>Mycobactéries non pathogènes/M. smegmatis</u>

M. smegmatis est une espèce à croissance rapide saprophyte et non pathogène. Il possède trois loci ESX qui codent les dispositifs de sécrétion ESX-1, ESX-3 et ESX-4.

Chez *M. smegmatis*, les SST7 se sont révélés impliqués dans la conjugaison et le transfert horizontal non-plasmidique d'ADN chromosomique (Flint *et al.*, 2004; Coros *et al.*, 2008; Derbyshire and Gray, 2014). En effet, l'ADN peut être transféré d'une souche donneuse de *M. smegmatis* à une souche receveuse possédant le système ESX-1 (Gray *et al.*, 2013). Plus récemment, il a été confirmé que ce dispositif ESX-1 était requis pour le transfert conjugué distributif (DCT, Distributive Conjugal Transfer), un procédé distinct de transfert de gènes qui a lieu entre des souches donneuse et receveuse indépendantes et génétiquement distinctes (Gray *et al.*, 2016). ESX-4 est essentiel pour l'activité DCT chez *M. smegmatis*. La transcription des gènes ESX-4 chez le destinataire requiert une co-culture avec une souche donneuse et un dispositif ESX-1 chez le destinataire, mais également le contact direct cellule-cellule est nécessaire pour initier la réponse transcriptionnelle d'ESX-4 (Gray *et al.*, 2016).

Le dernier système de sécrétion de type VII que possède *M. smegmatis* ESX-3 est impliqué dans l'homéostasie du fer comme celui de *M. tuberculosis* (Chapitre VII. V. Mycobactéries pathogènes/*M. tuberculosis*). Il n'a pas été directement lié à l'homéostasie du zinc et n'est pas essentiel à cet organisme contrairement à *M. tuberculosis* (Maciag *et al.*, 2009).



Figure 22. Organisation génétique et structurale des systèmes ESX chez M. tuberculosis.

(a) Organisation génétique des cinq loci ESX et de l'opéron *espACD* de *M. tuberculosis* souche type H37Rv.

(b) Image de microscopie électronique montrant les membranes interne et externe de l'enveloppe mycobactérienne.

(c) Modèle de l'appareil de sécrétion et des substrats sécrétés des systèmes ESX. Dans ce modèle, les composants conservés EccB, EccC, EccD et EccE, qui contiennent chacun un ou plusieurs domaines transmembranaires, forment la structure centrale des systèmes ESX qui se trouve dans la membrane interne (Gröschel *et al.*, 2016).

V. Mycobactéries pathogènes/M. tuberculosis

Les systèmes ESX les plus caractérisés comme associés aux interactions hôte-pathogène sont ESX-1 et ESX-5. Chez les mycobactéries pathogènes strictes et opportunistes, *M. tuberculosis* et *M. leprae* ainsi que *M. marinum* et *M. kansasii*, le SST7 ESX-1 est essentiel pour leur virulence, et son absence engendre une atténuation de la pathogénicité et de la réplication intracellulaire (Wards *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2006; MacGurn and Cox, 2007; Brodin *et al.*, 2010).

ESX-1 est retrouvé au sein d'une région très particulière dans le génome des mycobactéries du complexe *tuberculosis* : la région de différence 1 (RD1). ESX-1 permet la sécrétion, entre autres, des protéines antigéniques ESAT-6 (EsxA) et CFP-10 (Esx-B) (Figure 22). ESAT-6 est connue pour son activité lytique sur les membranes biologiques et pourrait donc être responsable de la perforation de la membrane phagosomale favorisant la libération de *M. tuberculosis* dans le cytosol (Gao *et al.*, 2004; van der Wel *et al.*, 2007). Très récemment, l'implication d'un lipide de la membrane externe de *M. tuberculosis*, le phthiocérol dimycocérosate (DIM), a été montré interagir en binôme avec le système ESX-1 pour induire une lésion et une rupture de la membrane phagosomale dans les macrophages infectés, conduisant finalement à l'apoptose des cellules hôtes (Augenstreich *et al.*, 2017).

Esx-A et Esx-B forment des complexes 1:1 (Renshaw *et al.*, 2002; Lightbody *et al.*, 2008; Champion *et al.*, 2014). Les souches vaccinales de type BCG, dépourvues de la région RD1, sont dépourvues d'EsxA (Mahairas *et al.*, 1996). ESAT-6 (EsxA) a été proposé comme antigène potentiel dans un vaccin expérimental contre la tuberculose (Brandt *et al.*, 2000). Chez *M. tuberculosis*, ESX-1 a été montré comme essentiel dans la résistance et l'évasion des réponses de l'hôte. L'une des fonctions clés de ESX-1 est son rôle dans l'induction de la rupture phagosomale et l'établissement d'un contact phagosome-cytosol déjà évoqué plus haut (Simeone *et al.*, 2015b; Gröschel *et al.*, 2016).

Les génomes d'un certain nombre de pathogènes opportunistes tels que *M. avium* et *Mycobacterium ulcerans* montrent une suppression partielle de ce système, ce qui indique que ces agents pathogènes ont un cycle d'infection indépendant de ESX-1 (Stinear *et al.*, 2007). Des études menées chez *M. tuberculosis*, *M. marinum* ou *M. smegmatis* ont démontré que la perturbation de la plupart des composants de base conservés (EccB, EccE, MycP) abrogeait la sécrétion de EsxA et de la plupart des autres substrats de ESX-1 (Hsu *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004; Guinn *et al.*, 2004; Converse and Cox, 2005; Fortune *et al.*, 2005; Brodin *et al.*, 2006; McLaughlin *et al.*, 2007; Carlsson *et al.*, 2009; Ohol *et al.*, 2010).

Dans une moindre mesure, les fonctions de deux autres SST7 de *M. tuberculosis* ESX-3 et ESX-5 ont été étudiés (Figure 22). ESX-3 semble être responsable de la sécrétion de certains facteurs solubles requis pour la croissance de *M. tuberculosis in vitro*, l'absorption optimale du fer et pour la modulation de sa virulence (Serafini *et al.*, 2009; Siegrist *et al.*, 2009; Tufariello *et al.*, 2016). Les gènes codant le SST7 ESX-3 sont conservés parmi les différentes mycobactéries suggérant un rôle important de ESX-3 dans la viabilité des espèces mycobactériennes environnementales et pathogènes (Lamichhane *et al.*, 2003; Sassetti and Rubin, 2003; Sassetti *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2011). Les deux seules protéines sécrétées identifiées de ce système sont EsxG et EsxH pour le moment. L'expression des gènes *esx-3* est régulée par le fer et le zinc et augmente pendant la phase chronique de l'infection des poumons de souris suggérant le rôle de ESX-3 dans l'homéostasie des métaux (Rodriguez *et al.*, 2002; Dubnau *et al.*, 2005; Maciag *et al.*, 2007). Ainsi les efforts visant à définir la fonction de ESX-3 chez *M. tuberculosis* ont été pendant longtemps limités à cause de l'incapacité à générer des mutants déficients en ESX-3, du fait de l'activité cruciale de certaines protéines codées dans ce système en croissance *in vitro* en milieux standards. Mais cette limitation a été récemment surmontée en complémentant le milieu de croissance avec divers complexes ferreux telle que l'hémine (Tufariello *et al.*, 2016).

Quant au dernier SST7, l'ESX-5 de M. tuberculosis, il est impliqué dans la sécrétion de deux familles de protéines spécifiques aux mycobactéries jouant un rôle dans leur phénotype de virulence, les PE (Pro-Glu) et PPE (Pro-Pro-Glu), ainsi que dans la stabilité de la paroi cellulaire et la réponse immunitaire de l'hôte (Bottai and Brosch, 2009; Abdallah et al., 2011; Sampson, 2011; Bottai et al., 2012; Houben et al., 2012b; Simeone et al., 2015a). L'un des quelques substrats de ESX-5 avec une fonction bien étudiée et définie est la protéine LipY. Cette protéine est une protéine PE chez M. tuberculosis mais est une protéine PPE chez *M. marinum*, ce qui illustre que les domaines PE-PPE ne sont probablement pas impliqués dans la fonction de ces protéines mais sont responsables de leur sécrétion (Srivastava et al., 2007; Mishra et al., 2008; Daleke et al., 2011). LipY est une lipase qui peut dégrader efficacement les triacylglycérols à chaîne longue qui sont présents dans la cellule hôte ou stockés à l'intérieur des mycobactéries (Deb et al., 2006; Daniel et al., 2011). L'utilisation de triacylglycérol est importante pendant l'infection latente, et l'expression de LipY est régulée à la hausse dans les modèles in vitro de dormance. Un autre substrat ESX-5 important putatif est PE_PGRS30. Cette protéine est régulée positivement pendant le stade chronique de l'infection et est impliquée dans l'arrêt de la maturation phagosomale, la réplication dans les macrophages et la persistance in vivo pendant la phase chronique de l'infection à M. tuberculosis chez la souris (Delogu et al., 2006; Iantomasi et al., 2012). Chez M. marinum et M. bovis, ESX-5 apparait comme essentiel pour leur croissance et pour l'absorption et l'utilisation de nutriments cruciaux. Une mutagénèse dirigée sur le domaine de liaison de l'ATPase membranaire EccC₅ de ESX-5 empêche la sécrétion via ce système et la croissance bactérienne sans affecter l'assemblage du complexe (Ates et al., 2015). In vivo, il a été montré qu'une souche de M. marinum délétée de ESX-5 était légèrement atténuée dans les embryons de poisson zèbre, mais montrait une virulence fortement accrue chez le poisson zèbre adulte caractérisée par une augmentation de la charge bactérienne et la formation précoce de granulomes avec un développement rapide de centres nécrotiques. La sécrétion de protéines PE et PPE via ESX-5 est utilisée par M. marinum pour établir une infection modérée et persistante. Le SST7 de M. marinum joue ainsi un rôle important dans la progression de l'infection chez son hôte naturel (Weerdenburg et al., 2012). Chez M. tuberculosis, le système Pst/SenX3-RegX3 de détection du phosphate active directement la sécrétion via ESX-5 en réponse à la limitation en phosphate, signal environnemental pertinent probablement rencontré par M. tuberculosis dans l'hôte (Elliott and Tischler, 2016a, 2016b).

Contrairement aux systèmes ESX-1, ESX-3 et ESX-5, les fonctions des systèmes ESX-2 et ESX-4 de *M. tuberculosis* sont totalement inconnues. Des criblages de transposon à haute densité semblent montrer qu'aucun de ces deux systèmes n'est nécessaire pour une croissance *in vitro* ou pour la virulence *in vivo* de *M. tuberculosis* chez la souris (Sassetti and Rubin, 2003; Abdallah *et al.*, 2008; Feltcher *et al.*, 2010). On connait davantage la régulation de ce système



Figure 23. Carte des systèmes de sécrétion de type VII de *M. abscessus* comparativement à la souche H37Rv de *M. tuberculosis*.

Les différentes souches de *M. abscessus* sont listées sur le côté droit de la carte (Sassi and Drancourt, 2014).
de sécrétion. Plusieurs gènes ESX-4, y compris *esxT* et *esxU*, sont régulés par le facteur sigma mycobactérien SigM (Agarwal *et al.*, 2007).

Le SST7 ESX-1 de M. tuberculosis possède également une protéine riche en alanine et proline de 70 kDa et codée par le gène espl. Il a été proposé que la protéine Espl puisse jouer un rôle dans la régulation du système ESX-1 (Das et al., 2011). Un mutant d'insertion de transposon espI dans la souche type H37Rv de M. tuberculosis a été trouvé défectueux dans le processus de sécrétion médié par ESX-1 et atténué (Guinn et al., 2004). Cependant, dans une autre étude, un mutant de suppression de espl a été trouvé compétent en matière de sécrétion et de virulence au même niveau que la souche sauvage suggérant que EspI n'est pas un composant essentiel de l'appareil de sécrétion ESX-1 (Brodin et al., 2006). Dans une dernière étude il a été montré que EspI chez M. tuberculosis régulait négativement le système de sécrétion ESX-1 en réponse à un faible taux d'ATP cellulaire et que cette fonction nécessitait le motif de liaison ATP de EspI. Ainsi, EspI pourrait potentiellement jouer un rôle pendant l'infection latente et la réactivation de M. tuberculosis (Zhang et al., 2014). Pour la régulation de ESX-1, on sait que PhoP joue un rôle dans la transcription de l'opéron espACD et donc dans la sécrétion de EsxA et la croissance intracellulaire de M. tuberculosis (Frigui et al., 2008), et que EspR joue également un rôle non encore totalement défini dans cette régulation (Raghavan et al., 2008; Blasco et al., 2012).

VI. <u>Mycobactéries pathogènes opportunistes/M. abscessus</u>

Le système ESX-1 n'est pas présent chez *M. abscessus*. *M. abscessus* possèdent deux SST-7 : ESX-3 et ESX-4 (Figure 23) (Ripoll *et al.*, 2009; Sassi and Drancourt, 2014; Dumas *et al.*, 2016).

Selon les souches comparées de *M. abscessus*, on peut retrouver des différences dans les protéines présentes dans les loci ESX-3 et ESX-4 (Figure 24). Dans la souche M139 de *M. abscessus* deux protéines sont manquantes dans le système ESX-3. Dans la souche M93 les protéines « like » ESAT-6 et CFP-10 sécrétées par le système ESX-4 sont manquantes. La souche M18 de *M. abscessus* code pour les protéines « like » ESAT-6 et CFP-10 sécrétées par le système ESX-1. Il y a deux ou trois protéines PE et six (*M. abscessus* sous-espèce *massiliense*, M115 et M47J26) à 12 (*M. abscessus* sous-espèce *bolletii* M24) protéines PPE qui sont rapportées comme étant impliquées dans la virulence de *M. tuberculosis* (Mukhopadhyay and Balaji, 2011; Sassi and Drancourt, 2014).

Pour résumer, ESX-3 de *M. abscessus* est similaire à celui de *M. tuberculosis* (Ripoll *et al.*, 2009). ESX-4 de *M. abscessus* possède un gène EccE₄ en plus du système de sécrétion ESX-4 de *M. tuberculosis* (Dumas *et al.*, 2016). Le locus ESX-4 de *M. abscessus* code ainsi pour tous les composants cœur essentiels d'un système ESX fonctionnel (Figure 23) comme décrit pour ESX-5 (Beckham *et al.*, 2017). On peut noter que les gènes EccA et EspG très étudiés, impliqués dans la sécrétion de substrats des autres systèmes ESX et caractérisés chez *M. tuberculosis* ne sont pas présents ici chez *M. abscessus*.



Figure 24. Organisation génétique des loci ESX chromosomiques à partir d'un ensemble de données représentatives des mycobactéries.

(Dumas et al., 2016)

Les locus ESX-4 de *M. abscessus* et de ces trois sous-espèces *abscessus sensu stricto*, *massiliense* et *bolletii* sont identiques et se composent dans l'ordre des gènes suivants :

- EsxT et EsxU
- MAB_3755c/MYCMA_05485/LA61_18970
- $EccC_4$
- EccD₄
- MycP₄
- EccB₄
- EccE₄

La protéine EccC fait partie des protéines à deux domaines transmembranaires de la famille ATPase FtsK-SpoIIIE, elle possède un domaine ATPase fournissant l'énergie au transport des protéines et reconnait probablement les substrats sécrétés. La protéine EccD possède 11 domaines transmembranaires et fonctionne sûrement comme un canal d'export de la membrane interne. La protéine MycP est une mycosine de la famille des sérines protéases de type subtilisine à deux domaines transmembranaires dont l'activité protéase peut être impliquée dans le traitement de certains substrats (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Les protéines EccB et EccE sont également des protéines transmembranaires à respectivement un et deux domaines. EccE qui a l'air de se situer en périphérie du système est essentiel pour la formation et la stabilité du complexe (Beckham *et al.*, 2017). Ainsi avec les quatre protéines Ecc (ESX conserved components) EccC, EccD, EccB, EccE composant le cœur du système de sécrétion de type VII et MycP, le locus ESX-4 de *M. abscessus* code pour un système de sécrétion complet et fonctionnel. Les protéines EsxT et EsxU sont souvent comparées aux protéines EsxA et EsxB (ESAT-6 et CFP-10) de *M. tuberculosis* car elles contiennent le même motif Trp-X-Gly (WXG) très caractéristique des substrats sécrétés des SST7.

OBJECTIFS

Le genre *Mycobacterium* regroupe des espèces allant d'organismes saprophytes inoffensifs à des agents pathogènes humains majeurs. Les espèces pathogènes bien connues telles que *M. tuberculosis*, *M. marinum* et *M. ulcerans* appartiennent au sous-groupe des mycobactéries à croissance lente. En revanche, le sous-groupe des mycobactéries à croissance rapide est caractérisé par leur capacité à former des colonies visibles à l'œil nu en moins de 7 jours sur milieu de culture solide. Les MCR forment un regroupement de plus de 180 espèces essentiellement composé de mycobactéries saprophytes non pathogènes. Les seules études d'interactions entre l'hôte et les MCR, le plus souvent *M. smegmatis*, ont montré que ces mycobactéries étaient rapidement éliminées par l'action bactéricide des macrophages.

M. abscessus, une MCR, est depuis une dizaine d'années identifiée comme un pathogène humain opportuniste, responsable d'un large éventail d'infections allant des infections pulmonaires à des infections de la peau et des tissus mous en passant par des infections disséminées. *M. abscessus* est considérée, avec *M. avium*, comme le principal agent pathogène mycobactérien chez les patients atteints de la mucoviscidose. De plus, c'est la principale MCR responsable d'infections pulmonaires aussi bien chez des sujets indemnes de toute pathologie respiratoire que chez les patients avec une pathologie pulmonaire sous-jacente. *M. abscessus* représente ainsi par différents aspects cliniques mais également expérimentaux une MCR pas comme les autres.

Les différentes études menées sur *M. abscessus* indiquent que cette mycobactérie se conduit comme un pathogène intracellulaire, capable de survivre à la réponse bactéricide des macrophages et des fibroblastes dans les poumons et la peau, survie habituellement non observée chez les MCR. L'analyse de séquence du génome de *M. abscessus* a montré que cette mycobactérie était dotée des voies métaboliques typiquement trouvées chez les microorganismes environnementaux en contact avec le sol, les plantes et les milieux aquatiques, où les amibes libres sont souvent présentes. L'analyse du génome a également démontré que *M. abscessus* était dotée de plusieurs gènes de virulence, non trouvés chez les MCR saprophytes et non pathogènes.

Expérimentalement, un des premiers résultats marquant est l'observation d'une croissance intracellulaire de *M. abscessus* dans les macrophages et une absence de croissance sans mortalité dans les cellules dendritiques. *M. abscessus* résiste également à l'acidification du phagosome, à l'apoptose ainsi qu'à l'autophagie, trois mécanismes de résistance essentiels de la cellule à l'infection. Il a même été montré que *M. abscessus* était capable d'établir très rapidement une communication entre la vacuole de phagocytose et le cytosol, environnement plus riche en nutriments pouvant permettre une meilleure multiplication bactérienne (Roux *et al.*, 2016).

Récemment, notre équipe a découvert qu'un des facteurs de virulence important dans le monde bactérien, la phospholipase C, jouait un rôle majeur dans la survie de *M. abscessus* au sein des amibes et donc un rôle majeur dans un contexte environnemental extérieur. En effet, *M. abscessus* possède des facteurs de virulence, telle que la phospholipase C, qui sont induits

lorsqu'elle est cultivée en présence d'amibes, la rendant plus virulente dans un modèle d'infection respiratoire de souris (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

Très peu de choses sont connues sur les exigences génétiques que *M. abscessus* a développé ou acquis pour survivre dans un environnement intracellulaire. Partant des observations que *M. abscessus* est un pathogène intracellulaire, nous nous sommes donc intéressés aux sources de ce comportement intracellulaire atypique pour une MCR. Au départ de ce travail, notre principale hypothèse était que *M. abscessus* avait développé des facteurs génétiques différentes des autres MCR non pathogènes pour survivre au sein des cellules phagocytaires qu'elle rencontre dans l'environnement et ainsi devenir infectieuse chez l'hôte humain.

A mon arrivée au laboratoire, l'équipe possédait déjà une expertise du modèle amibe du genre *Acanthamoeba*, potentielle niche environnementale que peut rencontrer *M. abscessus* et donc un modèle d'étude pertinent. Nous disposions également d'une banque de mutants de *M. abscessus* obtenue par insertion du transposon *Himar1*.

L'objectif principal de mon projet a été de mettre en évidence les avantages génomiques conférés à *M. abscessus* lui permettant de survivre dans les protozoaires environnementaux tels que les amibes. Pour cela un crible cellulaire a été réalisé suite à une co-culture entre les mutants de la banque obtenue par transposition et la souche type *Acanthamoeba castellanii* à la recherche de mutants dénués de croissance intracellulaire. Cette compétence a été confirmée ou infirmée au sein de macrophages, cellules hôte chez l'homme de *M. abscessus*. Ce travail nous a permis, notamment, de révéler le rôle essentiel du locus ESX-4 dans la viabilité intracellulaire de *M. abscessus*.

RESULTATS

PARTIE I - IDENTIFICATION DES GÈNES REQUIS POUR LA CROISSANCE *IN VIVO* DE *M. ABSCESSUS* : IMPORTANCE DU LOCUS ESX-4

M. abscessus est un pathogène intracellulaire qui possède la capacité de résister et d'échapper à la réponse bactéricide des macrophages et des protozoaires environnementaux tels que les amibes. *M. abscessus* exprime des facteurs de virulence lorsqu'il est cultivé en contact avec les amibes, ce qui le rend plus virulent chez la souris. Le premier objectif de ce travail a été de vouloir identifier les gènes présents chez *M. abscessus* qui lui permettent de survivre et de se multiplier au sein d'amibes. Pour cela une banque de mutants de *M. abscessus* sous-espèce *massiliense* obtenue par transposition a été criblée suite à une co-culture en présence d'amibes afin d'identifier des mutants ayant une croissance atténuée dans cet environnement intracellulaire. Le comportement de ces mêmes mutants a également été évalué suite à une co-culture avec des macrophages afin d'analyser si cette compétence était conservée.

Cette approche de criblage de la banque de transposons à l'aveugle a permis de confirmer un phénotype de réplication défectueux pour 47 mutants sur 6 000 qui présentaient une survie inférieure ou égale à 50% en amibes et/ou en macrophages par rapport aux témoins. Dans ce groupe de mutants, nous avons identifié 12 mutants de *M. abscessus* dans lesquels le transposon s'est inséré dans des gènes appartenant au locus *esx-4* du système de sécrétion de type VII. A la vue des résultats du criblage et de la répartition des différents mutants sélectionnés sur le génome de *M. abscessus*, ce locus spécifique *esx-4* est surreprésenté, ce qui souligne son importance dans la croissance intracellulaire de *M. abscessus*.

Pour confirmer les résultats du criblage et avoir une meilleure idée de la contribution du locus *esx-4* dans la croissance et la survie de *M. abscessus* dans les amibes et les macrophages, nous avons obtenu un mutant par KO dans la souche type MabsCIPS grâce à un système de double recombinaison homologue efficace chez les mycobactéries. Parmi les gènes impactés dans le locus *esx-4*, le gène *eccB*₄ a été choisi d'une part parce que nous avons obtenu plusieurs mutants dans ce gène lors du crible de la banque de transposons, et d'autre part parce que la protéine EccB fait partie des quatre composants cœur conservés du système de sécrétion de type VII et est décrite comme ayant une position centrale dans ce complexe. Après avoir délété le gène *eccB*₄ de la souche MabsCIPS pour créer le mutant $\Delta eccB_4$, son complémenté $C.\Delta eccB_4$ a également été construit. Les souches wt, $\Delta eccB_4$ et $C.\Delta eccB_4$ ont été évaluées pour leur croissance intracellulaire lors d'une cinétique d'infections d'amibes et de macrophages. Le

mutant $\triangle eccB_4$ a permis de confirmer le phénotype atténué en croissance en amibes et en macrophages et le mutant complémenté pour le gène $eccB_4$ a permis de restaurer une croissance intracellulaire à hauteur de celle de la souche sauvage. De plus grâce à des expériences d'adhésion et d'internalisation, nous avons pu montrer que la délétion du gène $eccB_4$ chez *M. abscessus* n'affecte pas sa capacité à adhérer aux cellules ou à les infecter.

Nous avons étudié le comportement intracellulaire du mutant $\triangle eccB_4$ pour déterminer si ce mutant modifiait l'acidification phagosomale et s'échappait dans le cytosol. En effet, il apparaissait intéressant d'étudier le comportement intracellulaire du mutant afin de mieux caractériser cette voie de sécrétion de type VII dans la survie intra-macrophagique de *M. abscessus*. Parce que l'inhibition de la fusion phagolysosome représente une stratégie clé utilisée par les mycobactéries pathogènes pour survivre et se répliquer intracellulairement, nous avons testé si la capacité réduite du mutant à croitre était liée à la dégradation médiée par les lysosomes. Les analyses de l'acidification dans les phagosomes de macrophages ont été réalisées avec deux techniques différentes, une de microscopie et une de mesure de pH intraphagolysosomes. Les souches wt et complémentée étaient capable d'inhiber l'acidification phagosomale contrairement au mutant $\triangle eccB_4$.

Comme il a été récemment montré d'abord chez *M. tuberculosis* puis chez *M. abscessus* qu'il y avait une communication entre le phagosome contenant ces mycobactéries et le cytosol de la cellule hôte, nous avons analysé si le système de sécrétion ESX-4 de *M. abscessus* était impliqué dans cette communication comme celui décrit pour le système de sécrétion ESX-1 de *M. tuberculosis*.

Les souches de *M. abscessus* dépourvus du gène $eccB_4$ sont incapables d'induire une rupture de la membrane phagosomale dans les cellules THP-1. L'évaluation de cette rupture de la membrane phagosomale a été analysée en cytométrie en flux par une expérience qui est basée, sur le clivage d'une molécule CCF-4 à localisation cytosolique, par la β -lactamase mycobactérienne membranaire lorsqu'elle établit un contact avec le cytosol. Ce clivage induit une émission de lumière bleue recueillie après une lecture en cytométrie en flux. La souche wt induisait une émission significativement plus forte que la souche mutante $\Delta eccB_4$. Ces résultats sont supportés par une restauration réussie du phénotype wt des dommages à la membrane phagosomale dans la souche complémentée $C.\Delta eccB_4$. L'étude de la détection de dommages de la membrane phagosomale a également été réalisée avec une technique de microscopie utilisant la Galectin-3, marqueur qui s'accumule dans les structures membranaires endommagées au voisinage des bactéries internalisées. On a observé significativement plus de cellules Gal-3 positives avec les souches wt et complémentée qu'avec le mutant $\Delta eccB_4$, confirmant des dommages au niveau de la membrane des phagosomes et une possible communication phagosome-cytosol établie par la mycobactérie.

En résumé, le mutant $eccB_4$ est moins efficace dans l'inhibition de l'acidification phagosomale dans les macrophages et dans l'établissement d'une communication phagosomecytosol afin de se soustraire aux compartiments acides, suggérant qu'un locus ESX-4 fonctionnel est requis pour déstabiliser les membranes des phagosomes contenant *M. abscessus*. La capacité réduite du mutant à croitre intracellulairement est donc liée à ce phénotype intracellulaire. Les locus qui codent pour les systèmes de sécrétion de type VII de *M. tuberculosis* sont bien caractérisés, mais peu d'études se sont intéressées à ceux de *M. abscessus* (ESX-3 et ESX-4). Le phénotype défectueux observé indique que le locus ESX-4 participe à la croissance et la survie de *M. abscessus* à l'intérieur des macrophages et des amibes.

Tous ces résultats font l'objet d'une publication actuellement en cours de révision dans le journal PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences. Dans cette version du mémoire de thèse, l'article initial a été remplacé par un article révisé et modifié suite aux retours des différents reviewers obtenus entre temps.

Article

Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth *in vivo*: a prominent role of the ESX-4 locus

<u>Auteurs</u>

<u>Laura Laencina</u>, Violaine Dubois, Vincent Le Moigne, Laleh Majlessi, Justin Pritchard, Audrey Bernut, Laura Piel, Anne-Laure Roux, Jean-Louis Gaillard, Eric J. Rubin, Roland Brosch, Laurent Kremer, Jean-Louis Herrmann, Fabienne Girard-Misguich

Identification of genes required for Mycobacterium abscessus growth in vivo: a

prominent role of the ESX-4 locus

Laura Laencina^a, Violaine Dubois^a, Vincent Le Moigne^a, Albertus Viljoen^b, Laleh Majlessi^c, Justin Pritchard^{d,2}, Audrey Bernut^{b,3}, Laura Piel^a, Anne-Laure Roux^{a,g}, Jean-Louis Gaillard^{a,g}, Bérengère Lombard^e, Damarys Loew^e, Eric J. Rubin^d, Roland Brosch^c, Laurent Kremer^{b,f}, Jean-Louis Herrmann^{a,g,1} and Fabienne Girard-Misguich^{a,1}

^a 2I, UVSQ, INSERM UMR1173, Université Paris-Saclay, Versailles, France.

^b Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, CNRS UMR 9004, Montpellier, France.

^c Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne, Paris, France.

^d Department of Immunology and Infectious Disease, Harvard TH Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA.

^e Institut Curie, PSL Research University, Laboratoire de spectrométrie de masse protéomique, Paris, France.

^fINSERM, IRIM, 34293 Montpellier, France.

^g AP-HP, Hôpitaux Universitaires Ile de France Ouest, Ambroise Paré, Boulogne and Raymond Poincaré, Garches, France.

¹To whom correspondence should be addressed. Emails: <u>fabienne.misguich@uvsq.fr</u> and <u>jean-louis.herrmann@aphp.fr</u>

²Present address: Pennsylvania State University, Department of Biomedical Engineering and the Huck Institutes of the Life Sciences.

³Present address: Bateson Centre, Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom.

Author contributions: L.L., J-L.H., and F.G-M., designed research; L.L., V.D., V.L-M., L.P., A. V., F.L-C.; J.P., D.L., F.D., and B.L., performed research; L.M., E.J.R., A.B., B.L., and A-L.R., contributed new reagents/analytic tools; L.L., V.D., V.L-M., L.M., A.V., D.L., L.K., J-L.H., and F.G-M. analyzed data; L.L., J-L.H., and F.G-M. wrote the paper; L.L., and F.G-M. prepared figures; and L.K., L.M., R.B., E.J.R., and J-L.G., provided input in writing the paper.

Abstract

Mycobacterium abscessus, a rapid growing mycobacterium (RGM) and an opportunistic human pathogen, is responsible for a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from pulmonary to skin and soft tissue infections. This intracellular organism can resist the bactericidal defense mechanisms of amoebae and macrophages, an ability that has not been observed in other RGM. M. abscessus can upregulate several virulence factors during transient infection of amoebae, thereby becoming more virulent in the subsequent respiratory infection in mice. Here, we sought to identify *M. abscessus* genes required for replication within amoeba. To this end, we constructed and screened a transposon insertion library of an M. abscessus subsp. massiliense clinical isolate and screening for attenuated clones. This approach identified five genes within the ESX-4 locus, which in M. abscessus encodes an ESX-4 type VII secretion system that exceptionally also includes the ESX conserved EccE component. To confirm these results and to get more insights into the contribution of ESX-4 to M. abscessus growth and survival in amoeba and macrophages, a deletion mutant of $eccB_4$, which encodes a core structural element of ESX-4. This mutant was less efficient at blocking phagosomal acidification than its parental strain. Importantly, and in contrast to the wild-type strain, it also failed to damage phagosomes and showed reduced signs of phagosome-to-cytosol contacts, as demonstrated by a combination of cellular and immunological assays. This study attributes an unexpected and genuine biological role to the yet underexplored mycobacterial ESX-4 system and its substrates.

Introduction

Mycobacteria and eukaryotic cells show a long-standing history of pronounced host-pathogen coevolution. Although the specialization in parasitism seems most advanced with *Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of tuberculosis, specific host-oriented adaptation processes also exist for several non-tuberculous mycobacteria (NTM) (1, 2). Environmental amoebae represent a natural unicellular eukaryotic host and reservoir for many pathogenic bacteria, such as *Legionella*, *Chlamydia*, and *Pseudomonas* (3–6) and likely also for selected mycobacterial species which can survive within amoeba as well (7). For example, *Mycobacterium marinum*, a close relative of *M. tuberculosis*, contains different sets of virulence determinants that are tailored for specific hosts (8). Moreover, the pathogenic potential of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* increase through passage in amoebae (9, 10).

M. abscessus is an emerging opportunistic pathogen, responsible for muco-cutaneous infections of nosocomial origin (11–13) as well as for severe lung infections, with cystic fibrosis (CF) patients showing a particular susceptibility to infections with this mycobacterium (14–19). The pathophysiological events of *M. abscessus* infection are tightly associated with the transition from a smooth (S) to a rough (R) morphotype (18, 20–23), which results from a disruption in the biosynthesis and/or transport of glycopeptidolipids (GPL) to the bacterial surface (24, 25). The R variant is mainly isolated from humans during exacerbation of disease (26) and is more virulent than the S variant in several animal models (23, 26, 27). In addition, the R variant is also hyperproinflammatory, a property which has been linked to the expression of TLR2 agonists, such as selected lipoproteins, at the bacterial surface (28). The ability of *M. abscessus* to infect selected host cell types might also be linked to the presence of selected virulence genes of non-mycobacterial origin in its genome that were originally acquired by ancient horizontal gene transfer events from unrelated microorganisms, such *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia* spp. or *Stenotrophomonas spp.* (29). Interestingly, these bacteria can also be found in amoebac (30, 31)

and share with *M. abscessus* the same pathophysiological niche, such as the CF patient airways. Of interest, the phospholipase C and Magnesium transporter MgtC, which are often associated with the intracellular survival capacity of diverse pathogens, have been found to be induced in M. abscessus grown inside, or in contact with amoebae or macrophages (10, 32). These observations suggest that *M. abscessus* strains are equipped with a genetic arsenal acquired during their evolution to survive within environmental amoeba. The fact that this genetic program might also to cause infection in humans cells makes it interesting to identify the genes expressed by *M. abscessus* inside the amoeba where it faces the harsh and microbicidal conditions, employed by host cell to control bacterial infection. In this study, we sought to identify such amoeba-induced survival (AIS) genes by the use of an *M. abscessus* genome-scale *Himar mariner* transposon (*Tn*) library (33), generated in the *M. abscessus* subsp. massiliense clinical isolate 43S. By selecting *Tn* mutants exhibiting a decreased fitness and intra-amoebal survival capacity, we provide here a selection of AIS gene candidates that were subsequently monitored and validated for their importance in intracellular survival and growth in infected human macrophages (M Φ). This allowed the definition of a unique "core" of genes required by M. abscessus to survive in both its environmental (amoeba) and human (M Φ) hosts. Importantly, this study unveiled the unanticipated contribution of the ESX-4 type VII secretion system (T7SS) of M. abscessus to the induction of phagosomal rupture and phagosome-to-cytosol contact (34), linked to the increased intracellular survival of the bacterium in the host cell.

Results

1. Selection of *M. abscessus Tn* mutants with impaired intracellular replication

A library of 6, 000 *Tn* mutants generated in a S clinical isolate of *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Mabs43S) was screened using an intracellular survival assay in *Acanthamoeba castellanii*, as illustrated in Fig. S1A. The control parental Mabs43S strain was arbitrarily placed at 100% survival at 48 hrs post-infection (hpi) in amoeba. One hundred and thirty-six *Tn* mutants (2.3% of the total tested) displayed various degrees of intracellular growth inhibition compared to Mabs43S. The 136 mutants were then individually screened in *A. castellanii* for 48 hrs and in MΦ for 72 hrs, at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell, and intracellular CFU were determined (10). This confirmed the replication-defective phenotype of 47 mutants, which exhibited a survival in amoeba and/or in MΦ of 50% or less that of the controls, as shown by the reduction in CFU counts (Fig. 1A). Importantly, none of these insertions were linked to a significant *in vitro* growth defect in axenic cultures, indicating that the disrupted genes are specifically required for *M. abscessus* intracellular growth. Because the first round of screening was performed in amoebae, it was not possible, to identify *M. abscessus* genes important for intracellular growth exclusively in MΦ, as it has been previously reported for *M. marinum* (8).

2. Intra-amoebal survival of esx-4 Tn mutants is strongly impeded

Sub-cloning was undertaken to identify the genomic sequences adjacent to the various Tn insertions. Comparison of these sequences with the *M. abscessus ATCC 19977* genome allowed the identification of 47 Tn insertion-disrupted genes listed on Table S1. Importantly, 12 (including 5 duplicates) out of the 47 Tn mutants, with less than 50% intra-amoebal survival, presented a Tn insertion in genes belonging to the ESX-4 locus (Fig. 1B and Table 1). This locus encodes one of the two *M. abscessus* T7SS (29, 35), for which related system can also be found in other Actinobacteria and in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes (36). Among these twelve

Tn mutants, nine with *Tn* insertions in the *esx-4* genes: *eccE* (2 mutants), *eccD* (2 mutants), and *eccB* (5 mutants) showed a 75% reduction in intra-amoebal replication. The remaining three mutants with a 50% intra-amoebal survival defect presented *Tn* insertions in the *esx-4* genes *mycP* (1 mutant) and *eccE* (2 mutants) (Fig. 1B and Table 1). Moreover, one mutant in *sigM* and three mutants in the *esx secreted protein espI*, found outside the ESX-4 locus, were identified. In *M. tuberculosis*, genes homologous to *sigM* and *espI* have been reported to regulate ESAT-6 secretion *via* the ESX-1 T7SS (37, 38). Supporting the important contribution of the ESX-4 locus to intracellular survival, *Tn* insertions in *espI* and *sigM* conferred also a severe defect in intra-amoebal survival (13% and 27% respectively, Table 1). The intracellular defects were not due to *in vitro* growth impairment in axenic cultures or to uptake and/or invasion defects (Fig S1B and S1C).

To exclude the possible polar effect of Tn in eccD4 and eccC4 on transcription of mycP and MAB_3755c , respectively, qRT-PCR was performed (Table S2). Neither mycP, nor MAB_3755c mRNA levels were affected by the Tn in eccD4 and eccC4, respectively.

3. Severely impaired intracellular survival of an *eccB*₄ knockout mutant in the reference *M. abscessus* strain

Because Mabs43S is resistant to both zeocin and hygromycin (our unpublished data) and the *Himar Tn* confers an additional resistance to kanamycin, complementation studies of *Tn* mutants reared in this background proved challenging. This prompted us to generate an *eccB*₄ (*MAB_3759c*) knockout (KO) mutant in the *M. abscessus* 104536^T type strain (MabsCIP, zeocin sensitive), using a double-crossover strategy as previously reported (10). As illustrated in Fig. S2A, $\Delta eccB_4$ was obtained by allelic exchange of nearly the entire $eccB_4$ coding sequence with a zeocin resistance cassette (Fig. S2B) (10, 32). The complemented strain (*C*. $\Delta eccB_4$) was obtained by cloning the $eccB_4$ gene under control of the *hsp60* promoter in the integrative plasmid

pMVH361, introducing this construct into $\Delta eccB_4$ and selecting recombinant clones with zeocin and hygromycin. The intracellular survival of $\Delta eccB_4$, $C.\Delta eccB_4$, and the parental MabsCIP strains, which had similar growth rates in axenic cultures (Fig. S2C), was assessed in the amoeba and murine M Φ infection models. Compared to MabsCIP, $\Delta eccB_4$ showed a pronounced and reproducible survival defect in amoebae (Fig. 2A) and in M Φ (Fig. 2B), with a 0.5 log reduction in the number of CFU at 3 days post-infection (dpi) in both cell types, and a 1.5 log reduction at 7 dpi in M Φ . Complementation with $eccB_4$ restored the wild-type growth and survival, thus excluding the possibility of a polar effect of the mutation on the downstream genes in the mutant strain (Fig. 2A and 2B). The distinct survival rates were not due to differences in the adherence capacity (Fig. S3A and S3B) or in the internalization (Fig. S3C and S3D) of $\Delta eccB_4$ with amoebae or M Φ .

We next took advantage of the *in vivo* attenuated phenotype of $\triangle eccB_4$ to analyze and dissect the contribution of ESX-4 to the intracellular outcome of MabsCIP.

4. M. abscessus EccB4 is involved in the blockage of phagosome acidification

Inhibition of the phagosome acidification is a well-characterized property of slow-growing pathogenic mycobacteria (SGM) (39, 40). Using pH-sensitive and pH-resistant dyes, we recently demonstrated that the RGM MabsCIP strain is able to block a decrease in the intra-phagosomal pH, as a means of promoting its intracellular survival (34). By a similar approach, we found here that $\Delta eccB_4$ has a reduced capacity to block phagosome acidification (Fig. 3A). The intraphagosomal pH curve of the $\Delta eccB_4$ mutant was comparable to that of heat-killed MabsCIP whereas the intraphagosomal pH curve of $C.\Delta eccB_4$ was similar to that of the wild-type strain (Fig. 3A).

Confocal microscopy of LysoTracker-Red-labeled cells infected with FITC-stained bacilli showed that a significantly higher number of phagosomes containing $\triangle eccB_4$ co-localized with the

LysoTracker dye compared to phagosomes containing the wild-type or $C. \triangle eccB_4$ strains (Fig. 3B). Results of the co-localization studies are shown as plots (Fig. 3B) and as Pearson's correlation coefficient (PCC) of the quantified of the co-localization signals (Fig. 3C).

Together, these findings suggest that the impaired intracellular replication of $\triangle eccB_4$ is linked to the progressive acidification of $\triangle eccB_4$ -containing compartments and, therefore, that EccB4 contributes to the inhibition of phagolysosomal fusion block.

5. $\Delta eccB_4$ is unable to damage the phagosomal membrane

MabsCIP was recently shown to share important pathogenic features with SGM (34). These include the potential to induce damage to and disruption of the phagosome membrane, thereby establishing a phagosome-to-cytosol communication (34). Since EccB₄ appears to be involved in the phagosome acidification inhibition, which is a prerequisite for the induction of phagosomal rupture (41), we evaluated the capacity of $\triangle eccB_4$ to induce a phagosomal rupture. To this end, we applied the previously developed FRET-based phagosomal rupture assay (34, 42), which depends on the activity of the *M. abscessus* endogenous β -lactamase (43). In this assay, when the β lactamase reaches the cytosol, it cleaves the cephalosporin core of the Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein (CCF-4) dye present in the cytosol, resulting in inhibition of the FRET from coumarin to fluorescein and in the subsequent switch of fluorescence emission from green to blue. In contrast to MabsCIP, and similarly to heat-killed MabsCIP, $\triangle eccB_4$ was unable to inhibit FRET signaling, as revealed by the absence of a green-to-blue fluorescent shift at 24 hpi (Fig. 4A). The wild-type phenotype was fully restored, in $C \triangle eccB_4$, which supports the involvement of EccB₄ in establishing a phagosome-to-cytosol communication in M. abscessus. These results were corroborated by calculating the ratio of mean fluorescence intensities (MFI) of the blue (447 nm) versus green (520 nm) signals (Fig. 4B).

Additionally, fluorescent-labeled galectin-3 was used to visualize the remnants of ruptured phagosomal membranes, following infection of J774 macrophages with the different strains. An intense labeling with galectin-3 was observed upon infection with MabsCIP and $C.\Delta eccB_4$. In contrast, the percentage of Gal3-positive cells infected with either $\Delta eccB4$ or heat-killed MabsCIP was significantly lower (Fig. 4C and 4D). This indicates that, in the absence of a functional EccB₄, only reduced signs of phagosomal lysis are observed.

Recently, a synergy between the PDIM and the ESX-1 pathways to cause phagosomal membrane rupture has been proposed in *M. tuberculosis* (44), prompting us to analyze and compare the lipid profiles in $\triangle eccB_4$ and MabsCIP. No obvious differences in the polar or apolar lipid fractions, or in the mycolic acid pattern were noticed (Fig. S4A and S4B).

Overall, these results strongly suggest that *M. abscessus* uses the ESX-4 machinery to interfere/damage the phagosomal membrane inducing phagosomal rupture, which ultimately may allow the escape of MabsCIP into the cytosol.

Recent studies reported that, during infection of differentiated human THP-1 cells, *M. tuberculosis* engages distinct cytosolic pattern recognition receptor systems, namely the cGAS – IFN-I axis and the inflammasome – IL-1 β pathway. The decision as to which pathway is triggered is determined by the relative abundance of ESX-1 effectors (45–47). We, therefore, quantified by ELISA IL-1 β and IFN- β by ELISA in the culture supernatant of THP-1 cells. A time-dependent increase in IL-1 β production was observed for both the parental and complemented strains. In contrast, reduced levels of IL-1 β were observed in the supernatant of M Φ infected with $\Delta eccB_4$, further substantiating a functional implication of EccB₄ in phagosome-to-cytosol communication (Fig. 4E). We confirmed that the difference in IL-1 β production was due to caspase-1 activation and not to an altered pro-IL-1 β transcription in $\Delta eccB_4$ compared to MabsCIP (Fig. 4F and 4G). In contrast, we were not able to detect IFN- β in the supernatant of THP-1 cells infected with either MabsCIP or $\Delta eccB_4$, for up to 40 hpi.

6. EccB₄-dependent secretome

A proteomic based approach was used to analyze and compare the concentrated culture supernatants from MabsCIP, $\triangle eccB_4$ and $C.\triangle eccB_4$ on four replicates to unveil proteins, possibly missing or present in diminished quantity in the $\triangle eccB_4$ mutant relative to the two others strains. Three comparisons were made using two M. abscessus proteomes (UP000007137 and UP0000038470) and a *M. tuberculosis* proteome (UP000001584), with the restriction that for the M. tuberculosis proteome, a full and comprehensive proteome comparison could not be done due to low homologies between peptides. Based on the two M. abscessus proteomes, 152 and 166 differently expressed or secreted proteins were identified, between MabsCIP and $\triangle eccB_4$ (Table S3 and S4). The analysis highlighted following proteins of particular interest: i) three PE/PPE proteins (MAB 0664, MAB 0047, MAB 4141) that are not part of ESX-4 locus were decreased in $\triangle eccB_4$, ii) four putative MmpL transporters, two MmpS proteins as well as four Mce-like proteins were diminished in *AeccB4*, iii) secretion of four lipoproteins (LpqY, LprC, LppL, and LprN) was decreased in $\triangle eccB_4$ mutant (Table S3 and S4). Regarding the ESX-4 encoded proteins; a decrease of EccB4 in $\triangle eccB_4$ was noticed (p = 0.24; Fig. S5A). Importantly, the presence of EsxT (MAB 3753c) and EsxU (MAB 3754c) in the supernatant were reduced by 52% and 27% respectively, in the $\triangle eccB_4$ mutant compared to MabsCIP. While there was a trend for less secretion to be observed, the decrease was not statistically significant (p=0.49 and p=0.82, respectively) (Fig. S5A).

To further explore these findings, the esxU-esxT operon was placed downstream of the hsp60 promoter in a replicative plasmid, with the purpose to generate a His-tagged EsxT fusion protein. The construct was introduced in MabsCIP and $\triangle eccB_4$ and expression of His-EsxT was analyzed by immunoblotting (Fig. S5B). As shown in Figure S5B, His-EsxT was not detected in the culture supernatant of both MabsCIP and the $\triangle eccB_4$ mutant. However, His-EsxT was detected in the cytosol and the cell membrane – but not in the cell wall – extracts of both MabsCIP and $\triangle eccB_4$ mutant (Fig. S5B), but its expression levels were lower in the $\triangle eccB_4$ construct (Fig. S5B) despite similar amount of proteins loaded (Fig. S5C). In addition, the *esxT* transcript levels remained unchanged as indicated by qRT-PCR analyses performed on both strains (ratio of 1.15 as compared to *sigA*). Altogether, these results confirm a decreased expression/secretion of ESX-4 substrates, such as PE/PPE proteins and EsxU/T in the $\triangle eccB_4$ mutant.

Discussion

Mycobacteria and free-living amoeba have co-evolved for a long time as inferred from the ability of selected mycobacteria to survive not only in trophozoites but also in amoebal cysts (48). In the environment, interactions with amoebae seem to have contributed to shaping the virulence and pathogenic potential of NTM, as illustrated recently for *M. avium* and *M. abscessus* (9, 10). Herein, we have identified a pool of genes essential for the intracellular survival/growth of *M. abscessus* inside amoebae, and macrophages (Table S1). Our major finding is the discovery of a hot spot of *Tn* insertions within the ESX-4 T7SS locus, with 12 individual mutants with insertions in the $eccC_4$, $eccD_4$, $mycP_4$, $eccB_4$ and $eccE_4$ genes identified (Table 1).

Interestingly, the *M. abscessus* ESX-4 locus differs from that of other mycobacterial species, such as *M. tuberculosis* or *Mycobacterium smegmatis*, in that it contains the ESX conserved component EccE₄ (35) (Fig. 1B). To further explore the function of ESX-4 in the intracellular survival of *M. abscessus*, we generated a deletion mutant in one of the key structural Esx-4 components, namely EccB₄, using an allelic exchange strategy. This approach confirmed the essential role of the *eccB₄* gene in intra-amoebal and intra-M Φ replication/survival of *M. abscessus*. The replication/survival defect of $\Delta eccB_4$ resulted neither from a decreased adhesion to the host cell surface nor from a defective phagocytosis, but from the intracellular fate of the mycobacteria.

In contrast to most other RGM, MabsCIP can replicate inside the M Φ thanks to the inhibition of phagosomal acidification (10, 34). We recently proved that the *M. abscessus MAB_4780* locus, which encodes a dehydratase which is involved in the metabolism of mycolic acids, participates in the blockage of phagolysosomal fusion (49). The present study demonstrates that EccB₄ is also a major player in this process. Previous electron microscopy studies have suggested the occurrence of MabsCIP in various intracellular compartments and the presence of lesions in the phagosomal membrane that may ultimately lead to membrane rupture of the phagosome containing the S variant of MabsCIP (34). These features may result in the unique ability of MabsCIP as an RGM

to replicate inside the cells, thereby avoiding the antibacterial response of the host $M\Phi$. Unexpectedly, this phenotype was also lost in the absence of a functional EccB₄. The combination of the FRET assay and the use of a fluorescent galectin-3 (FG3) probe highlighted the rupture of the phagosomal membrane, which occurred only in presence of an intact $eccB_4$ gene. FG3 was originally used to visualize vacuole lysis induced by extra-phagosomal pathogens (50, 51) and has been successfully used to confirm *M. tuberculosis*-induced phagosomal damage (42). In addition, the establishment of a phagosome-to-cytosol contact by wild-type MabsCIP was also supported by the measurements of IL-1 β secretion. Indeed, recent reports have suggested that mycobacterial access to the cytosolic compartment has several consequences in regard to the innate immune response, including enhanced activation of the inflammasome and release of functional IL-1 β (45, 46). Quantification of IL1- β produced by THP-1 cells infected with different *M. abscessus* mutants demonstrates the involvement of EccB₄ in triggering the inflammasome, further emphasizing a functional link between ESX-4 and phagosome-to-cytosol contact. However, the IFN-β results differ from those obtained in *M. tuberculosis*, as production of IFN-β was not observed during the *M. abscessus* infection, which could be explained by the potential absence of M. abscessus DNA release into the cytosol. In the case of M. tuberculosis, mycobacterial double stranded DNA, liberated from the bacteria by still unknown mechanisms and translocated to the cytosol, most likely through the ESX-1-mediated phagosomal membrane rupture, is admitted to be responsible for the activation of the IFN-I axis (46).

Whether ESX-4 plays a direct role in phagosomal acidification/membrane permeabilization, or it is involved in a signaling event that occurs prior to these processes, is currently being addressed. This phenomenon is reminiscent of analogous studies associating the crucial role of ESX-1 and its substrates with the phagosomal rupture induced by *M. tuberculosis* or *M. marinum* (46). Here, we also demonstrated a decreased expression of *M. abscessus* ESX-4 substrates such as EsxT in the $\Delta eccB_4$ mutant, which highlights a similar role of such compounds in the *M. abscessus*-induced phagosomal membrane damage. Taken together, these results imply an unanticipated role for the ESX-4 T7SS, and particularly EccB₄, in governing the intracellular behavior of a mycobacterium. Because *M. abscessus* lacks ESX-1, it is tempting to speculate that ESX-4 operates as a surrogate of ESX-1. Indeed, in pathogenic SGM, the induction of phagosomal rupture is linked to the genomic presence of the *esx-1* locus (42, 52). The ESX loci arose by gene duplication, in the phylogenetic order of *esx-4*, *esx-1*, *esx-3*, *esx-2* and *esx-5* (54). *M. abscessus* only possesses only *esx-3* and *esx-4* loci (29, 35) and lacks *esx-1* found in other RGM, including *M. smegmatis*. The importance of *esx-4* for conjugal recipient activity in *M. smegmatis* has been reported recently (53). Of importance, induction of *esx-4* transcripts in the recipient requires a functional recipient ESX-1 secretion system (53). *M. smegmatis* lacks EccE₄ as compared to *M. abscessus*. Whether *M. abscessus* requires a membrane-damaging system, such as the one formed by the ESX-1 substrates, or whether a functional ESX-4 locus is sufficient to promote conjugal transfer for *M. abscessus* remains to be explored.

In contrast to a recent report (54), we failed to obtain *Tn* insertions in the ESX-3 locus, which brings into question the essentiality of this locus in *M. abscessus*. The ESX-4 is considered as the most ancestral T7SS in mycobacteria (35) and it is also the smallest in size (9,870 bp) in *M. tuberculosis*, comprising only 7 genes (55, 56). However, in *M. abscessus*, the ESX-4 locus is larger (12,745 bp) and possesses a supplementary gene, referred to as *eccE*₄, which is absent in the ESX-4 loci of all the other mycobacteria, including the SGM species (Fig. 1B) (35). The presence of the complete set of *eccB*₄-*eccC*₄-*eccD*₄-*eccE*₄ genes encoding the structural components of the ESX machine is reminiscent of other ESX loci, including ESX-5, whose structural organization was recently unveiled (56, 57). Of importance is the interdependence of the different Ecc components for the formation of a functional nano-machine, as previously shown by the lack of stable expression of *EccB*₅, when *eccC*₅ or *eccD*₅ were mutated (56). Of note, the related *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium immunogenum* species possesses an ESX-4 locus

similar to that of the *M. abscessus* complex with an intact $eccE_4$ gene, for which the closest paralogues so far identified are $eccE_5$ and $eccE_1$ of *M. tuberculosis* (35). The ubiquitous absence of gene $eccE_4$ from ESX-4 loci of almost all interrogated mycobacterial species suggests that in *M. abscessus* where this gene is exceptionally present, its gene product EccE₄ might be involved in the secretion of proteins such as the ESX-4-associated EsxU and EsxT substrates across the cell envelope (58). The ESX-4 loci usually also lacks also the pe/ppe and espG genes that may play important physiological functions and participate in host-pathogen interactions (58, 59). However, our comparative analysis revealed lower amounts of PE/PPE proteins in the supernatant of the $\triangle eccB_4$ mutant. This situation is reminiscent to the specific role of ESX-5 from *M. marinum* in the secretion of dedicated PPE and PE-PGRS proteins (58). Whether these proteins are directly or indirectly secreted via ESX-4 in *M. abscessus* and whether they play a role in intracellular survival is currently unknown and will have to be investigated in further studies. In addition, EsxT, a very likely substrate of ESX-4 was identified as being associated to the membrane fraction and decreased levels of EsxT were found in the membrane of $\triangle eccB_4$, supporting the proteomic data. Whether EsxU and EsxT fulfill similar functions in *M. abscessus* than EsxA/B in *M. tuberculosis* will deserve further studies.

In conclusion, we describe here new peculiar properties of the ESX-4 locus in *M. abscessus* and we demonstrated its crucial role in the intracellular survival and pathogenic potential of mycobacteria. Our findings open new perspectives for better defining the biological role of the ESX-4 system in the light of the evolution of mycobacterial pathogens.

Material and Methods

Strains, cells and culture conditions

M. abscessus subsp. *massiliense* 43S (Mabs43S) is a smooth clinical isolate from Korea used to generate the *Tn* mutant library. The CIP 104536^T type strain of *M. abscessus* subsp. *abscessus* (MabsCIP) was also used to generate the $eccB_4$ deletion mutant. Mycobacterial strain and mutants were routinely grown aerobically at 37°C in Middlebrook 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose and supplemented with 250 mg/L kanamycin when necessary, with 25 mg/L zeocin for the $\Delta eccB_4$ strain or with 25 mg/L zeocin plus 250 mg/L hygromycin for $C.\Delta eccB_4$. Reporter strains and markers were used as described previously (23, 34). *A. castellanii* (ATCC[®] 30010[™]) was grown at room temperature without CO₂ in PYG Broth for the amplification of the strain. J774.2 and THP-1 M Φ cell lines were grown and used as described (32, 34).

Cell infection assays

A. castellanii culture was washed 4 times in 10 mL of AC buffer (4 mM MgSO4, 0.4 M CaCl2, 0,1 % sodium citrate dehydrate, 0.05 mM Fe(NH4)2(SO4)2-6H2O, 2.5 mM NaHPO3, pH6.5) and dispended into 96-well plates at the concentration of 5×10^4 amoeba per well. Following 1h of incubation at 32°C, the amoeba monolayer was inoculated with 5 µl of a 4 days' culture of each *Tn* mutant. After 1h30 of incubation at 32°C, extracellular mycobacteria were removed by one wash in AC buffer, followed by 2h of incubation in presence of 100 µg/mL amikacin, followed by two successive washes in AC buffer. Plates were incubated at 32°C, with the addition every 24h of 10^7 heat-inactivated *Escherichia coli* (70°C for 60 min) (10). After 2 days of co-culture, the *A. castellanii* monolayer was disrupted with 0.1% SDS for 30 min at 32°C. Thirty microliters of a 1/25 dilution were dropped off on a blood agar plate to perform the screen. Any mutants with equal or more than 50% reduction in CFUs were selected (Fig. S1A). Regarding the second screen, CFU counts were performed to confirm the intracellular behavior, as reported earlier (10).

Infection of J774.2 and/or THP-1 M Φ and CFU counts were performed as described (10, 34). Adhesion and internalization assays were carried out in 24-well plates, as described (60).

Subcloning and sequencing of *Tn* adjacent genomic regions

Genomic DNA was extracted from each mutant, *Cla*I restricited, and subcloned in pUC19 (61). Genomic DNA was sequenced using a 5' primer in the *Tn* (TTGACGAGTTCTTCTGA). Genomic sequence comparison was made using BLAST server (Genome Database from NCBI website). Sequence data were then used to design primers in order to confirm by PCR amplification on Mabs43S genomic DNA and sequencing the exact position of the *Tn* insertion. The web interface MaGe (Magnifying Genomes) was used to automatically assign gene product function of the genome of Mabs CIP 104536^T and of the mutated gene responsible of the resistance to degradation in M Φ cells. Gene products were assigned in COGs (Cluster of orthologous Groups) themselves classified into functional classification.

EccB mutant construction and complementation

Disruption of the $eccB_4$ gene was performed using the recombineering system and described previously (10, 61). Complementation was performed after amplifying and cloning $eccB_4$ into the integrative plasmid pMVH361 as described (10).

Analysis of phagosomal acidification by pH measurements

Mabs strains expressing the fluorescent protein mCherry were labeled with FITC and dispensed into 24-well plates containing J774.2 M Φ at a MOI of 10:1. Plates were centrifuged at low speed allowing mycobacteria to reach the monolayer and were incubated 15 min at 37°C prior to fluorescence measurements (34). Fluorescent signals were then measured by sequentially exciting at 485 nm (FITC) and 565 nm (mCherry) using a Tecan's Infinite® M200 multimode plate reader.

A standard pH curve was established to correlate the fluorescent signal with the pH by measuring the emission levels from fluorescent *M. abscessus* phagocytosed by M Φ after placing infected cell monolayers in standard series of buffers from pH 4.6 to 7.6 (25).

Analysis of phagosomal acidification by Lysotracker co-localization

Fully confluent monolayers of $M\Phi$ in 24-well plates of were infected with FITC-labeled *M. abscessus* and analysis of fluorescent signals was performed. The acidotropic dye LysoTracker Red DND-99 (Life technologies) was used as a marker of phagosome acidification and maturation. J774.2 M Φ were dispensed into 12-well plates containing glass coverslips and infected with FITC-labelled *M. abscessus* (100 mg/mL of FITC for 2hrs at room temperature). At the end of the infection, LysoTracker was added to each well. The percentage of FITC-labelled mycobacteria co-localized with LysoTracker-labelled phagosomes was determined by analyzing more than 100 infected cells from at least ten random fields with a Leica SP8-X confocal microscope. Pictures analyses and Pearson's correlation coefficient evaluation were done with IMARIS software.

Galectin-3 immunostaining to detect phagosomal membrane damages

 $M\Phi$ infected with fluorescent tdTomato-expressing *M. abscessus* strains were fixed on glass coverslips. Phagosomal membrane damage was revealed by immunostaining using a purified mouse anti-human Galectin-3 (#555746, BD Pharmingen) specific monoclonal antibody used at 1/200 dilution. The antibody was visualized using secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen). An infected cell was considered positive when at least one of its mycobacteriacontaining phagosomes was stained positive with the phagosomal damage marker. The majority of specific galectin-3-positive signals were associated to membranous structures surrounding bacteria-containing phagosomes. The percentages of infected cells having at least one *M. abscessus*-containing phagosome that was positive for galectin-3 were determined from at least 100 infected cells found in 5 different fields. All images were analyzed with IMARIS software.

Flow cytometry analysis to study phagosomal rupture and caspase-1 activation

CCF-4 FRET measurement to study phagosomal rupture were also performed as recently described (42, 62) by some of the co-authors.

The FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies) was used to evaluate the presence of catalytically active forms of the caspase 1 p10 and p12. THP-1 cells were infected at a MOI of 10 bacteria per cell for 3 hrs. As a positive control of apoptosis induction, cells were incubated with LPS 500 nM for 8 hrs at 37°C. The adherent cells were gently dissociated with TrypLE Express reagent (Gibco) as recommended. The cells were washed twice and resuspended in RPMI medium with 10% FBS prior to staining with 30X FAM-VADFMK for 30 min at 37°C. To gate specifically, the cells were also stained with the CD11b antibody (42) before being fixed with 5% PFA. Cells were analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of cells with the caspase 1 p10 and p12 active forms. The same extracts were used to evaluate mature and precursor IL-1 β (Abcam ab2105, 1:1000) by Western-Blot analysis.

ELISA analysis

Supernatants from THP-1 M Φ/M . *abscessus* co-cultures were collected and assayed for human IL-1 β secretion using the IL1- β kit DY201-05 (Bio-techne) and for IFN- β secretion using the human IFN- β kit 09341410-1 (TEBU), according to the manufacturer's recommendations.

EsxU and EsxT secretion analysis

MAB_3754c and *MAB_3753c* were cloned in the *Pvu*I and *Hind*III sites of in pMVH361. Primers were designed to incorporate a His-tag at the C-term of the MAB_3753c protein. A stop codon

was also introduced between the two genes. The plasmid was transformed in the wild-type and $\Delta eccB4$ strains.

Bacterial cultures were recovered at an OD_{600} of 0.8), resuspended in PBS containing PMSF and 1 mM EDTA (1 ml per gram), sonicated and subjected to fractionationAfter a first centrifugation at 1,000 g to eliminate non-lysed bacteria or debris, supernatants were centrifugated at 15,000 g for 30 min to obtain the cell wall fraction. The supernatant was then submitted to ultracentrifugation at 100,000 g for 3 hrs to separate the plasma membranes from the cytosolic compartment. Equal protein amounts we subjected to SDS-PAGE and immunoblotting and revealed using mice anti-His antibodies conjugated with peroxidase (Sigma).

Secretome analysis

MabsCIP, $\Delta eccB_4$ and C. $\Delta eccB_4$ strains were grown in 7H9 medium until an of $OD_{600}=0.8$. Then cells were diluted with Sauton medium plus glucose (1%), the appropriate and antibiotics (see section **Strains, cells and culture conditions)**, and 0.05% Tween 80 to an OD_{600} of 0.1. The diluted cells were incubated with an $OD_{600}=0.6-0.7$ was reached. Then bacteria were centrifuged, washed three times with cold PBS1X diluted again Sauton medium plus glucose (1%) and antibiotics, and incubated until the OD_{600} reaches 0.8 to 1 Culture supernatants where, then concentrated 100 times with *Amicon*® *Ultra* centrifugal filters (3 kDa cutoff) and protein concentration was measured with Pierce protein BCA assay. Briefly, secretomes were diluted with ammonium bicarbonate and incubated during 4h with 0.2 µg trypsin/LysC (Promega) at 37 °C. Samples were then loaded onto a homemade C18 SepPak-packed stage tip for desalting. Samples were eluted using 40 % ACN/ 0.1 % formic acid and vacuum concentrated to dryness. Desalted samples were reconstituted in 2% ACN/0.3% TFA that contained iRT peptides (Biognosys) for quality control. Sample were then analyzed by nano-liquid chromatography-coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) for protein identification. Spectra were recorded on a Q-

Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) and analyzed with SequestTM through Proteome DiscovererTM 2.0 using the uniprot *M. abscessus* UP000038470 and UP000007137 databases. All data were further processed using myProMS software (63).

Lipid extractions and analysis by thin layer chromatography

For lipid analyses *M. abscessus* was grown in 7H9 broth collected by centrifugation and subjected to lyophilization. Apolar and polar lipid fractions or methyl esters of fatty acids (FAME) and mycolic acids (MAME) were obtained from 50 mg of freeze dried mycobacterial cells as previously described (64). Lipid fractions were applied to aluminium TLC silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Germany) and separated using solvent systems as described in the text. After solvent separation, TLCs with apolar lipids and FAME and MAME were treated with a mist of 5% phosphomolybdic acid (dissolved in ethanol) and charred by heating to reveal lipid spots or bands, while TLCs with polar lipids were treated with a mist of 0.1% orcinol (dissolved in 20% H₂SO₄) prior to charring.

RNA extraction and RT-PCR analysis

Extractions of bacterial RNA from various *M. abscessus* mutants were performed as described previously (10). Briefly, total RNA was extracted used TRIzol reagent and a bead beater. PCR were performed with a Thermal cycler-CFX 96 (Biorad). The primers sequences used for qRT-PCR are listed in supplementary Table S6. Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out DNA contamination. The *sigA* gene was used as an internal control (10).

Acknowledgements

This work was supported by the French Cystic Fibrosis Patients Association "Vaincre la Mucoviscidose" (RF20150501377), the French Research National Agency (ANR program DIMIVYR (ANR-13-BSV3-0007-01) to JLH and LK, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) DEQ20150331719 to LK, and the Région Ile-de-France (Domaine d'Intérêt Majeur Maladies Infectieuses et Emergentes) for funding the postdoctoral fellowship to V.L-M., and to D. L. for mass spectrometry analysis. L. L. is a doctoral fellow from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". This work was presented at the ASM Conference on Tuberculosis: Past, Present and Future (American Society for Microbiology, New York, April 2017).

Bibliography

- Hagedorn M, Rohde KH, Russell DG, Soldati T (2009) Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* 323(5922):1729–33.
- 2. Boritsch EC, et al. (2014) A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Mol Microbiol* 93(5):835–52.
- 3. Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33(12):1179–83.
- Corsaro D, Michel R, Walochnik J, Müller K-D, Greub G (2010) Saccamoeba lacustris, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia "Candidatus Metachlamydia lacustris" (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *Eur J Protistol* 46(2):86–95.
- Fritsche TR, Gautom RK, Seyedirashti S, Bergeron DL, Lindquist TD (1993) Occurrence of bacterial endosymbionts in Acanthamoeba spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* 31(5):1122–6.
- Croxatto A, Murset V, Chassot B, Greub G (2013) Early expression of the type III secretion system of Parachlamydia acanthamoebae during a replicative cycle within its natural host cell Acanthamoeba castellanii. *Pathog Dis* 69(3):159–75.
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17(2):413–33.
- Weerdenburg EM, et al. (2015) Genome-Wide Transposon Mutagenesis Indicates that Mycobacterium marinum Customizes Its Virulence Mechanisms for Survival and Replication in Different Hosts. *Infect Immun* 83(5):1778–1788.
- 9. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE (1997) Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65(9):3759–67.
- Bakala N'Goma JC, et al. (2015) Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. *Infect Immun* 83(2):780–91.
- 11. Wallace RJ, Brown BA, Griffith DE (1998) Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 52:453–90.
- Duarte RS, et al. (2009) Epidemic of Postsurgical Infections Caused by Mycobacterium massiliense. J Clin Microbiol 47(7):2149–2155.
- 13. Leão SC, et al. (2010) Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly

growing mycobacteria in Brazil. Future Microbiol 5(6):971-980.

- Olivier KN, et al. (2003) Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(6):828–34.
- 15. Roux A-L, et al. (2009) Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. *J Clin Microbiol* 47(12):4124–8.
- Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ (1993) Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* 147(5):1271–8.
- Qvist T, et al. (2016) Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 15(3):380–385.
- Jönsson BE, et al. (2007) Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 45(5):1497–504.
- 19. Bryant JM, et al. (2016) Emergence and spread of a human-transmissible multidrugresistant nontuberculous mycobacterium. *Science* 354(6313):751–757.
- Cullen AR, Cannon CL, Mark EJ, Colin AA (2000) Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* 161(2 Pt 1):641–5.
- 21. Kreutzfeldt KM, et al. (2013) Molecular longitudinal tracking of Mycobacterium abscessus spp. during chronic infection of the human lung. *PLoS One* 8(5):e63237.
- 22. Catherinot E, et al. (2009) Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus. *J Clin Microbiol* 47(1):271–4.
- 23. Bernut A, et al. (2014) Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(10):E943-52.
- 24. Pawlik A, et al. (2013) Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus. *Mol Microbiol*:1–18.
- 25. Bernut A, et al. (2016) Insights into the smooth-to-rough transitioning in Mycobacterium bolletii unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* 99(5):866–83.
- 26. Catherinot E, et al. (2007) Hypervirulence of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain. *Infect Immun* 75(2):1055–8.
- Bernut A, Herrmann J-L, Ordway D, Kremer L (2017) The Diverse Cellular and Animal Models to Decipher the Physiopathological Traits of Mycobacterium abscessus Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 7:100.

- 28. Roux A-L, et al. (2011) Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol* 13(5):692–704.
- 29. Ripoll F, et al. (2009) Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. *PLoS One* 4(6):e5660.
- Falkinham JO, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA (2015) Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Legionella pneumophila, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa. *Environ Health Perspect* 123(8):749–58.
- Cateau E, et al. (2014) Stenotrophomonas maltophilia and Vermamoeba vermiformis relationships: Bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures. *Res Microbiol* 165(10):847–851.
- Le Moigne V, et al. (2016) MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against Mycobacterium abscessus Infection. *Infect Immun* 84(10):2895–2903.
- 33. Rubin EJ, et al. (1999) In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1645–50.
- 34. Roux A-L, et al. (2016) The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages. *Open Biol* 6(11). doi:10.1098/rsob.160185.
- 35. Dumas E, et al. (2016) Mycobacterial Pan-Genome Analysis Suggests Important Role of Plasmids in the Radiation of Type VII Secretion Systems. *Genome Biol Evol* 8(2):387–402.
- Unnikrishnan M, Constantinidou C, Palmer T, Pallen MJ (2017) The Enigmatic Esx Proteins: Looking Beyond Mycobacteria. *Trends Microbiol* 25(3):192–204.
- Zhang M, et al. (2014) EspI regulates the ESX-1 secretion system in response to ATP levels in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 93(5):1057–65.
- Raman S, et al. (2006) Mycobacterium tuberculosis SigM Positively Regulates Esx Secreted Protein and Nonribosomal Peptide Synthetase Genes and Down Regulates Virulence-Associated Surface Lipid Synthesis. J Bacteriol 188(24):8460–8468.
- Armstrong JA, Hart PD (1971) Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134(3 Pt 1):713–40.
- 40. Sturgill-Koszycki S, et al. (1994) Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263(5147):678–81.
- Simeone R, Bottai D, Frigui W, Majlessi L, Brosch R (2015) ESX/type VII secretion systems of mycobacteria: Insights into evolution, pathogenicity and protection. *Tuberculosis (Edinb)* 95 Suppl 1:S150-4.

- Simeone R, et al. (2015) Cytosolic access of Mycobacterium tuberculosis: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog* 11(2):e1004650.
- 43. Soroka D, et al. (2014) Characterization of broad-spectrum Mycobacterium abscessus class
 A -lactamase. J Antimicrob Chemother 69(3):691–696.
- 44. Augenstreich J, et al. (2017) ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol.* doi:10.1111/cmi.12726.
- 45. Majlessi L, Brosch R (2015) Mycobacterium tuberculosis Meets the Cytosol: The Role of cGAS in Anti-mycobacterial Immunity. *Cell Host Microbe* 17(6):733–735.
- Wassermann R, et al. (2015) Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGASand Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. *Cell Host Microbe* 17(6):799–810.
- Groschel MI, et al. (2017) Recombinant BCG Expressing ESX-1 of Mycobacterium marinum Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. *Cell Rep* 18(11):2752–2765.
- Adékambi T, Ben Salah S, Khlif M, Raoult D, Drancourt M (2006) Survival of environmental mycobacteria in Acanthamoeba polyphaga. *Appl Environ Microbiol* 72(9):5974–81.
- 49. Halloum I, et al. (2016) Deletion of a dehydratase important for intracellular growth and cording renders rough Mycobacterium abscessus avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(29):E4228-37.
- Paz I, et al. (2010) Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell Microbiol* 12(4):530–44.
- Thurston TLM, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A, Randow F (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482(7385):414–8.
- 52. Simeone R, et al. (2012) Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* 8(2):e1002507.
- 53. Gray TA, et al. (2016) Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. *Science (80-)* 354(6310):347–350.
- 54. Kim YS, et al. (2017) Mycobacterium abscessus ESX-3 plays an important role in host inflammatory and pathological responses during infection. *Microbes Infect* 19(1):5–17.
- 55. Abdallah AM, et al. (2007) Type VII secretion mycobacteria show the way. Nat Rev

Microbiol 5(11):883-891.

- 56. Houben ENG, et al. (2012) Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Mol Microbiol* 86(2):472–84.
- 57. Beckham KSH, et al. (2017) Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat Microbiol* 2:17047.
- 58. Abdallah AM, et al. (2009) PPE and PE_PGRS proteins of Mycobacterium marinum are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol Microbiol* 73(3):329–340.
- Singh VK, et al. (2016) A unique PE_PGRS protein inhibiting host cell cytosolic defenses and sustaining full virulence of *Mycobacterium marinum* in multiple hosts. *Cell Microbiol* 18(11):1489–1507.
- 60. Tanne A, et al. (2009) A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 206(10):2205–20.
- 61. Medjahed H, Singh AK (2010) Genetic manipulation of Mycobacterium abscessus. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 10:Unit 10D.2.
- 62. Simeone R, Misztal I, Aguilar I, Vitezica ZG (2012) Evaluation of a multi-line broiler chicken population using a single-step genomic evaluation procedure. *J Anim Breed Genet* 129(1):3–10.
- 63. Poullet P, Carpentier S, Barillot E (2007) myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* 7(15):2553–2556.
- 64. Besra GS (1998) Preparation of Cell-Wall Fractions from Mycobacteria. *Mycobacteria Protocols* (Humana Press, New Jersey), pp 91–108.

Mutant	M. abscessus	M. tuberculosis	Protein name	Amoeba	MΦ
	ATCC 19977	H37Rv		% survival	% survival
37F10	MAB_3756c	Rv3447c	EccC	9	>50
24H3	MAB_3756c	<i>Rv3447c</i>	EccC	17	>50
5A1	MAB_3757	Rv3448	EccD	9	26
7A1	MAB_3757	<i>Rv3448</i>	EccD	9	34
18D2	MAB_3758	Rv3449	MycP	26	>50
32C9 ^a	MAB_3759c	Rv3450c	EccB	11	34
14E9 ^c	MAB_3760		EccE	25	14
43A3 ^b	MAB_0628		EspI	13	8
13C3	MAB_4938	Rv3911	SigM	27	>50

Table 1. Genes laying within or outside the ESX-4 locus and presenting at least one Tn insertion.

Mutants with the same TA insertion site found several times: ^aduplications are 14B9, 19D4, 32C7, and 25E4; ^bduplications are 13F7 and 2D10; ^cduplication is 15G8.
Fig. 1. Quantitative screening of the Mabs43S *Tn* library for reduced intracellular survival (A) Left: *A. castellanii* cells. Right: M Φ cells. *A. castellanii* or J774.2 M Φ cells were infected with individual selected mutants in triplicate. After 2 days of co-culture in minimum medium or 3 days of co-culture in M Φ medium supplemented with amikacin, respectively, the cells were lysed and the bacteria were enumerated by CFU counting. Compared to a 100% survival rate for the parental MabsCIP strain, the survival of *Tn* mutants with less 50% of intracellular survival in amoeba or M Φ are shown as means \pm SD. Duplicates (*i.e.* same *Tn* insertions) are not shown. Dots represent mutants with *Tn* insertions in the ESX-4 locus, and *espI* and *sigM* genes. (B) Dots show the *Tn* positions of the *Tn* within the different genes of the locus ESX-4, and *espI* and *sigM* genes. Identical mutants, with the same TA insertion, are represented with several dots one below the other. Numbers represent the position of the genes in the genome (NCBI annotations): *M. abscessus* subsp. *massiliense str. GO 06, M. abscessus* subsp. *abscessus ATCC 19977, M. abscessus* subsp. *bolletii 103, M. tuberculosis H37Rv* and *M. smegmatis MC2 155.*

Fig. 2. Intrasurvival of $\triangle eccB_4$ and $C.\triangle eccB_4$ during coculture. Intracellular survival kinetics of wild-type (wt), $\triangle eccB_4$ and $C.\triangle eccB_4$ strains determined by CFU counting during infection within amoeba *A. castellanii* (A) or J774.2 M Φ (B) at a MOI of 10:1. Histograms with error bars represent means \pm SD that are representative data of three independent experiments. Statistical analysis: *P* values were generated by ANOVA, with the Dunnett test using GraphPad prism program: *ns: non-significant*, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001.

Fig. 3. Evaluation of phagosomal acidification in $M\Phi$ infected with different *M. abscessus* strains. (A) Left: differentiated THP-1 cells were infected with FITC-labelled and mCherryexpressing (fluorescent protein) *M. abscessus* (MabsCIP) wild-type (wt), $\triangle eccB_4$, *C.* $\triangle eccB_4$ or heat-killed MabsCIP strains. Fluorescent signals were measured sequentially usinf 485 nm (FITC) and 565 nm (mCherry) excitation wavelengths. The pH at each time point was extrapolated from a standardized pH curve. Right: the intra-phagosomal pH of macrophages of the different strains was measured every 5 min during more than 1 hour. (B-C) Analysis of the bacterial compartment by confocal microscopy using a fluorescent marker for acidic compartments. (B) Left: colocalization of FITC-labeled MabsCIP (wt), heat-killed MabsCIP (wt heat-killed), $\triangle eccB_4$ and $C.\Delta eccB_4$ with the acidotropic dye LysoTracker Red in infected J774.2 M Φ . Arrowheads indicate intracellular mycobacteria not co-localizing with LysoTracker Red. Scale bar, 10 µm. Right: the percentage of colocalization of FITC-labelled strains with LysoTracker was quantified by counting at least 100 infected cells in ten different fields. The mean percentages of bacilli colocalized with red acidic compartments in M Φ infected with wt heat killed, wt, $\Delta eccB_4$, $C. \Delta eccB_4$ are depicted by horizontal bars. (C) Pearson's correlation coefficient (PCC) of images of internalized FITC-labeled mycobacteria and LysoTracker Red marker in J774.2 cells. Data are representative of three independent experiments and represent means \pm SD. Statistical analyses: P values were determined by ANOVA with the Dunnett Test using GraphPad prism program (A, C) and Unpaired t-test (B): *ns: non-significant*, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001.

Fig. 4. Phagosomal rupture detected by CCF-4 FRET-based flow cytometry, galectin-3 immunostaining confocal microscopy and IL-1ß activation and production. (A) Results are depicted as signal overlays per group with 1,000,000 events per condition acquired: wild-type (wt) (dark grey line); wt heat killed (blue line); $\Delta eccB_4$ (red line); $C.\Delta eccB_4$ (green line) and noninfected (NI, light grey filled curve). (B) Histograms represent the ratio of blue mean fluorescent intensity (MFI) at 447 nm and green MFI at 520 nm and SD from at least 3 independent experiments. (C) Representative confocal images of $M\Phi$ infected with different tdTomato *M. abscessus* wt, wt heat killed, $\triangle eccB_4$, and $C.\triangle eccB_4$ strains (red), and stained for galectin-3 (green). Scale bar, 10 μm. (D) Percentage of infected MΦ containing at least one positively stained phagosome was determined (Gal- 3^+). The values represent the mean \pm SEM of at 100 infected cells in 5 different fields (E) Kinetics of IL-1ß production during THP-1 infection by wt, wt heat-killed, $\triangle eccB_4$, and $C.\triangle eccB_4$ (F) Caspase-1 activation was measured with the FAM-PLICA® caspase-1 assay. THP-1 cells were infected, or not-infected (NI), with wt, wt heat killed, $\triangle eccB_4$, and $C.\triangle eccB_4$ at a MOI of 10 for 3hrs. As a positive control of apoptosis induction, cells were incubated with LPS 500 nM for 8 hrs at 37°C. The adherent cells were gently dissociated with TrypLE Express reagent then the cells were washed twice and resuspended in RPMI medium with 10% FBS prior to staining with 30X FAM-VADFMK for stained with the CD11b antibody and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of cells with the caspase-1 p10 and p12 active forms. (G) Western-blot analysis for pro-IL-1β was then performed after cell lysis (same conditions as in F). Statistical analysis: P values were generated by ANOVA, with the Dunnett test (B, D) or Unpaired t-test (C) using GraphPad prism program: ns: non-significant, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Fig.1













С





Mutant	M. abscessus	M. tuberculosis	Protein name	Amoeba	MØ % survival
37F10	MAB_3756c	<i>Rv3447c</i>	EccC - Type VII secretion protein	9	>50
			TtsK/SpoIIIE family protein (TA insertion 15bp after 24H3)		
5A1	MAB_3757	<i>Rv3448</i>	EccD - Type VII secretion protein	9	26
7A1	MAB_3757	<i>Rv3448</i>	EccD - Type VII secretion protein (TA insertion 426bp after 5A1)	9	34
32C9 ^a	MAB_3759c	<i>Rv3450c</i>	EccB - Type VII secretion protein	11	34
3B9	MAB_0364c		ATPase, BadF/BadG/BcrA/BcrD type	12	28
43A3 ^b	MAB_0628		EspI - Secretion protein	13	8
24H3	MAB_3756c	<i>Rv3447c</i>	EccC - Type VII secretion protein FtsK/SpoIIIE family protein	17	>50
55F6	MAB_0855		MmpL - Membrane protein	18	36
14E9 ^c	MAB_3760		EccE* - Type VII secretion protein	25	14
18D2	MAB_3758	Rv3449	MycP - Serine protease	26	>50
13C3	MAB_4938	Rv3911	SigM - RNA polymerase sigma factor	27	>50
30D4	MAB_1027		Unknown	32	>50
2E4	MAB_1118c		Unknown	35	>50
57C10	Intergenic domain		\approx 20 bp before 3-oxoacyl-ACP synthase FabF; β -ketoacyl-ACP synthase FabF; β -ketoacyl-	41	49
47H4	(before <i>MAB</i> _4008) <i>MAB</i> _2436	Rv1860	ModD	43	18
56C2	MAB_1314		Mesocentin	46	37
22H2	MAB_1421	Rv1278	Unknown	47	24
27F10	MAB_4558c		Membrane protein	47	38
22D4	MYCMA_10265		Unknown	49	31
50C7	MAB_0821		GabT - 4-aminobutyrate aminotransferase	>50	8
29G1	MAB_0431c	Rv3661	Inhibition of morphological differentiation protein	>50	13
50H8	MAB_3787	Rv3399	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase	>50	26
57C7	MAB_4626c	<i>Rv0551c</i>	FadD - Acyl-CoA synthetase	>50	33
24A4	MAB_4302		Transmembrane protein DoxX	>50	33
47F1	MAB_2752	Rv1458c	Spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	>50	33
51H1	MAB_3800c		Glutamate dehydrogenase	>50	34
52B6	MAB_1915		FadD - Fatty-acid-CoA ligase	>50	34
28B7	MAB_2799		MspA	>50	35
58E5	MAB_0090c	Rv3085	EphD - Oxidoreductase	>50	35
29C8	MAB_1911c	Rv3166c	Sugar phospho-transferase, transmembrane protein	>50	36
27A9	Not found		Unknown	>50	36
51H4	MYCMA_08185		Mammalian cell entry protein	>50	37

Table S1. List of genes identified by *Tn* library screening, for intra-amoebal and/or intramacrophage survival rates of less than 50%.

51H7	MAB_4691c		PstA - Peptide synthetase	>50	38
40A11	MAB_3658c	Rv3305c	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	>50	40
15A11	MAB_3326c	Rv3329	Aminotransferase, class III	>50	41
57G6	Intergenic domain (before <i>MAB 3866c</i>)		≈ 90 nucleotides before a permease	>50	42
22D3	MAB_2426	Rv1851	UreF - Urease accessory protein	>50	42
15C4	MAB_2992c	Rv2689c	23S rRNA methyltransferase	>50	45
39H12	MAB_4593c		Unknown	>50	45
52A12	MAB_4173	Rv3526	Oxygenase	>50	50

The mutants are classified according to their intracellular survival rate. Identical mutants (with the same TA insertion site) isolated several times: ^a duplications are 14B9, 19D4, 32C7, and 25E4; ^b duplications are 13F7 and 2D10; ^c duplication is 15G8. (*) EccE was defined as described in (35).

Table S2. Evaluation of the polar effect of *Tn* insertion. Genes mean normalized expressionrelative to *SigA*.

espl M. Abscessus ATCC 19977 & & & & & & & & & & & & & & & & & &	SS STATES CORE	C4 eccD4 mycP4 eccD4 mycP4 eccD4 ec	eccB4 3 012 420 5 052 063 5 052 063 1 0 1 47 0 1 0 1 4 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0 1 0
	Mabs	24H3	7A1
	43S	$(Tn \ EccC4)$	(Tn EccD4)
MAB_3755c esx	1.0	1.2	ND
<i>MAB_3756c eccC</i> ₄	1.0	0.5	ND
$MAB_3757 \ eccD_4$	1.0	ND	0.1
MAB_3758 mycP ₄	1.0	ND	1.9
sigA	1.0	1.0	1.0

			·						
Gene &			Delta-E	CCB4/W1	Dict next		Total	MW (kD)	Description
Synonyms	Ratio	Log2	p-value	Coeff. var.	Uist. pept.	Pept, used	Peptides		Description
MAB 1372	0.6496537	-0.6222572	0.3932764	0.9680881	5	35	35	50.8	Probable sugar ABC transporter, sugar-binding protein LpqY
MAB 4240c	1.0072634	0.010441	0.9965026	1.838688	5	32	32	104.9	Putative membrane protein, MmpL
MAB 0719 MAB 2821c	0.5701225	-0.810656	0.063134 0.8288937	0.3943692 0.6759251	3	24	24	58.0 42.8	Putative oligopeptide ABC transporter, solute-binding protein Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC
MAB 1340	0.931499	-0.1023739	0.9447592	0.8373199	4	20	20	27.4	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase
MAB 3014	0.7173365	-0.4792781	0.8498491	1.6954196	3	19	19	49.1	Putative FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, similar to mercuric reductases protein
MAB 2756c MAB 0056c	1.1497825	0.2/07/46	0.0827613	1.2044549	2	18	16	144.6	ATP-dependent helicase HrpA
MAB 0985	1.0448903	0.0633514	0.9504132	0.4838856	1	16	16	55.7	Putative monooxygenase EthA
MAB 2977	0.7467379	-0.4213261	0.8730468	1.9224785	2	16	16	53.4	Uncharacterized protein
MAB 1418 MAB 0855	0.9945128	-0.0079382	0.2486619	0.0398800	2	15	15	18.5	Putative membrane protein. MmpL family
MAB 1160	0.7240453	-0.465848	0.4917118	0.4292955	2	15	15	45.3	Uncharacterized protein
xseA,MAB 12	0.7167715	-0.4804149	0.9016702	2.6266578	2	15	15	44.3	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit
MAB 05/4c MAB 4204	0.6260738	-0.6755954	0.6534113	1.25/4889	2	14	14	73.3	Amine oxidase
MAB 3285	0.4865464	-1.0393506	0.4917118	1.0530711	1	14	14	19.0	Uncharacterized protein
MAB 2533	0.6194847	-0.6908593	0.3268841	0.3431699	1	12	12	9.9	Uncharacterized protein
MAB 4150c MAB 4336	0.5552355	-0.8488284	0.5133653	0.356738	2	12	12	49.5	Hypothetical MCE-family protein Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE
MAB 2502	0.9249418	-0.1125655	0.9623828	0.6517624	2	11	11	38.0	Uncharacterized protein
MAB 4337	0.6903825	-0.5345323	0.5669508	0.9169274	2	11	11	33.8	Putative hydrolase, alpha/beta fold
MAB 3759c MAB 2368	0.1405161	-2.8311928	0.2323173	1.37/2418	2	10	15	32.2	Uncharacterized protein Uncharacterized protein
MAB 0118c	1.5779745	0.6580739	0.4847307		1	8	8	23.0	Superoxide dismutase
MAB 0636c	1.5396859	0.6226361	0.4665977		1	8	8	100.2	Putative cation antiporter NADH dehydrogenase subunit
MAB 3373c MAB 4906	1.37/917/2	0.4638024	0.5510935		1	8	8	31.8	Uncharacterized protein Putative transcriptional regulator PadR family
MAB 2106c	1.2798472	0.3559716	0.7958945		1	8	8	37.1	Probable conserved lipoprotein LppL
MAB 2610	1.2385437	0.3086448	0.9038505		1	8	8	46.9	Putative aminotransferase
MAB 1812c MAB 4086	1.1876447	0.2274899	0.8691924		1	8	8	27.2	Uncharacterized protein Possible TetR-family transcriptional regulator
MAB 4465	1.1650177	0.2203518	0.6086966		1	8	8	49.6	Uncharacterized protein
MAB 1917	1.1587741	0.2125993	0.7932269		1	8	8	49.5	Diacylglycerol O-acyltransferase
MAB 1570 MAB 1633	1.1027819	0.1411475 0.082538	0.8895544		1	8	8	31.1	Uncharacterized protein Putative DNA polymerase III delta subunit
MAB 3776	1.0170017	0.0243221	0.9723147		1	8	8	17.8	Uncharacterized protein
MAB 0948c	1.0101027	0.0145019	0.9902276		1	8	8	52.2	Uncharacterized protein
MAB 0527c MAB 0291	0.9773886	-0.0329959	0.9739455		1	8	8	43.3	Possible monooxygenase (Luciferase-like)
MAB 3423	0.9361515	-0.0951861	0.9675525		1	8	8	55.9	Probable cytochrome P450
MAB 3952	0.9345314	-0.0976849	0.9485283		1	8	8	39.5	Possible O-succinylbenzoic acidCoA ligase MenE
MAB 1414c MAB 2220c	0.896895	-0.156989	0.9238506		1	8	8	68.6	Probable ABC transporter, ATP-binding protein
MAB 2499c	0.832265	-0.2648852	0.8872935		1	8	8	36.7	Putative hydrolase, alpha/beta fold
MAB 4682c	0.8221909	-0.2824547	0.8451906		1	8	8	10.3	Uncharacterized protein
MAB 4719c MAB 4706	0.8113779	-0.301554	0.8646435		1	8	8	7.3	Uncharacterized protein
MAB 4790 MAB 4635	0.7992279	-0.3542325	0.8646435		1	8	8	44.9	Probable NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase
MAB 3908c	0.779623	-0.3591514	0.5363251		1	8	8	42.1	Uncharacterized protein
MAB 0795	0.7777886	-0.3625501	0.493441		1	8	8	27.6	Uncharacterized protein Putotive transportational exceptions TotP family
MAB 0138 MAB 3583c	0.7451463	-0.4244044	0.1530895		1	8	8	16.3	Uncharacterized protein
MAB 3382c	0.7374432	-0.4393961	0.8498491		1	8	8	27.6	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase
MAB 0654 MAB 2855c	0.7114393	-0.4911875	0.4300089		1	8	8	33.1	Uncharacterized protein
MAB 2184	0.7038277	-0.5067059	0.6560109		1	8	8	33.2	Uncharacterized protein
MAB 4762	0.6663275	-0.5856966	0.1928121		1	8	8	68.5	Uncharacterized protein
MAB 0704c	0.6572947	-0.6053877	0.6381113		1	8	8	37.2	Uncharacterized protein
MAB 0365c	0.6363683	-0.6520662	0.6973755		1	8	8	49.1	Probable sugar-transport integral membrane protein
MAB 2241	0.6330318	-0.6596501	0.7095013		1	8	8	49.6	Putative nitrate ABC transporter, periplasmic protein
MAB 0955c MAB 0708	0.6236522	-0.6811864	0.6277257		1	8	16	50.6	Probable sensor histidine kinase PrrB
MAB 1938c	0.6055386	-0.7237091	0.4995798		1	8	8	22.8	Putative transcriptional regulator, TetR family
MAB 2751	0.5991847	-0.7389274	0.245589		1	8	8	63.6	Uncharacterized protein
MAB 1489	0.5872276	-0.7680084	0.4917118		1	8	8	64.2	Probable acyl-CoA ligase FadD
MAB 4179c	0.5654113	-0.8226273	0.2070673		1	8	8	43.1	Uncharacterized protein
MAB p02	0.5467716	-0.8709898	0.7081268		1	8	8	15.6	Uncharacterized protein
MAB 0888c MAB 2151c	0.5317647	-0.91114	0.2323173		1	8	8	42.4	Putative fumarylacetoacetase Putative cutochrome P450
MAB 4151c	0.5237772	-0.9329749	0.2250795		1	8	8	37.9	Hypothetical MCE-family protein
MAB 0988c	0.5052913	-0.9848128	0.0797395		1	8	8	16.6	Probable membrane protein, MmpS
MAB 4080c MAB 4460	0.4898363	-1.0296283	0.3107978		1	8	8	21.8	Uncharacterized protein
MAB 3114	0.4792158	-1.0612526	0.3408009		1	8	8	44.7	Uncharacterized protein
MAB 4387	0.4672615	-1.097698	0.4071086		1	8	8	17.9	Uncharacterized protein
MAB 2112 MAB n15c	0.4187231	-1.1107638	0.0359669		1	8	8	32.0 119.4	Uncharacterized protein TraA/ATP-dependent exoDNAse/relaxase
MAB 3790	0.4016635	-1.3159407	0.1818956		1	8	8	56.9	Uncharacterized protein
MAB 3855c	0.3895	-1.3603046	0.0130044		1	8	8	18.9	Putative lipoprotein LprC
MAB 1993	0.3/40554	-1.4186762	0.259769		1	8	8	26.1 35.4	rutauve retk-family transcriptional regulator Methylenetetrahydrofolate reductase
MAB 1399	1.2364216	0.3061708	0.8442147		1	7	7	45.1	Probable peptidase
hisI,MAB 266	1.1478122	0.1988866	0.9426841		1	7	7	12.5	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase
MAB 3466c MAB 4325c	0.49549	-0.1489899 -1.0130722	0.3658655		1	7	7	5.4 36.6	Uncharacterized protein
MAB 0965	0.4763755	-1.0698288	0.2323173		1	7	7	39.4	Putative lipase
MAB 4703c	0.4661445	-1.1011508	0.552147		1	7	7	103.3	Probable membrane protein, MmpL
MAB 1314	0.5754183	-0.3321154	0.6989942		1	6	6	23.5	4-nyuroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase Uncharacterized protein
MAB 4383c	0.2181577	-2.196557	0.0359669		1	6	6	15.3	Putative membrane protein, MmpS
MAB 4531	1.1635206	0.2184968	0.9447592		1	5	5	16.0	Uncharacterized protein
MAB 3366 MAB 4306	0.7721405	-0.3730648	0.8930716	<u> </u>	1	5	5	44.8 28.8	Possible glycosyl transferase Putative transolutaminase-like protein
MAB 4511c	0.1436602	-2.7992676	0.2601116		1	5	5	44.0	Putative Mce family protein
MAB_0664	0.1143057	-3.1290305	0.3844635		1	5	5	9.8	PE family protein
MAB 2102 MAB 2934	1000	1000	0.4555747		1	4	4	48.4	Probable Asp/Glu racemase
MAB 3901	1.97407023	0.9811733	0.7617026		1	4	4	19.6	Peptidase C56 PfpI
MAB 0269c	0.4734197	-1.0788084	0.5554235		1	4	4	12.0	Uncharacterized protein
MAB 4141 MAB 2270-	0.3683075	-1.4410173	0.3533505		1	4	4	55.1 43.4	PE/PPE family protein Putative peroxidase
MAB 3970c	0.001	-1000			1	3	3	12.1	Uncharacterized protein
MAB 3354	0.001	-1000			1	2	2	37.8	Probable acyl-[acyl-carrier protein] desaturase DesA1
MAB 2287	0.001	-1000			1	1	1	27.7	Putative metal dependent phosphohydrolase
MAD 2989	0.001	-1000			1	1		20.2	constants and a cetylulatisticiase

Table S3 List of proteins present only in wild-type strain compared to $\Delta eccB_4$ strain (proteome UP000007137)

Table S4 List of proteins present only in wild-type strain compared to $\Delta eccB_4$ strain (proteome UP0000038470)

120/166 proteins	Delta-E			CCB4/WT		Total MW (kD)	xDa Description		
	Ratio	Log2	p-value	Coeff. var.	used	Pept. used	Peptides		
A0A0U0XHK9 A0A0U1A6G4	0.6516033 0.8251966	-0.6179341 -0.2771902	0.4095446 0.8330575	0.9694194 0.6780384	5	35	35	50.8 42.8	Probable sugar ABC transporter, sugar-binding protein LpqY Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC
A0A0U0ZYQ4	1.3023717	0.3811412	0.9179987	2.2820302	3	21	29	106.8	Membrane protein mmpL10
A0A0U0ZID4	1.2092983	0.2741701	0.673302	0.6704797	3	18	18	58.6	ABC transporter
A0A0U0ZYE5 A0A0U1AV71	1.1976146	0.2601638 0.2042208	0.8385343 0.9179987	0.8400254 1.2044549	2	16	16	21.6 144.2	Putative transcriptional regulator, TetR family ATP-dependent helicase HrpA
A0A0U1A2Y2	1.1232806	0.1677184	0.9320953	1.0041597	2	16	16	25.8	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase
A0A0U1ADX3 A0A0U1A421	1.0469636 0.7482196	0.0662113	0.9420111 0.8781956	0.4838856 1.9224785	2	16	16	55.7 53.4	Putative monooxygenase EthA Hydrolase
A0A0U1AUQ8	0.669483	-0.5788808	0.4463197	0.4718889	2	16	16	56.1	D,D-dipeptide-binding periplasmic protein ddpA
A0A0U1A4L4 A0A0U0YSW0	0.7253176	-0.4633153	0.4888152	0.4294923	2	15	15	44.5	Uncharacterized protein containing a von winebrand ractor type A (v w A) domain
A0A0U1A3F3 A0A0U0ZY15	0.988442	-0.0167717	0.9982928	1.9813678	2	13	13	49.1	Putative FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, similar to mercuric reductases protein Uncharacterized protein
A0A0U1AXX2	0.6210686	-0.6871754	0.3327292	0.3442104	1	12	12	11.5	Conserved exported protein of uncharacterised function
A0A0U0ZYZ7 A0A0U0WTG6	0.591489 0.1407043	-0.7575768	0.6858724 0.2378297	1.4405969 1.3786172	2	12	12	49.6 52.0	Hypothetical MCE-family protein ESX-4 secretion system protein eceB4
A0A0U1APU1	1.7021268	0.7673385	0.1005493		1	8	8	25.0	Uncharacterized protein
A0A0U1AEF5	1.6429364	0.7354115	0.744083		1	8	8	15.9	Probable molybdopterin biosynthesis protein Mog
A0A0U1AVW0 A0A0U1A870	1.5811056	0.6609338	0.4656354		1	8	8	23.0	Superoxide dismutase Putative short chain dehydrogenase/reductase
A0A0U0ZZA3	1.3556631	0.4389987	0.6934338		1	8	8	22.0	Possible transposase fusion protein
A0A0U1BKB6 A0A0U1AG97	1.33/9829	0.4200597	0.1129006		1	8	8	20.9 36.4	PadR family transcriptional regulator Probable conserved lipoprotein LppL
A0A0U1A0Z5	1.2691444	0.3438562	0.7060058		1	8	8	40.5	Putative dihydropicolinate reductase
A0A0U0XGZ3	1.1975807	0.2601229	0.589263		1	8	8	38.0	Glutamate 5-kinase
A0A0U1AVB6 A0A0U1ALI6	1.1953024 1.1826384	0.2573757 0.2420091	0.9320953 0.6720268		1	8	8	38.1 31.2	Topoisomerase IB PSP1 C-terminal conserved region
A0A0U0ZXY8	1.1731193	0.2303497	0.8655691		1	8	8	26.8	Possible TetR-family transcriptional regulator
A0A0U0WM26 A0A0U1ASW6	1.1673294	0.2232117 0.2212721	0.616595 0.8486992		1	8	8	49.6 26.4	Uncharacterized protein ABC transporter, ATP-binding protein
A0A0U1A7K6	1.1610734	0.2154592	0.7785398		1	8	8	49.4	Diacylglycerol O-acyltransferase
A0A0CIAIQ8 A0A0S1T0K9	1.1267126	0.1721193	0.9179987		1	8	8	43.2	AsnC family transcriptional regulator
A0A0U1AG36 A0A0U0ZZF4	1.119779	0.163214	0.9179987		1	8	8	39.4 36.8	Uncharacterized protein dTDP-rlucose 4.6-dehydratase
A0A0U0ZYR9	1.0358238	0.0507786	0.9557204		1	8	8	40.9	Probable glycosyl transferase
A0A0U0ZYY9 A0A0U1B2F8	1.0190197 1.0069365	0.027182 0.0099727	0.9697378 0.9952523		1	8	8	17.8 51.4	Uncharacterized protein tRNA modification GTPase MnmE
A0A0U1A3E7	0.9600903	-0.0587581	0.9677545		1	8	8	43.1	Flavin-dependent monooxygenase, oxygenase subunit HsaA
A0A0UIAI29 A0A0U0ZXA0	0.9363858	-0.094825	0.9505342		1	8	8	39.4	Possible O-succinylbenzoic acidCoA ligase MenE
A0A0U0ZYP6	0.8859952	-0.1746292	0.9306936		1	8	8	55.0	Probable aldehyde dehydrogenase
A0A0UIARA8 A0A0UIB4D4	0.8780324	-0.2046543	0.9179323		1	8	8	57.7	Primase C terminal 1 (PriCT-1)
A0A0U0ZX17 A0A0U1AHX6	0.8670776	-0.205767	0.9275237		1	8	8	31.1	Uncharacterized protein Uncharacterized protein
A0A0U1B5E3	0.841433	-0.2490797	0.9253962		1	8	8	45.8	N-isopropylammelide isopropyl amidohydrolase
A0A0U0ZWX1 A0A0U1ARX7	0.8238224 0.8138427	-0.2795948 -0.2971782	0.8411385 0.6112286		1	8	8	10.4 22.9	Uncharacterized protein Pyrrolidone-carboxylate peptidase
A0A0U1AZM3	0.8109656	-0.3022874	0.8603658		1	8	8	137.2	Uncharacterized protein
A0A0UIAHE/ A0A0U0ZX20	0.8008138	-0.3204613	0.8383438		1	8	8	33.4 41.1	Alpha/beta hydrolase Putative Mce family protein
A0A0U1AL63	0.7793319	-0.3596902	0.493833		1	8	8	26.7	Uncharacterized protein Putative transcriptional regulator. TetR family
A0A0U1AJ27	0.7389065	-0.4365362	0.8486992		1	8	8	27.8	Probable encyl-CoA hydratase/isomerase
A0A0U1AVG2 A0A0U1APD9	0.7363624 0.712851	-0.4415122 -0.4883276	0.3056219 0.4239446		1	8	8	32.0	Putative pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein Membrane protein
A0A0U1AMS0	0.7119051	-0.4902431	0.3217986		1	8	8	24.3	Acid phosphatase
A0A0U1B075	0.7084984	-0.4971634	0.7225289		1	8	8	68.1	Heavy metal translocating P-type ATPase
A0A0U1AXQ3	0.7060639	-0.5021293	0.7859529		1	8	8	51.4	tRNA/rRNA cytosine-C5-methylase
A0A0U0ZVK0	0.700045	-0.5144804	0.5168702		1	8	8	51.2	Probable aldehyde dehydrogenase
A0A0U1AAM6 A0A0U1B280	0.6946548 0.6826891	-0.5256319 -0.5506993	0.3959609 0.3729399		1	8	8	46.5	Uncharacterized protein Prophage integrase
A0A0U1AIL9	0.6676497	-0.5828367	0.1930909		1	8	8	68.5	ABC transporter
A0A0UIAA38 A0A0UIA3N1	0.637631	-0.6492063	0.327383		1	8	8	49.1	Probable sugar-transport integral membrane protein
A0A0U1A797 A0A0U0ZW29	0.6067402	-0.7208493 -0.7573596	0.493833		1	8	8	22.7	Putative transcriptional regulator, TetR family Putative hydrolase, alpha/beta fold
A0A0U1AKV1	0.5815082	-0.7821287	0.1825567		1	8	8	66.3	Mannosyltransferase vycA
A0A0UIATU3 A0A0U0ZWM5	0.5712956	-0.8076908	0.1664263 0.2013371		1	8	8	43.2	Uncharacterized protein Uncharacterized protein
A0A0U1B320	0.5633255	-0.8279594	0.1332773		1	8	8	17.1	Single-stranded DNA-binding protein
A0A0UIALAI A0A0UIBPT3	0.5248165	-0.930115	0.2378297		1	8	8	37.5	Hypothetical MCE-family protein
A0A0U1A2H2 A0A0U1A8T5	0.522485	-0.9365385 -0.9778436	0.47399		1	8	8	13.6 21.4	Uncharacterized protein Uncharacterized protein
A0A0U1AFA1	0.5062939	-0.9819529	0.077768		1	8	8	16.1	Probable membrane protein, MmpS
A0A0U1AC90 A0A0U1AWK0	0.49/8637	-1.0061773	0.1852297 0.4922793		1	8	8	1.39.0 89.8	A i r-dependent neucase/deoxyribonuclease subunit B Probable phosphoketolase
A0A0U1AFZ5	0.4639676	-1.1079039	0.0341203		1	8	8	31.9	Uncharacterized protein
A0A0UIAJM5 A0A0UIB0T1	0.4561332	-1.1539748	0.495855		1	8	8	65.4 69.3	ABC transporter, transmemorane region N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain-containing protein SAOUHSC_02979
A0A0U1AY37 A0A0U0ZXN6	0.4077329	-1.2943036	0.0126321		1	8	8	42.0	Efflux transporter, RND family, MFP subunit
A0A0U0ZY17	0.3747976	-1.4158163	0.2469415		1	8	8	27.3	HTH-type transcriptional regulator
A0A0U1AD19 A0A0U1AC13	0.3624978 0.3025407	-1.4639558 -1.7247991	0.0893864 0.2931233		1	8	8	64.7 21.7	Fibronectin-binding protein A N-terminus (FbpA) Two-component system response regulator
A0A0U1AGN3	1.6040163	0.6816888	0.2585021		1	7	7	35.4	Methylenetetrahydrofolate reductase
A0A0U1A8K3 A0A0U1ALH4	1.2394988	0.3097569	0.8350575		1	7	7	29.3	Probable peptidase Phosphomethylpyrimidine kinase
A0A0U1AE18	0.4793371	-1.0608874	0.238235		1	7	7	41.5	Putative lipase
A0A0U1AUV6	1.3823432	0.4671158	0.8411385		1	6	6	60.4	Putative 3-ketosteroid 1-dehydrogenase or fumarate reductase/succinate dehydrogenase
A0A0U0ZYB5 A0A0U1AVS9	1.2743253 0.801601	0.3497336	0.9019967 0.8330575		1	6	6	15.4 16.4	Uncharacterized protein 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase
A0A0U0ZXP3	0.6437311	-0.63547	0.8272281		1	6	6	76.9	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE
A0A0U1BYE0 A0A0U0ZXG2	0.55/4//5	-0.8430146	0.2359601		1	6	6	40.0	Acy-CoA denyarogenase Amine oxidase
A0A0U1A400	0.379926	-1.3962096	0.1825567		1	6	6	27.6	Putative short-chain dehydrogenase/reductase
A0A0U0ZW57	0.2194704	-2.1879017	0.0326167		1	6	6	15.4	Putative membrane protein, MmpS
A0A0U0ZVF7 A0A0U1ALV6	1.1693681 0.8134736	0.2257292	0.939024 0.941738		1	5	5	16.1 120.6	Uncharacterized protein Chromosome partition ATPase protein
A0A0U0YU15	0.7774957	-0.3630935	0.9089657		1	5	5	44.8	Glycogen synthase
A0A0U1BK12 A0A0U0ZVV2	0.4403966	-1.1831248 -2.8005552	0.1822436 0.2637772		1	5	5	28.9 44.1	Putative transgunantinase-like protein Putative Mee family protein
A0A0U1ARH8	0.1152733	-3.1168695	0.4020695		1	5	5	9.8	PE family protein SuccingLelioningnimelate desuccinglase
A0A0U1A4R2	2.1220613	1.0854663	0.4463197		1	4	4	25.7	Probable Asp/Glu racemase
A0A0U1AYF4 A0A0U1ATA4	1.2735071	0.3488071	0.9190069		1	4	4	34.2 43.5	Uncharacterized protein Putative peroxidase
A0A0U1A236	1000	1000			1	1	1	37.2	Dihydropteroate synthase
A0A0U1AC60 A0A0U1ADA1	0,001	-1000			1	1	1	29.3 95.7	Pyruvate formate-lyase-activating enzyme Bifunctional ATP-dependent DNA helicase/DNA polymerase III subunit ensilon

SigA F		TCCGAGAAAGACAAGGCTTC
SigA R		CCAGCTCGACTTCCTCTTCG
MYCMA_05485 F	esx	GTCCCGTCTCGCGCCCTGTG
MYCMA_05485 R	esx	ACCGCACCGTCAACGTCGCA
MYCMA_2064 F	eccC4	GCCATCGGTGTGCCGGATGC
MYCMA_2064 R	eccC4	CACCACTTCGGCGGGTCGCA
MYCMA_2065 F	eccD4	AACGGCGGAAAAGCCCACGG
MYCMA_2065 R	eccD4	GGGTGCCTCGGTCTGCGGG
MYCMA_2066 F	mycP4	GTCGTCGTGGTGGTGGCAGC
MYCMA_2066 R	mycP4	GCCGCCGAGACTGAATTTGGACG

Table S5. Primers used in RT-qPCR

Fig. S1. Visual first round of screening of the transposon library for reduced intracellular survival in amoeba and evaluation of mycobacterial adhesion to and internalization in MO. (A) Examples of mutants identified are highlighted with a white circle and are named according to the plate number and location in the 96-well plates of the original library. For comparison a nonselected mutant is shown with a black circle. (B) The in vitro growth of the selected mutants with a reduced ability to survive in amoeba was next checked. Growth was assessed by measuring the OD of the cultures at 600 nm every 2 days. (C) Adhesion assay (left): The different mycobacterial strains were added to a 24-wells plate containing J774.2 M Φ cells. The plate was centrifuged to allow the bacteria to reach the monolayer and incubated 30 minutes on ice. After 2 washes, the cells were lysed and the number of bacteria that had adhered to the M Φ were enumerated by CFU counting. Internalization assay (right): J774.2 M Φ cells were infected with the different mycobacterial strains during 1 hour at a MOI 10:1 at 37°C. After 3 washes to eliminated extracellular mycobacteria, the number of internalized bacteria were enumerated by CFU counting. Histograms and error bars represent means \pm SD that are representative data of three independent experiments. Statistical analysis: Unpaired *t*-test using GraphPad prism program, ns non-significant.

Fig. S2. Construction of the *M. abscessus eccB*₄ KO mutant strain $\Delta eccB_4$ by homologous recombination. (A) *M. abscessus eccB*₄ KO mutant ($\Delta eccB_4$) was constructed by first preparing the Allelic Exchange Substrate (AES) fragment, which contains an antibiotic resistance cassette (the zeocin resistance gene *ble* of *Streptoalloteichus hindustanus*) flanked by 1,000 bp of the DNA upstream and downstream of the target gene *eccB*₄. Homologous recombination with *M. abscessus* chromosome occurred upon electroporation of the AES fragment into *M. abscessus* wild-type (wt) containing the recombineering plasmid pJV53K, which was lost after plating the colonies in media without kanamycin. (B) PCR was performed to check the deletion of *eccB*₄ by homologous recombination. Primers are identified by arrows (primers F and R) (C) *In vitro* growth curves estimated by spectrophotometry (OD 600_{nm}) of *M. abscessus* MabsCIP (wt), $\Delta eccB_4$, and *C.* $\Delta eccB_4$ strains.

Fig. S3. Evaluation of mycobacterial adhesion and internalization on amoeba (A, C) or MΦ

(B, D). (A, B) The different mycobacterial strains wild-type (wt), $\Delta eccB_4$ and $C.\Delta eccB_4$ were added to a 24-wells plate containing *A. castellanii* amoeba or J774.2 M Φ cells. The plate was centrifuged to allow the bacteria to reach the monolayer and incubated 30 min on ice. After 2 washes, the cells were lysed and the number of bacteria which have adhered to the ameba or M Φ were enumerated evaluating CFU. (C, D) *A. castellanii* amoeba or J774.2 M Φ cells were infected with wild-type (wt), $\Delta eccB_4$ and $C.\Delta eccB_4$ during 1h at a MOI 10:1 at 37°C. After 3 washes to eliminated extracellular mycobacteria, the number of internalized bacteria was evaluated counting CFU. Histograms and error bars represent means \pm SD that are representative data of three independent experiments. Statistical analysis: Unpaired *t*-test using GraphPad prism program, ns non-significant. **Fig S4. Systematic thin layer liquid chromatographic (TLC) analysis reveal no changes in cell wall lipid compositions between** *M. abscessus AeccB* **mutants and wild type strains.** (A) TLC analyses of apolar and polar lipids. Solvent systems used were as follows: A: petroleum ether / ethyl acetate 98:2 run thrice (first dimension), petroleum ether / acetone 98:2 (second dimension); B: petroleum ether acetone 92:8 run thrice (first dimension), toluene / acetone 95:5 (second dimension); C: chloroform / methanol 96:4 (first dimension), toluene acetone 80:20 (second dimension); D: chloroform / methanol / water 100:14:0.8 (first dimension), chloroform / acetone / methanol /water 50:60:2.5:3 (second dimension); E: chloroform / methanol / water 60:30:6 (first dimension), chloroform / acetic acid / methanol / water 40:25:3:6 (second dimension). (B) TLC analyses of methyl esterified fatty acids and mycolic acids. The solvent system was petroleum ether / acetone 95:5.

Fig S5. EccB4-dependant secretome (A) Proteomic analysis of concentrated supernantants from wild-type (wt) and $\triangle eccB_4$ mutants. The figure represents the volcano plots for finding significant and not significant proteins using *t*-test. The below table represents the results concerning EccB4, EsxT and EsxU (referred as Esat-6 like proteins). A fold-change ≥ 2 was found for EccB4 and EsxT although the fold change was considered non significant. (B) Left: His-EsxT (Mab_3753c) detection using an Histidine Tag antibody in different bacterial compartments: cytosol, plama membrane (pl. mb) and cell wall, and in the supernatant (Snt) of wild-type (wt), $\triangle eccB_4$ mutant. Right: quantification of His-Esx-T band intensity (ImageJ software). (C) Red Ponceau stain of the different bacterial compartments (as in B).

Fig.S1



Fig.S2





Fig.S4





osol wiphile Baphile





Fig. S5

А				
~	Gène	Protéine	Taille	Motif
	MAB_0665	PE family protein	97 aa	PE
	MAB_0666	ESAT-6-like protein (10 kDa antigen)	96 aa	WXG100
	MAB_0667	Hyp. heavy metal transport/detoxification protein	74 aa	CopZ
	MAB_0046	Probable PE family protein	102 aa	PE
	MAB_0047	Probable PPE family protein	510 aa	PPE
	MAB_0048	Probable PE family protein	97 aa	PE
	MAB_0049	ESAT-6-like protein	96 aa	WXG100
	MAB_2228c	ESAT-6-like protein esxH	96 aa	WXG100
	MAB_2229c	Hypothetical PE family protein	97 aa	PE
	MAB_2230c	Hypothetical PPE family protein	523 aa	PPE
	MAB_0148c	PPE family protein	346 aa	PPE
	MAB_0149c	Hypothetical protein	123 aa	PE
	MAB_3112	Conserved hypothetical protein	105 aa	WXG100
	MAB_3113	Conserved hypothetical protein	103 aa	WXG100_ESAT6
	MAB_3753c	Conserved hypothetical protein	96 aa	WXG100
	MAB_3754c	Hypothetical protein	92 aa	WXG100_ESAT6
	MAB_2326c	Hypothetical protein	100 aa	WXG100_ESAT6
	MAB_2327c	Hypothetical protein	101 aa	WXG100
	MAB_4463	Hypothetical protein	101 aa	WXG100
	MAB_4464	Hypothetical protein	97 aa	WXG100
	MAB_4465	Conserved hypothetical protein	449 aa	Tox-REase-7
	MAB_4830c	Conserved hypothetical protein	107 aa	WXG100
	MAB_4831c	Hypothetical protein	95 aa	WXG100_ESAT6
	MAB_3114	Conserved hypothetical protein	433 aa	Ntox37
	MAB_3569c	Conserved hypothetical protein	356 aa	Abhydrolase
	MAB_4783	PPE family protein	496 aa	PPE
	MAB_0809c	Conserved hypothetical PPE family protein	494 aa	PPE
	MAB_2254c	PPE family protein	503 aa	PPE



Figure 25. (A) Regroupement des substrats potentiels du système de sécrétion ESX-4 de M. abscessus codés dans son génome, aa = acides aminés. (B) Gènes composant le locus ESX-4 de M. abscessus.

PARTIE II - AUTRES RÉSULTATS SUR L'IMPACT DE LA MUTATION DANS LE GÈNE ECCB4 DU LOCUS ESX-4 DE M. ABSCESSUS

I. <u>Analyses bio-informatiques des éventuels substrats du système ESX-4</u> <u>de *M. abscessus*</u>

ESX-4 est un système de sécrétion de type VII. La question se pose alors d'identifier s'il existe des substrats spécifiques qui seraient sécrétés par le système complet et fonctionnel de *M. abscessus*. Les systèmes ESX sont connus et identifiés pour être des transporteurs de substrats typiques de nature protéique présentant soit un motif WXG spécifique soit des protéines PE et/ou PPE.

Tout d'abord, nous avons identifié par une analyse bio-informatique les différentes protéines contenant ces motifs dans le génome de M. abscessus et qui potentiellement pourraient être sécrétées par le système ESX-4 (Figure 25A). Par comparaison, chez M. tuberculosis, les protéines PE et PPE représentent 10% du génome de M. tuberculosis. En vert sont représentées les protéines clairement identifiées comme contenant un motif PE. Les protéines de *M. abscessus* contenant un motif PPE sont en bleues. En jaune sont représentés les gènes codant pour des protéines d'environ 100 acides aminés contenant un motif WXG, sécrétées aussi par le système de sécrétion de type VII. Enfin, la recherche de potentiels substrats sécrétés en fonction des motifs protéiques a permis d'identifier les gènes esxT et esxU (en rouge) présents dans le locus esx-4 de M. abscessus qui lui-même se compose de 8 gènes : MAB_3753c (esxT), MAB_3754c (esxU), MAB_3755C, eccC₄, eccD₄, mycP₄, eccB₄ et eccE₄ (Figure 25B). Ces gènes esxT et esxU codent pour des protéines possédant le motif WXG et correspondent aux homologues les plus proches d'ESAT-6 et CFP-10 (respectivement EsxT et EsxU). Ces protéines EsxT et EsxU de M. abscessus ne sont pas sécrétées chez M. tuberculosis, et une première expérience de complémentation par le locus esx-4 de M. abscessus chez M. tuberculosis s'est avérée non concluante dans nos conditions expérimentales de sécrétion (Le Chevalier et Laencina, résultats non publiés). Nous effectuons actuellement le clonage d'esxT et esxU en amont d'une étiquette codant 6 histidines afin de suivre leur sécrétion au sein de la souche sauvage et de la souche mutée dans $eccB_4$.

II. Sécrétome des différents mutants du locus ESX-4

L'analyse du sécrétome de surnageants de culture des différents mutants de la banque Tn en lien avec le locus ESX-4 de *M. abscessus* (EccC, MycP, EccB, EccE, EspI et SigM) a été faite en comparaison du sécrétome de la souche wt correspondante Mabs43S. Après une culture classique en 7H9 jusqu'en phase exponentielle, les cultures ont été diluées dans du milieu Sauton supplémenté de Tween 80 et de glucose, puis lavées 3 fois dans du PBS par

	Espl	EccC	MycP	EccB	EccE	SigM
Cell wall and cell processes	IpqR			IpqR		
Lipid metabolism	fadA6	fadA6	fadA6	fadA6		
	echA9				echA9	echA9
		fbpC	fbpC	fbpC		
	acpM				acpM	
		fabG4				
		accA3				
Virulence, detoxification, adaptation		dnaK	dnaK	dnaK		
		tpx	tpx			
		groL2				
Intermediary metabolism and respiration	adk	adk	adk	adk	adk	adk
	proC	proC	proC	proC	proC	proC
	sirA	sirA	sirA	sirA		sirA
	thiC	thiC	thiC		thiC	thiC
	glcB	glcB	glcB		glcB	
	pykA	pykA	pykA		pykA	
	aroF	aroF	aroF			
	tal	tal	tal			
	bfrA	bfrA			bfrA	
	thrC	thrC	thrC			
	ino1	ino1	ino1			
		sdhA		sdhA	sdhA	
	gInA1	gInA1	· · · ·			
	IpdC	IpdC				
	gltA2				gltA2	
	gabD1	sdhA pckG-pckA gpmA / gpm1 gap fixB				
		moab2				
			tai			
			iivC eleD			
			yicb.		araE	
Regulatory proteins	prrA	ριτΛ	prrA	DITA	aror	prrΛ
regulatory proteins	rra A	pinA proA	rra A	рпд	рпд	pinA
	mtrA	mtrA	mtrA			
nformation nathwayc	aras	aras	arce	araC	araC	
niomation patiways	lous	leus	lous	aigo	lous	
	proC	neus	proS		prof	
	pios	pro5	pros		pios	
		nra+2	gpsl rplV			
				tsf	_	
Conserved hypotheticals	Rv2204c	Rv2204c	Rv2204c		Rv2204 c	

Tableau 7. Sécrétome des mutants ESX-4 obtenus par transposition.

Les protéines qui sont indiquées dans le tableau correspondent aux protéines qui ne sont plus présentes dans les surnageants des mutants de la banque Tn par rapport à la souche sauvage. La légende part du bleu le plus foncé pour les protéines qui ne sont plus dans aucun des surnageants des mutants à des bleus de plus en plus clair jusqu'à blanc quand la protéine n'est plus présente que dans un seul des surnageants d'un seul mutant. centrifugation, et enfin passées en milieu Sauton supplémenté de glucose uniquement, avant de séparer le surnageant du culot par centrifugation pour les conserver. Ce protocole a été choisi afin de limiter au minimum la contamination du sécrétome par des protéines issues d'une potentielle lyse cellulaire. Les surnageants ont ensuite été concentrés par des filtres de centrifugation (colonnes Amicon) et dosés puis déposés sur gel pour migration, puis les gels ont été colorés au nitrate d'argent. Cette technique ne permettait pas de distinguer de différences significatives dans les différents surnageants de culture des mutants et de la souche sauvage.

Une analyse protéomique des surnageants de cultures concentrés chez les mutants de la voie de sécrétion de type VII ESX-4 a alors été réalisée en spectrométrie de masse en collaboration avec Fabien Le Chevalier (Institut Pasteur). Une comparaison individuelle des résultats de chaque mutant par rapport aux résultats de la souche sauvage a été faite. Cela nous a permis de classer les protéines identifiées dans les sécrétomes des mutants selon leur présence ou leur absence par rapport au sécrétome de la souche sauvage, et ainsi de mettre en évidence les protéines manquantes dans le sécrétome des mutants. Pour chaque protéine sécrétée, grâce à son identifiant et à une recherche dans la base de données « tuberculist », il a été possible d'identifier le gène correspondant, sa fonction, ainsi que sa catégorie fonctionnelle. Cela nous a permis d'établir le tableau 7 dans lequel les protéines retrouvées dans les surnageants ont été répertoriées en sept catégories fonctionnelles (« Cell wall and cell processes », « Lipid metabolism », « Virulence, detoxification, adaptation », « Intermediary metabolism and respiration », Regulatory proteins », « Information pathways », « Conserved hypotheticals »). La catégorie dans laquelle il y a le plus grand nombre de protéines absentes dans les surnageants des mutants Tn par rapport à la souche sauvage est la respiration et le métabolisme intermédiaire puis viennent les voies d'information et de métabolisme des lipides. Le code couleur part du bleu le plus foncé pour les protéines qui sont présentes dans le surnageant de la souche sauvage Mabs43S mais plus dans aucun des surnageants des mutants à des bleus de plus en plus clairs jusqu'à blanc quand la protéine n'est plus présente que dans un seul des surnageants d'un seul mutant. Ainsi certaines protéines ne sont plus sécrétées que par certains mutants alors que d'autres ne sont totalement plus sécrétées par tous les mutants et ainsi retrouvées seulement dans le sécrétome de la souche sauvage. Par exemple, les protéines Adk, ProC et PrrA ne sont pas présentes dans les surnageants des mutants contrairement à celui de la souche sauvage Mabs43S.

Même si la culture a été conduite de façon à limiter la lyse bactérienne, nous avons constaté que certaines protéines normalement non sécrétées sont retrouvées dans les surnageants de culture. Cette expérience d'analyse de sécrétome en spectrométrie de masse n'a été réalisée qu'une seule fois et demande à être reproduite. Parmi les protéines identifiées dans ce sécrétome, la protéine FbpC codant une mycolyltransférase impliquée dans le métabolisme des lipides de l'enveloppe mycobactérienne nous a interpelée, elle n'était plus présente dans les sécrétomes des mutants EccC, MycP et EccB.





(A) Détection par Western-Blot de la protéine FbpC à partir des fractions des surnageants (Supernatant) et des lysats de culots (Pellet) de culture des différentes souches : wt, $\triangle eccB_4$ et $C.\triangle eccB_4$. (B) Migration sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu afin de comparer les quantités de protéines déposées. (C) Evaluation de l'activité mycolyltransférase des différentes souches wt, $\triangle eccB_4$ et $C.\triangle eccB_4$. (D) Analyse des lipides de paroi par TLC. (E) Analyse des ratios TMM/TDM par radio-marquages.

III. <u>Etude de la protéine FbpC et son activité mycolyltransférase</u>

Afin de vérifier si le SST7 et particulièrement le locus ESX-4 de *M. abscessus* était impliqué dans la sécrétion de FbpC comme semble nous le montrer les résultats de notre analyse de sécrétome, nous avons travaillé avec nos collègues de Montpellier (Equipe du Dr L. Kremer, IRIM, Montpellier) spécialiste de ce complexe antigénique. Ils ont analysé nos surnageants de culture du mutant KO pour *eccB*₄, $\Delta eccB_4$. Le complexe antigénique 85 inclus trois protéines sécrétées (Ag85A, Ag85B, Ag85C ou encore FBpA, FBpB, FbpC), l'Ag85B ou FbpB est la protéine la plus sécrétée chez *M. tuberculosis* et chacune de ces protéines a une activité enzymatique de type mycolyltransférase.

Le complexe antigénique 85 est aussi connu pour être responsable de l'affinité élevée des mycobactéries pour la fibronectine, une grande glycoprotéine adhésive qui facilite la fixation de *M. tuberculosis* sur les macrophages alvéolaires murins. Ces protéines contribuent également à maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire en catalysant le transfert des AM vers l'AG de la paroi cellulaire à travers la synthèse des TDM. Ils catalysent le transfert d'un résidu mycolyl d'une molécule de TMM à une autre TMM, conduisant à la formation de TDM.

Grâce à un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine FbpC, nous avons pu montrer que tout comme le mutant EccB de la banque Tn, le mutant $\triangle eccB_4$ de la souche MabsCIPS produisait dans son surnageant de culture moins d'Ag85C que les souches sauvage et complémentée (Figures 26A et 26B).

L'activité enzymatique mycolyltransférase du mutant $\triangle eccB_4$, en comparaison des souches sauvage et complémentée, a ensuite été évaluée par Albertus Viljoen (IRIM, Montpellier). En analysant l'activité de la mycolyltransférase, il est possible de détecter clairement la présence de l'Ag85 dans le surnageant de la souche sauvage de *M. abscessus*. En utilisant le surnageant concentré obtenu à partir des cultures du mutant $\triangle eccB_4$, il y a clairement une diminution significative de l'activité de la mycolyltransférase, cette activité est restaurée dans les surnageants de la souche complémentée (Figure 26C).

A cause de cette diminution de l'activité mycolyltransférase observée dans le mutant $\triangle eccB_4$, il devrait également y avoir une diminution de la quantité de TDM produite dans l'enveloppe mycobactérienne. Pour évaluer cela, des expériences de radio-marquages permettant d'analyser les ratios de TMM et TDM ont été faites par Albertus Viljoen (Figure 26E). Aucune diminution du taux de production de TDM dans le mutant $\triangle eccB_4$ n'a été observée contrairement à ce qu'on aurait pu attendre. La seule hypothèse est que les niveaux d'Ag85 présents dans le périplasme n'ont pas diminué de manière significative comme observé dans le surnageant. Si le système ESX-4 présent dans la membrane interne sécrétait l'Ag85 comme nous en avions fait l'hypothèse, nous devrions observer moins d'Ag85 dans le périplasme et cela aurait un impact sur la production des TDM, hors ce n'est pas le cas. Il est difficile de concilier un défaut dans l'activité mycolyltransférase de l'Ag85 avec des niveaux de TDM conservés dans la souche $\triangle eccB_4$. De même, l'analyse des différents lipides de paroi par TLC (Thin Layer Chromatography), également réalisée par Albertus Viljoen n'a pas montré de différence dans la composition lipidique de la paroi des différentes souches étudiées (Figure 26D).



Figure 27. Evaluation de la physiopathologie des souches mutante KO $\triangle eccB_4$ et de son complémenté $C.\triangle eccB_4$ dans les embryons de poisson zèbre.

Les larves de poisson zèbre Tg(mpeg1 :mCherry-F)ump2 ont été infectées par voie intraveineuse avec 150 à 200 bacilles sauvages, KO $\triangle eccB_4$, ou complémentées $C.\triangle eccB_4$ exprimant la protéine fluorescente TdTomato.

(A) Nombre de macrophages infectés dans le tissu hématopoïétique caudal (CHT) à 4h post-infection. Chaque symbole représente des embryons individuels et les lignes horizontales indiquent les valeurs moyennes.

(B) Proportion moyenne de macrophages infectés classés par légèrement, modérément, ou fortement infectés, contenant respectivement moins de 5, 5 à 10 ou plus de 10 bacilles dans le CHT à 1 jour post-infection (n = 14-16).

(C) Cinétique de formation des granulomes chez les embryons infectés par voie intraveineuse (n = 44-42).

(D) Nombre de granulomes par embryon infecté présentant des granulomes (n = 44-42)

Analyses statistiques : (A) Ordinary one-way ANOVA, (B-D) Chi-square test, ns non-significatif, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

IV. <u>Etude de la virulence du mutant $\triangle eccB_4$ en modèle animal chez</u> <u>le poisson zèbre</u>

Nous avons montré que le mutant $\triangle eccB_4$ était impacté en croissance intracellulaire en amibes et en macrophages par rapport à la souche sauvage. La virulence dans le modèle d'embryon de poisson zèbre de ce mutant a alors été analysée à nouveau par nos collaborateurs (Audrey Bernut, IRIM, Montpellier).

Dans les embryons de poisson zèbre, le nombre de macrophages infectés est le même quelle que soit la souche utilisée. La délétion du gène $eccB_4$ n'entraine pas de modification dans les phénomènes d'infection en modèle animal zébrafish. Par contre, une différence significative a été observée entre le wt et la souche KO $\Delta eccB_4$ en termes de nombre de bacilles 24h postinfection chez les embryons. En effet, les macrophages infectés par le mutant $\Delta eccB_4$ contiennent significativement moins de bacilles par macrophages que ceux infectés par le wt (Figure 27).

Aucune différence dans la cinétique du taux de survie des embryons de poisson zèbre n'a été observée parmi les différentes souches étudiées : wt, $\Delta eccB_4$ et $C.\Delta eccB_4$. Le mutant $\Delta eccB_4$ possède la même virulence en terme de mortalité des embryons que la souche sauvage. Cependant, des différences en terme de formation de granulomes ont été observées entre les différentes souches. En effet, le défaut de croissance intracellulaire du mutant $\Delta eccB_4$ semble être associé à une diminution de la formation de granulomes chez le poisson zèbre. En effet, on comptabilise moins d'embryons de poisson zèbre développant des granulomes quand ils sont infectés avec le mutant $\Delta eccB_4$ par rapport à la souche sauvage. De même, parmi les embryons présentant des granulomes, on observe, en terme de quantité, une réduction significative du nombre de granulomes par embryon dans le poisson zèbre infecté par le mutant $\Delta eccB_4$ par rapport aux embryons infectés par les souches sauvage ou $C.\Delta eccB_4$ (Figure 27). Cette diminution dans la formation de granulomes dans l'embryon de poisson ne peut pas être corrélée par un défaut de production de TDM dans la paroi mycobactérienne comme décrit dans le paragraphe précédent.



Figure 28. Répartition en COG des gènes contenant le transposon chez les mutants ayant une survie intracellulaire à moins de 50% en amibes et/ou macrophages.

Sous la famille « cellular processes and signaling » : D « cell cycle control, cell division, chromosome partitioning », O « posttranslational modification, protein turnover, chaperones », V « defence mechanisms ».

Sous la famille « information storage and processing » : J « translation, ribosomal structure and biogenesis », K « transcription ».

Sous la famille « metabolism » : E « amino acid transport and metabolism », G « carbohydrate transport and metabolism », H « coenzyme transport and metabolism », I « lipid transport and metabolism », P « inorganic ion transport and metabolism », Q « secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism ».

Sous la famille « poorly characterized » : R « general function prediction only », S « function unknown ».

Analyse statistique : Fisher's exact test a été utilisé pour comparer chaque ensemble, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, **** P <0,001.

PARTIE III - AUTRES MUTANTS IDENTIFIÉS PAR LE CRIBLE DE LA BANQUE EN AMIBES

La recherche de mutants dans la banque Tn possédant une croissance intracellulaire atténuée en amibes a identifié les 12 mutants précédemment cités pour lesquels le transposon s'est inséré dans les gènes du locus ESX-4 de *M. abscessus*. Le criblage a également permis de révéler d'autres mutants pour lesquels le transposon s'est inséré autre part dans le génome de *M. abscessus*.

Les 47 mutants identifiés comme présentant une survie intracellulaire atténuée en croissance en amibes et/ou macrophages sont regroupés et classés selon leur pourcentage de survie croissant dans la figure 28 et tableau 8. Ils ont également été regroupés par catégorie de COG (Clusters of Orthologous Group). La catégorie D « cell cycle control, cell division, chromosome partitioning » de la famille « "cellular processes and signaling » semble être la seule catégorie surreprésentée. C'est celle qui contient les 12 mutants présentant des insertions dans le locus ESX-4 de *M. abscessus*.

Parmi les autres mutants identifiés, on recense des gènes spécifiques et non spécifiques de *M. abscessus* :

- Le mutant 3B9 (12 et 28% de survie respectivement en amibes et macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_0364c* qui code pour une ATPase de type BcrA/BcrD/BadF/BadG (N-acétylglucosamine kinase NagK, BcrA bacitracin ABC transporter ATP-binding protein, BcrD bacitracin resistance protein). Cette protéine a pour rôle de faciliter le transport de divers substrats (ions, sucres, amino-acides, oligopeptides, médicaments). Elle a été caractérisée comme essentielle dans la pathogénicité de *M. tuberculosis* et le maintien de sa survie intraphagosomale.
- Le mutant 43A3 et ses doublons 2D10 et 13F7 (13 et 8% de survie respectivement en amibes et macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_0628* qui code pour une protéine de sécrétion appelée EspI-like riche en proline et alanine et légèrement homologue à la protéine EspI codée dans le système de sécrétion de type VII ESX-1 de *M. tuberculosis*. Cette protéine a été proposée comme jouant un rôle dans la régulation du système ESX-1 de *M. tuberculosis* (Guinn *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2011), rôle controversé dans une autre étude qui suggère que EspI n'est pas un composant essentiel de l'appareil de sécrétion ESX-1 (Brodin *et al.*, 2006). Pour finir, une dernière étude plus récente, suggère que EspI pourrait jouer un rôle pendant l'infection latente et la réactivation de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2014).
- Le gène 55F6 (18 et 36% de survie respectivement en amibes et macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_0855* qui code pour une protéine MmpL. Les protéines MmpL des mycobactéries sont impliquées dans le transport de lipides et les flux d'antibiotiques. Comme exemple de MmpL, on peut citer MmpL4b de *M. abscessus* essentielle à la synthèse des GPL, MmpL3 de *M. tuberculosis* qui est

	M. abscessus		Amoeba	МΦ
Mutant	ATCC 19977	Protein name	% survival	% survival
27510		EccC - Type VII secretion protein	0	NEO
37F10	IVIAB_3756C	FtsK/SpoIIIE family protein	9	>50
5A1	MAB_3757	EccD - Type VII secretion protein	9	26
7A1	MAB_3757	EccD - Type VII secretion protein	9	34
32C9	MAB_3759c	EccB - Type VII secretion protein	11	34
3B9	MAB_0364c	ATPase, BadF/BadG/BcrA/BcrD type	12	28
43A3	MAB_0628	Espl - Secretion protein	13	8
24H3	MAB_3756c	EccC - Type VII secretion protein FtsK/SpolIIE family protein	17	>50
55F6	MAB 0855	MmpL - Membrane protein	18	36
14E9	MAB 3760	EccE - Type VII secretion protein	25	14
18D2	MAB 3758	MycP - Serine protease	26	>50
13C3	MAB 4938	SigM - RNA polymerase sigma factor	27	>50
30D4	MAB 1027	Unknown	32	>50
2E4	MAB 1118c	Unknown	35	>50
57040	Intergenic domain	≈ 20 bp before 3-oxoacyl-ACP synthase FabF; β-		10
57C10	(before MAB 4608)	ketoacyl-ACP synthase II, KASII	41	49
47H4	MAB_2436	ModD	43	18
56C2	MAB_1314	Mesocentin	46	37
22H2	MAB_1421	Unknown	47	24
27F10	MAB 4558c	Membrane protein	47	38
22D4	MYCMA_10265	Unknown	49	31
50C7	MAB 0821	GabT - 4-aminobutyrate aminotransferase	>50	8
29G1	MAB_0431c	Inhibition of morphological differentiation protein	>50	13
FOUR		S-adenosyl-L-methionine-dependent	<u>۲</u>	26
2048	IVIAB_3787	methyltransferase	>50	26
57C7	MAB_4626c	FadD - Acyl-CoA synthetase	>50	33
24A4	MAB_4302	Transmembrane protein DoxX	>50	33
47F1	MAB_2752	Spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	>50	33
51H1	MAB 3800c	Glutamate dehvdrogenase	>50	34
52B6	MAB 1915	FadD - Fatty-acid-CoA ligase	>50	34
28B7	MAB 2799	MspA	>50	35
58F5	MAB 0090c	EphD - Oxidoreductase	>50	35
2908	MAB 1911c	Sugar phospho-transferase, transmembrane protein	>50	36
2749	Not found	Unknown	>50	36
51H4	MYCMA 08185	Mammalian cell entry protein	>50	37
51H7	MAB 4691c	PstA - Peptide synthetase	>50	38
40A11	MAB 3658c	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	>50	40
15A11	MAB 3326c	Aminotransferase, class III	>50	41
57G6	Intergenic domain (before MAB_3866c)	≈ 90 nucleotides before a permease	>50	42
22D3	MAB 2426	UreF - Urease accessory protein	>50	42
15C4	MAB 2992c	23S rRNA methyltransferase	>50	45
39H12	MAB 4593c	Unknown	>50	45
52A12	MAB 4173	Oxygenase	>50	50

Tableau 8. Mutants ayant une survie intracellulaire à moins de 50% en amibes et/ou macrophages regroupés par catégories COG.

Les 47 mutants identifiés dans le crible en amibes avec dans les colonnes du tableau : le numéro d'identification du mutant, le gène dans lequel s'est inséré le transposon, la protéine codée par le gène, le pourcentage de survie en amibes, le pourcentage de survie en macrophages.

essentielle à sa viabilité, et MmpL1, 4, 7 et 8 de *M. tuberculosis* qui sont essentielles pour le maintien de sa virulence chez la souris. Ce gène *MAB_0855* ne possède pas d'homologue connu chez les autres mycobactéries et a donc été étudié plus en détails (Dubois *et al.*, en rédaction, annexe 1).

- Le mutant 13C3 (27% de survie en amibes) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_4938* qui code pour le facteur sigma ARN polymerase SigM, connu pour être un régulateur des systèmes de sécrétion de type VII chez les mycobactéries.
- Les mutants 30D4, 2E4, 22D4, 22H2 et 39H12 dont le transposon s'est inséré respectivement dans les gènes *MAB_1027*, *MAB_1118c*, *MYCMA_10265* (gène non numéroté chez *M. abscessus sensu stricto*), *MAB_1421* et *MAB_4593c* dont les fonctions sont inconnues.
- Les mutants 57C10 et 57G6 dont le transposon s'est inséré dans des régions non codantes et non associées à des gènes.
- Le gène 47H4 (43 et 18% de survie respectivement en amibes et macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_2436* qui code pour la molécule antigénique ModD (aussi connue comme Apa). La mannosylation de ModD de *M. tuberculosis* est cruciale pour sa fixation aux récepteurs des cellules T (antigénicité) durant une infection humaine ou murine.
- Le mutant 50C7 (8% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_0821* qui code pour GabT une 4-aminobutyrate aminotransferase connue pour être un transporteur membranaire mais non étudié chez les mycobactéries.
- Le mutant 50H8 (26% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_3787* qui code pour une méthyltranferase S-adenosyl-L-methionine dépendente.
- Les mutants 57C7 et 52B6 (respectivement 33 et 34% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré respectivement dans les gènes *MAB_4626c* et *MAB_1915* qui code pour une protéine FadD (FadD acyl-CoA synthetase/Fatty-acid-CoA ligase) qui a pour rôle d'activer les acides gras en s'accrochant au coenzyme A.
- Le mutant 24A4 (33% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène MAB_4302 qui code pour une protéine transmembranaire qui forme un possible opéron avec l'alpha galactosidase précurseur MAB_4302. Elle est proche de MAB_4301c homologue de Mmps4 impliqué dans l'export de glycopeptidolipides ou de sidérophores.
- Les mutants 47F1 (33% de survie en macrophages) qui sont les mêmes et dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_2752* qui code pour un transporteur de type ABC spermidine/putrescine.
- Le mutant 51H1 (34% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_3800c* qui code pour une glutamate déhygrogénase. Cette enzyme convertit le 2-oxoglutarate en glutamate. Chez *Escherichia coli*, elle joue un rôle dans la synthèse du glutamate quand la cellule est en restriction d'énergie.
- Le mutant 28B7 (35% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_2799* qui code pour la protéine MspA connue comme étant une porine chez *M. smegmatis*.
- Le mutant 58E5 (35% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_0090c* qui code pour une oxydoréductase EphD non étudiée chez les mycobactéries.
- Le mutant 29C8 (36% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_1911c* qui code pour une protéine transmembranaire dont le rôle est le transfert des sucres (Sugar phospho-transferase, motif phosphotransferase system, HPr serine phosphorylation site).
- Le mutant 51H4 (37% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MYCMA_08185* (gène non numéroté chez *M. abscessus sensu stricto*) qui code pour une protéine Mce (Mammalian cell entry protein), protéines cruciales pour la virulence de *M. tuberculosis*.
- Le mutant 51H7 (38% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_4691c* et qui code pour une protéine PstA-like, probable peptide synthétase non-ribosomale (appartient au second locus GPL-like de *M. abscessus*).
- Le mutant 40A11 (40% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_3658c* et qui code pour une aminohydrolase (N-acyl-L-amino acid amidohydrolase) non étudiée chez les mycobactéries.
- Le mutant 22D3 (42% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_2426* et qui code pour une protéine UreF (Urease accessory protein), non étudiée chez les mycobactéries.

- Le mutant 52A12 (50% de survie en macrophages) dont le transposon s'est inséré dans le gène *MAB_4173* et qui code pour une sous-unité d'une oxygénase (Possible oxidoreductase 3-ketosteroid-9-alpha-hydroxylase oxygenase).

Grâce au séquençage de ces nombreux mutants, plusieurs points intéressants doivent être soulevés. Premièrement, on a pu vérifier que le système de transposition utilisé pour générer la banque Tn dérivé de *Himar1* introduisait bien un unique transposon par mutant et dans un site di-nucléotide TA. Deuxièmement, l'analyse des mutants d'insertion choisis arbitrairement indique bien que la transposition du *mariner* dans les mycobactéries s'est effectué de manière aléatoire dans les différents sites TA du génome de *M. abscessus*. Troisièmement, le fait de retrouver plusieurs fois le même mutant en sortie de co-culture avec les amibes montre bien que le criblage visuel mis en place pour cribler la banque est assez robuste et reproductible.

Le mutant 55F6 pour lequel le transposon s'est inséré dans une protéine appartenant à la famille des MmpL présente une croissance intracellulaire atténuée dans les amibes et les macrophages avec respectivement 18 et 36% de survie par rapport au 100% du témoin de la souche sauvage. Les protéines MmpL mycobactériennes sont des protéines à plusieurs domaines transmembranaires intégrées dans la membrane plasmique des mycobactéries et dont le rôle principal est le transport de composés lipidiques qui constituent la paroi mycobactérienne à travers la membrane. Le rôle des transporteurs MmpL a largement été étudié chez M. tuberculosis. Par exemple, MmpL3 est impliqué dans le transport de TMM, MmpL7 de PDIM, MmpL11 de monoméromycolyl diacylglycérol, MmpL8 de sulfolipide SL-1 et MmpL10 de diacyl tréhalose. Chez M. abscessus, les MmpL les plus caractérisées sont MmpL4a et MmpL4b impliquées dans le transport des GPL à la surface mycobactérienne. Le transport de tous ces lipides est essentiel pour maintenir l'intégrité et la perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne, mais également pour la virulence des mycobactéries. En effet, la perturbation de ces transporteurs lipidiques conduit à une atténuation de la croissance de M. tuberculosis chez la souris. La protéine MmpL caractérisée ici dans le génome de M. abscessus ne possède aucun homologue direct chez M. tuberculosis. De plus elle est impliquée dans le transport d'un nouveau lipide non encore décrit chez M. abscessus qui fait l'objet de la rédaction d'un nouvel article (Dubois et al., en rédaction, annexe 1).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les MNT sont des mycobactéries environnementales ubiquitaires qui peuvent causer des infections pulmonaires chroniques chez les individus sensibles particulièrement ceux présentant des pathologies pulmonaires inflammatoires. Parmi les MNT, les infections pulmonaires à M. abscessus ont émergé comme une menace importante car assombrissant le tableau clinique pour les individus atteints de la mucoviscidose (Mussaffi et al., 2005; Esther et al., 2010; Martiniano et al., 2014; Qvist et al., 2016). En effet, M. abscessus accélère les dommages pulmonaires inflammatoires et le déclin des fonctions respiratoires (Qvist et al., 2016) amenant à une augmentation de la morbidité et de la mortalité, et restent dans beaucoup de centres de prise en charge de la mucoviscidose une contre-indication à la transplantation pulmonaire étant donné les risques de dissémination de la bactérie post-transplantation (Sanguinetti et al., 2001; Jönsson et al., 2007). M. abscessus peut également être responsable d'infections de la peau et des tissus mous souvent suite à des actes iatrogènes (Tableau 3. Introduction. Chapitre II. V. 5.2.). M. abscessus est aussi une MCR intrinsèquement résistante à la plupart des antibiotiques connus. Une poly-chimiothérapie est obligatoire, mais elle peut rester inefficace malgré une thérapie prolongée. L'apparition récente de souches dominantes circulantes avec une virulence accrue représente un challenge d'infection international urgent (Bryant et al., 2016).

M. abscessus a un comportement se rapprochant beaucoup plus de celui des MCL pathogènes que de celui des autres mycobactéries appartenant aux MCR (Roux et al., 2016). L'élément clé de la pathogénicité des MCL est leur capacité de survivre voire de se multiplier au sein des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages et les cellules dendritiques. M. abscessus a donc acquis certains avantages génomiques comme le montre la séquence totale de son génome (Ripoll et al., 2009), et ceci comparativement aux MCR, afin de survivre ainsi au sein d'une cellule phagocytaire eucaryote. Il a été montré que le génome de *M. abscessus* était en évolution rapide et qu'il était très plastique avec de nombreuses séquences d'insertion récemment introduites telles que des prophages et des nouveaux gènes (Choo et al., 2014). M. abscessus possède un pan-génome ouvert suggérant que ce pathogène va continuer à acquérir du nouveau matériel génétique. Cela est compatible avec le temps de doublement rapide de M. abscessus et la facilité avec laquelle cette espèce s'adapte à des conditions environnementales diverses (Choo et al., 2014). Bien qu'il existe moins de données concernant les facteurs de virulence chez M. abscessus comparé à M. tuberculosis, M. abscessus semble pouvoir évoluer rapidement et activement vers une virulence accrue. Afin de mettre en évidence ces gènes requis pour la survie intracellulaire de M. abscessus, nous avons choisi de cribler une banque de mutants par transposition réalisée chez une sous-espèce du complexe M. abscessus et dans une souche clinique. Cette banque de mutants a été criblée sur amibes, ces dernières ayant été démontrées comme un « terrain d'entrainement » pour accroitre la virulence de M. abscessus chez la souris (Bakala N'Goma et al., 2015), à l'instar de ce qui est observé avec M. avium (Cirillo et al., 1997). Notre résultat majeur fût la mise en évidence pour la première fois dans le monde des mycobactéries du rôle essentiel du locus ESX-4 codant un système de sécrétion de type VII, et ancêtre du locus ESX-1 considéré comme essentiel à la virulence et la survie intracellulaire de M. tuberculosis et de M. marinum (Wards et al., 2000; Swaim et al., 2006; van der Wel et al., 2007).

Les amibes sont des protozoaires unicellulaires omniprésents, colonisant tous les milieux tels que le sol, l'eau et l'air. Les amibes vivent souvent sur des biofilms, sur des plantes aquatiques et à l'interface eau-air où elles se nourrissent de bactéries, de champignons, de levures, d'algues ainsi que d'autres amibes (Tosetti et al., 2014). Les amibes présentent une forte amplitude écologique et ont la capacité de survivre dans des conditions défavorables, y compris un pH extrême, une pression osmotique et des conditions de température ainsi que de privations de nourriture, en s'enkystant. En effet, dans des conditions favorables, les amibes sont sous la forme trophozoïte, elles sont mobiles et se nourrissent par phagocytose et se divisent par fission binaire. Lorsque les conditions deviennent difficiles, les amibes s'enkystent pour résister à cet environnement défavorable. Les kystes amibiens contiennent des bactéries environnementales et peuvent ainsi les protéger envers des conditions environnementales défavorables mais également servir de vecteur de dispersion lors du dékystement. Peu de bactéries survivent au sein des kystes, à l'exception de nombreuses espèces de mycobactéries (Drancourt, 2014). La survie au sein des trophozoïtes permettrait aux espèces bactériennes environnementales de s'adapter et de survivre dans les macrophages humains en évitant une dégradation par la cellule hôte, à l'instar des légionnelles (Cirillo et al., 1994; Escoll et al., 2013) par exemple et des mycobactéries (Cirillo et al., 1997; Thomas et al., 2008; Bakala N'Goma et al., 2015). Les mycobactéries connues comme agents pathogènes humains obligatoires ou opportunistes peuvent à ce sens être ajoutées à la liste croissante des bactéries résistantes aux amibes (Salah et al., 2009). Les amibes sont ainsi de plus en plus présentées comme un modèle d'étude pertinent et original pour l'étude des interactions hôtes-pathogènes. Les amibes sont des prédateurs naturels de nombreux microorganismes, y compris les bactéries qu'elles absorbent par phagocytose et digèrent dans les phagolysosomes, et peuvent être considérés comme des « macrophages » ancestraux partageant plusieurs similitudes concernant leurs effets microbicides telle que la présence d'un pH acide et d'hydrolases dans les phagolysosomes (Tosetti et al., 2014). Les amibes ne réalisent pas de reproduction sexuée contrairement aux paramécies mais par contre il a été montré lors du séquençage d'A. castellanii que cette amibe présente dans son génome de nombreux gènes bactériens et viraux (2,9% du protéome) acquis par transfert horizontal et ceci semble être un mécanisme clé dans l'évolution du génome des amibes (Clarke et al., 2013). En résumé, les amibes sont de précieuses cellules phagocytaires non seulement pour découvrir de nouvelles bactéries intracellulaires environnementales comme lors de l'isolement de M. massiliense (Adékambi et al., 2004), mais plus important encore, pour être utilisées comme modèle de la pathogénicité bactérienne, permettant de découvrir de nouveaux facteurs de virulence et ainsi étudier les interactions hôte-pathogène.

Le criblage de 6 000 mutants de *M. abscessus* que nous avons réalisé a permis de révéler douze mutants où le transposon était inséré dans le locus ESX-4, où sont retrouvés les gènes codant les protéines participant à la voie de sécrétion de type VII. Cette voie existe chez *M. tuberculosis*, où l'on retrouve cinq loci : ESX-1 à ESX-5 (Simeone *et al.*, 2015a). Comparativement, *M. abscessus* n'en possède que deux : ESX-3 et ESX-4 (Dumas *et al.*, 2016; Newton-Foot *et al.*, 2016). Le système de sécrétion ESX-3 est caractérisé dans la littérature pour être impliqué dans l'homéostasie du fer chez *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* (Maciag *et al.*, 2009; Serafini *et al.*, 2009; Siegrist *et al.*, 2009). Ce système apparait comme essentiel pour la croissance, l'absorption optimale du fer et pour la modulation de la virulence de *M. tuberculosis* (Tufariello *et al.*, 2016). Chez *M. tuberculosis*, l'étude du système ESX-3 s'est longtemps confrontée et limitée à la difficulté de générer des mutants déficients dans ce locus du fait de l'activité cruciale de certaines protéines codées dans ce système en croissance *in vitro* sur milieux standards car *M. tuberculosis* ne dispose pas d'autres systèmes de type sidérophore pour complémenter l'absence d'ESX-3 contrairement à *M. smegmatis*. C'est peut-être une des raisons qui fait que nous n'avons pas identifié de mutants dans le locus ESX-3 de la banque Tn de *M. abscessus* ou alors ce système ne joue aucun rôle pour la survie de la mycobactérie intracellulairement en amibes. Une étude récente a pu montrer qu'il était possible d'obtenir des mutants ESX-3 chez *M. tuberculosis* en ajoutant dans le milieu du fer (Tufariello *et al.*, 2016) ceci ouvrant de nouvelles perspectives d'études.

Le locus ESX-4 de M. abscessus est composé de 8 gènes : MAB_3753c (esxT), MAB_3754c (esxU), MAB_3755C, eccC₄, eccD₄, mycP₄, eccB₄ et eccE₄ (Figure 25B. Résultats. Partie II. I.). Dans notre étude, nous montrons que cinq gènes de ce locus ont été potentiellement impliqués dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* en amibes ($eccC_4$, $eccD_4$, $mycP_4$, eccB4) et eccE₄). Le locus ESX-4 de M. abscessus code pour un système de sécrétion de type VII comprenant toutes les protéines cœur conservées, nécessaires à la formation du canal dont fait exceptionnellement partie la protéine EccE qui n'est pas présente dans le système ESX-4 de M. tuberculosis (Dumas et al., 2016). Parmi les autres protéines/gènes retrouvés grâce au criblage, SigM a aussi été individualisée. SigM est un régulateur des systèmes de sécrétion de type VII, notamment de l'expression d'EsxT et EsxU (homologies d'ESAT-6 et CFP-10 respectivement) (Agarwal et al., 2007), confirmant à nouveau le rôle de ce locus dans la croissance intra-amibienne de M. abscessus. Nous avons obtenu des résultats supplémentaires récents de qRT-PCR indiquant que l'expression d'EsxT et d'EsxU de M. abscessus était abolie dans le mutant sigM confirmant que le phénotype du mutant sigM serait lié à l'absence d'expression d'esxT et esxU. Nous avons également obtenu un mutant dans le gène codant une protéine EspI-like qui fait partie du locus codant le système de sécrétion ESX-1 de M. tuberculosis.

Dans la suite de notre étude pour confirmer les résultats du criblage et avoir une meilleure idée de la contribution du système de sécrétion ESX-4 à la croissance et à la survie de *M. abscessus* dans les amibes et les macrophages, nous nous sommes focalisés sur un gène, $eccB_4$, élément structurel central de ESX-4, qui a été choisi pour créer un mutant de délétion, en remplaçant $eccB_4$ par une cassette de résistance à la zéocine dans la souche type de *M. abscessus* par double recombinaison. Ce mutant a permis de confirmer le phénotype observé de croissance et de survie atténuées dans les amibes et de plus au sein de macrophages murins et humains, et ce défaut a été complémenté par l'introduction d'une copie sauvage du gène $eccB_4$ dans le mutant. La viabilité intracellulaire diminuée du mutant $\Delta eccB_4$ est liée à l'absence de blocage de l'acidification phagosomale comparativement à la souche parentale. De plus, contrairement à la souche type sauvage, le mutant $\Delta eccB_4$ est incapable de provoquer des dommages au niveau de la membrane des phagosomes. Ce résultat majeur rejoint le résultat observé avec le locus ESX-1 chez *M. tuberculosis* et confirme bien que *M. abscessus* possède des avantages génomiques lui permettant de survivre au sein des cellules, avantages non retrouvés chez les MCR comme *M. fortuitum* ou *M. smegmatis* (Bohsali *et al.*, 2010).

Le résultat majeur de notre étude est l'attribution d'un rôle biologique au locus ESX-4 dont les fonctions, à ce jour, n'étaient pas ou peu connues chez les MCL et MCR. Une démonstration récente de son rôle dans la régulation de la conjugaison bactérienne, médiée par ESX-1 chez *M. smegmatis* a été faite (Gray *et al.*, 2016). Mais aucun rôle dans la virulence de

M. tuberculosis à l'instar de celui décrit pour *M. abscessus* n'a été trouvé (Le Chevalier et al., résultats non publiés).

Plusieurs questions restent posées quant à l'existence d'une fonction chez *M. abscessus* et pas chez les MCL. L'absence d'un locus complet, avec une réduction génique par la perte d'EccE dans le locus ESX-4 des MCL, serait responsable de la non fonctionnalité du système de sécrétion codé par *esx-4*. Les quatre protéines EccB, EccC, EccD et EccE sont indissociables et indispensables à la formation de la structure de sécrétion comme démontré récemment pour les composants du locus ESX-5 chez *M. xenopi* (Beckham *et al.*, 2017). EccB est le composant périplasmique prédominant. La protéine EccE est considérée comme essentielle à la stabilité du système, son absence affectant sérieusement la formation du système de sécrétion.

ESX-1 dérive d'ESX-4. L'évolution chez les MCL aurait alors réduit la fonctionnalité du locus ESX-4 pour éviter un effet synergique, ou double chez ces mycobactéries. Nous allons essayer de répondre à ces questions en réalisant différents échanges génétiques entre locus de *M. abscessus* exprimés chez *M. tuberculosis* et vice versa (projet DIM One Health, soumis).

Enfin, contrairement à *M. tuberculosis* où les produits secrétés par ESX-1 sont connus (ESAT-6 et CFP-10), ce qui n'est pas le cas pour ESX-4 de *M. abscessus*, nous avons tenté de comprendre la différence de sécrétome entre la souche sauvage et les différents mutants d'ESX-4 obtenus par transposition. Les systèmes ESX sont connus et identifiés pour être des transporteurs de substrats typiques présentant un motif WXG spécifique et des protéines PE et PPE. Cette approche protéomique comparative ne nous a pas permis de retrouver les homologues les plus proches d'ESAT-6 et CFP-10 (respectivement EsxT et EsxU). De manière intéressante, ces protéines EsxT et EsxU ne sont pas sécrétées chez *M. tuberculosis*, et une première expérience de complémentation par le locus *esx-4* de *M. abscessus* chez *M. tuberculosis* s'est avérée non concluante dans nos conditions expérimentales de sécrétion (conditions qui ne sont pas exactement connues) (Le Chevalier et Laencina, résultats non publiés). Cela confirmerait l'absence d'activité chez *M. tuberculosis*. Connaissant la spécificité de chaque locus ESX par rapport aux substrats sécrétés, nous effectuons actuellement le clonage d'*esxT* et d'*esxU* en amont d'une étiquette codant 6 histidines afin de suivre leur sécrétion au sein de la souche sauvage et de la souche mutée dans $\Delta eccB_4$.

Par contre, une analyse du sécrétome nous a révélé l'absence, dans trois mutants obtenus par transposition dans le locus ESX-4 (EccC, MycP et EccB), ainsi que dans le mutant EccB réalisé dans la souche type, de la protéine FbpC. C'est une protéine très étudiée dans le monde mycobactérien (Kremer *et al.*, 2002), impliquée dans la synthèse des acides mycoliques spécifiques aux mycobactéries. Son absence dans le surnageant des mutants, défini par westernblot et par l'absence d'activité enzymatique mycolyltransférase, présence et activité retrouvées chez la souche complémentée, sont des arguments forts pour indiquer l'absence d'une des trois mycolyltransférases lorsque le locus ESX-4 est impacté dans la synthèse d'un de ses composants (Viljoen, LeMoigne et Laencina, résultats non publiés). Nous n'avons pas encore le lien entre cette absence et la sécrétion médiée par le locus ESX-4. En effet, FbpC est sécrétée par la voie classique Sec, et ne devrait donc pas être impactée par une mutation dans le locus de sécrétion de type VII. La synthèse de la protéine n'est pas modifiée, comme le montre les résultats de western-blot obtenus avec les extraits protéiques totaux (Figure 26B). Le fait que le locus ESX-4 soit responsable de la sécrétion d'un élément permettant de stabiliser FbpC au sein du périplasme, à l'instar de la lipoprotéine LipY (Daleke *et al.*, 2011), reste posé et est en

cours d'étude au laboratoire. Beaucoup d'inconnues persistent donc quant au rôle complet du locus ESX-4 dans la sécrétion chez *M. abscessus* aussi bien dans le cadre de la physiologie de la bactérie, que de son rôle dans la virulence.

En plus, du système de sécrétion de type VII, le criblage de la banque a révélé plusieurs autres gènes d'intérêt pouvant jouer un rôle important dans la réplication intracellulaire de M. abscessus, notamment nous avons découvert une protéine MmpL spécifique à M. abscessus qui n'avait pas encore été caractérisée et dont l'absence impacte fortement la viabilité intracellulaire sein d'amibes et de macrophages, et in vivo chez l'animal (poisson zèbre et drosophile) de M. abscessus (Dubois et al., en rédaction, annexe 1). Cette protéine de transport de lipides (MmpL, MAB_0855) à la paroi de M. abscessus a été aussi étudiée au laboratoire suite à ce crible. Trente et une MmpL sont présentes chez M. abscessus, presque le double du capital MmpL de M. tuberculosis. Une seule des 31 MmpL (MAB_0855) a donc été détectée par le crible, avec confirmation d'un déficit de croissance au sein des macrophages (Dubois et al., en rédaction, annexe 1). Une élégante approche soustractive a permis d'identifier, chez M. tuberculosis, des mutants atténués au sein des gènes mmpL4, 5, 7, 8, 10 et 11 pour la survie dans les poumons et dans la rate des souris (Lamichhane et al., 2005). Une autre étude confirme une partie de ces résultats par l'identification des mutants de mmpL chez M. tuberculosis obtenus par insertion d'une cassette de résistance aux antibiotiques (Domenech et al., 2005). Les auteurs ont montré que MmpL4, 7, 8 et 11 étaient nécessaires pour maintenir la virulence de la bactérie chez les souris. Les mutants MmpL8 et 11 étaient atténués également pour la survie dans les phases chroniques de l'infection (Domenech et al., 2005). Beaucoup d'arguments suggèrent donc que ces protéines transmembranaires impliquées dans le transport de lipides exposés à la surface des mycobactéries jouent un rôle essentiel dans les interactions hôte-pathogènes (Viljoen et al., 2017). Notre étude a confirmé le rôle essentiel de MAB_0855 dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* (Dubois *et al.*, en rédaction, annexe 1) ; et nous sommes en train de caractériser le lipide transporté par cette MmpL (Yann Guerardel, Institut Pasteur Lille).

Rôle de ESX-4 chez *M. abscessus* une bactérie émergente et comparaison avec ESX-4 de *M. tuberculosis*

Comme nous l'avons vu, les mycobactéries possèdent des systèmes de sécrétion très particuliers, dénommés ESX. *M. tuberculosis* possède 5 loci *esx* (*esx-1* à 5) alors que *M. abscessus* n'en possède que deux (*esx-3* et *esx-4*). Le locus le plus ancien est *esx-4*. Le locus *esx-3* est indispensable à la croissance bactérienne. Les autres loci ont été acquis par recombinaison homologue, dans l'ordre *esx-1*, *esx-2* et *esx-5*, chez les MCL.

Nous avons travaillé en collaboration pour ce travail avec le groupe du Dr R. Brosch à l'Institut Pasteur car nos deux laboratoires se sont intéressés au locus *esx-4*. Nous par le criblage d'une banque de mutants par transposition chez *M. abscessus* en co-culture chez l'amibe, et l'autre équipe par l'obtention d'un mutant dépourvu du locus *esx-4* chez *M. tuberculosis* afin d'étudier l'impact de la mutation chez l'animal (F. Le Chevalier). Nous avons pu montrer une différence majeure entre ces deux loci. En effet, toute mutation observée dans le ou les gènes composant ce locus *esx-4* chez *M. abscessus*, impacte la croissance intracellulaire de celle-ci en amibes et macrophages. A l'opposé, une étude *ex vivo* avec des macrophages, ou *in vivo*

chez la souris de la souche de *M. tuberculosis* dépourvue du locus *esx-4*, démontrait l'absence de phénotype délétère chez le mutant. Par conséquent, aucun rôle lié à la virulence n'a été détecté pour le locus *esx-4* chez *M. tuberculosis* contrairement à ce qui a été observé chez *M. abscessus*. Nous pourrions à la suite de ces travaux comparer le rôle respectif de ce locus ancestral *esx-4* dans deux mycobactéries pathogéniques différentes. L'insertion génétique *esx-4Mabs* et l'expression du système ESX-4Mabs seraient réalisées dans leur intégralité chez *M. tuberculosis* et inversement chez *M. abscessus*.

Ce travail ouvre des perspectives sur les produits de sécrétion respectifs de chaque locus, comme cela a déjà été commencé, afin de connaître si les différences caractérisées seront expliquées par des différences de sécrétome entre ces deux loci. L'impact majeur serait d'identifier une ou plusieurs molécules protéiques sécrétées par le locus *esx-4*, qui interviendraient dans la virulence de *M. abscessus*, ou qui confèreraient une virulence accrue chez *M. tuberculosis* afin de les utiliser comme cibles diagnostiques et/ou vaccinales. Pour l'instant, notre regard se concentre sur les deux gènes *esxT* et *esxU* codés dans le locus *esx-4* de *M. abscessus* et qui sont recensés dans la liste des substrats potentiels de ce système de sécrétion car ils possèdent le motif caractéristique WXG100. Ces gènes sont considérés comme des homologues de ESAT-6 et CFP-10 de *M. tuberculosis* et on peut spéculer sur un mécanisme d'action similaire dans la virulence de *M. abscessus* avec un effet lytique des peptides sécrétés modulant la réponse de l'hôte et conduisant aux phénotypes observés d'inhibition de l'acidification et de dommages membranaires des phagosomes.

Définir une cartographie des avantages génomiques conférés à *M. abscessus* pour résister à la vie intraphagocytaire

Ce travail de thèse a permis de mettre en avant, en aveugle, comme avantages génomiques conférés à *M. abscessus* pour une vie intracellulaire, le locus ESX-4 de *M. abscessus* du système de sécrétion de type VII et le gène MmpL (*MAB_0855*) qui ne possède pas d'orthologue exact chez *M. tuberculosis* mais qui est très proche de *mmpl8, 10* et 12 de *M. tuberculosis*.

Le criblage de la banque de mutants obtenue par transposition a permis de mettre en lumière d'autres mutants qui pourraient nous permettre d'implémenter les facteurs de virulence décrits chez *M. abscessus* après analyse de la séquence du génome. Par exemple, le gène *MYCMA_08185* qui code pour une protéine Mce (Mammalian cell entry). Des mutations dans les opérons *mce1*, *mce2* et *mce3* de *M. tuberculosis* atténuent la virulence de *M. tuberculosis* dans un modèle d'infection de souris, qui survivent alors plus longtemps (Gioffré *et al.*, 2005). *M. tuberculosis* possède quatre opérons *mce* en tout. Il a également été montré que la suppression de l'opéron *mce1* modifiait le profil lipidique de *M. tuberculosis* et l'absorption de l'acide palmitique. En effet, un mutant *mce1* accumule plus d'acides mycoliques que la souche sauvage et cette accumulation est exacerbée quand le mutant est cultivé en présence d'acide palmitique et d'acide arachidonique (Forrellad *et al.*, 2014). Très peu de choses sont connues sur les potentiels opérons *mce* chez *M. abscessus*, il serait alors intéressant d'étudier plus en détails ce mutant, voir s'il présente des homologies avec les opérons plus connus de *M. tuberculosis*, et voir si le fait que son atténuation de croissance intracellulaire soit liée avec un différentiel dans son métabolisme lipidique.

Un autre des gènes mis en évidence lors du criblage de la banque Tn est le gène *MAB_2436* qui code pour une protéine ModD. Chez *M. tuberculosis*, la mannosylation de ModD est cruciale pour sa fixation aux récepteurs des cellules T durant une infection humaine ou murine. ModD est une protéine spécifique des bactéries du genre *Mycobacterium* (Gao and Gupta, 2012). ModD est une protéine sécrétée de 45/47 kDa chez *M. tuberculosis* qui a été identifiée comme un antigène majeur des cellules T (Mattow *et al.*, 2003), mais cette protéine n'est absolument pas décrite chez *M. abscessus*. Une étude de ModD d'un point de vue de son rôle dans l'immunogénicité de *M. abscessus* pourrait entrevoir la possibilité de l'utiliser comme cible vaccinale.

Un troisième exemple est le gène *MAB_2799* identifié lui aussi par le criblage de la banque et qui code pour une protéine MspA de type Porine. Cette dernière est connue pour être une protéine de sécrétion spécifique de type porine de la membrane externe mycobactérienne (Bitter *et al.*, 2009b). Chez *M. smegmatis*, cette protéine est liée à sa capacité à persister dans les amibes (*A. castellanii*) (Salah *et al.*, 2009). Les MCL semblent avoir perdu cette protéine MspA au cours de l'évolution et cela pourrait expliquer entre autres leur faible vitesse de croissance (Wee *et al.*, 2017). Le système de sécrétion de la membrane externe de *M. abscessus* n'est pas connu, ce système qui viendrait en prolongement des ESX-3 et 4 de la membrane plasmique, permettrait aux substrats des systèmes de sécrétion de type VII ESX de la membrane interne, de traverser la totalité de la paroi mycobactérienne, il serait intéressant une fois trouvés des substrats spécifiques sécrétés par ESX-4 de *M. abscessus* de réaliser un double mutant ESX-MspA (le système *crispr cas9* est maintenant utilisé au laboratoire) pour vérifier si ces substrats sont toujours sécrétés.

Une approche RNAseq afin d'avoir une vision globale des systèmes de régulation de la virulence de *M. abscessus*

Ce travail a aussi permis de valider les modèles d'interactions amibes-*M. abscessus* et macrophages-*M. abscessus*. Pour aller plus loin que le criblage individuel de mutants et pour exploiter au mieux la banque de mutants obtenue par transposition l'idée serait de caractériser le rôle des mutants et de leur réseau de régulation par une approche RNAseq. Cette technologie lors de ma 2^e année de doctorat a été mise en place au laboratoire.

Deux jeux de données sont souhaités, des données de RNAseq lors de la co-culture amibes-*M. abscessus* ou macrophages-*M. abscessus* mais aussi à deux temps de culture, un temps précoce pour définir les gènes indispensables à l'invasion cellulaire par *M. abscessus* et un temps plus tardif afin de définir les gènes indispensables à la croissance intracellulaire de *M. abscessus*. Actuellement, l'analyse de ces données montrent des résultats assez différents par rapport aux résultats issus du criblage de la banque de mutants obtenus par transposition à part pour les MmpL. L'avantage de cette méthode est de pouvoir réaliser aussi cette étude avec *M. chelonae* qui se multiplie très bien au sein d'amibes et d'avoir une image soustractive par rapport à celle obtenue pour *M. abscessus* afin de définir plus finement le core génome de virulence de *M. abscessus*.

De plus des analyses des transcriptomes comparatifs de la banque de mutants co-cultivée en amibes par rapport à une banque de mutants co-cultivée en macrophages pourraient identifier des pools de gènes nécessaires à une survie environnementale de *M. abscessus* mais pas chez l'hôte humain et vice versa.

Recherche de M. abscessus dans l'environnement, regardons du côté des amibes

Le réservoir environnemental de *M. abscessus* est encore mal identifié ainsi que ses modes de transmission autres que par du matériel médical contaminé dans les centres de soin, c'est une difficulté pour mieux appréhender l'évolution de cette mycobactérie et prévenir sa dissémination. Des études environnementales de criblage des réseaux d'eau de Paris ont déjà été menées. Elles ont permis d'identifier de nouvelles espèces mycobactériennes mais pas d'isoler *M. abscessus* (Konjek *et al.*, 2016). Il serait alors intéressant de mener une étude similaire mais sur des points environnementaux spécifiques tels que les milieux de vie de patients contaminés à *M. abscessus*. De la même manière, il serait intéressant de mieux caractériser le rôle des amibes environnementales comme terrain propice à *M. abscessus* pour acquérir de nouveaux gènes de virulence ou également pour être responsable de sa dissémination.

Quel modèle pour étudier tous les mutants de M. abscessus liés à la virulence

Dans le cas des patients atteints de la mucoviscidose qui représentent une population particulièrement sensible aux infections à *M. abscessus*, les patients font face à des infections à plusieurs espèces pathogènes autres que mycobactériennes comme par exemple *P. aeruginosa* ou encore *B. cepacia*. Récemment, notre équipe a mis au point un modèle d'étude *ex vivo* en 3 dimensions d'un épithélium de voies aériennes humaines. Ce modèle novateur pourrait servir pour l'étude de l'infection des voies respiratoires par différentes espèces de bactéries pathogènes afin de mieux comprendre les voies de la colonisation et les mutants sélectionnés dans cette étude pourraient être comparés à la souche sauvage de *M. abscessus*. Dans ce modèle de tissu épithélial des voies aériennes, il est également possible de moduler l'inflammation pour se rapprocher au mieux des conditions *in vivo* chez les patients atteints de la mucoviscidose pour lesquels les voies respiratoires sont souvent le site d'inflammations chroniques.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence en aveugle des facteurs de virulence de *M. abscessus*, via une banque de mutants obtenus par transposition ce qui nous a permis de dépasser les difficultés à obtenir des mutants par KO chez *M. abscessus*. Ce travail ouvre des perspectives en terme de diagnostic et en terme de vaccination si le sécrétome de *M. abscessus* via le SSTVII aboutit. Cette approche a aussi permis de mettre en évidence le rôle d'une MmpL et une seule parmi les 27 MmpL de *M. abscessus* et les données produites en modèle animal semble confirmer la virulence de cette MmpL.

MATERIEL ET METHODES

I. <u>Banque de Transposon, souches mycobactériennes, lignées cellulaires</u> <u>et conditions de culture</u>

Une banque de mutants obtenus par transposition (E. J. Rubin, Harvard School of Public Health, Boston, USA) a été construite à partir d'une souche clinique 43S du complexe *M. abscessus (M. abscessus* sous-espèce *massiliense)* isolée chez un patient coréen et de morphotype lisse. De plus, le phagemide MycoMarT7 a été obtenu en ajoutant à pMycoMar un transposon *Himar1* (Zhang *et al.*, 2012) portant un gène de résistance à la kanamycine et le promoteur T7. Ainsi, le phagemide a été introduit dans *M. abscessus* par électroporation et a permis l'insertion unique d'un transposon de façon aléatoire dans un dinucléotide TA (91 240 séquences TA dans le génome de *M. abscessus*). Les mutants ont été sélectionnés sur milieu Middlebrook 7H11 et seuls ceux pour lesquels le transposon n'entraînait pas de défaut de croissance ont été récupérés ce qui correspond à environ 28 000 mutants et représente 5,6 fois le génome de *M. abscessus* en admettant qu'il n'y ait pas de redondance dans la banque.

La souche type de morphotype S de *M. abscessus* CIP104536^T (MabsCIPS) (Institut Pasteur) a été utilisée pour créer un mutant *eccB*₄ KO \triangle *eccB*₄ et sa souche complémentée correspondante *C.* \triangle *eccB*₄. La même souche CIP104536^T a aussi été transformée par les plasmides pMV261_mCherry et pTEC27 contenant les protéines fluorescentes mCherry ou tdTomato.

Les souches sauvages de *M. abscessus* Mabs43S et MabsCIPS ont été cultivées en condition aérobie à 37°C dans du milieu Middlebrook 7H9 supplémenté avec 0,2% glycérol et 1% de glucose. Les mutants de *M. abscessus* ont été cultivés dans les mêmes conditions en présence de 250 mg/L de kanamycine pour les mutants Tn de la banque, avec 25 mg/L de zéocine pour le mutant $\Delta eccB_4$, ou avec 25 mg/L de zéocine et 250 mg/L d'hygromycine B pour la souche complémentée $C.\Delta eccB_4$. Les souches de *M. abscessus* exprimant mCherry ou tdTomato ont été cultivées respectivement en présence de 250 mg/L de kanamycine ou 100 mg/L d'apramycine.

L'amibe *A. castellanii* ATCC[®]30010 est une cellule phagocytaire d'origine environnementale et a été cultivée à 32°C dans du milieu PYG pour l'amplification de la lignée cellulaire (Rowbotham, 1983). Les expériences de co-culture en présence de *M. abscessus* ont été effectuées à 32°C dans le tampon AC contenant : 4 mM MgSO₄, 0,4 M CaCl₂, 0,1% sodium citrate dehydrate, 0,05 mM Fe(NH4)₂(SO₄)₂-6H₂O, 2,5 mM NaHPO₃ au pH 6,5 et qui ne contient aucune source de carbone ou d'azote (Moffat and Tompkins, 1992).

La lignée cellulaire J774.2[®] (Sigma-Aldrich) de macrophages issus de souris BALB/c a été décongelée et cultivée suivant les procédures et recommandations du fournisseur Sigma-Aldrich dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, 100 UI/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine à 37°C en présence de 5% de CO₂.

La lignée cellulaire pro-monocytaire d'origine humaine THP-1[®] a été cultivée dans du milieu RPMI 1640 glutamax (Gibco) et 10% de SVF inactivé par la chaleur à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les monocytes THP-1 ont été traités avec 100 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) pendant 72h pour induire leur différenciation en macrophages.

II. Criblage de la banque Masb43S en co-culture avec des amibes

La mise au point du criblage (temps, concentrations, volumes, quantités, matériels...) a d'abord été faite avec la souche type de M. abscessus MabsCIPS. Pour le criblage, 5.10⁴ amibes ont été réparties par puits d'une plaque 96 puits dans le tampon AC. C'est un tampon minimum dans lequel les amibes ne se multiplient pas et qui empêche la croissance extracellulaire des mycobactéries (Bakala N'Goma et al., 2015). Après 1h d'incubation à 32°C permettant aux amibes d'adhérer, chaque puits a été infecté par 5 µL d'une culture en plaques de mutants de la banque Tn. Le volume d'infection reste alors constant mais la multiplicité d'infection MOI (Multiplicity of infection) est inconnue. Après une heure et demie d'infection, trois lavages ont été effectués avec du milieu AC, et 2 heures de traitement ont été réalisés avec 100 µg/ml d'amikacine pour éliminer les mycobactéries extracellulaires, on a ensuite maintenu la culture avec une concentration de 50 μ g/ml d'amikacine et on a ajouté 5.10⁷ bactéries *E. coli* inactivées par la chaleur pour prévenir l'enkystement des amibes. Cette dernière opération a été répétée 24 heures plus tard. Après 48 heures de co-culture, les amibes ont été lysées par l'ajout de 0,1% de SDS pendant 30 min à 32°C et une dilution a été déposée sur des géloses Columbia contenant 5% de sang de mouton afin d'évaluer la quantité de mycobactéries intracellulaires présentes. Quand les colonies de mycobactéries ont commencé à apparaitre sur gélose, on a fait une sélection visuelle des mutants impactés dans leur croissance intracellulaire.

2.1. Confirmation de l'atténuation de croissance en amibes

Après une première sélection visuelle des mutants Tn atténués dans leur croissance intracellulaire, un deuxième criblage a été réalisé à nouveau lors d'une co-culture amibesmutants Tn de *M. abscessus* mais seulement avec les mutants sélectionnés lors du premier crible. Cette fois-ci, le crible a été réalisé de manière quantitative (connaissance de la MOI, de 10), en triplicatas et en plaques 24 puits (P24). Ce second crible est basé sur l'énumération précise des CFU à l'issue de la co-culture. Nous avons toujours travaillé en aveugle puisqu'à ce stade nous ne connaissions pas la position d'insertion du transposon dans le mutant.

Le même protocole a été utilisé pour l'évaluation de la cinétique de survie intracellulaire, les co-cultures ont juste été arrêtées à différents temps après lyse des amibes. La viabilité des amibes pendant les co-cultures a été évaluée en les énumérant à l'aide du bleu Trypan.

2.2. Étude de la croissance in vitro

Pour écarter les mutants avec une survie intracellulaire atténuée qui serait due à un défaut de croissance intrinsèque de la mycobactérie, les courbes de croissance de tous les mutants Tn sélectionnés ont été évaluées en culture liquide en milieu riche *in vitro*. La croissance *in vitro* de tous les mutants a été surveillée en suivant la DO à 600 nm des cultures tous les 2 jours. Les différents mutants présentant un défaut de croissance *in vitro* par rapport à la souche type sauvage correspondante ont été exclus de l'étude. Ils sont ainsi au nombre de 15 sur 136 mutants cultivés.

III. <u>Co-cultures en macrophages</u>

Après la sélection de 136 mutants après le premier crible en amibes, nous nous sommes intéressés au comportement de ces mutants lors d'une co-culture en macrophages en parallèle de la confirmation de l'atténuation de la croissance en amibes.

De même que pour les amibes, la mise au point de la co-culture (temps, concentrations, volumes, quantités, matériels...) a d'abord été réalisée avec la souche type MabsCIPS. Les macrophages utilisés sont des macrophages murins de la lignée J774.2[®]. La capacité des mutants Tn, sélectionnés pour être atténués dans leur croissance intracellulaire en amibes, à persister dans les macrophages, a été examinée.

Les macrophages ont été ensemencés à raison de 5.10^4 macrophages par puits de P24 en milieu riche, du DMEM supplémenté de 10% de SVF et laissés 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂ pour leur permettre d'adhérer aux puits. De même que pour le deuxième crible en amibes, un volume constant et une MOI connue et contrôlée de 10 mycobactéries pour un macrophage ainsi qu'un triplicata technique ont été réalisés. Après 3 heures d'infection suivies de trois lavages au DMEM, 1 heure de traitement à 250 µg/ml d'amikacine a été effectuée pour éliminer les mycobactéries extracellulaires, l'amikacine a alors été enlevée pour en rajouter tout au long de la co-culture mais à une dose de 50 µg/ml dans le milieu de culture afin de prévenir la multiplication mycobactérienne extracellulaire. Après 72 heures de co-culture à 37°C en présence de 5% de CO₂, les macrophages ont été lysés à 4°C après remplacement du milieu par de l'eau et des CFU ont été effectuées pour évaluer la quantité de bactéries intracellulaires présentes. Le même protocole a été utilisé pour l'évaluation de la cinétique de survie intracellulaire, les co-cultures ont juste alors été arrêtées à différents temps post-co-culture. La viabilité des macrophages pendant les co-cultures a été surveillée en les énumérant au bleu de Trypan.

IV. <u>Identification du site d'insertion du transposon des mutants de</u> <u>la banque</u>

Dans un vecteur plasmidique pUC19 (InvitrogenTM) de 2 686 bp portant une cassette de résistance à l'ampicilline, nous avons introduit un site de restriction *ClaI* (pUC19-*ClaI*) non initialement présent dans le plasmide mais existant dans la séquence du transposon en dehors

(en amont) de la cassette de résistance à la kanamycine de ce dernier. C'est également une des enzymes de restriction les plus représentées dans le génome de *M. abscessus* (2 173 sites de restriction). Le plasmide nouvellement créé a été restreint et ouvert par *Cla*I pendant 2 heures à 37°C puis déphosphorylé par l'antarctique phosphatase alcaline (New England BiolabsTM).

L'ADN génomique des mutants a été extrait en utilisant une méthode combinant l'emploi d'un BeadBeater (Ozyme) pour lyser les cellules à l'aide de billes de zirconium et de phénol pour éliminer les contaminants des acides nucléiques (Medjahed and Singh, 2010). L'ADN génomique a ensuite été dosé au nanodrop (Fischer) et restreint à 37°C par l'enzyme *Cla*I sur une nuit.

Cinquante ng du plasmide pUC19-*ClaI* ouvert par *ClaI* et 50 ng d'ADN génomique extrait des mutants et digéré par *ClaI* également ont ensuite été ligués ensemble pendant 1 heure à température ambiante par une unité de ligase T4 (InvitrogenTM) dans un volume final de 10 μ L.

Des bactéries *E. coli* électrocompétentes ont ensuite été transformées avec le résultat de la ligation. Les clones ayant incorporés les plasmides contenant le transposon présent dans l'ADN génomique ont été sélectionnés sur une gélose additionnée des deux antibiotiques, l'ampicilline permettant de sélectionner les bactéries porteuses du plasmide pUC19 et la kanamycine pour la présence du transposon inséré dans le plasmide.

Chaque clone isolé a été cultivé en milieu liquide LB une nuit avec la sélection antibiotique appropriée. Des extractions plasmidiques ont été faites à partir de ces cultures avec le kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo ScientificTM). Ces plasmides ont ensuite tous été vérifiés par restriction enzymatique (pour vérifier la bonne insertion d'une séquence d'ADN génomique) et par séquençage de l'extrémité 3' du transposon et du gène en aval du transposon (Eurofins) avec l'oligonucléotide : 5'-TTG ACG AGT TCT TCT GA-3' correspondant aux 17 dernières paires de base de la cassette de résistance à la kanamycine du transposon (pour identifier le gène en aval de l'insertion du transposon dans l'ADN génomique).

L'analyse des séquences a été réalisée par **BLAST-N** (NCBI, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). La souche sauvage 43S se rapprochant du sous-type massiliense, les gènes identifiés ont été retrouvés par homologie avec ceux présents chez la souche M. abscessus sous-espèce massiliense str. GO 06 et une comparaison a été faite avec ceux trouvés chez la souche type *M. abscessus* CIP 104536^T, le génome de la souche *M. abscessus* sous-espèce massiliense str. GO 06 n'étant pas séquencé en Sanger. L'identité du produit de chaque gène a été par ailleurs vérifiée par une analyse de motifs protéiques en réalisant des BLAST-X et des BLAST-P par rapport à des souches de mycobactéries dont le génome a été séquencé en Sanger et via InterProScan 5 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/).

De plus, le produit des 47 gènes sélectionnés a été classé au sein de clusters de groupes orthologues (COG) à partir du classement des gènes de la souche *M. abscessus* CIP 104536^T au sein de COG (MaGe, https://www.genoscope.cns.fr/), cette classification n'étant pas disponible pour la souche *M. abscessus* sous-espèce *massiliense* str. GO 06.

V. <u>Construction du mutant KO ΔeccB4 dans la souche MabsCIPS et son</u> <u>complémenté C.ΔeccB4</u>

Pour confirmer les résultats des criblages et avoir une meilleure idée de la contribution du gène $eccB_4$ d'intérêt dans la croissance et la survie de *M. abscessus* dans les amibes et les macrophages, nous avons généré un mutant par délétion du gène d'intérêt dans la souche type MabsCIPS grâce à un système de double recombinaison homologue efficace chez les mycobactéries (van Kessel and Hatfull, 2007; Medjahed and Singh, 2010).

Un schéma du principe du système de double recombinaison homologue avec une délétion du gène $eccB_4$ est présenté dans la figure 2A des données supplémentaires de l'article (Résultats, Partie I). Après avoir obtenu le substrat d'échange allélique composé des séquences (1 000 bp) en amont et en aval du gène $eccB_4$ à supprimer entourant une cassette de résistance à la zéocine, 300 ng de ce dernier ont été électroporés dans la souche type MabsCIPS contenant un plasmide de recombinaison pJV53 (contenant une cassette de résistance à la kanamycine) inductible à l'acétamide (2%). Les clones ont été sélectionnés sur boites de gélose 7H11 en présence de glucose (20%), de kanamycine (50 mg/L) et de zéocine (100 mg/L). Après avoir induit la recombinaison homologue du substrat, le plasmide de recombinaison a été éliminé par curage (étalements successifs du mutant nouvellement créé sur milieu contenant de la zéocine mais pas de kanamycine pour que la souche perde son plasmide pJV53). La bonne double recombinaison homologue avec l'absence du gène d'intérêt a été vérifiée par PCR.

Afin de complémenter le gène supprimé, une amplification par PCR du gène $eccB_4$ a été réalisée dans la souche MabsCIPS en utilisant une amorce sens recouvrant les 20 premiers nucléotides du début du gène, flanquée de la séquence de l'enzyme de restriction ClaI et une amorce anti-sens recouvrant les 20 derniers nucléotides du gène d'intérêt, flanquée de la séquence de l'enzyme de restriction HpaI. Le résultat de cette amplification a été digéré par les enzymes ClaI et HpaI, et cloné dans le plasmide intégratif pMVh361 codant une cassette de résistance à l'hygromycine lui-même linéarisé par les enzymes ClaI et HpaI. Le résultat de cette ligation a été transformé dans une souche d'E. coli électrocompétente et les clones ayant incorporés le plasmide avec le gène inséré entre les enzymes ClaI et HpaI ont été sélectionnés sur boites de gélose contenant 250 mg/L d'hygromycine B. Chaque clone isolé a été cultivé en milieu liquide LB une nuit avec la sélection antibiotique appropriée. Des extractions plasmidiques ont été faites à partir de ces cultures avec le kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo ScientificTM). La vérification de la construction plasmidique a été faite par digestion enzymatique pour vérifier la taille du plasmide et également par séquençage du plasmide. Le plasmide construit a été électroporé dans la souche $\triangle eccB_4$ et les clones ayant bien incorporés le plasmide de complémentation ont été sélectionnés sur leur double résistance antibiotique à la zéocine (remplacement du gène $eccB_4$ par la cassette de résistance de la zéocine dans le muatnt $\triangle eccB_4$) et à l'hygromycine (bonne incorporation du plasmide pMVh361 contenant le gène $eccB_4$). La présence du plasmide de complémentation dans la souche complémentée $C. \Delta eccB_4$ a été vérifié par amplification PCR du gène $eccB_4$.

VI. <u>Expériences d'adhésion et d'internalisation</u>

Pour les expériences d'adhésion et d'internalisation sur les amibes et les macrophages, des puits de P24 ont été ensemencés avec 5.10^4 cellules par puits. Pour les amibes comme pour le protocole de co-culture, 1 heure d'incubation à 32° C leur permet d'adhérer au fond des puits. Pour les macrophages, comme pour le protocole de co-culture, 24 heures d'incubation à 37° C sous 5% de CO₂ sont nécessaires pour permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits. Avant l'infection, les plaques ont été posées 30 min sur de la glace pour uniformiser l'état physiologique des cellules. De même, avant l'infection, les bactéries ont été incubées 30 min sur de la glace. Les différentes souches de *M. abscessus* ont ensuite été ajoutées dans les puits des P24 contenant soit des amibes soit des macrophages à une MOI de 10 bactéries pour une cellule, diluées soit dans du milieu AC pour l'infection des amibes, soit dans du DMEM supplémenté de 10% SVF pour l'infection des macrophages.

Pour les expériences d'adhésion, les plaques infectées en triplicatas ont encore été incubées 30 min sur glace suivie de trois lavages doux au DMEM. Les cellules ont ensuite été lysées soit avec 1 ml d'eau froide pendant 30 min à 4°C pour les macrophages, soit avec 0,1% de SDS pendant 30 min à 32°C pour les amibes comme pour les expériences de co-culture. Le nombre de mycobactéries ayant adhéré aux amibes ou aux macrophages a été énuméré en évaluant les CFU.

Pour les expériences d'internalisation, les plaques contenant les amibes ou les macrophages et infectées par les différentes souches de *M. abscessus* en triplicatas ont été laissées pendant 1 heure à 37°C sous 5% de CO₂. Après trois lavages doux pour éliminer les mycobactéries extracellulaires, la lyse des cellules a été faite de la même manière que pour les expériences d'adhésion. Et de même, le nombre de mycobactéries internalisées a été évalué en effectuant des CFU.

VII. <u>Analyses de l'acidification phagosomale</u>

Les analyses de l'acidification dans les phagosomes de macrophages ont été réalisées avec deux techniques différentes, une de microscopie et une de mesure de pH.

7.1. <u>Etude de la colocalisation avec le LysoTracker et marquage de</u> <u>*M. abscessus*</u>

Cette première technique consiste en la recherche de colocalisation en microscopie confocale entre les mycobactéries marquées avec un fluorochrome vert, le FITC (fluorescein isothiocyanate, Sigma-Aldrich), et un marqueur fluorescent rouge des compartiments acides, le LysoTracker Red DND-99 (Life technologies). Ce dernier permet le marquage et le suivi des organites acidifiés dans les cellules vivantes et peut donc être utilisé comme marqueur de l'acidification et de la maturation des phagosomes. Le LysoTracker passe librement les membranes cellulaires et reste piégé dans les compartiments acides. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du LysoTracker Red, respectivement 577 et 590 nm, sont idéales pour des études de colocalisation avec des sondes fluorescentes au FITC (Via *et al.*, 1998).

Les mycobactéries ont au préalable été marquées au FITC : les cultures des différentes souches de *M. abscessus* ont été lavées deux fois par centrifugation (7 min, 4 000 rpm) avec du PBS, puis le culot de bactéries a été repris dans une solution de FITC (100 μ g/ml) diluée dans du tampon HEPES (20 mM) et supplémentée de 100 μ l de diméthylsulfoxyde pendant 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière sur un roller agitateur. Les bactéries marquées ont ensuite été relavées (7 min, 4 000 rpm) dans du PBS pour éliminer l'excédent de FITC non lié aux mycobactéries (Catanzaro and Wright, 1990), et resuspendues dans 1 ml de PBS supplémenté de 1% SVF, 0,9 mM Ca et 0,5 mM Mg. Les mycobactéries ont été passées à la seringue 29G pour individualiser les bacilles puis diluées à la bonne MOI pour l'infection.

Les macrophages J774.2[®] ont été ensemencés sur des lamelles de verre (glass coverslips) à raison de 5.10⁵ macrophages par puits d'une plaque 12 puits et laissés 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂ pour leur permettre d'adhérer. Les macrophages ont ensuite été infectés avec les mycobactéries marquées au FITC (MOI entre 5 et 10) pendant 3 heures, suivi de trois lavages au DMEM, 1 heure d'incubation à l'amikacine, et ensuite trois autres lavages au DMEM comme pour les protocoles de co-culture. Une heure avant la fin de l'infection, le LysoTracker a été ajouté dans le milieu de co-culture (200 nM). Les macrophages sur les lamelles de verre ont ensuite été fixés au paraformaldéhyde (PFA) (4% pendant 15 min à température ambiante) puis après trois lavages en PBS, les lamelles sont montées sur des lames de verre en présence d'un goutte d'un agent limitant l'affaiblissement de la fluorescence, le ProLong Antifade Mountant contenant du DAPI (Life technologies), pour être ensuite observées au microscope confocal (Leica SP8-X).

Le nombre de mycobactéries marquées au FITC colocalisant avec les phagosomes marqués au LysoTracker, c'est-à-dire le nombre de mycobactéries emprisonnées dans des compartiments s'acidifiant de macrophages a été compté sur des photos en microscopie confocale en analysant plus de 100 cellules infectées à partir d'au moins dix champs aléatoirement capturés avec un objectif à immersion grossissant 63 fois. Le logiciel IMARIS a été utilisé pour traiter les images et pour déterminer le calcul du coefficient de corrélation de Pearson (PCC). Les valeurs du PCC varient de 1 pour deux images dont les intensités de fluorescence sont parfaitement linéairement liées à -1 pour deux images dont les intensités de fluorescence sont parfaitement, mais inversement, liées entre elles. Les valeurs proches de zéro reflètent les distributions des sondes qui ne sont pas corrélées les unes avec les autres.

7.2. Mesure du pH intraphagosomal des macrophages infectés

Les souches de *M. abscessus* exprimant la protéine fluorescente mCherry ont été marquées par du FITC (solution de FITC ($100 \mu g/ml$) pendant 2 heures à température ambiante) et réparties dans des plaques 24 puits contenant 5.10^5 macrophages à une MOI de 20. Les plaques ont été centrifugées à faible vitesse (1 min, 1 200 rpm) pour permettre aux mycobactéries d'atteindre la couche de cellules et incubées 15 min à 37°C sous 5% de CO₂ avant d'effectuer les mesures de fluorescence décrites dans un précédent article (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996; Roux *et al.*, 2016).

Les signaux fluorescents ont ensuite été mesurés de suite après pendant 1h par excitation séquentielle à 485 nm (FITC), l'emission du FITC varie en fonction du pH, et à 565 nm (mCherry), afin de déterminer le nombre de bactéries présentes dans les macrophages en utilisant un lecteur de plaques multimodes Infinite® M200 Tecan. Une courbe de pH standard a été établie pour corréler le signal de fluorescence avec le pH en mesurant les niveaux d'émission à partir de souches de *M. abscessus* fluorescentes phagocytées par les macrophages et placées dans une série de tampons standards de pH 4,6 à 7,6 (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996; Pethe *et al.*, 2004).

VIII. <u>Analyses de la rupture phagosomale</u>

Les études de détection de dommages de la membrane phagosomale ont été réalisées avec deux techniques différentes, une utilisant la technique de FRET et une de microscopie.

8.1. Cytométrie de flux et expérience de FRET avec le CCF-4

Le développement et l'utilisation d'une expérience de rupture phagosomale basée sur un transfert d'énergie par résonance fluorescence FRET, qui est basée sur le clivage du CCF-4 cytosolique par la β-lactamase mycobactérienne, lorsque M. tuberculosis est au contact du cytosol, a été démontré après lecture en cytométrie en flux (Simeone et al., 2012, 2015b). Dans le but d'étudier le comportement mycobactérien dans les phagosomes, on peut ainsi utiliser la propriété de la β-lactamase de M. abscessus qui peut cliver le substrat CCF-4 piégé dans le cytosol afin de voir l'établissement ou non d'une communication phagosome-cytosol. Comme décrit précédemment dans une étude récente (Simeone et al., 2015b), dans le cas où les mycobactéries restent emprisonnées dans un phagosome intact, la β -lactamase mycobactérienne endogène ne peut pas atteindre le substrat CCF-4 présent dans le cytosol, et après stimulation à 409 nm le CCF-4 montre un FRET conduisant à l'émission d'une lumière verte à 535 nm. A l'inverse, en cas de rupture phagosomale et de contact cytosolique, la βlactamase mycobactérienne entre en contact avec le substrat CCF-4 et induit le clivage du substrat, inhibant le FRET, et conduisant à une émission de lumière bleue à 450 nm. Cette technique peut de manière fiable faire la distinction entre les souches qui établissent un contact cytosolique et les souches qui restent enfermées dans un phagosome intact.

Nous avons mis en place cette technique au laboratoire grâce à une étroite collaboration avec la Dr Laleh Majlessi de l'Institut Pasteur de Paris. Un mélange contenant le substrat CCF-4 à une concentration de 50 mM dans un tampon EM (120 mM NaCl, 7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 5 mM glucose, et 25 mM HEPES, pH 7,3) additionné de 2,5 mM de probénécide, est ajouté pendant 2 heures à température ambiante aux macrophages THP-1 préalablement infectés (Infection menée comme pour les co-cultures précédemment décrites). Les macrophages sont ensuite marqués avec un anticorps anti-CD11b-APC (BD) (1/100) pendant 30 min à 4°C et fixés avec de la PFA (4%) (Simeone *et al.*, 2012). Les macrophages sont ensuite analysés avec un cytomètre Fortessa (BD LSRFortessa[™] Cell Analyzer, BD Biosciences) en utilisant le logiciel BD FACSDiva[™]. Au moins 100 000 événements par échantillon sont enregistrés. Pour finir, les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (Treestar, OR).

8.2. <u>Immuno-marquage à la Galectin-3 pour détecter les dommages</u> membranaires phagosomaux

L'immuno-marquage de la Galectin-3 (Gal-3) intracellulaire a été proposé comme un potentiel outil novateur pour analyser la lyse des vacuoles des cellules épithéliales et des macrophages, en effet Gal-3 s'accumule dans les structures endommagées au voisinage des bactéries internalisées (Paz *et al.*, 2010).

Les macrophages J774 infectés avec les différentes souches fluorescentes tdTomato de *M. abscessus* sur des lamelles de verre sont fixés avec 4% de PFA pendant 15 min, lavés au PBS, perméabilisés avec 0,3% Triton X100 pendant 10 min, et bloqués dans du PBS supplémenté de 1% BSA. Les lésions des membranes phagosomales sont immuno-marquées en utilisant un anticorps monoclonal de souris spécifique anti-Gal-3 dilué au 1/200 (BD Pharmingen). L'anticorps primaire est visualisé par un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (1/500). Les lamelles sont ensuite montées sur des lames de verre avec du ProLong Antifade Mountant avec DAPI et observées au microscope confocal Leica SP8-X avec un objectif à immersion 63x. Une cellule infectée est considérée comme positive (Gal-3+) lorsqu'au moins un de ses phagosomaux (Wong and Jacobs Jr, 2011). La majorité de la Gal-3 se trouve sur les structures membranaires entourant les phagosomes contenant *M. abscessus* qui était positif pour la Galectine-3 ont été déterminés à partir d'au moins 100 cellules infectées dans cinq champs différents. Toutes les images ont été analysées avec le logiciel IMARIS.

8.3. <u>Détermination de la sécrétion d'IL-1β et d'IFN-β</u>

Les concentrations en interférons de type I IFN- β et en interleukines IL-1 β ont été quantifiées par ELISA dans les surnageants de culture de macrophages THP-1 infectés par les différentes souches de *M. abscessus*. Cette sécrétion de cytokines correspond à la réponse cellulaire suite à la rupture phagosomale dans les macrophages et à l'accès des bactéries au cytosol. Le kit DuoSet® ELISA development system Human IL-1 β (R&D systemsTM) a été utilisé pour le dosage de la sécrétion d'IL-1 β dans les surnageants selon les recommandations du fabricant. Brièvement, un anticorps de capture anti-IL-1 β est dilué à 4 µg/ml et réparti dans les puits de la plaque. Après une nuit à température ambiante, la plaque est lavée et bloquée avec le Reagent Diluent composé de PBS et de BSA. Après plusieurs lavages, les échantillons à doser ainsi qu'une gamme standard sont ajoutés aux différents puits de la plaque et incubés pendant 2 heures. S'ensuivent entre différentes étapes de lavages, l'ajout de l'anticorps de détection anti-IL-1 β , l'ajout de l'enzyme Streptavidin-HRP, l'ajout de son substrat, et pour finir l'ajout de la solution stop pour arrêter la réaction avant une lecture de la DO des puits de la plaque à 450 nm. De la même manière, le kit VeriKine TM Human Interferon Beta ELISA a été

utilisé pour le dosage en sandwich de la sécrétion d'IFN- β dans les surnageants avec cette foisci des plaques pré-cotées selon les recommandations du fabricant.

IX. <u>Analyses des sécrétomes des mutants Tn du locus ESX-4</u>

9.1. Obtention du sécrétome des mutants

Les mycobactéries ont tout d'abord été cultivées en milieu 7H9 supplémenté de 1% glucose et de l'antibiotique approprié jusqu'en phase de croissance exponentielle (DO entre 0,8 et 1). Les cultures ont ensuite été diluées à une DO de 0,1 dans du milieu Sauton supplémenté de 1% glucose, 0,05% Tween 80 et de l'antibiotique approprié. Dans 1 L de milieu Sauton il y a : 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄, 2 g d'acide citrique, 4 g de L-Asparagine, 60 ml de glycérol, 0,05 g de Ferric amonium citrate, 0,2 ml de ZnSO₄, quelques gouttes de NaOH pour amener le pH à 7, qsp 1 L de H₂O. La culture a été mise à pousser à 37°C sous agitation jusqu'à une DO de 0,6-0,7, les bactéries ont été récupérées par centrifugation (3 500 rpm, 15 min, 4°C), et lavées trois fois dans du PBS froid. Pour finir, les mycobactéries ont été remises en culture dans du milieu Sauton supplémenté de 1% glucose et de l'antibiotique approprié à 37°C sous agitation environ 24 heures jusqu'à une DO de 0,8-1. Le culot contenant les mycobactéries a été séparé des surnageants par centrifugation (4 000 rpm, 20 min, 4°C) et les deux échantillons (culots et surnageants) ont été conservés à -40°C.

Les protéines présentes dans les différents surnageants de culture des mutants sélectionnés (EccC, MycP, EccB, EccE, SigM, EspI) ont été concentrées sur des filtres de concentration/centrifugation (Amicon® Centrifugal Filters Ultracel® 3K, Merck Millipore) et analysées par migration sur gel IEF (Biorad) permettant de séparer les protéines selon leur point isoélectrique. Ces gels ont ensuite été colorés au nitrate d'argent (Kit Biorad). Ces surnageants concentrés 100X ont également été traités par spectrométrie de masse en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris (Fabien LeChevalier) sur un appareil (Q Exactive HF-Hybrid, Quadrupole-Orbitrap Mass, ThermoFisher scientific) après traitement des échantillons. Le traitement des échantillons consiste en 1) une réduction disulfide : dans 100 µl de surnageant supplémentés de 8 M d'urée et 0,1 M de Tris-HCl pH 8,5, 2,5 µl de DTT 200 mM (concentration finale 5 mM) ont été ajoutés suivi d'une incubation entre 45 min et 1 heure à température ambiante; 2) une alkylation: 20 µl d'une solution de IAA (Iodoacétamide 200 mM, concentration finale 40 mM) ont été ajoutés, suivi d'une incubation de 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière ; 3) une digestion : de l'Ammonium bicarbonate (concentration finale 1,6 M) a été ajouté, puis de la trypsine à 1/100 ou 1/50 et incubé une nuit à 37°C. Les échantillons ont ensuite été lavés par plusieurs étapes : acidification de l'échantillon avec de l'acide formique (AF), activation de la colonne C18 pour permettre l'accrochage des peptides avec du méthanol, un lavage avec le tampon A (0,1% HAc), équilibration avec le tampon A, charge de l'échantillon, recharge de l'échantillon, lavage avec le tampon A, élution des peptides avec le tampon B (0,1% HAc, 80% Acétonitrile (ACN)) ou 50% ANC et 0,1% AF, séchage des peptides par centrifugation sous vide, pour finir les peptides sont resuspendus dans le tampon de charge pour avoir une concentration de l'ordre de 2 mg/ml.

L'analyse des peptides identifiés dans les surnageants de culture a été faite grâce à la base de données « Tuberculist » (http://tuberculist.epfl.ch/). Ainsi pour chaque protéine sécrétée, grâce à son identifiant, il a été possible d'identifier le gène correspondant, sa fonction, ainsi que sa catégorie fonctionnelle. Cela nous a permis de classer les peptides selon sept catégories fonctionnelles et dans chacune d'entre elles de voir si des peptides étaient absents des surnageant des mutants par rapport au surnageant de la souche sauvage Mabs43S.

9.2. <u>Sécrétion de la protéine FbpC analysée par Western Blot</u>

Les sécrétomes du mutant $\triangle eccB_4$, de la souche complémentée $C.\triangle eccB_4$ ainsi que de la souche sauvage MabsCIPS ont été obtenus de la même manière que pour les sécrétomes de mutants obtenus par transposition (IX. 9.1. Obtention du sécrétome des mutants). Les sécrétomes et les lysats de culots de ces mycobactéries (obtenus par sonication) ont été dosés afin de déterminer la concentration en protéines par la méthode de Bradford (Bio-Rad) ainsi 10 µg de protéines ont été déposés et séparés dans un gel de polyacrylamide (Mini-PROTEAN® TGXTM gels 4-20%, Bio-Rad), puis transférées sur membrane PVDF (AmershamTM HybondTM 0,45 µm PVDF, GE Healthcare Life science). Pour la visualisation de la sécrétion de la protéine FpbC, les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-FpbC (Laurent Kremer, IRIM, Montpellier) dilué au 1/10, cet anticorps primaire (anticorps monoclonal anti-souris, Fisher) a ensuite été révélé par un anticorps secondaire dilué et couplé à la peroxydase.

9.3. <u>Evaluation de l'activité enzymatique mycolyltransférase des</u> sécrétomes

La teneur totale en protéines a été déterminée cette fois ci par le test Pierce BCA protein (Thermofisher, USA). Le dosage de l'activité mycolyltransférase a été effectué dans un tampon phosphate de sodium à 50 mM (pH 6) contenant 4 mM tréhalose, pour 80 à 140 μ g de protéines contenues dans le sécrétome. La réaction a été déclenchée par l'ajout de résorufine butyrate 12,5 μ M et a été suivie en continu à l'aide d'un spectrophotomètre à plaques POLARstar Omega Plate Reader Spectrophotometer (BMG Labtech, Germany). Ces expériences ont été réalisées par Albertus Viljoen (IRIM, Montpellier).

9.4. <u>Extractions lipidiques et analyse par chromatographie sur</u> <u>couche mince TLC</u>

Pour les analyses lipidiques, *M. abscessus* a été cultivé dans du milieu 7H9 comme décrit précédemment, recueilli par centrifugation et soumis à une lyophilisation. Des fractions lipidiques apolaires et polaires ou des esters méthyliques d'acides gras (FAME) et des acides mycoliques (MAME) ont été obtenus à partir de 50 mg de cellules mycobactériennes lyophilisées (Besra, 1998). Des fractions lipidiques ont été appliquées sur des plaques de gel de silice TLC 60 F_{254} en aluminium (Merck, Allemagne) et séparées en utilisant des systèmes de

solvants. Après séparation par solvant, les TLC avec lipides apolaires, et FAME et MAME ont été traités avec une vaporisation d'acide phosphomolybdique à 5% (dissous dans l'éthanol) et calcinés par chauffage pour révéler les tâches ou bandes lipidiques, tandis que les TLC avec lipides polaires ont été traitées avec une vaporisation de 0.1 % d'orcinol (dissous dans 20% de H_2SO_4) avant la carbonisation.



Abdallah, A. M. *et al.* (2006). A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. Mol. Microbiol. *62*, 667–679.

Abdallah, A. M. *et al.* (2009). PPE and PE_PGRS proteins of *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5. Mol. Microbiol. *73*, 329–340.

Abdallah, A. M. *et al.* (2011). Mycobacterial Secretion Systems ESX-1 and ESX-5 Play Distinct Roles in Host Cell Death and Inflammasome Activation. J. Immunol. *187*.

Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., Champion, P. A. D., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmelk, B. J., and Bitter, W. (2007). Type VII secretion--mycobacteria show the way. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 883–891.

Abdallah, A. M., Savage, N. D. L., van Zon, M., Wilson, L., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., van der Wel, N. N., Ottenhoff, T. H. M., and Bitter, W. (2008). The ESX-5 Secretion System of Mycobacterium marinum Modulates the Macrophage Response. J. Immunol. *181*.

Adékambi, T., Berger, P., Raoult, D., and Drancourt, M. (2006). rpoB gene sequencebased characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of Mycobacterium bolletii sp. nov., Mycobacterium phocaicum sp. nov. and Mycobacterium aubagnense sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *56*, 133–143.

Adékambi, T., and Drancourt, M. (2009). Mycobacterium bolletii respiratory infections. Emerg. Infect. Dis. *15*, 302–305.

Adékambi, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M.-J., La Scola, B., Raoult, D., Drancourt, M., Scola, B. La, Raoult, D., and Drancourt, M. (2004). Amoebal coculture of "Mycobacterium massiliense" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J. Clin. Microbiol. *42*, 5493–5501.

Adekambi, T., Sassi, M., van Ingen, J., and Drancourt, M. (2017). Reinstating Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii as species of the Mycobacterium abscessus complex. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *67*, 2726–2730.

Adjemian, J., Olivier, K. N., and Prevots, D. R. (2014). Nontuberculous Mycobacteria among Patients with Cystic Fibrosis in the United States. Screening Practices and Environmental Risk. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *190*, 581–586.

Agarwal, N., Woolwine, S. C., Tyagi, S., and Bishai, W. R. (2007). Characterization of the Mycobacterium tuberculosis sigma factor SigM by assessment of virulence and identification of SigM-dependent genes. Infect. Immun. *75*, 452–461.

Ahn, C. H., Lowell, J. R., Onstad, G. D., Shuford, E. H., and Hurst, G. A. (1979). A Demographic Study of Disease due to Mycobacterium kansasii or M intracellulare-avium in Texas. Chest 75, 120–125.

Aitken, M. L. *et al.* (2012). Respiratory outbreak of Mycobacterium abscessus subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *185*, 231–232.

Akhtar, M. *et al.* (2000). Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus.

Alexander, B. M., Petren, E. K., Rizvi, S., Fink, A., Ostrenga, J., Sewall, A., and Loeffler, D. (2015). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report 2015.

Alfa, M. J., Sisler, J. J., and Harding, G. K. (1995). Mycobacterium abscessus infection of a Norplant contraceptive implant site. CMAJ *153*, 1293–1296.

Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., and Riley, L. (1993). Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science (80-.). 261.

Asai, Y., Ouchi, H., Ohosima, T., Nakano, R., Yamano, Y., Inoshima, I., Yamauchi, T., Fukuyama, S., Inoue, H., and Nakanishi, Y. (2009). [A case of secondary pulmonary alveolar proteinosis associated with myelodysplastic syndrome, complicated with disseminated M. abscessus infection]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 47, 1120–1125.

Ates, L. S. *et al.* (2015). Essential Role of the ESX-5 Secretion System in Outer Membrane Permeability of Pathogenic Mycobacteria. PLOS Genet. *11*, e1005190.

Augenstreich, J. *et al.* (2017). ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. Cell. Microbiol., e12726.

Bakala N'Goma, J. C. *et al.* (2015). Mycobacterium abscessus Phospholipase C Expression Is Induced during Coculture within Amoebae and Enhances M. abscessus Virulence in Mice. Infect. Immun. *83*, 780–791.

Ballarino, G. J., Olivier, K. N., Claypool, R. J., Holland, S. M., and Prevots, D. R. (2009). Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: Antibiotic treatment and associated costs. Respir. Med. *103*, 1448–1455.

Baltierra-Uribe, S. L., García-Vásquez, M. de J., Castrejón-Jiménez, N. S., Estrella-Piñón, M. P., Luna-Herrera, J., and García-Pérez, B. E. (2014). Mycobacteria entry and trafficking into endothelial cells. Can. J. Microbiol. *60*, 569–577.

Band, J. D., Ward, J. I., Fraser, D. W., Peterson, N. J., Silcox, V. A., Good, R. C., Ostroy, P. R., and Kennedy, J. (1982). Peritonitis due to a mycobacterium chelonei-like organism associated with intermittent chronic peritoneal dialysis. J. Infect. Dis. *145*, 9–17.

Bange, F.-C., Brown, B. A., Smaczny, C., Wallace, R. J., and Bottger, E. C. (2001). Lack of Transmission of Mycobacterium abscessus among Patients with Cystic Fibrosis Attending a Single Clinic. Clin. Infect. Dis. *32*, 1648–1650.

Baptista, C., Barreto, H. C., São-José, C., Missiakas, D., and Piersma, S. (2013). High Levels of DegU-P Activate an Esat-6-Like Secretion System in Bacillus subtilis. PLoS One 8, e67840.

Bar-On, O., Mussaffi, H., Mei-Zahav, M., Prais, D., Steuer, G., Stafler, P., Hananya, S., and Blau, H. (2015). Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. *14*, 53–62.

Barker, K. F. (1999). Antibiotic resistance: a current perspective. Br. J. Clin. Pharmacol. 48, 109–124.

Barker, L. P., George, K. M., Falkow, S., and Small, P. L. (1997). Differential trafficking of live and dead Mycobacterium marinum organisms in macrophages. Infect. Immun. *65*, 1497–1504.

Bastian, S., Veziris, N., Roux, A.-L., Brossier, F., Gaillard, J.-L., Jarlier, V., and Cambau, E. (2011). Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 775–781.

Bax, H. I., Freeman, A. F., Anderson, V. L., Vesterhus, P., Laerum, D., Pittaluga, S., Wilson, W. H., and Holland, S. M. (2013). B-Cell Lymphoma in a Patient with Complete Interferon Gamma Receptor 1 Deficiency. J. Clin. Immunol. *33*, 1062–1066.

Beckham, K. S. H. *et al.* (2017). Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. Nat. Microbiol. *2*, 17047.

Bello, L., Vazquez, P., Rodriguez, I., and Pedreira, J. D. (2012). Infeccion diseminada por mycobacterium abscessus en paciente infectado por el VIH. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. *30*, 47–48.

Bernut, A., Herrmann, 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. U. S. A. *111*, E943-52.

Bernut, A., Nguyen-Chi, M., Halloum, I., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2016). Mycobacterium abscessus-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking. PLoS Pathog. *12*, e1005986.

Besra, G. S. (1998). Preparation of Cell-Wall Fractions from Mycobacteria. In: Mycobacteria Protocols, New Jersey: Humana Press, 91–108.

Birmingham, C. L., Canadien, V., Kaniuk, N. A., Steinberg, B. E., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2008). Listeriolysin O allows Listeria monocytogenes replication in macrophage vacuoles. Nature *451*, 350–354.

Bitter, W. *et al.* (2009a). Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. PLoS Pathog. *5*, e1000507.

Bitter, W., Houben, E. N. G., Luirink, J., and Appelmelk, B. J. (2009b). Type VII secretion in mycobacteria: classification in line with cell envelope structure. Trends Microbiol. *17*, 337–338.

Blasco, B., Chen, J. M., Hartkoorn, R., Sala, C., Uplekar, S., Rougemont, J., Pojer, F., and Cole, S. T. (2012). Virulence Regulator EspR of Mycobacterium tuberculosis Is a Nucleoid-Associated Protein. PLoS Pathog. *8*, e1002621.

Bohsali, A., Abdalla, H., Velmurugan, K., and Briken, V. (2010). The non-pathogenic mycobacteria M. smegmatis and M. fortuitum induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. BMC Microbiol.

Bolan, G., Reingold, A. L., Carson, L. A., Silcox, V. A., Woodley, C. L., Hayes, P. S., Hightower, A. W., McFarland, L., Brown, J. W., and Petersen, N. J. (1985). Infections with Mycobacterium chelonei in patients receiving dialysis and using processed hemodialyzers. J. Infect. Dis. *152*, 1013–1019.

Borghans, J. G., and Stanford, J. L. (1973). Mycobacterium chelonei in abscesses after injection of diphtheria-pertussis-tetanus-polio vaccine. Am. Rev. Respir. Dis. *107*, 1–8.

Bottai, D. *et al.* (2012). Disruption of the ESX-5 system of Mycobacterium tuberculosis causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation.

Mol. Microbiol. 83, 1195–1209.

Bottai, D., and Brosch, R. (2009). Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. Mol. Microbiol. *73*, 325–328.

Bottai, D., Supply, P., Brosch, R., and Stinear, T. P. (2014). Mycobacterial Pathogenomics and Evolution. Microbiol. Spectr. 2.

Böttger, E. C. (2013). Transmission of M abscessus in patients with cystic fibrosis. Lancet *382*, 503–504.

Boxerbaum, B. (1980). Isolation of rapidly growing mycobacteria in patients with cystic fibrosis. J. Pediatr. *96*, 689–691.

Brandt, L., Elhay, M., Rosenkrands, I., Lindblad, E. B., and Andersen, P. (2000). ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. *68*, 791–795.

Brennan, P. J., and Nikaido, H. (1995). The Envelope of Mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. 64, 29–63.

Brodin, P. *et al.* (2006). Dissection of ESAT-6 system 1 of Mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence. Infect. Immun. 74, 88–98.

Brodin, P. *et al.* (2010). High Content Phenotypic Cell-Based Visual Screen Identifies Mycobacterium tuberculosis Acyltrehalose-Containing Glycolipids Involved in Phagosome Remodeling. PLoS Pathog. *6*, e1001100.

Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. T., and Brosch, R. (2004). ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends Microbiol. *12*, 500–508.

Brown-Elliott, B. A. *et al.* (2015). Utility of sequencing the erm(41) gene in isolates of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus with low and intermediate clarithromycin MICs. J. Clin. Microbiol. *53*, 1211–1215.

Brown-Elliott, B. A., and Philley, J. V (2017). Rapidly Growing Mycobacteria. Microbiol. Spectr. 5.

Brown-Elliott, B. A., and Wallace, R. J. (2002). Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 15, 716–746.

Brown, B. A., Wallace, R. J., Onyi, G. O., De Rosas, V., and Wallace, R. J. (1992). Activities of four macrolides, including clarithromycin, against Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium chelonae, and M. chelonae-like organisms. Antimicrob. Agents Chemother. *36*, 180–184.

Bryant, J. M. *et al.* (2013). Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. Lancet *381*, 1551–1560.

Bryant, J. M. *et al.* (2016). Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. Science (80-.). *354*.

Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrt, S., Piddington, D., Riley, L., and Groisman, E. A. (2002). A parallel intraphagosomal survival strategy shared by Mycobacterium tuberculosis and Salmonella enterica. Mol. Microbiol. *35*, 1375–1382.

Burts, M. L., DeDent, A. C., and Missiakas, D. M. (2008). EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. *69*, 736–746.

Burts, M. L., Williams, W. A., DeBord, K., and Missiakas, D. M. (2005). EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of Staphylococcus aureus infections. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 1169–1174.

Byrd, T. F., and Lyons, C. R. (1999). Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection. Infect. Immun. *67*, 4700–4707.

Camargo, D., Saad, C., Ruiz, F., Ramirez, M. E., Lineros, M., Rodriguez, G., Navarro, E., Pulido, B., and Orozco, L. C. (1996). Iatrogenic outbreak of M. chelonae skin abscesses. Epidemiol. Infect. *117*, 113–119.

Campos-Herrero, M. I., Chamizo, F. J., Caminero, J. A., Gilarranz, R., Cabrera, G., and Cuyás, J. (2016). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis patients on the Island of Gran Canaria. A population study. J. Infect. Chemother. 22, 526–531.

Candido, P. H. C. *et al.* (2014). Multidrug-Resistant Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Cystic Fibrosis Patients. J. Clin. Microbiol. *52*, 2990–2997.

Carlsson, F., Joshi, S. A., Rangell, L., Brown, E. J., and Lawson, E. (2009). Polar Localization of Virulence-Related Esx-1 Secretion in Mycobacteria. PLoS Pathog. *5*, e1000285.

Carlsson, F., Kim, J., Dumitru, C., Barck, K. H., Carano, R. A. D., Sun, M., Diehl, L., and Brown, E. J. (2010). Host-Detrimental Role of Esx-1-Mediated Inflammasome Activation in Mycobacterial Infection. PLoS Pathog. *6*, e1000895.

Catanzaro, A., and Wright, S. D. (1990). Binding of Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare to human leukocytes. Infect. Immun. 58, 2951–2956.

Catherinot, E. *et al.* (2009). Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus. J. Clin. Microbiol. *47*, 271–274.

Catherinot, E. *et al.* (2013). Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. J. Cyst. Fibros. *12*, 74–80.

Catherinot, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J.-F., Daffé, M., Perronne, C., Soudais, C., Gaillard, J.-L., and Rottman, M. (2007). Hypervirulence of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain. Infect. Immun. *75*, 1055–1058.

Cavalli, Z., Reynaud, Q., Bricca, R., Nove-Josserand, R., Durupt, S., Reix, P., Perceval, M., de Montclos, M. P., Lina, G., and Durieu, I. (2017). High incidence of non-tuberculous mycobacteria-positive cultures among adolescent with cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros.

Champion, M. M., Williams, E. A., Pinapati, R. S., and Champion, P. A. D. (2014). Correlation of phenotypic profiles using targeted proteomics identifies mycobacterial esx-1 substrates. J. Proteome Res. *13*, 5151–5164.

Champion, P. A. D., Champion, M. M., Manzanillo, P., and Cox, J. S. (2009). ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. Mol. Microbiol. *73*, 950–962.

de Chastellier, C. (2009). The many niches and strategies used by pathogenic

mycobacteria for survival within host macrophages. Immunobiology 214, 526–542.

de Chastellier, C., Forquet, F., Gordon, A., and Thilo, L. (2009). Mycobacterium requires an all-around closely apposing phagosome membrane to maintain the maturation block and this apposition is re-established when it rescues itself from phagolysosomes. Cell. Microbiol. *11*, 1190–1207.

de Chastellier, C., Lang, T., and Thilo, L. (1995). Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, Mycobacterium avium, in comparison to phagosomes which contain Bacillus subtilis or latex beads. Eur. J. Cell Biol. *68*, 167–182.

de Chastellier, C., and Thilo, L. (1997). Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. Eur. J. Cell Biol. 74, 49–62.

Chen, J. M., Boy-Röttger, S., Dhar, N., Sweeney, N., Buxton, R. S., Pojer, F., Rosenkrands, I., and Cole, S. T. (2012). EspD is critical for the virulence-mediating ESX-1 secretion system in Mycobacterium tuberculosis. J. Bacteriol. *194*, 884–893.

Chernenko, S. M., Humar, A., Hutcheon, M., Chow, C.-W., Chaparro, C., Keshavjee, S., and Singer, L. G. (2006). Mycobacterium abscessus Infections in Lung Transplant Recipients: The International Experience. J. Hear. Lung Transplant. *25*, 1447–1455.

Chetchotisakd, P., Kiertiburanakul, S., Mootsikapun, P., Assanasen, S., Chaiwarith, R., and Anunnatsiri, S. (2007). Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection in Patients Who Are Not Infected with HIV in Thailand. Clin. Infect. Dis. *45*, 421–427.

Chetchotisakd, P., Mootsikapun, P., Anunnatsiri, S., Jirarattanapochai, K., Choonhakarn, C., Chaiprasert, A., Ubol, P. N., Wheat, L. J., and Davis, T. E. (2000). Disseminated Infection Due to Rapidly Growing Mycobacteria in Immunocompetent Hosts Presenting with Chronic Lymphadenopathy: A Previously Unrecognized Clinical Entity. Clin. Infect. Dis. *30*, 29–34.

Le Chevalier, F., Cascioferro, A., Frigui, W., Pawlik, A., Boritsch, E. C., Bottai, D., Majlessi, L., Herrmann, J. L., and Brosch, R. (2015). Revisiting the role of phospholipases C in virulence and the lifecycle of Mycobacterium tuberculosis. Sci. Rep. *5*, 16918.

Chitale, S., Ehrt, S., Kawamura, I., Fujimura, T., Shimono, N., Anand, N., Lu, S., Cohen-Gould, L., and Riley, L. W. (2001). Recombinant Mycobacterium tuberculosis protein associated with mammalian cell entry. Cell. Microbiol. *3*, 247–254.

Cho, Y.-J., Yi, H., Chun, J., Cho, S.-N., Daley, C. L., Koh, W.-J., and Jae Shin, S. (2013). The Genome Sequence of Mycobacterium massiliense Strain CIP 108297 Suggests the Independent Taxonomic Status of the Mycobacterium abscessus Complex at the Subspecies Level. PLoS One 8, e81560.

Choi, G.-E. *et al.* (2012a). Macrolide Treatment for Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense Infection and Inducible Resistance. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *186*, 917–925.

Choi, G.-E., Cho, Y.-J., Koh, W.-J., Chun, J., Cho, S.-N., and Shin, S. J. (2012b). Draft genome sequence of Mycobacterium abscessus subsp. bolletii BD(T). J. Bacteriol. *194*, 2756–2757.

Choi, W. S., Kim, M. J., Park, D. W., Son, S. W., Yoon, Y. K., Song, T., Bae, S. M., Sohn, J. W., Cheong, H. J., and Kim, M. J. (2011). Clarithromycin and amikacin vs. clarithromycin and moxifloxacin for the treatment of post-acupuncture cutaneous infections

due to Mycobacterium abscessus: a prospective observational study. Clin. Microbiol. Infect. *17*, 1084–1090.

Chong, S. G., Kent, B. D., Fitzgerald, S., and McDonnell, T. J. (2014). Pulmonary non-tuberculous mycobacteria in a general respiratory population. Ir. Med. J. *107*, 207–209.

Choo, S. W., Wee, W. Y., Ngeow, Y. F., Mitchell, W., Tan, J. L., Wong, G. J., Zhao, Y., and Xiao, J. (2014). Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen Mycobacterium abscessus reveals high evolutionary potential. Sci. Rep. *4*, 4061.

Chopra, S., Matsuyama, K., Hutson, C., and Madrid, P. (2011). Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 1533–1536.

Cirillo, J. D., Falkow, S., and Tompkins, L. S. (1994). Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. Infect. Immun. *62*, 3254–3261.

Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S., and Bermudez, L. E. (1997). Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence. Infect. Immun. *65*, 3759–3767.

Clarke, M. *et al.* (2013). Genome of Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. Genome Biol. *14*, R11.

Clegg, H. W., Foster, M. T., Sanders, W. E., and Baine, W. B. (1983). Infection due to organisms of the Mycobacterium fortuitum complex after augmentation mammaplasty: clinical and epidemiologic features. J. Infect. Dis. *147*, 427–433.

Clemens, D. L., and Horwitz, M. A. (1995). Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J. Exp. Med. *181*.

Cole, S. T. *et al.* (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature *393*, 537–544.

Collins, A. C. *et al.* (2015). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for Mycobacterium tuberculosis. Cell Host Microbe *17*, 820–828.

Colomba, C., Rubino, R., Di Carlo, P., Mammina, C., Bonura, C., Siracusa, L., Titone, L., and Saporito, L. (2012). Probable disseminated Mycobacterium abscessus subspecies bolletii infection in a patient with idiopathic CD4+ T lymphocytopenia: a case report. J. Med. Case Rep. *6*, 277.

Colsky, A. S., EM, E., DB, K., and TB, N. (1999). Treatment of Refractory Disseminated Mycobacterium abscessus Infection With Interferon Gamma Therapy. Arch. Dermatol. *135*, 125.

Converse, S. E., and Cox, J. S. (2005). A protein secretion pathway critical for Mycobacterium tuberculosis virulence is conserved and functional in Mycobacterium smegmatis. J. Bacteriol. *187*, 1238–1245.

Converse, S. E., Mougous, J. D., Leavell, M. D., Leary, J. A., Bertozzi, C. R., and Cox, J. S. (2003). MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and Mycobacterium tuberculosis virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 6121–6126.

Coros, A., Callahan, B., Battaglioli, E., and Derbyshire, K. M. (2008). The specialized

secretory apparatus ESX-1 is essential for DNA transfer in Mycobacterium smegmatis. Mol. Microbiol. *69*.

Cystic Fibrosis Trust (2011). Standards for the Clinical Care of Children and Adults with Cystic Fibrosis in the UK.

Czuczman, M. A., Fattouh, R., van Rijn, J. M., Canadien, V., Osborne, S., Muise, A. M., Kuchroo, V. K., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2014). Listeria monocytogenes exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread. Nature *509*, 230–234.

Dai, J., Chen, Y., and Lauzardo, M. (2011). Web-accessible database of hsp65 sequences from Mycobacterium reference strains. J. Clin. Microbiol. *49*, 2296–2303.

Dailloux, M., Abalain, M. L., Laurain, C., Lebrun, L., Loos-Ayav, C., Lozniewski, A., Maugein, J., and French Mycobacteria Study Group (2006). Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. Eur. Respir. J. 28, 1211–1215.

Daleke, M. H., Cascioferro, A., de Punder, K., Ummels, R., Abdallah, A. M., van der Wel, N., Peters, P. J., Luirink, J., Manganelli, R., and Bitter, W. (2011). Conserved Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE) protein domains target LipY lipases of pathogenic mycobacteria to the cell surface via the ESX-5 pathway. J. Biol. Chem. 286, 19024–19034.

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.

Das, C., Ghosh, T. S., Mande, S. S., Hitchen, P., and Williams, K. (2011). Computational Analysis of the ESX-1 Region of Mycobacterium tuberculosis: Insights into the Mechanism of Type VII Secretion System. PLoS One *6*, e27980.

Davidson, L. B., Nessar, R., Kempaiah, P., Perkins, D. J., and Byrd, T. F. (2011). Mycobacterium abscessus glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by H β D2 gene expression and IL-8 release. PLoS One *6*, e29148.

Deb, C., Daniel, J., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Dubey, V. S., and Kolattukudy, P. E. (2006). A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. *281*, 3866–3875.

Delafont, V., Mougaris, F., Cambau, E., Joyeux, M., Bouchon, D., Hechard, Y., and Moulin, L. (2014). First evidence of amoebae - mycobacteria association in drinking water network. Environ. Sci. Technol.

Delogu, G., Sanguinetti, M., Pusceddu, C., Bua, A., Brennan, M. J., Zanetti, S., and Fadda, G. (2006). PE_PGRS proteins are differentially expressed by Mycobacterium tuberculosis in host tissues. Microbes Infect. *8*, 2061–2067.

Derbyshire, K. M., and Gray, T. A. (2014). Distributive Conjugal Transfer: New Insights into Horizontal Gene Transfer and Genetic Exchange in Mycobacteria. Microbiol. Spectr. 2.

Di, A. *et al.* (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. Nat. Cell Biol. *8*, 933–944.

Ding, L. W., Lai, C. C., Lee, L. N., and Hsueh, P. R. (2006). Disease caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan, 1997-2003. Epidemiol. Infect. *134*, 1060–1067.

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.

Dorhoi, A. *et al.* (2012). Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. Eur. J. Immunol. *42*, 374–384.

Drancourt, M. (2014). Looking in amoebae as a source of mycobacteria. Microb. Pathog. 77, 119–124.

Duarte, R. S. *et al.* (2009). Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense. J. Clin. Microbiol. *47*, 2149–2155.

Dubnau, E., Chan, J., Mohan, V. P., and Smith, I. (2005). responses of mycobacterium tuberculosis to growth in the mouse lung. Infect. Immun. *73*, 3754–3757.

Dumas, E. *et al.* (2016). Mycobacterial pan-genome analysis suggests important role of plasmids in the radiation of type VII secretion systems. Genome Biol. Evol.

Eid, A. J., Berbari, E. F., Sia, I. G., Wengenack, N. L., Osmon, D. R., and Razonable, R. R. (2007). Prosthetic Joint Infection Due to Rapidly Growing Mycobacteria: Report of 8 Cases and Review of the Literature. Clin. Infect. Dis. *45*, 687–694.

El-Shazly, S., Ahmad, S., Mustafa, A. S., Al-Attiyah, R., and Krajci, D. (2007). Internalization by HeLa cells of latex beads coated with mammalian cell entry (Mce) proteins encoded by the mce3 operon of Mycobacterium tuberculosis. J. Med. Microbiol. *56*, 1145–1151.

Elliott, S. R., and Tischler, A. D. (2016a). Phosphate responsive regulation provides insights for ESX-5 function in Mycobacterium tuberculosis. Curr. Genet.

Elliott, S. R., and Tischler, A. D. (2016b). Phosphate Starvation: A Novel Signal that Triggers ESX-5 Secretion in Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol.

Ernst, R. K. *et al.* (2003). Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. Environ. Microbiol. *5*, 1341–1349.

Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013). From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of Legionella pneumophila infection in both hosts. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *376*, 1–34.

Esther, C. R., Esserman, D. A., Gilligan, P., Kerr, A., and Noone, P. G. (2010). Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. *9*, 117–123.

Esther, C. R., Henry, M. M., Molina, P. L., and Leigh, M. W. (2005). Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. Pediatr. Pulmonol. *40*, 39–44.

Falkinham, J. O., Norton, C. D., and LeChevallier, M. W. (2001). Factors influencing numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. *67*, 1225–1231.

Fangous, M.-S., Mougari, F., Gouriou, S., Calvez, E., Raskine, L., Cambau, E., Payan, C., and Héry-Arnaud, G. (2014). Classification algorithm for subspecies identification within

the Mycobacterium abscessus species, based on matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 52, 3362–3369.

Fauroux, B. M., Delaisi, B. M., Clément, A. >MD P., Saizou, C. M., Moissenet, D. M., Truffot-Pernot, C. M., Tournier, G. M., and Thien, H. V. M. (1997). Mycobacterial lung disease in cystic fibrosis: a prospective study.

Feltcher, M. E., Sullivan, J. T., and Braunstein, M. (2010). Protein export systems of Mycobacterium tuberculosis : novel targets for drug development? Future Microbiol. *5*, 1581–1597.

Ferroni, A. *et al.* (2006). Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. *44*, 2237–2239.

Field, S. K., and Cowie, R. L. (2006). Lung Disease Due to the More Common Nontuberculous Mycobacteria. Chest *129*, 1653–1672.

Fisher, E. J., and Gloster, H. M. (2005). Infection with mycobacterium abscessus after Mohs micrographic surgery in an immunocompetent patient. Dermatol. Surg. *31*, 790–794.

Flesselles, B., Anand, N. N., Remani, J., Loosmore, S. M., Klein, M. H., D., H., C.E., B., and W.R., J. (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.

Flint, J. L., Kowalski, J. C., Karnati, P. K., and Derbyshire, K. M. (2004). The RD1 virulence locus of Mycobacterium tuberculosis regulates DNA transfer in Mycobacterium smegmatis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 12598–12603.

Floto, R. A. *et al.* (2016). US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. Thorax 71, i1–i22.

Forrellad, M. A., McNeil, M., Santangelo, M. de la P., Blanco, F. C., García, E., Klepp, L. I., Huff, J., Niederweis, M., Jackson, M., and Bigi, F. (2014). Role of the Mce1 transporter in the lipid homeostasis of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis *94*, 170–177.

Fortune, S. M., Jaeger, A., Sarracino, D. A., Chase, M. R., Sassetti, C. M., Sherman, D. R., Bloom, B. R., and Rubin, E. J. (2005). Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 10676–10681.

Fox, L. P., Geyer, A. S., Husain, S., Della-Latta, P., and Grossman, M. E. (2004). Mycobacterium abscessus cellulitis and multifocal abscesses of the breasts in a transsexual from illicit intramammary injections of silicone. J. Am. Acad. Dermatol. *50*, 450–454.

Freeman, J., Morris, A., Blackmore, T., Hammer, D., Munroe, S., and McKnight, L. (2007). Incidence of nontuberculous mycobacterial disease in New Zealand, 2004. N. Z. Med. J. *120*, U2580.

Frehel, C., de Chastellier, C., Offredo, C., and Berche, P. (1991). Intramacrophage growth of Mycobacterium avium during infection of mice. Infect. Immun. *59*, 2207–2214.

Freudenberger, R. S., and Simafranca, S. M. (2006). Cutaneous Infection With Rapidly-Growing Mycobacterial Infection Following Heart Transplant: A Case Report and Review of the Literature. Transplant. Proc. *38*, 1526–1529.

Fridovich, I. (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64, 97–112.

Frigui, W. *et al.* (2008). Control of M. tuberculosis ESAT-6 Secretion and Specific T Cell Recognition by PhoP. PLoS Pathog. *4*, e33.

Fukui, S. *et al.* (2015). Disseminated Mycobacterium abscessus Infection Following Septic Arthritis: A Case Report and Review of the Literature. Medicine (Baltimore). *94*, e861.

Furuya, E. Y. *et al.* (2008). Outbreak of *Mycobacterium abscessus* Wound Infections among "Lipotourists" from the United States Who Underwent Abdominoplasty in the Dominican Republic. Clin. Infect. Dis. *46*, 1181–1188.

Galil, K., Miller, L. A., Yakrus, M. A., Wallace, R. J., Mosley, D. G., England, B., Huitt, G., McNeil, M. M., and Perkins, B. A. (1999). Abscesses due to mycobacterium abscessus linked to injection of unapproved alternative medication. Emerg. Infect. Dis. *5*, 681–687.

Galmés-Truyols, A. *et al.* (2011). An outbreak of cutaneous infection due to Mycobacterium abscessus associated to mesotherapy. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 29, 510–514.

Gao, B., and Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *76*, 66–112.

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.

Garbe, T., Harris, D., Vordermeier, M., Lathigra, R., Ivanyi, J., and Young, D. (1993). Expression of the Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton antigen in Mycobacterium smegmatis: immunological analysis and evidence of glycosylation. Infect. Immun. *61*, 260–267.

Garrison, A. P. *et al.* (2009). Mycobacterium abscessus infection in solid organ transplant recipients: report of three cases and review of the literature. Transpl. Infect. Dis. *11*, 541–548.

Garufi, G., Butler, E., and Missiakas, D. (2008). ESAT-6-like protein secretion in Bacillus anthracis. J. Bacteriol. *190*, 7004–7011.

Gey Van Pittius, N. C., Gamieldien, J., Hide, W., Brown, G. D., Siezen, R. J., and Beyers, A. D. (2001). The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. Genome Biol. *2*, RESEARCH0044.

Gey van Pittius, N. C., Sampson, S. L., Lee, H., Kim, Y., van Helden, P. D., and Warren, R. M. (2006). Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. BMC Evol. Biol. *6*.

Gilljam, M., Scherstén, H., Silverborn, M., Jönsson, B., and Ericsson Hollsing, A. (2010). Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and Mycobacterium abscessus infection.

Gioffré, A. *et al.* (2005). Mutation in mce operons attenuates Mycobacterium tuberculosis virulence. Microbes Infect. 7, 325–334.

Girón, R. M., Domingo, D., Buendía, B., Antón, E., Ruiz-Velasco, L. M., and Ancochea, J. (2005). Micobacterias ambientales en pacientes adultos con fibrosis quística. Arch.

Bronconeumol. 41, 560–565.

Girón, R. M., Máiz, L., Barrio, I., Teresa Martínez, M., Salcedo, A., and Prados, C. (2008). Estudio multicéntrico de prevalencia de micobacterias ambientales en pacientes con fibrosis quística. Arch. Bronconeumol. *44*, 679–684.

Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013). Genome dynamics in Legionella: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*.

Gray, T. A., Clark, R. R., Boucher, N., Lapierre, P., Smith, C., and Derbyshire, K. M. (2016). Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. Science (80-.). *354*, 347–350.

Gray, T. A., Krywy, J. A., Harold, J., Palumbo, M. J., and Derbyshire, K. M. (2013). Distributive Conjugal Transfer in Mycobacteria Generates Progeny with Meiotic-Like Genome-Wide Mosaicism, Allowing Mapping of a Mating Identity Locus. PLoS Biol. *11*, e1001602.

Graybill, J. R., Silva, J., Fraser, D. W., Lordon, R., and Rogers, E. (1974). Disseminated mycobacteriosis due to Mycobacterium abcessus in two recipients of renal homografts. Am. Rev. Respir. Dis. *109*, 4–10.

Greub, G., and Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin. Microbiol. Rev. *17*, 413–433.

Griffin, J. E., Gawronski, J. D., Dejesus, M. A., Ioerger, T. R., Akerley, B. J., and Sassetti, C. M. (2011). High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. PLoS Pathog. *7*, e1002251.

Griffith, D. E. (2003). Emergence of Nontuberculous Mycobacteria as Pathogens in Cystic Fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *167*, 810–812.

Griffith, D. E. *et al.* (2007). An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *175*, 367–416.

Griffith, D. E., Brown-Elliott, B. A., L. Benwill, J., and Wallace, R. J. (2015). Mycobacterium abscessus . "Pleased to Meet You, Hope You Guess My Name..." Ann. Am. Thorac. Soc. *12*, 436–439.

Griffith, D. E., Girard, W. M., and Wallace, R. J. (1993). Clinical Features of Pulmonary Disease Caused by Rapidly Growing Mycobacteria: An Analysis of 154 Patients. Am. Rev. Respir. Dis. *147*, 1271–1278.

Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., and Brosch, R. (2016). ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. Nat. Rev. Microbiol. *14*, 677–691.

Guinn, K. M., Hickey, M. J., Mathur, S. K., Zakel, K. L., Grotzke, J. E., Lewinsohn, D. M., Smith, S., and Sherman, D. R. (2004). Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. *51*, 359–370.

Han, D., Lee, K. S., Koh, W.-J., Yi, C. A., Kim, T. S., and Kwon, O. J. (2003). Radiographic and CT Findings of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection Caused by Mycobacterium abscessus. Am. J. Roentgenol. *181*, 513–517.

Hansen, T., and Sarma, D. (2006). Multiple subcutaneous nodules associate with Mycobacterium abscessus infection following removal of an infected Groshon vascular catheter tip. Dermatol Online J.

Hanson, K. E., Slechta, E. S., Muir, H., and Barker, A. P. (2014). Rapid molecular detection of inducible macrolide resistance in Mycobacterium chelonae and M. abscessus strains: a replacement for 14-day susceptibility testing? J. Clin. Microbiol. *52*, 1705–1707.

Harada, T. *et al.* (2012). Clinical and microbiological differences between Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense lung diseases. J. Clin. Microbiol. *50*, 3556–3561.

Harris, K. A., Underwood, A., Kenna, D. T. D., Brooks, A., Kavaliunaite, E., Kapatai, G., Tewolde, R., Aurora, P., and Dixon, G. (2014). Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analysis Do Not Provide Evidence for Cross-transmission of Mycobacterium abscessus in a Cohort of Pediatric Cystic Fibrosis Patients. Clin. Infect. Dis. *60*, 1007–1016.

Hartkoorn, R. C., Uplekar, S., and Cole, S. T. (2014). Cross-Resistance between Clofazimine and Bedaquiline through Upregulation of MmpL5 in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 2979–2981.

Herdman, A. V., and Steele, J. C. H. (2004). The new mycobacterial species-emerging or newly distinguished pathogens. Clin. Lab. Med. 24, 651–690.

Hjelt, K., Højlyng, N., Howitz, P., Illum, N., Munk, E., Valerius, N. H., Fursted, K., Hansen, K. N., Heltberg, I., and Koch, C. (1994). The role of Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) in patients with cystic fibrosis. Scand. J. Infect. Dis. *26*, 569–576.

Hoffman, P. C., Fraser, D. W., Robicsek, F., O'Bar, P. R., and Mauney, C. U. (1981). Two outbreaks of sternal wound infection due to organisms of the Mycobacterium fortuitum complex. J. Infect. Dis. *143*, 533–542.

Houben, D. *et al.* (2012a). ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. Cell. Microbiol. *14*, 1287–1298.

Houben, E. N. G., Bestebroer, J., Ummels, R., Wilson, L., Piersma, S. R., Jiménez, C. R., Ottenhoff, T. H. M., Luirink, J., and Bitter, W. (2012b). Composition of the type VII secretion system membrane complex. Mol. Microbiol. *86*, 472–484.

Houben, E. N. G., Korotkov, K. V., and Bitter, W. (2014). Take five — Type VII secretion systems of Mycobacteria. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. *1843*, 1707–1716.

Howard, S. T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., Lyons, C. R., and Byrd, T. F. (2006). Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. Microbiology *152*, 1581–1590.

Hsu, T. *et al.* (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 12420–12425.

Huang, C.-W., Chen, J.-H., Hu, S.-T., Huang, W.-C., Lee, Y.-C., Huang, C.-C., and Shen, G.-H. (2013). Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan. Int. J. Antimicrob. Agents *41*, 218–223.

Huang, J. H., Kao, P. N., Adi, V., and Ruoss, S. J. (1999). Mycobacterium avium-

intracellulare Pulmonary Infection in HIV-Negative Patients Without Preexisting Lung Disease: Diagnostic and Management Limitations. Chest *115*, 1033–1040.

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.

Huppert, L. A., Ramsdell, T. L., Chase, M. R., Sarracino, D. A., Fortune, S. M., and Burton, B. M. (2014). The ESX system in Bacillus subtilis mediates protein secretion. PLoS One *9*, e96267.

Hutchins, G. M., and Boitnott, J. K. (1978). Atypical mycobacterial infection complicating mineral oil pneumonia. JAMA 240, 539–541.

Iantomasi, R. *et al.* (2012). PE_PGRS30 is required for the full virulence of Mycobacterium tuberculosis. Cell. Microbiol. *14*, 356–367.

van Ingen, J., de Zwaan, R., Dekhuijzen, R. P. N., Boeree, M. J., and van Soolingen, D. (2009). Clinical relevance of Mycobacterium chelonae–abscessus group isolation in 95 patients. J. Infect. *59*, 324–331.

Ingram, C. W., Tanner, D. C., Durack, D. T., Kernodle, G. W., and Corey, G. R. (1993). Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. Clin. Infect. Dis. *16*, 463–471.

Isberg, R. R., O'Connor, T. J., and Heidtman, M. (2009). The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. Nat. Rev. Microbiol. 7, 13–24.

Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Hoshino, Y., Kurita, H., Hotta, K., Shiba, T., and Hattori, M. (2004). The complete genomic sequence of Nocardia farcinica IFM 10152. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 14925–14930.

Jeon, K., Kwon, O. J., Lee, N. Y., Kim, B.-J., Kook, Y.-H., Lee, S.-H., Park, Y. K., Kim, C. K., and Koh, W.-J. (2009). Antibiotic Treatment of Mycobacterium abscessus Lung Disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *180*, 896–902.

Jeong, Y. J., Lee, K. S., Koh, W.-J., Han, J., Kim, T. S., and Kwon, O. J. (2004). Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection in Immunocompetent Patients: Comparison of Thin-Section CT and Histopathologic Findings. Radiology *231*, 880–886.

de Jonge, M. I. *et al.* (2007). ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. J. Bacteriol. *189*, 6028–6034.

Jönsson, B. E., Gilljam, M., Lindblad, A., Ridell, M., Wold, A. E., and Welinder-Olsson, C. (2007). Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. *45*, 1497–1504.

Jönsson, B., Ridell, M., and Wold, A. E. (2012). Phagocytosis and cytokine response to rough and smooth colony variants of Mycobacterium abscessus by human peripheral blood mononuclear cells. APMIS *121*, 45–55.

Jurado, V., Kroppenstedt, R. M., Saiz-Jimenez, C., Klenk, H.-P., Mouniee, D., Laiz, L., Couble, A., Potter, G., Boiron, P., and Rodriguez-Nava, V. (2009). Hoyosella altamirensis gen. nov., sp. nov., a new member of the order Actinomycetales isolated from a cave biofilm. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *59*, 3105–3110.
Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science (80-.). 245.

van Kessel, J. C., and Hatfull, G. F. (2007). Recombineering in Mycobacterium tuberculosis. Nat. Methods *4*, 147–152.

Khermosh, O., Weintroub, S., Topilsky, M., and Baratz, M. (1979). Mycobacterium abscessus (M. chelonei) infection of the knee joint: report of two cases following intra-articular injection of corticosteroids. Clin. Orthop. Relat. Res., 162–168.

Kilby, J. M., Gilligan, P. H., Yankaskas, J. R., Highsmith, W. E., Edwards, L. J., and Knowles, M. R. (1992). Nontuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis. Chest *102*, 70–75.

Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y., Kook, Y. H., and Kook, Y.-H. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J. Clin. Microbiol. *37*, 1714–1720.

Kim, H.-Y. *et al.* (2007). Outbreak of Mycobacterium massiliense infection associated with intramuscular injections. J. Clin. Microbiol. *45*, 3127–3130.

Kim, H.-Y., Kim, B. J., Kook, Y., Yun, Y.-J., Shin, J. H., Kim, B.-J., and Kook, Y.-H. (2010). Mycobacterium massiliense is differentiated from Mycobacterium abscessus and Mycobacterium bolletii by erythromycin ribosome methyltransferase gene (erm) and clarithromycin susceptibility patterns. Microbiol. Immunol. *54*, 347–353.

Kim, H.-Y., Kook, Y., Yun, Y.-J., Park, C. G., Lee, N. Y., Shim, T. S., Kim, B.-J., and Kook, Y.-H. (2008a). Proportions of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii strains among Korean Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus group isolates. J. Clin. Microbiol. *46*, 3384–3390.

Kim, H. S., Lee, K. S., Koh, W.-J., Jeon, K., Lee, E. J., Kang, H., and Ahn, J. (2012). Serial CT Findings of Mycobacterium massiliense Pulmonary Disease Compared with Mycobacterium abscessus Disease after Treatment with Antibiotic Therapy. Radiology *263*, 260–270.

Kim, H. S., Lee, Y., Lee, S., Kim, Y. A., and Sun, Y.-K. (2014). Recent trends in clinically significant nontuberculous Mycobacteria isolates at a Korean general hospital. Ann. Lab. Med. *34*, 56–59.

Kim, R. D. *et al.* (2008b). Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *178*, 1066–1074.

Knoll, B. M. (2014). Update on Nontuberculous Mycobacterial Infections in Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. Curr. Infect. Dis. Rep. *16*, 421.

Knoll, B. M., Kappagoda, S., Gill, R. R., Goldberg, H. J., Boyle, K., Baden, L. R., Fuhlbrigge, A. L., and Marty, F. M. (2012). Non-tuberculous mycobacterial infection among lung transplant recipients: a 15-year cohort study. Transpl. Infect. Dis. *14*, 452–460.

Koh, S.-J. *et al.* (2010). An outbreak of skin and soft tissue infection caused by Mycobacterium abscessus following acupuncture. Clin. Microbiol. Infect. *16*, 895–901.

Koh, W.-J. et al. (2011). Clinical Significance of Differentiation of Mycobacterium

massiliense from Mycobacterium abscessus. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183, 405-410.

Koh, W.-J., Kwon, O. J., Lee, N. Y., Kook, Y.-H., Lee, H.-K., and Kim, B.-J. (2009). First case of disseminated Mycobacterium bolletii infection in a young adult patient. J. Clin. Microbiol. *47*, 3362–3366.

Koh, W.-J., Lee, K. S., Kwon, O. J., Jeong, Y. J., Kwak, S.-H., and Kim, T. S. (2005). Bilateral Bronchiectasis and Bronchiolitis at Thin-Section CT: Diagnostic Implications in Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Infection. Radiology *235*, 282–288.

Koh, W.-J., Stout, J. E., and Yew, W.-W. (2014). Advances in the management of pulmonary disease due to Mycobacterium abscessus complex. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 18, 1141–1148.

Konjek, J. *et al.* (2016). Mycobacterium lutetiense sp. nov., Mycobacterium montmartrense sp. nov. and Mycobacterium arcueilense sp. nov., members of a novel group of non-pigmented rapidly growing mycobacteria recovered from a water distribution system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *66*, 3694–3702.

Koo, I. C., Wang, C., Raghavan, S., Morisaki, J. H., Cox, J. S., and Brown, E. J. (2008). ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. Cell. Microbiol. *10*, 1866–1878.

Kremer, L., Guérardel, Y., Gurcha, S. S., Locht, C., and Besra, G. S. (2002). Temperatureinduced changes in the cell-wall components of Mycobacterium thermoresistibile. Microbiology *148*, 3145–3154.

Kuo, Y.-M., Cheng, A., Wu, P.-C., Hsieh, S.-C., Hsieh, S.-M., Hsueh, P.-R., and Yu, C.-L. (2011). Disseminated Mycobacterium abscessus infection and showerheads, Taiwan. Emerg. Infect. Dis. *17*, 2077–2078.

Kupz, A., Zedler, U., Stäber, M., Perdomo, C., Dorhoi, A., Brosch, R., and Kaufmann, S. H. E. (2016). ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control in vivo. J. Clin. Invest. *126*, 2109–2122.

Kuritsky, J. N., Bullen, M. G., Broome, C. V, Silcox, V. A., Good, R. C., and Wallace, R. J. (1983). Sternal wound infections and endocarditis due to organisms of the Mycobacterium fortuitum complex. Ann. Intern. Med. *98*, 938–939.

Kusunoki, S., and Ezaki, T. (1992). Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and Elevation of Mycobacterium chelonae subsp . abscessus (Kubica et al.) to Species Status : Mycobacterium abscessus comb . nov . Int. J. Syst. Bacteriol., 240–245.

Lai, C.-C., Chao, C.-M., Gau, S.-J., and Hsueh, P.-R. (2013). Thoracic empyema and bacteremia due to Mycobacterium abscessus in a patient with liver cirrhosis. J. Microbiol. Immunol. Infect. *46*, 482–484.

Lai, C.-C., Tan, C.-K., Cheng, A., Chung, K.-P., Chen, C.-Y., Liao, C.-H., Huang, Y.-T., and Hsueh, P.-R. (2012). Nontuberculous mycobacterial infections in cancer patients in a medical center in Taiwan, 2005–2008. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 72, 161–165.

Lai, C. C., Tan, C. K., Chou, C. H., Hsu, H. L., Liao, C. H., Huang, Y. T., Yang, P. C., Luh, K. T., and Hsueh, P. R. (2010). Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. Emerg. Infect. Dis. *16*, 294–296.

Lam, G. Y., Fattouh, R., Muise, A. M., Grinstein, S., Higgins, D. E., and Brumell, J. H.

(2011). Listeriolysin O Suppresses Phospholipase C-Mediated Activation of the Microbicidal NADPH Oxidase to Promote Listeria monocytogenes Infection. Cell Host Microbe *10*, 627–634.

Lambertucci, J. R., Borges, A. H., and Voieta, I. (2011). Disseminated Mycobacterium abscessus infection in an AIDS patient. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 265–265.

Lamichhane, G., Tyagi, S., and Bishai, W. R. (2005). Designer Arrays for Defined Mutant Analysis To Detect Genes Essential for Survival of Mycobacterium tuberculosis in Mouse Lungs. Infect. Immun. *73*, 2533–2540.

Lamichhane, G., Zignol, M., Blades, N. J., Geiman, D. E., Dougherty, A., Grosset, J., Broman, K. W., and Bishai, W. R. (2003). A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 7213–7218.

Lamrabet, O., Medie, F. M., Drancourt, M., Suykerbuyk, P., and Leirs, H. (2012). Acanthamoeba polyphaga-Enhanced Growth of Mycobacterium smegmatis. PLoS One *7*, e29833.

Laneelle, M.-A., Launay, A., Spina, L., Marrakchi, H., Laval, F., Eynard, N., Lemassu, A., Tropis, M., Daffe, M., and Etienne, G. (2012). A novel mycolic acid species defines two novel genera of the Actinobacteria, Hoyosella and Amycolicicoccus. Microbiology *158*, 843–855.

Laskowski, L. F., Marr, J. J., Spernoga, J. F., Frank, N. J., Barner, H. B., Kaiser, G., and Tyras, D. H. (1977). Fastidious Mycobacteria Grown from Porcine Prosthetic-Heart-Valve Cultures. N. Engl. J. Med. 297, 101–102.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. Trends Mol. Med. *10*, 599–606.

Leão, S. C. *et al.* (2010). Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. Future Microbiol. *5*, 971–980.

Leao, S. C., Tortoli, E., Euzeby, J. P., and Garcia, M. J. (2011). Proposal that Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii be united and reclassified as Mycobacterium abscessus subsp. bolletii comb. nov., designation of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus subsp. nov. and emended description of Mycobacteri. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *61*, 2311–2313.

Leao, S. C., Tortoli, E., Viana-Niero, C., Ueki, S. Y. M., Lima, K. V. B., Lopes, M. L., Yubero, J., Menendez, M. C., and Garcia, M. J. (2009). Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the Mycobacterium chelonae-M. abscessus group is needed. J. Clin. Microbiol. 47, 2691–2698.

Lee, M.-R., Cheng, A., Lee, Y.-C., Yang, C.-Y., Lai, C.-C., Huang, Y.-T., Ho, C.-C., Wang, H.-C., Yu, C.-J., and Hsueh, P.-R. (2012). CNS infections caused by Mycobacterium abscessus complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 222–225.

Lee, S. H., Yoo, H. K., Kim, S. H., Koh, W.-J., Kim, C. K., Park, Y. K., and Kim, H. J. (2014). The Drug Resistance Profile of Mycobacterium abscessus Group Strains from Korea. Ann. Lab. Med. *34*, 31.

Lee, W. J., Kang, S. M., Sung, H., Won, C. H., Chang, S. E., Lee, M. W., Kim, M. N., Choi, J. H., and Moon, K. C. (2010). Non-tuberculous mycobacterial infections of the skin: A retrospective study of 29 cases. J. Dermatol. *37*, 965–972.

Letek, M. *et al.* (2010). The Genome of a Pathogenic Rhodococcus: Cooptive Virulence Underpinned by Key Gene Acquisitions. PLoS Genet. *6*, e1001145.

Levy, I. *et al.* (2008). Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. Emerg. Infect. Dis. *14*, 378–384.

Levy, Z. D., Du, V., Chiluwal, A., Chalif, D. J., and Ledoux, D. E. (2016). Ventriculoperitoneal Shunt Infection with Mycobacterium abscessus: A Rare Cause of Ventriculitis.

Liao, C.-H., Chen, M.-Y., Hsieh, S.-M., Sheng, W.-H., Hung, C.-C., and Chang, S.-C. (2004). Discontinuation of secondary prophylaxis in AIDS patients with disseminated non-tuberculous mycobacteria infection. J. Microbiol. Immunol. Infect. *37*, 50–56.

Lichtenstein, I. H., and MacGregor, R. R. (1983). Mycobacterial Infections in Renal Transplant Recipients: Report of Five Cases and Review of the Literature. Clin. Infect. Dis. *5*, 216–226.

Liebeskind, D. S., Ostrzega, N., Wasterlain, C. G., and Buttner, E. A. (2001). Neurologic manifestations of disseminated infection with Mycobacterium abscessus. Neurology *56*, 810–813.

Lightbody, K. L., Ilghari, D., Waters, L. C., Carey, G., Bailey, M. A., Williamson, R. A., Renshaw, P. S., and Carr, M. D. (2008). Molecular features governing the stability and specificity of functional complex formation by Mycobacterium tuberculosis CFP-10/ESAT-6 family proteins. J. Biol. Chem. 283, 17681–17690.

Liu, R. *et al.* (2013). Mycobacterium abscessus Bacteremia After Receipt of Intravenous Infusate of Cytokine-Induced Killer Cell Therapy for Body Beautification and Health Boosting. Clin. Infect. Dis. *57*, 981–991.

Liu, T.-T., Weng, S.-W., Wang, M.-C., and Huang, W.-T. (2016). Nontuberculous mycobacterial infection with concurrent IgG4-related lymphadenopathy. APMIS *124*, 216–220.

Lobo, L. J., Chang, L. C., Esther, C. R., Gilligan, P. H., Tulu, Z., and Noone, P. G. (2013). Lung transplant outcomes in cystic fibrosis patients with pre-operative Mycobacterium abscessus respiratory infections. Clin. Transplant. *27*, 523–529.

Lowry, P. W., Beck-Sague, C. M., Bland, L. A., Aguero, S. M., Arduino, M. J., Minuth, A. N., Murray, R. A., Swenson, J. M., and Jarvis, W. R. (1990). Mycobacterium chelonae infection among patients receiving high-flux dialysis in a hemodialysis clinic in California. J. Infect. Dis. *161*, 85–90.

Lyu, J., Kim, B.-J., Kim, B.-J., Song, J. W., Choi, C.-M., Oh, Y.-M., Lee, S.-D., Kim, W. S., Kim, D. S., and Shim, T. S. (2014). A shorter treatment duration may be sufficient for patients with Mycobacterium massiliense lung disease than with Mycobacterium abscessus lung disease. Respir. Med. *108*, 1706–1712.

Ma, Y., Keil, V., and Sun, J. (2015). Characterization of Mycobacterium tuberculosis EsxA membrane insertion: roles of N- and C-terminal flexible arms and central helix-turn-helix

motif. J. Biol. Chem. 290, 7314–7322.

MacGurn, J. A., and Cox, J. S. (2007). A genetic screen for Mycobacterium tuberculosis mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. Infect. Immun. 75, 2668–2678.

Macheras, E. *et al.* (2014). Multilocus sequence typing scheme for the Mycobacterium abscessus complex. Res. Microbiol. *165*, 82–90.

Macheras, E., Roux, A.-L., Ripoll, F., Sivadon-Tardy, V., Gutierrez, C., Gaillard, J.-L., and Heym, B. (2009). Inaccuracy of single-target sequencing for discriminating species of the Mycobacterium abscessus group. J. Clin. Microbiol. *47*, 2596–2600.

Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, G. M., Milano, A., Provvedi, R., Pasca, M. R., Smith, I., Palù, G., Riccardi, G., and Manganelli, R. (2007). Global analysis of the Mycobacterium tuberculosis Zur (FurB) regulon. J. Bacteriol. *189*, 730–740.

Maciag, A., Piazza, A., Riccardi, G., and Milano, A. (2009). Transcriptional analysis of ESAT-6 cluster 3 in Mycobacterium smegmatis. BMC Microbiol. *9*, 48.

Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., and Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. J. Bacteriol. *178*, 1274–1282.

Majlessi, L., and Brosch, R. (2015). Mycobacterium tuberculosis Meets the Cytosol: The Role of cGAS in Anti-mycobacterial Immunity. Cell Host Microbe *17*, 733–735.

Majlessi, L., Prados-Rosales, R., Casadevall, A., and Brosch, R. (2015). Release of mycobacterial antigens. Immunol. Rev. 264, 25–45.

Malcolm, K. C. *et al.* (2013). Mycobacterium abscessus induces a limited pattern of neutrophil activation that promotes pathogen survival. PLoS One *8*, e57402.

Malen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., and Wiker, H. G. (2007). Comprehensive analysis of exported proteins fromMycobacterium tuberculosis H37Rv. Proteomics *7*, 1702–1718.

Malouf, M. A., and Glanville, A. R. (1999). The Spectrum of Mycobacterial Infection after Lung Transplantation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *160*, 1611–1616.

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.

Maniu, C., Hellinger, W., Chu, S., Palmer, R., and Alvarez?Elcoro, S. (2001). Failure of Treatment for Chronic *Mycobacterium abscessus* Meningitis Despite Adequate Clarithromycin Levels in Cerebrospinal Fluid. Clin. Infect. Dis. *33*, 745–748.

Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A., and Daffé, M. (2014). Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. Chem. Biol. 21, 67–85.

Martiniano, S. L., Sontag, M. K., Daley, C. L., Nick, J. A., and Sagel, S. D. (2014). Clinical Significance of a First Positive Nontuberculous Mycobacteria Culture in Cystic Fibrosis. Ann. Am. Thorac. Soc. 11, 36–44. Mattow, J., Schaible, U. E., Schmidt, F., Hagens, K., Siejak, F., Brestrich, G., Haeselbarth, G., Müller, E.-C., Jungblut, P. R., and Kaufmann, S. H. E. (2003). Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv and attenuated M. bovis BCG Copenhagen. Electrophoresis *24*, 3405–3420.

Maxson, S., Schutze, G. E., and Jacobs, R. F. (1994). Mycobacterium abscessus Osteomyelitis: Treatment with clarithromycin. Infect. Dis. Clin. Pract. *3*, 203–206.

McLaughlin, B., Chon, J. S., MacGurn, J. A., Carlsson, F., Cheng, T. L., Cox, J. S., and Brown, E. J. (2007). A Mycobacterium ESX-1–Secreted Virulence Factor with Unique Requirements for Export. PLoS Pathog. *3*, e105.

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. Nat. Rev. Immunol. *15*, 87–103.

Medjahed, H., Gaillard, J.-L., and Reyrat, J.-M. (2010). Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. Trends Microbiol. *18*, 117–123.

Medjahed, H., and Reyrat, J.-M. (2009). Construction of Mycobacterium abscessus defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 1331–1338.

Medjahed, H., and Singh, A. K. (2010). Genetic manipulation of Mycobacterium abscessus. Curr. Protoc. Microbiol. *Chapter 10*, Unit 10D.2.

Miller, L., Mangione, E., Beebe, J., Hoffman, R., Levy, P., G, H., Miller, G., and (CDC), C. for D. C. (1996). Infection with Mycobacterium abscessus associated with intramuscular injection of adrenal cortex extract--Colorado and Wyoming, 1995-1996. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 45, 713–715.

Millington, K. A., Fortune, S. M., Low, J., Garces, A., Hingley-Wilson, S. M., Wickremasinghe, M., Kon, O. M., and Lalvani, A. (2011). Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for Mycobacterium tuberculosis infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 5730–5735.

Mishra, B. B., Moura-Alves, P., Sonawane, A., Hacohen, N., Griffiths, G., Moita, L. F., and Anes, E. (2010). Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. Cell. Microbiol. *12*, 1046–1063.

Mishra, K. C., de Chastellier, C., Narayana, Y., Bifani, P., Brown, A. K., Besra, G. S., Katoch, V. M., Joshi, B., Balaji, K. N., and Kremer, L. (2008). Functional role of the PE domain and immunogenicity of the Mycobacterium tuberculosis triacylglycerol hydrolase LipY. Infect. Immun. *76*, 127–140.

Moffat, J. F., and Tompkins, L. S. (1992). A quantitative model of intracellular growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii. Infect. Immun. *60*, 296–301.

Le Moigne, V., Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., Gaillard, J.-L., Kremer, L., Herrmann, J.-L., and Blanc-Potard, A.-B. (2016). MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against Mycobacterium abscessus Infection. Infect. Immun. *84*, 2895–2903.

Moncrief, M. B., and Maguire, M. E. (1998). Magnesium and the role of MgtC in growth of Salmonella typhimurium. Infect. Immun. *66*, 3802–3809.

Montero, J. A., Alrabaa, S. F., and Wills, T. S. (2016). Mycobacterium abscessus

ventriculoperitoneal shunt infection and review of the literature. Infection 44, 251–253.

Moore, M., and Frerichs, J. B. (1952). An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region.pdf.

Mooren, V. H. J. F., Bleeker, M. W. P., van Ingen, J., Hermans, M. H. A., and Wever, P. C. (2017). Disseminated Mycobacterium abscessus infection in a peritoneal dialysis patient.

Morales, P., Gil, A., and Santos, M. (2010). Mycobacterium abscessus Infection in Transplant Recipients. Transplant. Proc. 42, 3058–3060.

Mueller, P. S., and Edson, R. S. (2001). Disseminated Mycobacterium abscessus infection manifesting as fever of unknown origin and intra-abdominal lymphadenitis: Case report and literature review. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *39*, 33–37.

Mukhopadhyay, S., and Balaji, K. N. (2011). The PE and PPE proteins of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis *91*, 441–447.

Murillo, J., SI, H., DG, B., B, B., RJ, W. I., MS, S., (ed), Y. R., Castro, J., Rubino, L., and Cordido, M. (2000). Skin and Wound Infection by Rapidly Growing Mycobacteria<subtitle>An Unexpected Complication of Liposuction and Liposculpture</subtitle> Arch. Dermatol. *136*, 1347.

Mushatt, D. M., and Witzig, R. S. (1995). Successful Treatment of Mycobacterium abscessus Infections with Multidrug Regimens Containing Clarithromycin. Clin. Infect. Dis. 20, 1441–1442.

Mussaffi, H., Rivlin, J., Shalit, I., Ephros, M., and Blau, H. (2005). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. Eur. Respir. J. 25.

Mwandumba, H. C., Russell, D. G., Nyirenda, M. H., Anderson, J., White, S. A., Molyneux, M. E., and Squire, S. B. (2004). Mycobacterium tuberculosis Resides in Nonacidified Vacuoles in Endocytically Competent Alveolar Macrophages from Patients with Tuberculosis and HIV Infection. J. Immunol. *172*.

Nakanaga, K., Sekizuka, T., Fukano, H., Sakakibara, Y., Takeuchi, F., Wada, S., Ishii, N., Makino, M., Kuroda, M., and Hoshino, Y. (2014). Discrimination of Mycobacterium abscessus subsp. massiliense from Mycobacterium abscessus subsp. abscessus in clinical isolates by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. *52*, 251–259.

Nakayama, Y., Nakayama, H., and Takeya, K. (1970). Studies of the relationship between Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium runyonii. Am. Rev. Respir. Dis. *101*, 558–568.

Nash, K. A., Brown-Elliott, B. A., and Wallace, R. J. (2009). A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae. Antimicrob. Agents Chemother. *53*, 1367–1376.

Nelson, B. R., Rapini, R. P., Wallace, R. J., and Tschen, J. A. (1989). Disseminated Mycobacterium chelonae ssp. abscessus in an immunocompetent host and with a known portal of entry. J. Am. Acad. Dermatol. *20*, 909–912.

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.

Nessar, R., Reyrat, J.-M., Davidson, L. B., and Byrd, T. F. (2011). Deletion of the

mmpL4b gene in the Mycobacterium abscessus glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response. Microbiology *157*, 1187–1195.

Newton-Foot, M., Warren, R. M., Sampson, S. L., van Helden, P. D., and Gey van Pittius, N. C. (2016). The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems. BMC Evol. Biol. *16*, 62.

O'Brien, D. P., Currie, B. J., and Krause, V. L. (2000). Nontuberculous Mycobacterial Disease in Northern Australia: A Case Series and Review of the Literature. Clin. Infect. Dis. *31*, 958–968.

O'Brien, R. J., Geiter, L. J., and Snider, D. E. (1987). The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. Am. Rev. Respir. Dis. *135*, 1007–1014.

O'Driscoll, C. *et al.* (2016). Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus complex isolates in Ireland. J. Cyst. Fibros. *15*, 179–185.

Oberley-Deegan, R. E., Lee, Y. M., Morey, G. E., Cook, D. M., Chan, E. D., and Crapo, J. D. (2009). The antioxidant mimetic, MnTE-2-PyP, reduces intracellular growth of Mycobacterium abscessus. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *41*, 170–178.

Ohol, Y. M., Goetz, D. H., Chan, K., Shiloh, M. U., Craik, C. S., and Cox, J. S. (2010). Mycobacterium tuberculosis MycP1 Protease Plays a Dual Role in Regulation of ESX-1 Secretion and Virulence. Cell Host Microbe 7, 210–220.

Olivier, K. N. *et al.* (2003a). Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *167*, 828–834.

Olivier, K. N., Weber, D. J., Lee, J.-H., Handler, A., Tudor, G., Molina, P. L., Tomashefski, J., Knowles, M. R., and Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group (2003b). Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *167*, 835–840.

Page, A. L., Ohayon, H., Sansonetti, P. J., and Parsot, C. (1999). The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of Shigella flexneri. Cell. Microbiol. *1*, 183–193.

Pallen, M. J. (2002). The ESAT-6/WXG100 superfamily – and a new Gram-positive secretion system? Trends Microbiol. *10*, 209–212.

Park, S. *et al.* (2008). In vitro antimicrobial susceptibility of Mycobacterium abscessus in Korea. J. Korean Med. Sci. 23, 49–52.

Paschoal, I. A., de Oliveira Villalba, W., Bertuzzo, C. S., Cerqueira, E. M. F. P., and Pereira, M. C. (2007). Cystic Fibrosis in Adults. Lung *185*, 81–87.

Pawlik, A. *et al.* (2013). Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus. Mol. Microbiol. *90*, 612–629.

Paz, I. *et al.* (2010). Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. Cell. Microbiol. *12*, 530–544.

Pennini, M. E., Pai, R. K., Schultz, D. C., Boom, W. H., and Harding, C. V. (2006).

Mycobacterium tuberculosis 19-kDa Lipoprotein Inhibits IFN-γ-Induced Chromatin Remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK Signaling. J. Immunol. *176*.

Di Pentima, M. C., Doyle, R., Locke, R., and Tuttle, D. (2004). Late-Onset Mycobacterium abscessus Sepsis in a Very Low Birthweight Premature Infant: Diagnostic and Therapeutic Challenges. Am. J. Perinatol. *21*, 365–368.

Pethe, K., Swenson, D. L., Alonso, S., Anderson, J., Wang, C., and Russell, D. G. (2004). Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 13642–13647.

Petrini, B. (2006). Mycobacterium abscessus: an emerging rapid-growing potential pathogen. Review article. APMIS *114*, 319–328.

Phowthongkum, P., Prasanthai, V., Udomsantisook, N., and Suankratay, C. (2005). Rapidly growing mycobacteria in King Chulalongkorn Memorial Hospital and review of the literature in Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 88, 1153–1162.

Pierre-Audigier, C. *et al.* (2005). Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. *43*, 3467–3470.

Pietersen, R., Thilo, L., and de Chastellier, C. (2004). Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium modify the composition of the phagosomal membrane in infected macrophages by selective depletion of cell surface-derived glycoconjugates. Eur. J. Cell Biol. *83*, 153–158.

Prevots, D. R., Shaw, P. A., and Strickland, D. (2010). Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease Prevalence at four Integrated Health Care Delivery Systems.pdf.

Prince, D. S., Peterson, D. D., Steiner, R. M., Gottlieb, J. E., Scott, R., Israel, H. L., Figueroa, W. G., and Fish, J. E. (1989). Infection with Mycobacterium avium Complex in Patients without Predisposing Conditions. N. Engl. J. Med. *321*, 863–868.

Pruetpongpun, N., Khawcharoenporn, T., Damronglerd, P., Suthiwartnarueput, W., Apisarnthanarak, A., Rujanavej, S., and Suwantarat, N. (2016). Disseminated Talaromyces marneffei and Mycobacterium abscessus in a Patient With Anti-Interferon- γ Autoantibodies. Open Forum Infect. Dis. *3*, ofw093.

Qvist, T. *et al.* (2015). Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. J. Cyst. Fibros. *14*, 46–52.

Qvist, T. *et al.* (2016). Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. *15*, 380–385.

Qvist, T., Pressler, T., Thomsen, V. O., Skov, M., Iversen, M., and Katzenstein, T. L. (2013). Nontuberculous Mycobacterial Disease Is Not a Contraindication to Lung Transplantation in Patients With Cystic Fibrosis: A Retrospective Analysis in a Danish Patient Population. Transplant. Proc. 45, 342–345.

Radhakrishnan, D. K., Yau, Y., Corey, M., Richardson, S., Chedore, P., Jamieson, F., and Dell, S. D. (2009). Non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis: Isolation, prevalence, and predictors. Pediatr. Pulmonol. *44*, 1100–1106.

Raghavan, S., Manzanillo, P., Chan, K., Dovey, C., and Cox, J. S. (2008). Secreted

transcription factor controls Mycobacterium tuberculosis virulence. Nature 454, 717–721.

Ratjen, F., and Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. Lancet 361, 681–689.

Ray, K., Bobard, A., Danckaert, A., Paz-Haftel, I., Clair, C., Ehsani, S., Tang, C., Sansonetti, P., Van Nhieu, G. T., and Enninga, J. (2010). Tracking the dynamic interplay between bacterial and host factors during pathogen-induced vacuole rupture in real time. Cell. Microbiol. *12*, 545–556.

Raynaud, C., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganelli, R., Smith, I., Gicquel, B., and Jackson, M. (2002). Phospholipases C are involved in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. *45*, 203–217.

Renaud, C. J., Subramanian, S., Tambyah, P. A., and Lee, E. J. (2011). The clinical course of rapidly growing nontuberculous mycobacterial peritoneal dialysis infections in Asians: A case series and literature review. Nephrology *16*, 174–179.

Renshaw, P. S. *et al.* (2005). Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. EMBO J. 24, 2491–2498.

Renshaw, P. S., Panagiotidou, P., Whelan, A., Gordon, S. V, Hewinson, R. G., Williamson, R. A., and Carr, M. D. (2002). Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the Mycobacterium tuberculosis complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for p. J. Biol. Chem. 277, 21598–21603.

Rhoades, E. R., Archambault, A. S., Greendyke, R., Hsu, F.-F., Streeter, C., and Byrd, T. F. (2009). Mycobacterium abscessus Glycopeptidolipids Mask Underlying Cell Wall Phosphatidyl-myo-Inositol Mannosides Blocking Induction of Human Macrophage TNF- α by Preventing Interaction with TLR2. J. Immunol. *183*.

Richey, L. E., Bahadorani, J., and Mushatt, D. (2013). Endovascular Mycobacterium abscessus infection in a heart transplant recipient: a case report and review of the literature. Transpl. Infect. Dis. *15*, 208–213.

Righter, J., Hart, G. D., and Howes, M. (1983). Mycobacterium chelonei: report of a case of septicemia and review of the literature. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1, 323–329.

Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L., and Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J. Clin. Microbiol. *37*, 852–857.

Ripoll, F. *et al.* (2007). Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in Mycobacterium abscessus and M. chelonae. BMC Genomics *8*, 114.

Ripoll, F. *et al.* (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. PLoS One *4*, e5660.

Rodman, D. M. *et al.* (2005). Late Diagnosis Defines a Unique Population of Long-term Survivors of Cystic Fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *171*, 621–626.

Rodríguez, D. C., Ocampo, M., Varela, Y., Curtidor, H., Patarroyo, M. A., and Patarroyo, M. E. (2015). Mce4F Mycobacterium tuberculosis protein peptides can inhibit invasion of human cell lines. Pathog. Dis. *73*, 2509–2519.

Rodriguez, G. M., Voskuil, M. I., Gold, B., Schoolnik, G. K., and Smith, I. (2002). ideR,

An essential gene in mycobacterium tuberculosis: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. Infect. Immun. 70, 3371–3381.

Rodriguez, G., Ortegon, M., Camargo, D., and Orozco, L. C. (1997). Iatrogenic Mycobacterium abscessus infection: histopathology of 71 patients. Br. J. Dermatol. *137*, 214–218.

Romagnoli, A. *et al.* (2012). ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. Autophagy 8, 1357–1370.

Rosenzweig, S. D., Dorman, S. E., Uzel, G., Shaw, S., Scurlock, A., Brown, M. R., Buckley, R. H., and Holland, S. M. (2004). A Novel Mutation in IFN- γ Receptor 2 with Dominant Negative Activity: Biological Consequences of Homozygous and Heterozygous States. J. Immunol. *173*.

Rottman, M., Catherinot, E., Hochedez, P., Emile, J.-F., Casanova, J.-L., Gaillard, J.-L., and Soudais, C. (2007). Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower Mycobacterium abscessus in C57BL/6 mice. Infect. Immun. *75*, 5898–5907.

Roux, A.-L. *et al.* (2009). Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. J. Clin. Microbiol. 47, 4124–4128.

Roux, A.-L. *et al.* (2011). Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. Cell. Microbiol. *13*, 692–704.

Roux, A.-L. *et al.* (2015). Comparing Mycobacterium massiliense and Mycobacterium abscessus lung infections in cystic fibrosis patients. J. Cyst. Fibros. *14*, 63–69.

Roux, A.-L. *et al.* (2016). The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages. Open Biol. *6*.

Rowbotham, T. J. (1983). Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J. Clin. Pathol. *36*, 978–986.

Rubin, E. J., Akerley, B. J., Novik, V. N., Lampe, D. J., Husson, R. N., and Mekalanos, J. J. (1999). In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 1645–1650.

Rüger, K., Hampel, A., Billig, S., Rücker, N., Suerbaum, S., and Bange, F.-C. (2014). Characterization of rough and smooth morphotypes of Mycobacterium abscessus isolates from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. *52*, 244–250.

Runyon, E. H. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. North Am. 43, 273–290.

Runyon, E. H. (1970). Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. Am. J. Clin. Pathol. 54, 578–586.

Ryu, H. J., Kim, W. J., Oh, C. H., and Song, H. J. (2005). Iatrogenic Mycobacterium abscessus infection associated with acupuncture: clinical manifestations and its treatment. Int. J. Dermatol. *44*, 846–850.

Safranek, T. J., Jarvis, W. R., Carson, L. A., Cusick, L. B., Bland, L. A., Swenson, J. M., and Silcox, V. A. (1987). Mycobacterium chelonae Wound Infections after Plastic Surgery

Employing Contaminated Gentian Violet Skin-Marking Solution. N. Engl. J. Med. 317, 197–201.

Saiman, L. *et al.* (2014). Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. Infect. Control Hosp. Epidemiol. *35 Suppl 1*, S1–S67.

Salah, I. B., Ghigo, E., and Drancourt, M. (2009). Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. Clin. Microbiol. Infect. *15*, 894–905.

Salsgiver, E. L., Fink, A. K., Knapp, E. A., LiPuma, J. J., Olivier, K. N., Marshall, B. C., and Saiman, L. (2016). Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. Chest *149*, 390–400.

Sampson, S. L. (2011). Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. Clin. Dev. Immunol. 2011, 497203.

Sánchez-Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T. F., Julián, E., Brambilla, C., and Luquin, M. (2011). Demonstration of cord formation by rough Mycobacterium abscessus variants: implications for the clinical microbiology laboratory. J. Clin. Microbiol. *49*, 2293–2295.

Sánchez, A., Espinosa, P., García, T., Mancilla, R., A, T., Mancilla, R., and I (2012). The 19 kDa Mycobacterium tuberculosis lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: a role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. Clin. Dev. Immunol. *2012*, 950503.

Sanguinetti, M., Ardito, F., Fiscarelli, E., La Sorda, M., D'Argenio, P., Ricciotti, G., and Fadda, G. (2001). Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant Mycobacterium abscessus in a patient with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. *39*, 816–819.

Sani, M. *et al.* (2010). Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins. PLoS Pathog. *6*, e1000794.

Sarma, S., Sharma, S., Baweja, U. K., and Mehta, Y. (2011). Mycobacterium abscessus bacteremia in an immunocompetent patient following a coronary artery bypass graft. J. Cardiovasc. Dis. Res. 2, 80–82.

Sassetti, C. M., Boyd, D. H., and Rubin, E. J. (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol. Microbiol. *48*, 77–84.

Sassetti, C. M., and Rubin, E. J. (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 12989–12994.

Sassi, M., and Drancourt, M. (2014). Genome analysis reveals three genomospecies in Mycobacterium abscessus. BMC Genomics 15, 359.

Satana, D., Erkose-Genc, G., Tamay, Z., Uzun, M., Guler, N., and Erturan, Z. (2014). Prevalence and drug resistance of mycobacteria in Turkish cystic fibrosis patients. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. *13*, 28.

Sayes, F. *et al.* (2012). Strong Immunogenicity and Cross-Reactivity of Mycobacterium tuberculosis ESX-5 Type VII Secretion -Encoded PE-PPE Proteins Predicts Vaccine Potential. Cell Host Microbe *11*, 352–363.

Scott, C. C., Botelho, R. J., and Grinstein, S. (2003). Phagosome Maturation: A Few Bugs in the System. J. Membr. Biol. *193*, 137–152.

Sekizuka, T., Kai, M., Nakanaga, K., Nakata, N., Kazumi, Y., Maeda, S., Makino, M., Hoshino, Y., and Kuroda, M. (2014). Complete Genome Sequence and Comparative Genomic Analysis of Mycobacterium massiliense JCM 15300 in the Mycobacterium abscessus Group Reveal a Conserved Genomic Island MmGI-1 Related to Putative Lipid Metabolism. PLoS One *9*, e114848.

Serafini, A., Boldrin, F., Palù, G., and Manganelli, R. (2009). Characterization of a Mycobacterium tuberculosis ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. J. Bacteriol. *191*, 6340–6344.

Sermet-Gaudelus, I. *et al.* (2003). Mycobacterium abscessus and children with cystic fibrosis. Emerg. Infect. Dis. *9*, 1587–1591.

Shallom, S. J., Moura, N. S., Olivier, K. N., Sampaio, E. P., Holland, S. M., and Zelazny, A. M. (2015). New Real-Time PCR Assays for Detection of Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the Mycobacterium abscessus Group. J. Clin. Microbiol. *53*, 3430–3437.

Shimono, N., Morici, L., Casali, N., Cantrell, S., Sidders, B., Ehrt, S., and Riley, L. W. (2003). Hypervirulent mutant of Mycobacterium tuberculosis resulting from disruption of the mce1 operon. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 15918–15923.

Shin, D.-M., Yang, C.-S., Yuk, J.-M., Lee, J.-Y., Kim, K. H., Shin, S. J., Takahara, K., Lee, S. J., and Jo, E.-K. (2008). *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. Cell. Microbiol. *10*, 1608–1621.

Siegrist, M. S., Unnikrishnan, M., McConnell, M. J., Borowsky, M., Cheng, T.-Y., Siddiqi, N., Fortune, S. M., Moody, D. B., and Rubin, E. J. (2009). Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 18792–18797.

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., Bottai, D., Frigui, W., Majlessi, L., and Brosch, R. (2015a). ESX/type VII secretion systems of mycobacteria: Insights into evolution, pathogenicity and protection. Tuberculosis *95*, S150–S154.

Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M. I., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015b). Cytosolic access of Mycobacterium tuberculosis: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. PLoS Pathog. *11*, e1004650.

Singh, S., Bouzinbi, N., Chaturvedi, V., Godreuil, S., and Kremer, L. (2014). In vitro evaluation of a new drug combination against clinical isolates belonging to the Mycobacterium abscessus complex. Clin. Microbiol. Infect. 20, O1124–O1127.

Smibert, O., Snell, G. I., Bills, H., Westall, G. P., and Morrissey, C. O. (2016). Mycobacterium abscessus Complex - a Particular Challenge in the Setting of Lung Transplantation. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. *14*, 325–333.

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. J., Efthimiou, J., Hodson, M. E., and Batten, J. C. (1984). Mycobacterial isolations in young adults with cystic fibrosis. Thorax *39*, 369–375.

Solomonson, M., Huesgen, P. F., Wasney, G. A., Watanabe, N., Gruninger, R. J., Prehna, G., Overall, C. M., and Strynadka, N. C. J. (2013). Structure of the mycosin-1 protease from the mycobacterial ESX-1 protein type VII secretion system. J. Biol. Chem. 288, 17782–17790.

Song, J. Y., Sohn, J. W., Jeong, H. W., Cheong, H. J., Kim, W. J., and Kim, M. J. (2006). An outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to Mycobacterium abscessus. BMC Infect. Dis. *6*, 6.

Sørensen, A. L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P., and Andersen, A. B. (1995). Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. *63*, 1710–1717.

Speert, D. P., Munson, D., Mitchell, C., Johnson, D. E., Thompson, T. R., Ferrieri, P., and Wannamaker, L. W. (1980). Mycobacterium chelonei septicemia in a premature infant. J. Pediatr. *96*, 681–683.

Spellberg, B., Yoo, T., and Bayer, A. S. (2004). Reversal of linezolid-associated cytopenias, but not peripheral neuropathy, by administration of vitamin B6. J. Antimicrob. Chemother. *54*, 832–835.

Srivastava, V., Rouanet, C., Srivastava, R., Ramalingam, B., Locht, C., and Srivastava, B. S. (2007). Macrophage-specific Mycobacterium tuberculosis genes: identification by green fluorescent protein and kanamycin resistance selection. Microbiology *153*, 659–666.

St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., and Nathan, C. (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 9901–9906.

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*.

Stanley, S. A., Johndrow, J. E., Manzanillo, P., and Cox, J. S. (2007). The Type I IFN Response to Infection with Mycobacterium tuberculosis Requires ESX-1-Mediated Secretion and Contributes to Pathogenesis. J. Immunol. *178*.

Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W., and Cox, J. S. (2003). Acute infection and macrophage subversion by Mycobacterium tuberculosis require a specialized secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 13001–13006.

Stavrum, R., Valvatne, H., Stavrum, A.-K., Riley, L. W., Ulvestad, E., Jonassen, I., Doherty, T. M., and Grewal, H. M. S. (2012). Mycobacterium tuberculosis Mce1 protein complex initiates rapid induction of transcription of genes involved in substrate trafficking. Genes Immun. *13*, 496–502.

Stinear, T. P. *et al.* (2007). Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of Mycobacterium ulcerans, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res. *17*, 192–200.

Stinear, T. P. et al. (2008). Insights from the complete genome sequence of

Mycobacterium marinum on the evolution of Mycobacterium tuberculosis. Genome Res. 18, 729–741.

Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U. E., and Russell, D. G. (1996). Mycobacteriumcontaining phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. EMBO J. *15*, 6960–6968.

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P., Chakraborty, P., Haddix, P., Collins, H., Fok, A., Allen, R., Gluck, S., Heuser, J., and Russell, D. (1994). Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science (80-.). *263*.

Su, S.-H., Chen, Y.-H., Tsai, T.-Y., Huang, S.-C., Lin, C.-Y., Chen, T.-C., and Lu, P.-L. (2013). Catheter-related Mycobacterium abscessus bacteremia manifested with skin nodules, pneumonia, and mediastinal lymphadenopathy. Kaohsiung J. Med. Sci. *29*, 50–54.

Sungkanuparph, S., Sathapatayavongs, B., and Pracharktam, R. (2003). Infections with rapidly growing mycobacteria: report of 20 cases. Int. J. Infect. Dis. 7, 198–205.

Swaim, L. E., Connolly, L. E., Volkman, H. E., Humbert, O., Born, D. E., and Ramakrishnan, L. (2006). Mycobacterium marinum infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. Infect. Immun. *74*, 6108–6117.

Swanson, J. (2006). CFTR: helping to acidify macrophage lysosomes. Nat. Cell Biol. 8, 908–909.

Swenson, J. M., Thornsberry, C., and Silcox, V. A. (1982). Rapidly growing mycobacteria: testing of susceptibility to 34 antimicrobial agents by broth microdilution. Antimicrob. Agents Chemother. 22, 186–192.

Swenson, J. M., Wallace, R. J., Silcox, V. A., and Thornsberry, C. (1985). Antimicrobial susceptibility of five subgroups of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae. Antimicrob. Agents Chemother. 28, 807–811.

Swetter, S. M., Kindel, S. E., and Smoller, B. R. (1993). Cutaneous nodules of Mycobacterium chelonae in an immunosuppressed patient with preexisting pulmonary colonization. J. Am. Acad. Dermatol. *28*, 352–355.

Tahara, M. *et al.* (2016). Disseminated Mycobacterium abscessus Complex Infection Manifesting as Multiple Areas of Lymphadenitis and Skin Abscess in the Preclinical Stage of Acute Lymphocytic Leukemia. Intern. Med. *55*, 1787–1791.

Talati, N. J., Rouphael, N., Kuppalli, K., and Franco-Paredes, C. (2008). Spectrum of CNS disease caused by rapidly growing mycobacteria. Lancet Infect. Dis. *8*, 390–398.

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.

Tanaka, E., Kimoto, T., Tsuyuguchi, K., Suzuki, K., and Amitani, R. (2002). Successful treatment with faropenem and clarithromycin of pulmonary Mycobacterium abscessus infection. J. Infect. Chemother. 8, 252–255.

Tang, P. *et al.* (2006). Outbreak of Acupuncture-Associated Cutaneous Mycobacterium Abscessus Infections. J. Cutan. Med. Surg. *10*, 166–169.

Taylor, J. L., and Palmer, S. M. (2006). Mycobacterium abscessus Chest Wall and Pulmonary Infection in a Cystic Fibrosis Lung Transplant Recipient. J. Hear. Lung Transplant. *25*, 985–988.

Tekaia, F., Gordon, S. V., Garnier, T., Brosch, R., Barrell, B. G., and Cole, S. T. (1999). Analysis of the proteome of Mycobacterium tuberculosis in silico. Tuber. Lung Dis. *79*, 329–342.

Thoma-Uszynski, S. *et al.* (2001). Induction of Direct Antimicrobial Activity Through Mammalian Toll-Like Receptors. Science (80-.). 291.

Thomas, V., Loret, J.-F., Jousset, M., and Greub, G. (2008). Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. Environ. Microbiol. *10*, 2728–2745.

Thomson, R. M. (2010). Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. Emerg. Infect. Dis. *16*, 1576–1583.

Thomson, R. M., Carter, R., Tolson, C., Coulter, C., Huygens, F., and Hargreaves, M. (2013). Factors associated with the isolation of Nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in Brisbane, Australia. BMC Microbiol. *13*, 89.

Titball, R. W. (1993). Bacterial phospholipases C. Microbiol. Rev. 57, 347-366.

Tomashefski, J. F. J., Stern, R. C., Demko, C. A., and Doershuk, C. F. (1996). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. An autopsy study. Am. J. Respir. Crit. Care Med.

Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin. Microbiol. Rev. *16*, 319–354.

Tortoli, E. *et al.* (2016). Emended description of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and Mycobacterium abscessus subsp. bolletii and designation of Mycobacterium abscessus subsp. massiliense comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *66*, 4471–4479.

Tortoli, E., Gabini, R., Galanti, I., and Mariottini, A. (2008). Lethal Mycobacterium massiliense Sepsis, Italy. Emerg. Infect. Dis. *14*, 984–985.

Tosetti, N., Croxatto, A., and Greub, G. (2014). Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. Microb. Pathog.

Toy, B. R., and Frank, P. J. (2003). Outbreak of Mycobacterium abscessus infection after soft tissue augmentation. Dermatol. Surg. *29*, 971–973.

Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat. Rev. Immunol. *10*, 210–215.

Tufariello, J. M. *et al.* (2016). Separable roles for Mycobacterium tuberculosis ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E348-57.

Uslan, D. Z., Kowalski, T. J., Wengenack, N. L., Virk, A., Wilson, J. W., R, B., (eds.), J. J., (eds.), P. M., and (eds.), Y. R. (2006). Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. Arch. Dermatol.

142, 607.

Varghese, B., Shajan, S. E., Al, M. O., and Al-Hajoj, S. A. (2012). First case report of chronic pulmonary lung disease caused by Mycobacterium abscessus in two immunocompetent patients in Saudi Arabia. Ann. Saudi Med. *32*, 312–314.

Via, L. E., Fratti, R. A., McFalone, M., Pagan-Ramos, E., Deretic, D., and Deretic, V. (1998). Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. J. Cell Sci., 897–905.

Viana-Niero, C., Lima, K. V. B., Lopes, M. L., Rabello, M. C. da S., Marsola, L. R., Brilhante, V. C. R., Durham, A. M., and Leão, S. C. (2008). Molecular characterization of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. J. Clin. Microbiol. *46*, 850–855.

Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2017). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. Mol. Microbiol. *104*, 889–904.

Villanueva, A., Calderon, R. V, Vargas, B. A., Ruiz, F., Aguero, S., Zhang, Y., Brown, B. A., and Wallace, R. J. (1997). Report on an outbreak of postinjection abscesses due to Mycobacterium abscessus, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Clin. Infect. Dis. 24, 1147–1153.

Villeneuve, C., Etienne, G., Abadie, V., Montrozier, H., Bordier, C., Laval, F., Daffe, M., Maridonneau-Parini, I., and Astarie-Dequeker, C. (2003). Surface-exposed Glycopeptidolipids of Mycobacterium smegmatis Specifically Inhibit the Phagocytosis of Mycobacteria by Human Macrophages. J. Biol. Chem. 278, 51291–51300.

Wallace, R. J., Glassroth, J., Griffith, D. E., Olivier, K. N., Cook, J. L., and Gordin, F. (1997). Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *156*, S1–S25.

Wallace, R. J., Swenson, J. M., Silcox, V. A., Good, R. C., Tschen, J. A., and Stone, M. S. (1983). Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. Rev. Infect. Dis. *5*, 657–679.

Wang, H., Jin, P., and Wu, Q. (2008). Disseminated cutaneous infection with Mycobacterium abscessus in a patient with a low CD4+ T cell count. Eur. J. Dermatol. *18*, 337–340.

Wards, B. J., de Lisle, G. W., and Collins, D. M. (2000). An esat6 knockout mutant of Mycobacterium bovis produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. Tuber. Lung Dis. *80*, 185–189.

Wassermann, R. *et al.* (2015). Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. Cell Host Microbe *17*, 799–810.

Watson, R. O., Bell, S. L., MacDuff, D. A., Kimmey, J. M., Diner, E. J., Olivas, J., Vance, R. E., Stallings, C. L., Virgin, H. W., and Cox, J. S. (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. Cell Host Microbe *17*, 811–819.

Watson, R. O., Manzanillo, P. S., and Cox, J. S. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. Cell *150*, 803–815.

Way, S. S., and Wilson, C. B. (2005). The Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 homologue in Listeria monocytogenes is dispensable for growth in vitro and in vivo. Infect. Immun. *73*, 6151–6153.

Wee, W. Y., Dutta, A., and Choo, S. W. (2017). Comparative genome analyses of mycobacteria give better insights into their evolution. PLoS One *12*, e0172831.

Weerdenburg, E. M., Abdallah, A. M., Mitra, S., de Punder, K., van der Wel, N. N., Bird, S., Appelmelk, B. J., Bitter, W., and van der Sar, A. M. (2012). ESX-5-deficient Mycobacterium marinum is hypervirulent in adult zebrafish. Cell. Microbiol. *14*, 728–739.

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.

Wenger, J. D., Spika, J. S., Smithwick, R. W., Pryor, V., Dodson, D. W., Carden, G. A., and Klontz, K. C. (1990). Outbreak of Mycobacterium chelonae infection associated with use of jet injectors. JAMA *264*, 373–376.

White, C. I., Birtles, R. J., Wigley, P., and Jones, P. H. (2010). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. Vet. Rec. *166*, 401–402.

Whittier, S., Olivier, K., Gilligan, P., Knowles, M., and Della-Latta, P. (1997). Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous mycobacteria in sputum samples from cystic fibrosis patients. The Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Grou. J. Clin. Microbiol. *35*, 2706–2708.

Williams, M. M., Yakrus, M. A., Arduino, M. J., Cooksey, R. C., Crane, C. B., Banerjee, S. N., Hilborn, E. D., and Donlan, R. M. (2009). Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 2091–2098.

Winthrop, K. L., McNelley, E., Kendall, B., Marshall-Olson, A., Morris, C., Cassidy, M., Saulson, A., and Hedberg, K. (2010). Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical Features. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *182*, 977–982.

Wong, K.-W., and Jacobs Jr, W. R. (2011). Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis. Cell. Microbiol. *13*, 1371–1384.

Woods, B. A. *et al.* (2011). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Approved standard, 2nd ed. CLSI document M24-A2. Clin. Lab. Stand. Institute, Wayne, PA.

Woods, G. L., Brown-Elliott, B. A., Desmond, E. P., Hall, G. S., Heifets, L., Pfyffer, G. E., Ridderhof, J. C., Wallace, R. J., Warren, N. G., and Witebsky, F. G. (2003). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Approved standard, 2nd ed. CLSI document M24-A. Clin. Lab. Stand. Institute, Wayne, PA 23.

Wu, S. et al. (2004). The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of

Mycobacterium tuberculosis in vivo. Mol. Microbiol. 51, 1551–1562.

Wyrostkiewicz, D., Skorupa, W., Jakubowska, L., Zabost, A., and Kuś, J. (2014). Mikobakterioza u chorych na mukowiscydozę — opis trzech przypadków. Pneumonol. Alergol. Pol. 82, 561–567.

Yang, S.-C., Hsueh, P.-R., Lai, H.-C., Teng, L.-J., Huang, L.-M., Chen, J.-M., Wang, S.-K., Shie, D.-C., Ho, S.-W., and Luh, K.-T. (2003). High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. *47*, 1958–1962.

Yang, S.-C., Hung, C.-F., Aljuffali, I. A., and Fang, J.-Y. (2015). The roles of the virulence factor IpaB in Shigella spp. in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. Microbiol. Res. *181*, 43–51.

Yoshida, S., Tsuyuguchi, K., Suzuki, K., Tomita, M., Okada, M., Hayashi, S., Iwamoto, T., and Saito, H. (2013). Further isolation of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and subsp. bolletii in different regions of Japan and susceptibility of these isolates to antimicrobial agents.

Yu, H. S., Jeong, H. J., Hong, Y.-C., Seol, S.-Y., Chung, D.-I., and Kong, H.-H. (2007). Natural occurrence of Mycobacterium as an endosymbiont of Acanthamoeba isolated from a contact lens storage case. Korean J. Parasitol. *45*, 11–18.

Zelazny, A. M. *et al.* (2009). Cohort study of molecular identification and typing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium massiliense, and Mycobacterium bolletii. J. Clin. Microbiol. *47*, 1985–1995.

Zhang, M., Chen, J. M., Sala, C., Rybniker, J., Dhar, N., and Cole, S. T. (2014). EspI regulates the ESX-1 secretion system in response to ATP levels in M ycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. *93*, 1057–1065.

Zhang, Y. J., Ioerger, T. R., Huttenhower, C., Long, J. E., Sassetti, C. M., Sacchettini, J. C., and Rubin, E. J. (2012). Global assessment of genomic regions required for growth in Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog. *8*, e1002946.

Zhang, Y., Yakrus, M. A., Graviss, E. A., Williams-Bouyer, N., Turenne, C., Kabani, A., and Wallace, R. J. (2004). Pulsed-field gel electrophoresis study of Mycobacterium abscessus isolates previously affected by DNA degradation. J. Clin. Microbiol. *42*, 5582–5587.

Zhou, X., He, X., Liang, J., Li, A., Xu, T., Kieser, T., Helmann, J. D., and Deng, Z. (2005). A novel DNA modification by sulphur. Mol. Microbiol. *57*, 1428–1438.

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

ANNEXES

ANNEXE 1 – Dubois *et al.* Article MmpL *M. abscessus*

Le criblage de la banque de mutants par transposition a également permis d'identifier un mutant dont le transposon s'était inséré dans un gène codant pour une protéine MmpL. Les protéines MmpL des mycobactéries sont impliquées dans le transport des lipides et les flux d'antibiotiques. La MmpL identifiée s'est avérée essentielle pour la croissance intracellulaire de *M. abscessus* en amibes et en macrophages, pour sa virulence en poisson zèbre et pour son adhérence et la création de dommages membranaires phagosomaux dans les macrophages. En collaboration avec les équipes de Laurent Kremer (Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier UMR9004, CNRS, Montpellier) et Yann Guérardel (Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR8576, CNRS, Villeneuve d'Ascq), nous avons pu identifier et caractériser structurellement un nouveau lipide transporté par cette MmpL chez *M. abscessus*.

Ce travail, en phase de rédaction, a permis l'identification d'un nouveau transporteur MmpL non encore caractérisé chez *M. abscessus* impliqué dans le transport d'un nouveau lipide requis pour la survie intracellulaire de *M. abscessus* dans les amibes et les macrophages ainsi que pour sa virulence dans le modèle animal d'embryon de poisson zèbre.

<u>Article</u>

A *Mycobacterium abscessus* MmpL involved in the transport of a new glycolipid essential to intracellular survival and virulence in zebrafish

Auteurs

Violaine Dubois, <u>Laura Laencina</u>, Albertus Viljoen, Vincent Le Moigne, Audrey Bernut, Faustine Dubar, Mickaël Blaise, Jean-Louis Gaillard, Yann Guérardel, Laurent Kremer, Jean-Louis Herrmann, Fabienne Girard-Misguich

A *Mycobacterium abscessus* MmpL involved in the transport of a new glycolipid essential to intracellular survival and virulence in zebrafish

Violaine Dubois¹, Laura Laencina^{1§}, Albertus Viljoen^{2§}, Vincent Le Moigne¹, Audrey Bernut², Faustine Dubar³, Mickaël Blaise², Jean-Louis Gaillard^{1,4}, Yann Guérardel³, Laurent Kremer^{2,5}, Jean-Louis Herrmann^{1,4*}, Fabienne Girard-Misguich^{1*}

¹2I, UVSQ, INSERM, Université Paris-Saclay, Versailles, France.

²Centre National de la Recherche Scientifique UMR9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier, France.

³CNRS UMR8576, IFR 147, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

⁴APHP, GHU PIFO, Hôpital Raymond Poincaré, Hôpital Ambroise Paré, Garches, Boulogne Billancourt, France.

⁵INSERM, IRIM, 34293 Montpellier, France.

*Correspondence to JLH and FGM: <u>jean-louis.herrmann@aphp.fr;</u> <u>fabienne.girard-</u> <u>misguich@uvsq.fr</u>

^{\$}contributed equally to this work.

Keywords: Mycobacterium abscessus, MmpL, lipid, transport, cell wall, virulence, macrophage, zebrafish

Introduction

One of the major features of pathogenic mycobacteria is their ability to survive in phagocytic cells, a property also shared with *M. abscessus* (Brambilla et al., 2016; Roux et al., 2016). The unique mycobacterial outer cell wall offers a major advantage to the bacteria in thriving during the hostpathogen interactions, by enabling bacteria to evade or resist elements of the cellular response, such as phagosome maturation, nitrosative and oxidative stress and nutrient limitation (Glickman et al., 2000; Makinoshima and Glickman, 2005). A large arsenal of enzymes and transporters participate in the biogenesis of a large set of unique cell wall (glycol)lipids (Cole et al., 1998). Impairment in the synthesis and/or transport of numerous lipids render mycobacteria more sensitive to the host responses (Cox et al., 1999; Pilar Domenech et al., 2005; Yu et al., 2012; Cambier et al., 2014). For example, attenuated M. tuberculosis mutants that cannot synthesize or transport a complex cell wall-associated lipid called phthiocerol dimycocerosate (PDIM) are unable to grow in the lungs of infected mice (Cox et al., 1999). The structurally related phenolic glycolipids (PGL) which are unique to pathogenic mycobacteria, are also required for the virulence of Mycobacterium marinum, a close pathogenic relative to M. tuberculosis, in zebrafish (Alibaud et al., 2011; Yu et al., 2012). Immune evasion by M. tuberculosis and M. marinum, was found to be mediated by PDIM that mask the underlying pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and PGL through involvement of a host chemokine receptor 2 (CCR2)-mediated pathway with a preferential recruitment and infection of permissive macrophages while evading microbicidal ones (Cambier et al., 2014).

In several non-tuberculous mycobacteria (NTM), such as *M. abscessus* or *Mycobacterium avium*, glycopeptidolipids (GPL) conditioning the smooth (S) morphotype can be regarded as lipids equivalent to PGL. The loss of synthesis and/or transport of the GPLs to the cell surface is sufficient to confer to NTM a rough (R) morphotype (Billman-Jacobe, 2004; Sondén *et al.*, 2005; Pawlik *et al.*, 2013). The *M. abscessus* R variant, for example, is linked to a more pronounced virulence phenotype than the *M. abscessus* S variant (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2009; Bernut *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015).

A recent study delineated the mechanism by which GPL inhibits apoptosis in macrophages infected with *M. abscessus* through direct interaction with the mitochondrial cyclophilin D, thus inhibiting bacterial spreading and hence virulence, further highlighting the important contribution of this class of lipids in the host cell/*M. abscessus* interactions (Whang *et al.*, 2017). Another class of lipids, the trehalose polyphleates, were recently shown to contribute to the highly aggregative phenotype associated with the R variant of *M. abscessus* (Llorens-Fons *et al.*, 2017), which might

contribute to cord formation, a physiopathological trait driving virulence of the R variant (Halloum *et al.*, 2016), but for which a direct role in *M. abscessus* virulence have yet to be demonstrated. To date no cell wall lipid unique to the *M. abscessus* clade have been implicated in intracellular survival or virulence. Mycobacterium membrane protein Large (MmpL) permeases are a subclass of the Resistance-Nodulation-cell-Division (RND) proteins containing 10 to 13 transmembrane domains which have been reported to translocate lipids trough the plasma membrane (Viljoen *et al.*, 2017). Lipids thought to be transported by MmpL include PDIM and PGL (MmpL7), sulfolipid (MmpL8), diacyl trehalose (MmpL10), GPL (MmpL4a and MmpL4b), monomeromycolyl diacylglycerol (MmpL11) and trehalose monomycolate (MmpL3), all of which have been implicated in *M. tuberculosis* or *M. abscessus* virulence (Chalut, 2016; Viljoen *et al.*, 2017).

A recent phenotypic screen of a transposon mutant library generated in *M. abscessus* subsp. *massiliense* performed in amoeba and macrophages unraveled the importance of the ESX-4 type 7 secretion system in intracellular survival (Laencina et al., submitted). Herein, we have set forth a similar approach to identify a yet uncharacterized MmpL transporter specific to *M. abscessus* and participating in the transport of a new lipid required for optimal survival in amoebae and macrophages as well as for virulence in zebrafish.

Results

Identification of a new M. abscessus MmpL crucial for intracellular survival.

A *Tn* mutant library constructed in the *M. abscessus* subsp *bolletii* 43S smooth clinical isolate, was originally screened for survival in *Acanthamoeba castellanii* amoebae and J774.2 murine macrophages (M Φ) (Laencina *et al.*, submitted). The *Tn* insertion site from 67 selected mutants was cloned and sequenced allowing the identification of 33 genes that had incorporated the *Tn* into their coding sequences. Six mutants exhibiting a Growth Index (GI) below 0.5 in M Φ compared to the wild- type (WT) strain (**Figure 1A**), carried insertions of the *Tn* in genes belonging to the M (cell wall/membrane/envelope biogenesis) or I (lipid transport and metabolism) Cluster of Orthologous Groups (COG) categories (**Table 1**). One of these mutants (55F6) was highly attenuated in both amoebae and M Φ (**Figure 1A**). In this mutant, the *Tn* insertion occurred in the gene *MYCMA_0439*, encoding a membrane protein which is orthologous to Mabs CIP104536^T *MAB_0855*, encoding a putative MmpL protein (**Table 1**). We next assessed the survival kinetic of 55F6 in amoebae and M Φ at different time points (**Figure 1B**). Strikingly, the kinetic confirmed the pronounced attenuation phenotype of the mutant at the early stages of the

infection (1dpi) which remained significant throughout the course of the infection as compared to the parental strain (**Figure 1B**).

MAB_0855 exports a new glycolipid in M. abscessus.

Upstream of *MAB_0855* are located several genes, in a possible operon configuration with *MAB_0855*, that encode proteins implicated in lipid transport and metabolism (**Figure 2**). Indeed, a putative lipase/esterase LipP is found but also two Fad proteins (Fad A and Fad B) that are implicated in the β-oxidation of fatty acids, a polyketide synthase (PKS)-associated protein (PapA2) as well as a putative PKS (*MAB_0859*) thought to participate in the biosynthesis and assembly of complex mycobacterial cell wall lipids (Kolattukudy *et al.*, 1997). Altogether, the genetic context of *MAB_0855* suggests that the MAB_0855 protein might be implicated in the transport of a complex lipid across the cell wall.

Regarding the conservation of this gene cluster, we could not find any synteny conservation between MAB 0852 and MAB 0859 in saprophytic RGM, opportunistic or pathogenic SGM, with the exception of *M. chelonae*, to be a unique signature characterizing the *M. abscessus* complex (Figure 2A). This *M. abscessus*-containing specific region was also found in *M.* immunogenum, albeit in an inverted orientation with respect to the M. abscessus genome organization. Noteworthy, although the cluster is mostly split apart when compared to other mycobacteria, some genes are conserved in synteny in *M. tuberculosis*, upstream *MAB* 0852 and downstream MAB 0859, suggesting that in between those genes a deletion might have occurred. When focusing on MAB 0855 gene itself, we observed that its conservation among mycobacteria is also intriguing. We found an orthologous gene of MAB 0855 in Mycobacterium smegmatis (MSMEG 4747) that encodes an MmpL12 protein, assumed transporter of lipooligosaccharides (LOS) (Ref), lipid compound absent in M. abscessus. Two additional orthologs of MAB 0855 are found in LOS-producing mycobacteria, slow (Mycobacterium kansasii MKAN 27530) and fast (Mycobacterium gastri MGAS 07340) growing (Figure 2B). Finally, when comparing the conservation of MAB 0855 to MAB 0937c (orthologous gene of *M. tuberculosis mmpL10*), it appears that MAB 0937c is better conserved in both SGM and RGM. Higher Best Hit scores were obtained, and for MAB 0855, the conservation pattern was unusual. We did not observe difference between mean scores obtained with SGM and RGM genes (50.68 ± 1.65 and 51.72 ± 1.87 respectively). Taken together, these observations confirmed that the MAB 0855 locus and the MAB 0855 gene itself were specific to the MCC.

Modifications of the cell wall possibly linked to *Tn* insertion in *MAB* 0855 were first analyzed by thin layer chromatography (TLC). A systematic approach utilizing a range of 2D TLCs of apolar and polar lipids extracted from the either 55F6 or from its 43S progenitor strain initially failed to reveal any clear differences in their lipid profiles (Figure S1). However, a 1D TLC that offers good separation of abundant glycolipids, such as GPL and TDM, allowed identification of a chaplet of lipids whose amounts appeared to be severely decreased in 55F6 as compared to the 43S parental strain (Figure 3A). These lipids exhibited an apparent Rf value that was smaller than that of the GPL. To further corroborate this phenotype, defined deletion mutants were generated in both the *M. abscessus* CIP104536^T S and R variants by allelic exchange of the *MAB* 0855 open reading frame with a zeocin resistance-conferring cassette using the recombineering strategy (van Kessel and Hatfull, 2007) (Figure S2). The mutants were confirmed through a combination of PCR and sequencing analysis (Figure S2) and subsequently complemented by transformation with an integrative plasmid containing an intact copy of MAB 0855. As was the case for the 55F6, no apparent and reproducible differences in the lipid profiles of the deletion mutants and their parental progenitor complemented strains could be observed by 2D TLC (Figure S1). However, 1D TLC analysis again revealed that the same chaplet of lipids whose expression levels were affected in 55F6 were decreased in both the S and R *M. abscessus* $\Delta 0855$ deletion mutants compared to their respective wild-type strains (Figure 3A). In particular, the expression level of one lipid, from here on referred to as lipid 0855, migrating close to the GPL, was markedly different between mutant and wild-type strains, which was especially apparent in the R variant background (Figure 3A). Partial restoration of this lipid's expression was observed in the complemented rough M. *abscessus* $\Delta 0855$ strain when twice the normal amount of material was loaded on the TLC (Figure **3A**, right panel). Owing to its relative abundance, we decided to focus our attention on lipid 0855 for structural determination, which is transported by MAB 0855.

Structural characterization of lipid 0855. Yann Guérardel

MAB_0855 plays a role in M. abscessus ex vivo and in vivo survival and virulence.

When it comes to *M. abscessus* virulence, a little is known about the contribution of the MmpL family despite a large amount of MmpL proteins in the *M. abscessus* group (Viljoen *et al.*, 2017). A few studies in *M. tuberculosis* showed that some MmpL implicated in shaping the cell-wall play a key role in the bacilli intracellular survival (Lamichhane *et al.*, 2005). When comparing *M. abscessus* MmpL to those of *M. tuberculosis*, only half of *M. tuberculosis* MmpL are found in

BBH with *M. abscessus* MmpL suggesting that M. abscessus MmpL might play different roles (**Figure 4A**). Plus, the diversification of the MmpL family in *M. abscessus* illustrated by tandem duplications of the *mmpL4* gene and *M. abscessus* MmpL specific clades (blue and red spots, **Figure 4A**) might reflect adaptation to its lifestyle. However, regarding MAB_0855, a phylogenetic proximity is found with *M. tuberculosis* MmpL8 and 12 in particular, MmpL10 orthologue being known as MAB_0937c . Deciphering whether or not those two MmpL were sufficient to restore the WT phenotype in the MAB_0855 mutant might thus give a clue on MAB_0855 function.

For the ensuing part of the study, we thus focused on the MAB 0855 knock-out mutants that were generated in the fully sequenced and annotated *M. abscessus* CIP104536^T S and R type strains (Ripoll et al., 2009). To further confirm the role of MAB 0855 in M. abscessus virulence, infection studies were performed with S variant of *M. abscessus* $\Delta 0855$ for which a defect in intracellular survival was observed in murine macrophages compared to the WT strain ($P \le 0.0001$) (Figure **4B**). Restoration of the wild-type intracellular survival phenotype was obtained upon functional complementation of the mutant with both MAB 0855 (Mabs $\Delta 0855::0855^{MAB}$) and its M. equivalent MYCMA 0439 (Mabs $\triangle 0855::0439^{MMAS}$) (Figure **4B)**. massiliense Full complementation with either gene confirmed their role in *M. abscessus* intracellular survival. Complementation with the *M. tuberculosis* genes (*mmpL8*, *mmpL10* and *mmpL12*) showing the highest homology to MAB 0855 (Figure 4A) was observed only with mmpL8 and mmpL12 (Figure 4B). This confirms the phylogenetic proximity of these genes to MAB 0855 at the functional level.

Next, the virulence of the R *Mabs_\Delta 0855* was compared to its wild-type counterpart and assessed in the zebrafish model of infection (Bernut *et al.*, 2014; Bernut *et al.*, 2015). While the S form failed to kill zebrafish embryos, infection with R variant led to the typical death kinetic over a 13days period after infection (Bernut *et al.*, 2014). The rapid larval death and hypervirulence of the R variant is directly mediated by the high propensity of this variant to form large serpentine cords that cannot be phagocytozed by macrophages (Bernut *et al.*, 2014; Bernut *et al.*, 2015; Halloum *et al.*, 2016). Strikingly, the R *Mabs_\Delta 0855* was significantly impaired in its ability to kill zebrafish (**Figure 5A**). In comparison, complementation of this mutant with an intact copy of *MAB_0855* partially restored virulence (**Figure 5A**). A deeper analysis of the R *Mabs_\Delta 0855* attenuation revealed a strong defect in granuloma formation in infected embryos as judged the low percentage of embryos containing granulomas as well as the lower numbers of granulomas per embryo (**Figure 5B**).

MAB_0855 is required for adherence of *M. abscessus* to macrophages and phagosome membrane damage.

To decipher the role played by MAB 0855 in interaction between phagocytozed M. abscessus and its host cells, we first assessed the adhesion ability of the S Mabs $\Delta 0855$ mutant to murine macrophages by flow cytometry. The cells with adherent bacteria form a population that is well separated from the non-adherent bacteria who co-localized with cellular debris (Figure 6A). We observed a two-fold decrease in cell adherence ability for the mutant compared to the WT strain (Figure 6A). Next, the acidification of phagosomes in macrophages infected with the S *Mabs* $\Delta 0855$ mutant and complemented strains was assessed using an intra-phagosomal pH assay (Roux et al., 2016). Phagosome acidification is a hallmark of maturation of phagosomes and phagolysosome formation and we previously showed that while R M. abscessus phagosomes rapidly acidify following phagocytosis, this was completely impeded by S M. abscessus (Roux et al., 2016). The S Mabs $\Delta 0855$ behaved not differently from its corresponding parental strain in this assay, maintaining its phagosomal compartment pH at around 6.4, well above the acidic values observed with the heat-killed (HK) M. abscessus control (Figure 6B). This suggests that the reduced intracellular survival observed upon inactivation of MAB 0855 in macrophages and amoeba is not linked to the phagosomal acidification process. Recently, we demonstrated using Fluorescence Energy Transfer (FRET) and electron microscopy, that the *M. abscessus* S variant is able to establish cytosolic contact in human THP-1 cells and in murine bone-marrow derived macrophages, respectively (Roux et al., 2016). Compellingly, using the same FRET assay, the ability of S *Mabs* $\Delta 0855$ to establish a cytosolic contact was impaired at 20 hours post-infection and this defect persisted over time (Figure 6C), suggesting that MAB 0855 may participate in disruption of the phagosomal membrane. The macrophage cytokine response was next assayed following infection with the various M. abscessus strains, unveiling a pronounced decrease in IL-1β secretion over the time (Majlessi and Brosch, 2015; Wassermann *et al.*, 2015) (Figure 6D), thus further corroborating the decreased ability of the mutant to establish cytosol communications. Taken together, these results suggest that the decreased survival of *Mabs* $\Delta 0855$ in macrophages is likely to result from a combination of events including a decreased capacity to adhere to macrophages and a defect in the ability to induce cytosol communications.

Discussion

Twelve MmpL (MmpL1 to MmpL12) were initially identified in *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Several were shown to be involved in *M. tuberculosis* virulence (Lamichhane *et al.*, 2005; P. Domenech *et al.*, 2005). A search for MmpL proteins by multiple blast analyses against the *M. abscessus* proteome revealed the existence of 31 MmpL in the Pasteur collection strain of *M. abscessus* (equivalent to ATCC 19977) (Viljoen *et al.*, 2017). A motif analysis performed with InterProScan 5 confirmed the belonging of MAB_0855 protein to the MmpL family (Supplementary Figure 1), a family of transporters for which a role in lipid transport has first been reported in *M. tuberculosis* (Viljoen *et al.*, 2017). MAB_0855 protein depicts all the characteristics of a functional MmpL: 12 helical transmembrane domains (TMD) along its length, two extracytoplasmic loops between TMD1/2 and TMD7/8. Also noteworthy, MAB_0855 possesses an additional Sterol Sensing Domain (SSD), a cluster of five membrane-spanning segments that confers sensitivity to regulation by sterol (Supplementary Figure 1). Alternatively, the SSD may interact with other lipids than cholesterol. A description of the *MAB_0855* locus (*MAB_0845:MAB_0864*) is given (Supplementary Figure 2).

Material and methods

Strains, cells and culture conditions.

Mycobacterial strains were grown aerobically at 37°C in Middlebrook 7H9 and on 7H11 medium supplemented with 0.2% glycerol and 1% glucose. *Escherichia coli* was grown on Luria Bertani (LB) medium with or without kanamycin (25 μ g/ml). When necessary, kanamycin, hygromycin and zeocin were added in the growth medium at 250, 1000 and 100 μ g/ml respectively.

Mouse BALB/c monocyte J774.2 macrophages (Sigma-Aldrich) were grown at 37°C under 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Calf Serum (FBS), penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (100 UI/mL).

The human pro-monocytic cell line THP-1 was maintained in RPMI 1640 glutamax and 10% heatinactivated FBS at 37°C under 5% CO₂. For differentiation into monocytes, 10^6 THP-1 cells were seeded into 12-well plates and treated with 20 ng/ml of PMA (Sigma) for 72 h. *Acanthamoeba castellanii* (ATCC[®] 30010TM) was grown at room temperature in PYG Broth (Rowbotham, 1983) for amplification.

Transposon mutant selection and identification of the *Tn* insertion.

Selection of *Tn* mutants defective for growth in amoebae and macrophages and identification of the *Tn* insertion site were performed as described previously (Laencina et al., submitted). *Tn* insertion sites were identified by nucleotide BLAST comparison against the *Tn* sequence and the *Mycobacterium massiliense GO 06* genome hosted by NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). To confirm the Blast results, the disrupted regions were amplified by PCR using purified genomic DNA obtained from the mutant and primer that hybridizes within the disrupted gene, downstream of the *Tn* insertion site (primer used for the 55F6::*Tn* mutant: 5' AATTCAACGCGGTACGTAGC 3').

MAB_0855 gene and locus characterization.

A protein motif analysis was carried out with InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005) to confirm the membership of the 55F6::*Tn* disrupted gene to the MmpL family. In addition, orthologs of the identified gene were searched using the OPSCAN program developed by Morgat *et al.* (unpublished) with the « -H » and « -O » options, enabling the identification of a Bidirectional Best Hits (BBH) (<u>http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/opscan/</u>). The first similarity scan was performed with a fastp algorithm. Since the identity matrix is used, the score obtained corresponds to the percentage of amino-acid identity of the partial alignment. This score is normalized in the 0-100 range, with a score of 100 being the longest sequence aligned with itself. A list of Best Hits

was obtained by replacing the « -O » option with the « -S » option. Best Hits displayed a score higher than 40. All proteins encoded by genes from the *MAB_0855* locus (from *MAB_0845* to *MAB_0864*) were also submitted to InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005) to check their annotation and to further predict functions for the proteins encoded by them, when no functional annotation was provided. The *MAB_0855* locus conservation was assessed by a BBH search in the *M. abscessus* closest relative species: *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium immunogenum*. Comparisons with saprophytic (*Mycobacterium smegmatis*), opportunistic (*M. avium*) and strictly pathogenic (*M. tuberculosis*) species were also performed. The loci were drawn with the genoPlotR package (Guy *et al.*, 2010).

Construction of the MAB_0855 knock out in the M. abscessus subsp abscessus type strain.

A knockout was performed in the *M. abscessus subsp abscessus* S and R CIP 104536^T strains as previously described using the recombineering approach (van Kessel and Hatfull, 2007; Medjahed and Reyrat, 2009; Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Le Moigne *et al.*, 2016). Complementation was performed by electrotransforming the mutant strains with the integrative vector pMVZH361::*MAB_0855*. Complementation studies with the *M. tuberculosis* closest homologous genes to *MAB_0855*: *Rv1183* (*MmpL10*), *Rv1522c* (*MmpL12*), *Rv3823c* (*MmpL8*) were performed in a similar fashion.

Infection, adhesion and phagosomal escape assays with macrophages.

M Φ infection experiments with the WT, mutant and complemented *M. abscessus* strains were performed as described (Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Roux *et al.*, 2016). Briefly, cells were exposed for 3 hours to an MOI of 10 to 20 bacteria per cell in order to obtain similar bacterial uptake for the different strains. After 3 hours of incubation at 37°C, medium with bacteria was removed, and new medium containing amikacin at 250 µg/ml was added for one hour. At the end of the one-hour period, cells were thoroughly washed 3 times with PBS, and incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂. Cells were then lysed with ice-cold water at different time points and 10fold serial dilutions were plated on selective agar medium. CFU were counted after 3 to 5 days of incubation at 37°C.

Adhesion experiments with murine M Φ were performed by flow cytometry based on the method described by (Hytönen *et al.*, 2006). Prior to infection, log-phase bacteria were stained with CFDA-se 50 μ M (Molecular probes) for 20 min at 37°C with end-over-end rotation, washed twice with cold PBS and kept on ice, protected from light. In the meantime, M Φ were washed twice with DMEM, scraped and resuspended in DMEM medium. The cells were incubated at 4°C for 30 min

with gentle agitation before the infection. Fifty thousand cells were infected with the bacterial strains at a high MOI (100 bacteria per cell) to favor bacteria-cell contact, then incubated back at 4° C for 45 min with gentle agitation. The cell-bacteria incubations were carried out in three parallel tubes and the experiments were repeated twice with new batches of M Φ and labeled bacteria. After the adhesion step, the cells were fixed with no washing by adding 1 vol. of 4% w/v paraformaldehyde in PBS for 15 min. The fluorescent intensity of the cells with adherent bacteria was measured with BD Fortessa equipment (Becton Dikinson Biosciences). The data obtained from the flow cytometer were analyzed using BD FACSDIVA software and the FlowJo software (Star, OR, USA).

Assessment of the phagosome acidification and assessment of the phagosomal escape by FRET after THP-1 M Φ infection were performed as previously described (Simeone *et al.*, 2012).

Cytokine assays.

IL-1ß was measured as previously described (Groschel *et al.*, 2017). Briefly, supernatants were collected at different time points after infection of human THP-1 macrophages by *M. abscessus* WT, mutant and complemented strains as described above, and cytokine measurement was performed using the ELISA DY201-05 pre-coated plates (Bio-techno).

Zebrafish infections.

All zebrafish experiments were approved by the Direction Sanitaire et Vétérinaire de l'Hérault et Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale de la région Languedoc Roussillon under the reference CEEA-LR-1145. Experiments were done using the *golden* mutant (Lamason *et al.*, 2005) crossed with wild-type AB zebrafish, maintained as described earlier (Bernut *et al.*, 2014). Ages of embryos are expressed as hours post fertilization (hpf). Each *M. abscessus* strain was prepared for infection as described previously (Bernut *et al.*, 2014). Zebrafish were infected and mortality, CFU and granuloma formation were monitored throughout the study period as described previously (Bernut *et al.*, 2014).

Lipid analyses.

Exponentially growing bacteria were plated on $7H10^{OADC}$ agar plates (100 µL per plate) and incubated for 1 week at 37°C until a dense lawn of bacterial growth was obtained. Subsequently, bacteria were collected using an inoculation loop and suspended in PBS, autoclaved for 10 min at 121°C, washed thrice with PBS, flash frozen in liquid nitrogen and freeze dried. Apolar and polar

lipid fractions were extracted from exactly 50 mg of freeze dried material and subsequently analyzed by thin layer liquid chromatography as previously described method (Besra, 1998).

Statistical analysis.

Two-way ANOVA were used for all comparisons (GraphPad Prism version 6.0d; GraphPad Software, Inc). A *p*-value less than 0.05 was considered significant (ns = non-significant, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ***p < 0.001).

References

Alibaud, L., Rombouts, Y., Trivelli, X., Burguière, A., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., Dubremetz, J.-F., Guérardel, Y., Lutfalla, G., and Kremer, L. (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.

Bakala N'Goma, J.C., Le Moigne, V., Soismier, N., Laencina, L., Le Chevalier, F., Roux, A.-L., Poncin, I., Serveau-Avesque, C., Rottman, M., Gaillard, J.-L., et al. (2015). Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. Infect. Immun. *83*, 780–791.

Bechara, C., Macheras, E., Heym, B., Pages, A., and Auffret, N. (2010). Mycobacterium abscessus skin infection after tattooing: first case report and review of the literature. Dermatol. Basel Switz. *221*, 1–4.

Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014a). Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E943-52.

Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014b). Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E943-952.

Bernut, A., Dupont, C., Sahuquet, A., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2015). Deciphering and imaging pathogenesis and cording of Mycobacterium abscessus in zebrafish embryos. J Vis Exp *103*, e53130.

Bernut, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., Brosch, R., de Chastellier, C., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2016). Insights into the smooth-to-rough transitioning in Mycobacterium bolletii unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. Mol. Microbiol. *99*, 866–883.

Bryant, J.M., Grogono, D.M., Greaves, D., Foweraker, J., Roddick, I., Inns, T., Reacher, M., Haworth, C.S., Curran, M.D., Harris, S.R., et al. (2013). Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. Lancet *381*, 1551–1560.

Bryant, J.M., Grogono, D.M., Rodriguez-Rincon, D., Everall, I., Brown, K.P., Moreno, P., Verma, D., Hill, E., Drijkoningen, J., Gilligan, P., et al. (2016). Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. Science *354*, 751–757.

Burbaud, S., Laval, F., Lemassu, A., Daffé, M., Guilhot, C., and Chalut, C. (2016). Trehalose Polyphleates Are Produced by a Glycolipid Biosynthetic Pathway Conserved across Phylogenetically Distant Mycobacteria. Cell Chem. Biol. *23*, 278–289.

Byrd, T.F., and Lyons, C.R. (1999). Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection. Infect. Immun. *67*, 4700–4707.

Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B., Cosma, C.L., and Ramakrishnan, L. (2014). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. Nature *505*, 218–222.

Catherinot, E., Roux, A.-L., Macheras, E., Hubert, D., Matmar, M., Dannhoffer, L., Chinet, T., Morand, P., Poyart, C., Heym, B., et al. (2009). Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus. J. Clin. Microbiol. *47*, 271–274.

Chernenko, S.M., Humar, A., Hutcheon, M., Chow, C.-W., Chaparro, C., Keshavjee, S., and Singer, L.G. (2006). Mycobacterium abscessus infections in lung transplant recipients: the international experience. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. *25*, 1447–1455.

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.

Cortesia, C., Lopez, G.J., de Waard, J.H., and Takiff, H.E. (2010). The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. J. Antimicrob. Chemother. *65*, 2574–2581.

Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R. (1999). Complex lipid determines tissuespecific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice. Nature *402*, 79–83.

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.

Floto, R.A., Olivier, K.N., Saiman, L., Daley, C.L., Herrmann, J.-L., Nick, J.A., Noone, P.G., Bilton, D., Corris, P., Gibson, R.L., et al. (2016). US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. Thorax *71*, 88–90.

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

Griffith, D.E. (2011). The Talking Mycobacterium abscessus Blues. Clin. Infect. Dis. *52*, 572–574.

Griffith, D.E., Girard, W.M., and Wallace, R.J. (1993). Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. Am. Rev. Respir. Dis. *147*, 1271–1278.

Groschel, M.I., Sayes, F., Shin, S.J., Frigui, W., Pawlik, A., Orgeur, M., Canetti, R., Honore, N., Simeone, R., van der Werf, T.S., et al. (2017). Recombinant BCG Expressing ESX-1 of Mycobacterium marinum Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. Cell Rep *18*, 2752–2765.

Guy, L., Roat Kultima, J., and Andersson, S.G.E. (2010). genoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. Bioinformatics *26*, 2334–2335.

Halloum, I., Carrère-Kremer, S., Blaise, M., Viljoen, A., Bernut, A., Le Moigne, V., Vilchèze, C., Guérardel, Y., Lutfalla, G., Herrmann, J.-L., et al. (2016). Deletion of a dehydratase important for intracellular growth and cording renders rough Mycobacterium abscessus avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E4228-4237.

Hytönen, J., Haataja, S., and Finne, J. (2006). Use of flow cytometry for the adhesion analysis of Streptococcus pyogenes mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator Rgg. BMC Microbiol. *6*, 18.

Jönsson, B.E., Gilljam, M., Lindblad, A., Ridell, M., Wold, A.E., and Welinder-Olsson, C. (2007). Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. *45*, 1497–1504.

Lamason, R.L., Mohideen, M.-A.P.K., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Jurynec, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., et al. (2005). SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. Science *310*, 1782–1786.

Lamichhane, G., Tyagi, S., and Bishai, W.R. (2005). Designer Arrays for Defined Mutant Analysis To Detect Genes Essential for Survival of Mycobacterium tuberculosis in Mouse Lungs. Infect. Immun. *73*, 2533–2540.

Makinoshima, H., and Glickman, M.S. (2005). Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. Nature *436*, 406–409.

Medjahed, H., Gaillard, J.-L., and Reyrat, J.-M. (2010). Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. Trends Microbiol. *18*, 117–123.

Le Moigne, V., Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., Gaillard, J.-L., Kremer, L., Herrmann, J.-L., and Blanc-Potard, A.-B. (2016). MgtC as a Host-Induced Factor

and Vaccine Candidate against Mycobacterium abscessus Infection. Infect. Immun. *84*, 2895–2903.

Olivier, K.N., Weber, D.J., Wallace, R.J., Faiz, A.R., Lee, J.-H., Zhang, Y., Brown-Elliot, B. a, Handler, A., Wilson, R.W., Schechter, M.S., et al. (2003). Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *167*, 828–834.

Pawlik, A., Garnier, G., Orgeur, M., Tong, P., Lohan, A., Le Chevalier, F., Sapriel, G., Roux, A.-L., Conlon, K., Honoré, N., et al. (2013). Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus. Mol. Microbiol. 1–18.

Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., and Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. Nucleic Acids Res. *33*, W116-20.

Qvist, T., Taylor-Robinson, D., Waldmann, E., Olesen, H.V., Hansen, C.R., Mathiesen, I.H., Høiby, N., Katzenstein, T.L., Smyth, R.L., Diggle, P.J., et al. (2016). Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. J. Cyst. Fibros. *15*, 380–385.

Roux, A.-L., Catherinot, E., Ripoll, F., Soismier, N., Macheras, E., Ravilly, S., Bellis, G., Vibet, M.-A., Le Roux, E., 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.

Roux, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., Deramaudt, T., Rottman, M., Gaillard, J.-L., Majlessi, L., et al. (2016). The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages. Open Biol. *6*.

Rowbotham, T.J. (1983). Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J. Clin. Pathol. *36*, 978–986.

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.

Sondén, B., Kocíncová, D., Deshayes, C., Euphrasie, D., Rhayat, L., Laval, F., Frehel, C., Daffé, M., Etienne, G., and Reyrat, J.-M. (2005). Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. Mol. Microbiol. *58*, 426–440.
Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2017a). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. Mol. Microbiol. *104*, 889–904.

Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2017b). The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. Mol. Microbiol. *104*, 889–904.

Yu, J., Tran, V., Li, M., Huang, X., Niu, C., Wang, D., Zhu, J., Wang, J., Gao, Q., and Liu, J. (2012). Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of Mycobacterium marinum. Infect. Immun. *80*, 1381–1389.

Table 1: *Tn* disrupted genes in Mma 43S attenuated mutants in macrophages that are implicated in the cell wall biology, lipid transport and metabolism.

Tn mutants	Mabs Mma disrupted gene and corresponding protein	Mabs CIP corresponding gene and encoded-protein
47H4	<i>MYCMA_09125</i> : modD	MAB_2436: conserved hypothetical protein
51H4	MYCMA_08185: mammalian cell entry protein mce	None
52B6	<i>MYCMA_0991</i> : nitrate ABC transporter substrate- binding protein	MAB_1915: probable fatty-acid-coa ligase FadD
55F6	MYCMA_0439: membrane protein	MAB_0855: putative membrane protein, MmpL family
57C7	MYCMA_2554: acyl-CoA synthetase / activates fatty acids by binding to coenzyme A	MAB_4626c: probable fatty-acid-CoA ligase FadD
58C5 58E5	MYCMA_0056: oxidoreductase	MAB_0090c: probable oxidoreductase EphD

Table 2: Primers, strains, constructs used in this study.

En cours.

Figure legends

Figure 1. Identification of a putative MmpL required for intracellular replication in both amoebae and macrophages from a *Tn* library screen. (A) *Tn* mutants impaired in their intracellular survival compared to the WT strain (Growth Index) in amoeba and macrophages which the *Tn* insertion occurred in a gene implicated in lipid metabolism/transport or parietal processes. Amoebae (*A. castellanii*) and murine macrophages were infected at an MOI of 10 and lysed at different days p.i. (2 days and 3 days p.i., respectively) prior to CFU determinations. The mutant *Tn* insertion site was cloned to identify the disrupted genes. Identified genes were categorized with the COG classification. (B) Survival kinetic of 55F6 compared to the wild-type progenitor inside amoeba (left) and macrophages (right). Cells were infected at an MOI of 10 and lysed at different days p.i. for the CFU counting: 3h (day 0), 1 day and 2 days (amoebae) or 3 days (macrophages). For reference, the growth index of 55F6 in the original phenotypic screen on cells shown in panel A is indicated by a black horizontal line. Histograms with error bars represent means \pm SD calculated using data from three independent experiments. Differences between means were analyzed by two-way ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed. **** *P*<0.0001.

Figure 2. Exclusive phylogenetic conservation of the *MAB_0855* locus in the *M. abscessus* clade. BBH were inferred with the Opscan program and are depicted with different colors according to the score (40-100) obtained against the reference *M. abscessus* CIP104536^T strain. The chromosomal loci encompassing the relevant genes depicted in the figure were built with the GenoPlotR package. A grey band links BBH genes. Genes exhibiting BBH towards *MAB_0855* are represented by bold arrows. Genes for which no BBH was obtained are depicted in grey.

Figure 3. Expression of a polar lipid is altered by deletion of MAB_0855 . (A) TLC showing decreased expression of a set of polar lipids in strains lacking MAB_0855 . Polar lipids extracted from freeze dried bacteria were separated once by TLC using chloroform/methanol/water (90:10:1 v/v/v) as solvent system. TLCs were subsequently orcinol (0.1% w/v in a 20% v/v H₂SO₄ solution) and charred by heating to reveal lipids. The presence of a particular lipid (lipid 0855, indicated with a red arrow) is dramatically decreased in the mutant, which is particularly evident in the *M. abscessus* R background lacking GPLs. Inset on right shows partial restoration of the expression of the MAB_0855 lipid in the mutant strain complemented with MAB_0855. To clearly observe complementation, double the amount of material loaded on the TLC in the left panel were loaded. (B) MS, (C) NMR, (D) lipid structure (Yann).

Figure 4. Disruption of the MAB 0855 impacts on M. abscessus virulence. (A) MAB 0855 gene phylogenetic position among *M. tuberculosis* MmpL transporters. *M. abscessus* and *M.* tuberculosis phylogeny was inferred by Maximum Likelihood using the PHYML software and the aLRT statistic. The aLRT statistic values over 0.9 are indicated. Bar, 0.5 estimated amino acids substitution. When a BBH was found, the BBH score was indicated. A zoom on the MAB 0855containing clade (deep blue spot) shows the proximity of MAB 0855 to M. tuberculosis mmpL8, mmpL10 and mmpL12 genes. A functionally orthologous M. abscessus gene for the M. tuberculosis mmpL10 gene is known (MAB 0937c) (Burbaud et al., 2016) that directly clusters with it. (B) Murine macrophages were infected at an MOI of 10 with the S Mabs $\Delta 0855$ mutant as well as this mutant complemented with either MYCMA 0439 or MAB 0855 (left panel) or the M. tuberculosis closest homologues to MAB 0855 (mmpL8, mmpL10, mmpL12; right panel). Intracellular growth was assessed by CFU counting along the infection. Histograms with error bars represent means \pm SD calculated using data from three independent experiments. Differences between means were analyzed by two-way ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed. ns non-significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P < 0.0001. (C) TLCs to be added by Bertus.

Figure 5. *MAB_0855* gene plays a role in *M. abscessus in vivo* survival and virulence. (B) *In vivo*. A compléter par Audrey.

Figure 6. MAB_0855-dependent interactions between *M. abscessus* and macrophages are necessary for intracellular survival. (A) Adhesion to murine macrophages assessment by flow cytometry. Cells were cooled down to avoid bacterial internalization, then infected with CFDA-se stained bacteria at an MOI of 100 for 1h at 4°C with gentle agitation to favor bacteria-cell contact. Non-adherent bacteria are well-separated from intact cells (left), a substantial shift was observed for the cell population with adherent bacteria (right, infected cells). (B) Phagosome acidification test. Murine macrophage intraphagosomal pH following an infection at an MOI of 10 was assessed by the mean of FITC fluorescence measurement (485 nm) combined with mCherry (565 nm) on double stained bacteria. The pH along the infection is extrapolated from a pH standard curve. (C, D) Intracellular behavior in human macrophages (THP-1 cells). Cells were infected at an MOI of 10. The ability of bacteria to establish a contact with the cell cytosol was assessed by FRET 20h and 30 hours post-infection (C) and the cellular response along the infection was assessed by quantifying the amount of IL-1 β secreted by the cells, used as a marker of cytosolic contact (D). Histograms with error bars represent means \pm SD calculated using data from three independent

experiments. Differences between means were analyzed by two-way ANOVA and the Tukey posttest allowing multiple comparisons to be performed. ns non-significant, *P < 0.05, **P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

Supplementary Figure 1. Systematic 2D TLC analysis of *M. abscessus MAB_0855* mutant strains and their complemented strains. Apolar and polar lipids extracted from freeze dried bacteria were separated by TLC using a range of solvent systems as indicated in the figure. TLCs were subsequently treated with a phosphomolybdic acid solution (5% w/v in ethanol) in the case of apolar lipids or orcinol (0.1% w/v in a 20% v/v H₂SO₄ solution) in the case of polar lipids and charred by heating to reveal lipids.

Supplementary Figure 2. Construction of a knockout mutant lacking the MAB_0855 gene by recombineering. (A) The knockout mutant was obtained allelic exchange between the sequences flanking the MAB_0855 locus and a linear DNA fragment (2,600 bp) bearing the zeocin resistance cassette (from *Streptoalloteichus hindustanus* ble, ShBle) between 1,000 bp cloned segments upstream and downstream of the MAB_0855 gene. Putative mutant colonies were selected on 7H11 agar supplemented with both kanamycin and zeocin. Confirmed deletion mutants (as shown in panel B), were cured of the pJV53 recombineering plasmid through serial culture in 7H9 medium free of the selective antibiotic kanamycin. (B) Confirmation of the $\Delta 0855$ genotype by PCR and sequencing analysis. Three pairs of primers were used 1 (in the center of MAB_0855), 2 (in the genes flanking MAB_0855) and 3 (in the zeocin cassette) that correspond to a red, blue and green arrow respectively.

Supplementary Figure 3. *MAB_0855* phylogenetic conservation among mycobacteria compared to its closest genes in *M. abscessus* and *M. tuberculosis* reveals *MAB_0855* singularity. *MAB_0855* conservation was assessed by BBH and BH searches among LOS-containing mycobacteria, plus *M. tuberculosis* and *M. fortuitum* (closest species to the Mabs-containing clade). The score of genes in BBH is bolded. A gradient from blue to red is given (from the lowest and the highest (B)BH score). Also the species are classified according to their distance to Mabs, *M. tuberculosis* being the most distant species to Mabs et *M. fortuitum*, the closest species to Mabs.





Figure 2



BBH score compare to Mabs CIP: 40-50 50-60 60-70 70-80 80-90 90-100

В









TLCs of $\Delta 0855$ attB::mmpL8, 10 and 12 (all of Mtb)

Figure 5



Figure 6



Figure S1

Apolar Lipids





Mabs CIP::pJV53K

Figure S3

Phylogentic tree to show MAB_0855 uniqueness as Figure S1, instead of the original Table S1

			Query genomes						
			M. abscessus		M. tuberculosis				
	Target genomes	Hits, S>40	MAB_0855	MAB_0937c	Rv1183	Rv3823c	Rv1522c		
SGM		Rv1183	53	57					
	M. tuberculosis	Rv3823c	51						
		Rv1522c	-48						
		MCAN_11941	52	57	100				
	M. canetti	MCAN_38421	51				100		
		MCAN_15431	48			99	1 2		
	M. kansasii	MKAN_27530	52		54	52			
	M. gastri	MGAST_07640	51	50	54	52	60		
	M. marinum	MMAR_4836		40					
		MMAR_2342					59		
	M. szulgai	A5657_17070	51		72	56			
		A5657_01955	50	70					
		A5657_23850	- 48			49	67		
	M. gordonae	AO501_05505	53		2	50			
		AO501_21640		69	62	56			
		AO501_29360				49	66		
RGM		MSMEG_4741	51			50	50		
	m. smegmaos	MSMEG_0410		75	57	50	50		
		A5630_03645	51		Î	49	48		
	M. mucogenicum	A5630_07335		67	59	53	50		
		A5630_11455				46	46		
		MFORT_03021	55			58	54		
	M. fortuitum	XA26_03390	50	76	60	52	50		
		MFORT_06937	*		5	()	-41		

ANNEXE 2 – Roux *et al.* 2016 Article Comportement intracellulaire de *M. abscessus*

M. abscessus possède la capacité de transiter d'un morphotype S avec une production très caractéristique de GPL associés à sa surface mycobactérienne vers un morphotype R dépourvu de GPL. A mon arrivée au laboratoire, l'équipe étudiait plus en détails les différences entre ces deux morphotypes de *M. abscessus*. Nous avons montré que les variants S et R de *M. abscessus* pouvaient se multiplier à l'intérieur des macrophages. Cependant ces variants occupent des phagosomes morphologiquement différents avec la présence ou non de la zone ETZ apposée sur la membrane phagosomale entourant les bacilles. De plus contrairement au variant R, le variant S est capable de restreindre l'acidification intraphagosomale et induit moins d'apoptose et d'autophagie. Pour finir, la membrane des phagosomes enfermant les formes S a montré des signes d'altération suggérant que ce morphotype est capable de provoquer une communication phagosome-cytosol.

Le morphotype S de *M. abscessus* présente un comportement à l'intérieur des macrophages qui rappelle les espèces de mycobactéries à croissance lente pathogènes.

<u>Article</u>

The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages

Auteurs

Anne-Laure Roux, Albertus Viljoen, Aïcha Bah, Roxane Simeone, Audrey Bernut, <u>Laura Laencina</u>, Thérèse Deramaudt, Martin Rottman, Jean-Louis Gaillard, Laleh Majlessi, Roland Brosch, Fabienne Girard-Misguich, Isabelle Vergne, Chantal de Chastellier, Laurent Kremer, Jean-Louis Herrmann

Open Biol. 2016 Nov;6(11). pii: 160185.

OPEN BIOLOGY

rsob.royalsocietypublishing.org





Cite this article: Roux A-L *et al.* 2016 The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol.* **6**: 160185. http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160185

Received: 17 June 2016 Accepted: 31 October 2016

Subject Area:

microbiology

Keywords:

Mycobacterium abscessus, macrophages, phagosome, innate response, rapid-growing mycobacteria

Authors for correspondence:

Laurent Kremer e-mail: laurent.kremer@cpbs.cnrs.fr Jean-Louis Herrmann e-mail: jean-louis.herrmann@aphp.fr

[†]These authors contributed equally to this study.

Electronic supplementary material is available online at https://dx.doi.org/10.6084/m9.fig-share.c.3573255.



The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages

Anne-Laure Roux^{1,†}, Albertus Viljoen^{3,4,†}, Aïcha Bah⁵, Roxane Simeone⁶, Audrey Bernut³, Laura Laencina¹, Therese Deramaudt², Martin Rottman¹, Jean-Louis Gaillard¹, Laleh Majlessi⁶, Roland Brosch⁶, Fabienne Girard-Misguich¹, Isabelle Vergne⁵, Chantal de Chastellier⁴, Laurent Kremer^{3,7} and Jean-Louis Herrmann¹

¹UMR1173, and ²UMR1179, Inserm and UFR Des Sciences de la Santé Simone Veil, Université de Versailles Saint Quentin, Montigny, France

³Centre National de la Recherche Scientifique FRE 3689, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Université de Montpellier, 1919, Route de Mende, 34293, Montpellier, France

⁴Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille Université UM 2, Inserm, U1104, CNRS UMR7280, 13288, Marseille, France

⁵CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), UMR 5089 CNRS/Université Paul Sabatier, 205 route de Narbonne, BP 64182, 31077 Toulouse Cedex 4, France

⁶Unité de Pathogénomique mycobactérienne, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, Paris, France

⁷INSERM, CPBS, 34293 Montpellier, France

(D) J-LH, 0000-0003-2347-6418

Mycobacterium abscessus is a pathogenic, rapidly growing mycobacterium responsible for pulmonary and cutaneous infections in immunocompetent patients and in patients with Mendelian disorders, such as cystic fibrosis (CF). Mycobacterium abscessus is known to transition from a smooth (S) morphotype with cell surface-associated glycopeptidolipids (GPL) to a rough (R) morphotype lacking GPL. Herein, we show that M. abscessus S and R variants are able to grow inside macrophages and are present in morphologically distinct phagosomes. The S forms are found mostly as single bacteria within phagosomes characterized by a tightly apposed phagosomal membrane and the presence of an electron translucent zone (ETZ) surrounding the bacilli. By contrast, infection with the R form leads to phagosomes often containing more than two bacilli, surrounded by a loose phagosomal membrane and lacking the ETZ. In contrast to the R variant, the S variant is capable of restricting intraphagosomal acidification and induces less apoptosis and autophagy. Importantly, the membrane of phagosomes enclosing the S forms showed signs of alteration, such as breaks or partial degradation. Although not frequently encountered, these events suggest that the S form is capable of provoking phagosomecytosol communication. In conclusion, M. abscessus S exhibits traits inside macrophages that are reminiscent of slow-growing mycobacterial species.

1. Introduction

The *Mycobacterium* genus represents a complex group of more than 100 species, of which only a limited number are strict human or animal pathogens. Most of the non-pathogenic saprophytic mycobacteria belong to the rapid-growing mycobacteria (RGM) group, although some of them, including *M. abscessus*, *M. chelonae* and *M. fortuitum*, have recently been classified as true opportunistic pathogens [1]. *Mycobacterium abscessus* is now recognized as the major pulmonary pathogen within the RGM [2], with cystic fibrosis (CF) patients being particularly vulnerable to infection with this mycobacterium [3–7]. *Mycobacterium abscessus* is

© 2016 The Authors. Published by the Royal Society under the terms of the Creative Commons Attribution License http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/, which permits unrestricted use, provided the original author and source are credited.

2

also regarded as a nosocomial infectious agent responsible for several epidemics due to clinical practices with contaminated materials [8,9]. Recent epidemiological studies and clinical case studies of CF patients infected with *M. abscessus* emphasized the persistence, sometimes for several decades, of *M. abscessus* within the host [10–12]. Finally, *M. abscessus* has been associated with the most direct impact on lung functions in CF patients when compared with the slow-growing mycobacterium (SGM) *M. avium*, and non-fermentative Gram-negative bacteria [13].

Like *M. avium* or *M. smegmatis* [14], *M. abscessus* displays two distinct morphotypes on solid agar media: a smooth (S) variant, non-cording but motile and biofilm-forming, and a rough (R) variant, cording but non-motile and non-biofilmforming. The major difference between these two variants resides in the total loss of surface-associated glycopeptidolipids (GPL) in the R form [15]. Importantly, the R variant appears to arise only during the course of infection in the host organism, as evidenced by culture-positive sputum samples from patients [11] or experiments in B-cell-deficient mice [16]. In addition, R variants are frequently associated with severe infections as observed in CF patients infected with *M. abscessus* [11,12]. In the light of these findings, one may hypothesize that S and R variants differentially affect the phagocytic pathway.

One key difference between pathogenic and non-pathogenic mycobacteria is the capacity of pathogenic mycobacteria to survive and replicate within macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC) by arresting phagosome maturation and, hence, preventing fusion with lysosomes [17–23]. *Mycobacterium fortuitum* and *M. smegmatis*, a saprophytic RGM, are both unable to multiply inside M ϕ and are rapidly cleared from the infected cells [24,25]. In sharp contrast, *M. abscessus* not only survives, but also replicates inside M ϕ [26–28]. Histopathological studies performed on autopsy-derived lung tissue sections of patients who died from an infection with *M. abscessus* revealed the presence of granulomas with caseous lesions, a hallmark of persistent mycobacterial infection [29]. Such characteristic features have also recently been corroborated in zebrafish and mice infected with *M. abscessus* [16,30].

Based on these physiopathological features, *M. abscessus* can be regarded as a pseudotuberculous and virulent RGM with a potential dual pathogenic manifestation linked to the S to R transition. This prompted us to compare the phagocytic uptake and fate of both S and R variants within M ϕ with respect to growth and describe how these events affect the endomembrane compartment in which they reside. Our findings point to intracellular characteristics that are specific to *M. abscessus* S and which resemble those usually attributed to pathogenic SGM.

2. Results

2.1. Differential phagocytic uptake of *Mycobacterium abscessus* S and R variants

Bone-marrow-derived murine M ϕ (BMDM) were infected with the S or R variant of *M. abscessus* at a multiplicity of infection (MOI) of 1 in the absence of antibiotics (see Experimental procedures). After extensive washes to eliminate the residual extracellular bacteria, cells were fixed and processed for transmission electron microscopy (TEM) at selected time points thereafter (0–24 h p.i.). Examination of thin sections up to 24 h p.i. showed that the S variant was efficiently phagocytized. Bacteria in phagocytic cups or still binding to the cell surface were usually not found with M. abscessus S (figure 1a). Around 80% of the phagosomes harbouring M. abscessus S were loner phagosomes containing a single bacterium whereas 60% of the phagosomes harbouring M. abscessus R were social phagosomes with at least 2 bacilli (electronic supplementary material, figure S1). Most of the cell profiles displayed between 1 and 10 phagosomes at 24 h p.i. By contrast, the cell profiles displayed a low number of phagosomes following infection with the R variant. This could be linked to the highly aggregative nature of the R variant, despite extensive treatments involving several passages through a syringe needle. An important consequence of the R clumping/cording is that, in many instances, bacteria were gathered in long chains located at the close vicinity of the cell surface or in phagocytic cups. In the latter case, the tips of the pseudopods seemed to be unable to fuse together to give rise to nascent phagosomes (figure 1b). This observation indicates that a large amount of R forms might remain outside the cells. A few phagosomes, however, were found within M ϕ . They usually harboured large numbers of the M. abscessus R variant (figure 1c) as opposed to those harbouring the S variant, usually containing a single bacterium (figure 1d).

2.2. *Mycobacterium abscessus* multiplies similarly inside wild-type and cystic fibrosis conductance transmembrane regulator defective Md

We next evaluated the intracellular growth of both variants in murine and human M ϕ by infecting cells at an MOI of 1 for 3 h (see Experimental procedures). That M. abscessus S and R survive in murine (figure 2a) and human (figure 2b) M ϕ is in line with previous reports [26,28]. However, it was not possible to directly compare the data obtained for the S and R variants because we systematically observed important differences in the mycobacterial uptake (up to a one log_{10} difference for the R variant). Determination of bacterial doubling time in M ϕ was 14.3 \pm 0.8 h for the R variant and 19.4 ± 0.6 h for the S variant (figure 2*a*,*b*) compared with 6.0 ± 0.6 h and 5.8 ± 0.7 h for the *in vitro* grown R and S variants, respectively (electronic supplementary material, figure S2). These differences might be due to the intrinsic clumping of the M. abscessus R variant (figure 1b,c), despite extensive treatments to obtain homogeneous bacterial preparations [21,31]. Although extracellular growth cannot be totally excluded, this seems very unlikely because cells were systematically maintained under amikacin treatment during the duration of the experiment.

Mycobacterium abscessus infection has been reported in patients with CF, a genetic disease linked to a functional defect of the CFTR (cystic fibrosis conductance transmembrane regulator) chloride channel [32]. We therefore evaluated whether mutations abolishing the expression level or function and/or the stability of CFTR may affect *M. abscessus* intracellular survival/growth. Comparison of the bacterial loads clearly indicated that intracellular growth of the S and R variants was similar in wild-type and *cftr*^{-/-} BMDM (figure 2*c*,*d*). Comparable results were obtained following infection of murine M¢ carrying the CFTR^{Δ F508} mutation, representing the most frequent mutation encountered in CF patients and resulting in an abnormal CFTR protein (electronic supplementary material,



Figure 1. Ultrastructural differences of the *M. abscessus* S- or R-containing phagosomes. Bone marrow-derived murine $M\Phi$ (BMDM) were infected with either the S (*a*,*d*) or R (*b*,*c*) variants of *M. abscessus* for 3 h. At 24 h p.i., cells were fixed and processed for TEM. Thin sections were analysed for phagocytic uptake of each variant (*a*,*b*) and the morphological appearance of R (*c*) or S (*d*)-containing phagosomes. S forms (*a*) reside within phagosomes and none are found in phagocytic cups whereas most of the R forms (*b*) are still clustered in phagocytic cups (arrows) at 24 h p.i. (*c*) Once formed, the R-containing phagosomes usually comprise several bacteria (social phagosomes, indicated with arrows). (*d*) The S-containing phagosomes typically comprise a single bacterium (loner phagosomes, indicated with stars).



Figure 2. Growth of *M. abscessus* S (Mabs S) and R (Mabs R) variants in different cells. Wild-type murine (*a*) or human (*b*) M φ were infected with S and R variants. Amikacin treatment was applied to avoid extracellular growth (see Experimental procedures). The number of CFU was determined at the indicated times p.i. (*c*,*d*) Wild-type and *cftr*^{-/-} murine M φ were infected as mentioned above. Intracellular growth was similar in murine wild-type M φ and in murine M φ knock-out for *cftr* (*cftr*^{-/-}). Error bars indicate the s.e.m., based on the results from three independent experiments.



Figure 3. Morphological appearance of the electron translucent layer (ETZ) of the cell wall of *M. abscessus* within phagosomes. Bone marrow-derived murine M ϕ (BMDM) were infected with various *M. abscessus* strains for 3 h. At selected time points p.i., cells were fixed and processed for TEM. The cell wall ultrastructure of the different strains was assessed on 100–200 different bacterial profiles. (*a*) S variant: the electron translucent outermost layer (ETZ) of the wall was thick and apposed to the smooth phagosome membrane (arrows) all around. (*b*) R variant: in the absence of GPL production, the ETZ was thin and the phagosome membrane had a wavy appearance (arrows); in some instances a close contact was observed at discrete sites (arrow and insert). (*c*) *Mycobacterium abscessus* $\Delta mmpL4b$ complemented strain: as for the S variant. (*d*) *Mycobacterium abscessus* $\Delta mmpL4b$ mutant: no GPL produced and thin ETZ as for the R variant.

figure S3). Overall, these observations not only indicate that *M. abscessus* can resist the bactericidal activity of murine/human M ϕ but also suggest that a functional CFTR is not required for sustaining intracellular growth of *M. abscessus*, at least within *in vitro* infected M ϕ .

2.3. Distinct morphology of the intraphagosomal *Mycobacterium abscessus* S and R variants

The persistence phenotype of *M. abscessus* S and R in M ϕ prompted us to examine their ultrastructure within phagosomes. The most prominent feature was the appearance of the mycobacterial cell wall and its interaction with the phagosome membrane. In the case of the S strain, the outermost electron translucent zone (ETZ), which is a major part of the mycobacterial cell wall [33], was thick and apposed to the phagosome membrane all around (figure 3*a*). By contrast, the R form displayed a very thin ETZ (figure 3*b*). Although the phagosome membrane was no longer tightly apposed to the mycobacterial cell wall all around, it did seem to make contact with the mycobacterial cell wall at discrete sites (figure 3*b*, arrows and insert).

It is well known that a major difference in the cell wall of the S and R variants of *M. abscessus* and *M. bolettii* resides in the lack of GPLs in the outermost cell wall layer of the R variant [34,35]. To confirm the dependence of ETZ formation on GPL production, BMDM were infected with a $\Delta mmpL4b$ mutant generated in an S background, a well-defined mutant that fails to produce and export GPL but exhibits a clumping/cording phenotype similar to the wild-type R strain [34]. BMDM were also infected with the corresponding complemented strain expressing *mmpL4b* under the control of the *hsp60* promoter on the pNVB1 integrative plasmid [36]. Only the wild-type *M. abscessus* S and the $\Delta mmpL4b$ complemented strain, both producing GPLs, elaborated a thick ETZ (figure 3*a*,*c*), whereas the GPL-deficient $\Delta mmpL4b$ mutant, like the R variant, did not (figure 3*b*,*d*). Overall, these results indicate that *M. abscessus* elaborates an ETZ that depends on GPL production, which might contribute to the survival of the S variant within its host cell.

2.4. *Mycobacterium abscessus* S prevents phagosome maturation/acidification

Based on the intracellular survival of the two variants, it was of importance to understand by which mechanism(s) they resist the bactericidal response, known to clear most RGM infections. Live pathogenic mycobacteria, but not avirulent mycobacteria, are known to be retained in a mildly acidified environment [17,37-39]. The measurement of the phagosomal pH, following internalization, has been widely used as a physiologically relevant indicator of the maturation status of phagosomes [40]. We therefore analysed the pH of S- versus R-containing phagosomes in $M\phi$ using direct measurement of intraphagosomal pH by double fluorescent labelling. FITC (pH sensitive)-labelled M. abscessus S or R expressing mCherry (pH resistant) were used to infect Mo. The ratio between pH-sensitive and pH-resistant fluorescent stains was scored at specific time points. The pH was then calculated by comparing each ratio against a pH standard curve established with well-defined pH buffers [40]. Mycobacterium abscessus S- and M. marinum-containing phagosomes were not acidified in murine $M\phi$, as reported for *M. tuberculosis* or *M. avium* infected cells [17,37] (figure 4). That heat-killed M. abscessus S failed to prevent phagosomal acidification suggests that this relies on an active process. Conversely, M. abscessus R-containing phagosomes were significantly more acidic than those containing the S variant at all time points (figure 4). A fast decline in phagosomal pH was previously reported to correlate with the rapid processing of phagosomes in late phagosomes or phagolysosomes [41]. This establishes that M. abscessus S-containing phagosomes are not processed into phagolysosomes following infection as shown earlier for phagosomes containing pathogenic mycobacteria [17,23,42-44].

2.5. The S variant may induce phagosome-cytosol communication

Both *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated that pathogenic *M. tuberculosis* and *M. marinum* induce ruptures in the phagosome membrane and establish a phagosome-to-cytosol communication prior to the host cell death [45–48]. We evaluated whether this may also occur for *M. abscessus*. Conventional TEM approaches were first used to investigate whether the S form was able to promote an alteration of the phagosomal membrane, eventually followed by rupture of the membrane, which would allow the S form to gain access to the cytosol. Phagosomal rupture and phagosome-cytosol communication can be difficult to assess by conventional TEM because of tangential sections through part or all of the phagosome membrane. Care was therefore taken to examine only parts of the phagosome membrane



Figure 4. Absence of phagosomal acidification inside *M. abscessus* S-infected M ϕ . Human THP-1 M ϕ were infected with FITC-labelled mCherry-expressing *M. abscessus* S (Mabs S) and R (Mabs R), *M. smegmatis*, *M. marinum* and heat-killed *M. abscessus* S (Mabs S heat-killed). Fluorescent signals were measured sequentially at 485 nm (FITC) and 544 nm excitation wavelengths (mCherry) after a 15 mn incubation period at 37°C. The first time point on the *x*-axis (0 mn) was taken immediately after the 15 mn incubation. Subsequently, the pH at each time point was extrapolated from a standardized pH curve. The pH values were significantly different depending on whether phagosomes contained S or R variants. Results are representative of three independent experiments. (**p < 0.01).



Figure 5. Alteration of the membrane of phagosomes containing the S variant as assessed by TEM. Bone marrow-derived murine $M\phi$ were infected with *M. abscessus* S for 3 h. Phagosomes were examined for obvious signs of membrane alteration/destruction. (*a*) No alteration: the phagosome membrane is smooth (arrows) and closely apposed to the mycobacterial cell wall ETZ all around. (*b*) First sign of alteration: the phagosome membrane has become wavy and is no longer closely apposed to the bacterium all around (arrows). (*c*) The phagosome membrane displays breaks (arrowheads). (*d*) The phagosome membrane is no longer visible (stars).

where the plane of the section was perpendicular to the mycobacterial cell wall and hence also the phagosome membrane. Four situations were observed at 24 h p.i., as follows. (i) In the first and most frequent case, the phagosome membrane had a smooth appearance and it was tightly apposed to the ETZ (figure 5*a*, arrows). (ii) For part of the phagosomes, the membrane became wavy and it was no longer closely apposed to the ETZ (figure 5*b*, arrow). This could represent the first sign of an alteration of the phagosomal membrane. (iii) In rare instances, interruptions in the phagosome membrane were observed

(figure 5*c*, arrowheads) that were not observed in other endocytic organelles (not shown). (iv) Finally, in a few cases, the phagosome membrane was no longer visible around part of the bacterium (figure 5*d*). Owing to the above-mentioned constraints, it was not possible by TEM to determine whether the entire bacterium had been freed in the cytosol (complete rupture of the phagosome membrane) or not (phagosome–cytosol communication only) and quantifications were not possible for the same reasons.

Phagosome membrane rupture was subsequently assessed using the CCF-4 (cephalosporin core linking 7-hydroxycoumarin to fluorescein) substrate in a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay, as previously described [47]. Differentiated THP-1 cells infected at an MOI of 1, either with M. abscessus S, M. smegmatis (negative control) or M. marinum, displayed at day 0 (3 h p.i.) a FRET 450 nm (blue)/535 nm (green) ratio of 1 (electronic supplementary material, figure S4), indicative of an absence of CCF-4 cleavage by the M. abscessus β -lactamase (Bla_{Mab}) [48]. Interestingly, and in contrast to M. smegmatis-infected Mo, M. abscessus S-infected cells displayed a FRET ratio of 1.5 at 24 h p.i., indicative of the fluorescence shift as a result of the disruption of CCF-4 by Bla_{Mab} in the cytosolic compartment (electronic supplementary material, figure S4). The FRET assay, performed in THP-1 cells, relies either on phagosome-cytosol interplay enabling diffusion of Bla_{Mab} into the cytosol and/or on the presence of free intra-cytosolic organisms. These results corroborate the TEM observations in murine $M\phi$ and suggest that the S variant, but not the R form, might establish a successful phagosome-cytosol communication.

2.6. *Mycobacterium abscessus* S fails to trigger apoptosis and bacterial autophagy

The phagosome-cytosol interplay may substantially impact on apoptosis and autophagy in the infected host phagocytes [49], both these cellular responses being efficient in controlling the intracellular growth of the RGM, M. smegmatis and M. fortuitum [24,50,51]. Here, we evaluated the extent of apoptosis following infection of THP-1 Mo with M. abscessus S, following annexin-V labelling. M. smegmatis, known as a potent apoptosis-inducing species [24,25], was also included as a positive control. Our results confirm the previously described proapoptotic activity of M. smegmatis [25] with nearly 80% of infected cells annexin-V-positive at 24 h p.i. (figure 6a). Compared to M. smegmatis, M. abscessus S- and R-infected Mo were only slightly apoptotic, with at most 10% of infected cells annexin-V-positive at 24 h (figure 6a). However, a significant difference in labelling was observed between the S and R variants at 48 h p.i. (figure 6a) with 50% and 90% of annexin-Vpositive infected Mø, respectively. Overall, these results indicate that M. abscessus S is less pro-apoptotic than M. abscessus R, in agreement with previous observations in zebrafish [30].

Autophagy was next assessed after infection of THP-1 M ϕ with the Alexa488-labelled S variant and using anti-LC3-antibodies to specifically immunolabel autophagosome membranes. *M. abscessus* S did not co-localize with the LC3 marker, with 10% at 24 h p.i. of autophagosomes potentially containing the S variant (figure 6*b*,*c*). Comparatively, the R variant induced more autophagy than the S variant (figure 6*b*,*c*), as evidenced by the increased percentage of *M. abscessus*-LC3-positive infected cells (figure 6*b*) and confocal microscopy (figure 6*c*). In addition, the results obtained with the GPL-deficient $\Delta mmpL4b$ S mutant were comparable to those of *M. abscessus* R (figure 6*b*), confirming the importance of the surface-exposed GPL in the inhibition of autophagy of the S variant.

3. Discussion

The source and the mechanism responsible for pulmonary contamination of CF patients with M. abscessus remain unclear [52]. It appears, therefore, critical to understand how M. abscessus resists the Mo bactericidal activity, usually highly efficient against other RGM, such as M. smegmatis and M. fortuitum [24,25]. The S variant, capable of forming biofilm-like structures, is most likely to be the infecting form. GPL present at the surface of *M. abscessus* S have been shown to prevent TLR2 signalling in respiratory epithelial cells [53], possibly allowing lung colonization and subsequent survival in a silent and permissive niche, as shown for M. tuberculosis and M. marinum [20,45]. Herein, we confirmed that M. abscessus S survives in M ϕ , an observation consistent with previous studies [26-28], and demonstrated, for the first time, that replication of M. abscessus in Mo was not affected by functional CFTR defects. This provides evidence that such a modification is not responsible for the peculiar susceptibility of CF patients to M. abscessus infections, at least at the intracellular level. Noteworthily, Griffith et al. demonstrated that one third of the pulmonary infections due to M. abscessus can occur in the absence of a pre-existing lung pathology [2], emphasizing the intrinsic ability of M. abscessus to resist the bactericidal activity of $M\phi$, a feature historically considered to be an exclusive attribute of SGM. In this context, Oberley-Deegan et al. proposed that M. abscessus could interfere with phagosome processing into phagolysosomes through the manipulation of host signal transduction pathways [27,54].

After phagocytosis by M ϕ , the S variant is found as a single bacterium in loner phagosomes whose membrane is closely apposed all around the outer surface of the mycobacterial cell wall. The S variant was also found to reside in slightly acidified non-mature phagosomes that are unable to fuse with lysosomes [42,43]. The retention of Rab5 at the membrane of *M. abscessus*-containing phagosomes in epithelial cells [54] is consistent with these findings. In addition, *M. abscessus* S was also found to be a poor apoptosis- and autophagy-inducing strain. These results were unexpected as all the RGM studied so far, particularly *M. smegmatis* and *M. fortuitum*, reside in phagolysosomes and are subsequently eliminated by the M ϕ . Moreover, RGM are known to induce the formation of autophagic vacuoles and cell apoptosis, both strategies considered important host cell defence mechanisms [55–57].

By contrast, the R form follows a rather different pathway. First, during the early infection stage, it presents a strong tendency to form chains or large clumps that usually remain in phagocytic cups instead of being internalized. As a result, cells contain less phagosomes but the latter contain generally multiple bacteria. It is well known that phagosomes containing several bacteria are systematically processed into phago-lysosomes [17,23,41–44]. As expected, such phagosomes were rapidly acidified. Yet the intraphagosomal R variants did not appear to undergo degradation, at least during the first 24 h p.i., as assessed by EM observation of thin sections. The absence of degradation in phagolysosomes has already been observed for other mycobacteria [42]. Furthermore, the presence of the



Figure 6. *Mycobacterium abscessus*-induced apoptosis and autophagy in wild-type M ϕ . (*a*) Analysis of apoptosis: THP-1 M ϕ were infected with *M. abscessus* S (Mabs S), *M. abscessus* R (Mabs R) or *M. smegmatis* (MS). The percentage of apoptotic cells was determined at 24 h p.i. using annexin-V-FITC conjugates (Abcam, USA) and propidium iodide to stain the dead cells. Fluorescent signals (mCherry from mycobacteria, FITC from the annexin-V and absence of propidium iodide) were analysed by flow cytometry. A significant increase in the percentage of apoptotic cells was associated with *M. smegmatis*-infected cells when compared with M ϕ infected with *M. abscessus* S or R. However, the R variant was significantly more pro-apoptotic than the S variant at 48 h. Error bars indicate the s.e.m. based on the results of two independent experiments (**p < 0.01). (*b,c*) Comparative behaviour of *M. abscessus* S and R variants towards autophagy. (*b*) Percentage of colocalization of *M. abscessus* S (Mabs S), S $\Delta mmpL4b$ mutant (MabsS $\Delta mmpL4b$), $\Delta mmpL4b$ complemented (C-MabsS $\Delta mmpL4b$) and R (Mabs R)-infected cells with LC3 at 2 and 24 h p.i. determined after immunofluorescence analyses. Error bars indicate the s.e.m. based on the results from four independent experiments (*p < 0.05). (*c*) Confocal immunofluorescence images of fixed THP-1 cells infected with Alexa-488-labelled *M. abscessus* variant S (Mabs S) or variant R (Mabs R) (green) (2 h p.i.) and immuno-stained for endogenous LC3 (red). Scale bars, 5 μ m.

R variant within M ϕ induced the formation of autophagic vacuoles and cells became apoptotic. All these results point towards a typical RGM-like behaviour for the R variant [24,25]. It is note-worthy that the potent apoptosis-induced cell death activity may help the R variant to reach the extracellular environment ([30] and our study) where it can form cords. However, another unexpected result of this study was that the R variant, as opposed to other RGM, was able to replicate within M ϕ , an intriguing phenotype that may be due to the extensive clumping of the R variant within phagocytic cups or phagosomes. Moreover, re-invasion of extracellular bacteria that are released from the apoptotic M ϕ cannot be fully excluded.

The question that arises from this work is the following: why do the R and S variants follow such different phagosome trafficking pathways? Based on EM analyses of murine $M\phi$ infected with either *M. avium*, or *M. tuberculosis*, de Chastellier and colleagues showed evidence that, independent of the molecular mechanisms involved in the blocking of phagosome maturation of a mycobacterium-containing phagosome, the establishment and maintenance of a close apposition of the phagosome membrane with the entire mycobacterial surface all around represented a necessary requirement for prevention of phagosome maturation [39,42]. Interestingly, such a close interaction was observed in the case of S variant-containing phagosomes but not for those containing the R form. The establishment and maintenance of a long-lasting close apposition most probably involves the interaction between specific proteins and/or lipids of the phagosome membrane with specific components of the mycobacterial cell wall surface. Among these, ManLAM of M. tuberculosis is considered to be responsible for the prevention of phagosome maturation [58]. Recent studies also demonstrated that cyclopropane rings in α -mycolic acids are critical determinants for the phagosome maturation block [59]. The masking role of phenolic glycolipid (PGL), a major glycolipid found in SGM, including M. marinum and some M. tuberculosis clinical isolates, for recruiting permissive Mo has also been unravelled [60]. By analogy, GPL can be regarded as the rsob.royalsocietypublishing.org Open Biol. 6: 160185

PGL-matching glycolipid of atypical mycobacteria as it displays similar functional roles, such as limiting mycobacterial uptake [61] and masking the TLR2 ligands, thereby accounting for different inflammation-elicited responses towards S and R variants [36,62]. It could thus be argued that the S to R transition, involving loss of function mutations in the GPL biosynthetic or export machinery in *M. abscessus*, conditions the inflammatory response of the infected host.

The EM approaches used in this work provide compelling evidence on the role of GPL in the differential processing of phagosomes containing the S and R variants. It is well known that GPL is a major constituent of the mycobacterial cell wall ETZ [63,64]. While the ETZ was very thick in the case of the S variant, it was thinned out in the case of the R variant and also in the case of the $\Delta mmpL4b$ mutant that is unable to transport/assemble GPL at the bacterial surface. With the S variant being closely apposed to the phagosome membrane all around, and the R variant making contact with the phagosome membrane only at discrete sites, it is tempting to speculate that GPL is a major actor for establishing and maintaining the close apposition required for prevention of phagosome maturation. In fact, the *M. avium* complex GPL can delay phagosome–lysosome fusion following its ligation to the mannose receptor [65,66].

Interestingly, among *M. abscessus*, *M. smegmatis* and *M. chelonae*, all expressing cell surface GPL, as evidenced by high conservation of their respective *gpl* locus [67], only *M. abscessus* and *M. chelonae* have retained the ability to survive inside M ϕ [68]. *Mycobacterium smegmatis* mc²155 strain, which derives originally from the ATCC 607 strain [69], expresses less triglycosylated GPL than *M. abscessus* or *M. chelonae* [67]. That the level of GPL production can be enhanced in *M. smegmatis* mc²155 when overexpressing the whole *mbtH-mps1-mps2-gap* operon from *M. abscessus* [70] reflects quantitative differences in GPL production between these species, despite the presence of a similar *gpl* locus. Subtle differences at the cell surface in relation to GPL production may thus considerably interfere and modify the fate of mycobacteria within M ϕ .

Another important aspect concerns the possibility for *M. abscessus* to alter the phagosomal membrane and free itself from the phagosome in which it resides. A qualitative EM analysis of thin sections of at least 150 phagosomes showed that the membrane of S- but not R-containing phagosomes may present alterations. The membrane became loose and, in rare instances, showed breaks or partial lysis. Importantly, neighbouring organelles showed no signs of membrane alteration, thus ruling out eventual artefacts due to the processing of the EM samples. Unfortunately, we were neither able to quantify such events nor to conclusively determine whether the entire bacterium could be released into the cytosolic compartment.

The mycobacterial constituents and molecular mechanisms involved in the alteration or rupture of the *M. abscessus* S-containing phagosome membrane remain unknown. It has been reported that *M. abscessus* is not equipped with the ESX-1 apparatus, which mediates establishment of cytosol contact for slow-growing pathogenic mycobacteria such as *M. tuberculosis* [46,47,55,71,72], *M. marinum* [45] and *M. kansasii* [73]. Ongoing work dedicated to study a panel of defined transposon mutants [74] will hopefully allow us to identify the putative ESX-1-independent membrane-damaging constituents of the S strain, which are obviously mediated by an ESX-1-independent mechanism.

To summarize, it seems to be rather difficult to strictly compare the behaviours of S and R morphotypes. S and R variants can be regarded as two representatives of the same isolate, which coexist and/or evolve differently in response to host immunity, resulting in different fates for both the bacteria and the host. In conclusion, we provide compelling evidence that, at the cellular level, M. abscessus S imitates the phenotypic traits of pathogenic SGM and that the loss of cell wall associated lipids, namely GPL, can result in the acquisition of an RGM-like intracellular behaviour with a peculiar extracellular state characterized by a very high replication capacity [30]. CF patients are mainly infected with extracellular pathogens, such as Pseudomonas and Staphylococcus, with high growth rates in the bronchial lumen. By analogy, M. abscessus R can be regarded as the aggressive form in these patients. The capacity of M. abscessus to transition from an S intra-Moresistant form to an R extracellular form probably increases its capacity to adapt and survive in the changing environments. This is corroborated by recent comparative genomic studies indicating that M. abscessus evolves rapidly and should be monitored closely for the acquisition of more pathogenic traits. Mycobacterium abscessus genomes are very plastic, with many recently introduced insertion sequences such as prophages and novel genes, and have an open pangenome [75,76], suggesting that they might continue to acquire new genetic material, for the adaptation to divergent environmental conditions.

4. Experimental procedures

4.1. Bacterial culture conditions

Isogenic pairs of S and R GFP- or mCherry-expressing *M. abscessus* CIP 104536T were used throughout this study. An *mmpL4b* KO ($\Delta mmpL4b$) mutant displaying an R morphotype [34] and its complemented counterpart, which stably expresses MmpL4b under the control of the *hsp60* promoter, were also used. Mycobacteria were grown aerobically in Middlebrook 7H9 medium supplemented with 0.05% Tween 80 and 10% OADC (oleic acid, dextrose, catalase and bovine albumin) (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) at 37°C. GFP-expressing strains were propagated in medium containing 500 µg ml⁻¹ hygromycin B (Roche Diagnostics, Meylan, France). MCherry-expressing mycobacterial strains were grown in the presence of 250 µg ml⁻¹ kanamycin (Sigma, USA).

4.2. Macrophage culture conditions

Animal experiments were performed according to institutional and national ethical guidelines (Agreement no 92-033-01). Δ F508 FVB mice, supplemented with movicol (Norgine, The Netherlands), and their wild-type FVB littermates [77,78] were from INRA (Jouy en Josas, France). The BMDM M ϕ , human monocyte- derived M ϕ (HMDM) and THP-1 M ϕ were prepared as previously described [31,79]. THP-1 M ϕ were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and differentiated for 24 h with 20 ng ml⁻¹ PMA prior to infection.

4.3. $M\varphi$ infections and intracellular growth measurement

Mycobacteria, grown aerobically at 37°C up to mid-log phase, were harvested by centrifugation and suspended in a phosphate buffer saline (PBS) solution (Sigma, USA). The bacterial

clumps were disrupted by 20-30 passages through 26.5G insulin syringe and the bacterial suspension was then used to infect $M\phi$ (5 × 10⁴ to 10⁵) at an MOI between 1 and 10 mycobacteria per $M\varphi$ in order to avoid rapid cell lysis, and incubated for 3 hat 37°C. After infection, cells were washed thoroughly with PBS (three to four times, except when explicitly stated differently) to eliminate extracellular bacteria and re-fed with complete medium containing amikacin at $250 \ \mu g \ ml^{-1}$ (except for EM experiments) for a further 1 h incubation at 37°C. This step was essential for killing the remaining extracellular mycobacteria, particularly the R variant that presents a sticky and clumpy phenotype (see Results). The medium containing amikacin was then discarded and cells were washed again three times. Infected cells were subsequently incubated in the presence of amikacin at 50 μ g ml⁻¹ at 37°C (except for EM experiments). CFU counts were performed at day 0 (or 4 h p.i. after the last wash), day 1, day 3 and day 5, by lysing the cells with cold distillated water, and plating 10-fold serial dilutions on LB plates (Sigma, USA). Colony enumeration was performed after 5–7 days of incubation at 37°C.

4.4. Analysis of phagosomal acidification

In total, 24-well plates of fully confluent monolayers of M ϕ were infected with FITC-labelled *M. abscessus* (expressing mCherry) at an MOI between 1 and 10, centrifuged at low speed for 90 s and incubated at 37°C for 15 min prior to fluorescence measurements. Fluorescent signals were then measured by sequentially exciting at 485 nm (FITC) and 544 nm (mCherry) using a Fluoroskan Ascent FL spectrofluorometer (Thermo Fisher Scientific, France). A standard pH curve was established to correlate the fluorescence signal with the pH as described [40].

4.5. Apoptotis and autophagy determination

The apoptosis assay was performed as described previously [80]. M ϕ were infected with *M. abscessus* and the percentage of apoptotic cells was determined using annexin-V–FITC conjugates (Abcam, USA) and propidium iodide staining of dead cells. Cells were infected with mCherry-expressing mycobacteria at an MOI of 10. For flow cytometry analysis, 10 000 events were collected for each condition and the percentages of annexin-V-positive mCherry-positive and propidium iodide-negative cells were determined, in order to count infected cells that became apoptotic.

For autophagy, mycobacteria were labelled with $50 \ \mu g \ ml^{-1}$ Alexa-488-succinimidyl ester in PBS for 45 min at room temperature (RT) and used to infect THP-1 Mo at an MOI of 1–10. Cells were spun down for 5 min at 800 rpm to synchronize phagocytosis, incubated for 30 min at 37°C, washed several times to remove extracellular bacteria and then incubated for 15 min, 2 h or 24 h at 37°C. Subsequently, cells were fixed with 2% paraformaldehyde (Delta microscopy) for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X100/PBS for 5 min and blocked with 4% BSA (Euromedex, France), 2% goat serum (Sigma, USA) in PBS for 1 h. Cells were incubated with rabbit anti-LC3 (MBL, France) overnight in blocking buffer, washed and then incubated for 3 h with secondary antibody coupled to Alexa-568. Observation was done using a Zeiss LSM 510 Inv confocal microscope and images were processed with IMAGEJ software. A total of 100 bacteria were counted per time point.

4.6. Processing for electron microscopy

Cells were fixed for 1 h at RT with 2.5% glutaraldehyde (Sigma, St Louis, MI, USA) in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, containing 0.1 M sucrose, 5 mM CaCl₂ and 5 mM MgCl₂. After two successive 15 min washes with the same buffer, cells were post-fixed for 1 h at RT with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences, distributed by Euromedex, Mundolsheim, France) in the same buffer devoid of sucrose. Cells were washed with buffer, scraped off the dishes with a rubber policeman, concentrated in 2% agarose in the same buffer, and treated for 1 h in 1% uranyl acetate in 30% methanol. Samples were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in Spurr resin. Thin sections were stained with 1% uranyl acetate in distilled water and then with lead citrate.

4.7. Fluorescence resonance energy transfer

We performed a modified assay that was previously used to investigate the breakdown of the endocytic vacuoles by Gram-negative bacteria using a chemical probe that is trapped within the host cytoplasm and detectable by fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements, as recently described [47]. Briefly, at successive stages of the time course measurements, a mix containing 50 µM CCF-4 substrate (Life Technologies, Saint Aubin, France) in EM medium (120 mM NaCl, 7 mM KCl, 1.8 mM CaCl2, 0.8 mM MgCl2, 5 mM glucose and 25 mM Hepes at pH 7.3) containing 2.5 µM probenicid was added to the infected THP-1 cells for 2 h at RT in the dark. Cells were then washed with PBS containing $2.5 \,\mu\text{M}$ probenicid before fixing with PFA 4% for 30 min at RT in the dark. Cells were washed directly before performing fluorescence imaging. Measurement of the ratio of 450 nm (blue)/ 535 nm (green) fluorescence allowed determining whether the bacteria established a phagosome-cytosol communication. Reading was performed by a fluorescence microscope with AutoPlay (Nikon) for the automatic acquisition of at least 50 cells per well and image analyses were performed using a dedicated algorithm using METAMORPH software [47]. The experiment was repeated twice with similar results.

4.8. Statistical analyses

Fisher's exact test and the Student's *t*-test were used for all comparisons (GraphPad PRISM version 6.0d; GraphPad Software, Inc). A *p*-value less than 0.05 was considered significant (n.s. = non-significant, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ***p < 0.001).

Authors' contributions. A.-L.R., A.V., A.B., R.S., A.B., L.L., T.D., L.M., M.R. and F.G.-M. carried out the microbiology, bacterial–cells interaction, confocal microscopy, electronic microscopy (A.V. with C.d.C.). J.-L.H., L.K., C.d.C., I.V., R.B., L.M. and J.-L.G. participated in the design of the study and drafted the manuscript; A.-L.R., A.B., R.S., L.M., I.V., R.B. and J.-L.H. carried out the statistical analyses; J.-L.H., L.K., R.B., C.d.C. and I.V. conceived the study, designed the study, coordinated the study and drafted the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Competing interests. We have no competing interests.

Funding. This work was supported by the French Cystic Fibrosis Patients Association 'Vaincre la Mucoviscidose' (IC0709; IC0808; IC1010) and the French Research National Agency (ANR program DIMIVYR (ANR-13-BSV3-0007-01). R.B. acknowledges support by the Fondation Pour La Recherche Médicale FRM (DEQ20130326471). L.K. acknowledges the FRM (DEQ20150331719). I.V. was supported by a European Community FP7 Marie Curie Career Integration Grant Europe (autophagtuberculosis 293416), University of Toulouse and Vaincre la Mucoviscidose. A.V. would like to thank Infectiopôle Sud for financial support. C.d.C. and A.V. performed the EM observations and analyses in the PiCSL EM core facility (Institut de Biologie du Développement/Aix Marseille Université, Marseille), a member of the France-BioImaging French research infrastructure. Acknowledgements. We greatly acknowledge Dr S. Canaan for critical reading of the manuscript and help in formatting the TIFF files of EM figures and V. Dubois for formatting the figures. We wish to acknowledge TRI-Genotoul Imaging facility (Toulouse, France). The authors wish to thank Jean Paul Chauvin, head of this EM facility, for expert technical assistance with the electron microscopes and the digital camera.

References

- Guglielmetti L *et al.* 2015 Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view. *Future Microbiol.* **10**, 1467–1483. (doi:10. 1111/j.1462-5822.2005.00675.x)
- Griffith DE, Girard WM, Wallace RJJ. 1993 Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 1271–1278. (doi:10. 1164/ajrccm/147.5.1271)
- Olivier KN *et al.* 2003 Nontuberculous mycobacteria.
 I: Multicenter prevalence study in cystic fibrosis.
 Am. J. Respir. Crit. Care Med. **167**, 828–834.
 (doi:10.1164/rccm.200207-6780C)
- Levy I *et al.* 2008 Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg. Infect Dis.* 14, 378–384. (doi:10.3201/ eid1403.061405)
- Roux A-L *et al.* 2009 Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. *J. Clin. Microbiol.* 47, 4124–4128. (doi:10.1128/JCM. 01257-09)
- Esther CRJ, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. 2010 Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J. Cyst Fibros.* 9, 117–123. (doi:10.1016/j.jcf.2009.12.001)
- Qvist T *et al.* 2015 Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J. Cyst Fibros.* 14, 46–52. (doi:10. 1016/j.jcf.2014.08.002)
- Duarte RS *et al.* 2009 Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2149–2155. (doi:10.1128/ JCM.00027-09)
- Leão SC *et al.* 2010 Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. *Future Microbiol.* 5, 971–980. (doi:10.2217/fmb.10.49)
- Cullen AR, Cannon CL, Mark EJ, Colin AA. 2000 Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? Am. J. Respir. Crit Care Med. 161, 641–645. (doi:10.1164/ajrccm.161.2. 9903062)
- Jonsson BE, Gilljam M, Lindblad A, Ridell M, Wold AE, Welinder-Olsson C. 2007 Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1497–1504. (doi:10.1128/JCM.02592-06)
- 12. Catherinot E *et al.* 2009 Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*.

J. Clin. Microbiol. **47**, 271–274. (doi:10.1128/JCM. 01478-08)

- Qvist T *et al.* 2016 Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst Fibros.* **15**, 380–385. (doi:10.1016/j. jcf.2015.09.007)
- Chatterjee D, Khoo KH. 2001 The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 2018–2042. (doi:10.1420-682X/01/142018-25)
- Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, Lyons CR, Byrd TF. 2006 Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**, 1581–1590. (doi:10.1099/ mic.0.28625-0)
- Rottman M, Catherinot E, Hochedez P, Emile J-F, Casanova J-L, Gaillard J-L, Soudais C. 2007 Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* **75**, 5898–5907. (doi:10.1128/IAI.00014-07)
- de Chastellier C, Lang T, Thilo L. 1995 Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. *Eur. J. Cell Biol.* 68, 167–182.
- Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG. 1996 Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 15, 6960–6968.
- Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, 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, 13 326–13 331. (doi:10.1074/jbc.272. 20.13326)
- Russell DG. 2001 *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 569–577. (doi:10.1038/35085034)
- Tailleux L. *et al.* 2003 Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J. Immunol.* **170**, 1939–1948. (doi:10.4049/jimmunol.170.4.1939)
- Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. 2004 Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20, 367–394. (doi:10. 1146/annurev.cellbio.20.010403.114015)

- Clemens DL, Horwitz MA. 1995 Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* **181**, 257–270. (doi:10.10.1084/jem. 181.1.257)
- Anes E *et al.* 2006 Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages. *Cell Microbiol.* 8, 939–960. (doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00675.x)
- Bohsali A, Abdalla H, Velmurugan K, Briken V. 2010 The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. *BMC Microbiol.* **10**, 237. (doi:10.1186/1471-2180-10-237)
- Byrd TF, Lyons CR. 1999 Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun.* 67, 4700–4707. (doi:10.0019-9567/99)
- Oberley-Deegan RE, Lee YM, Morey GE, Cook DM, Chan ED, Crapo JD. 2009 The antioxidant mimetic, MnTE-2-PyP, reduces intracellular growth of *Mycobacterium abscessus. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 170–178. (doi:10.1165/rcmb.2008-01380C)
- Nessar R, Reyrat J-M, Davidson LB, Byrd TF. 2011 Deletion of the mmpL4b gene in the *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response. *Microbiology* **157**, 1187–1195. (doi:10. 1099/mic.0.046557-0)
- Tomashefski JFJ, Stern RC, Demko CA, Doershuk CF. 1996 Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. An autopsy study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 523–528. (doi:10.1164/ajrccm. 154.2.8756832)
- Bernut A, Herrmann J-L, Kissa K, Dubremetz J-F, Gaillard J-L, Lutfalla G, Kremer L. 2014 *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E943 – E952. (doi:10.1073/pnas.1321390111)
- Catherinot E et al. 2007 Hypervirulence of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain. Infect Immun. 75, 1055–1058. (doi:10.1128/IAI. 00835-06)
- Riordan JR *et al.* 1989 Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073. (doi:10.1126/science.2475911)
- Draper P. 1974 The mycoside capsule of Mycobacterium avium 357. J. Gen. Microbiol. 83, 431–433. (doi:10.1099/00221287-83-2-431)

11

- Medjahed H, Reyrat J-M. 2009 Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1331–1338. (doi:10.1128/AEM. 01914-08)
- Bernut A *et al.* 2016 Insights into the smoothto-rough transitioning in *Mycobacterium bolletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol. Microbiol.* 99, 866–883. (doi:10.1111/mmi.13283)
- 36. Roux A-L *et al.* 2011 Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol.* 13, 692-704. (doi:10.1111/j.1462-5822.2010. 01565.x)
- Sturgill-Koszycki S *et al.* 1994 Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263, 678–681. (doi:10.1126/science.8303277)
- Mwandumba HC, Russell DG, Nyirenda MH, Anderson J, White SA, Molyneux ME, Squire. 2004 *Mycobacterium tuberculosis* resides in nonacidified vacuoles in endocytically competent alveolar macrophages from patients with tuberculosis and HIV infection. *J. Immunol.* **172**, 4592–4598. (doi:10.4049/jimmunol.172.7.4592)
- 39. de Chastellier C, Forquet F, Gordon A, Thilo L. 2009 Mycobacterium requires an all-around closely apposing phagosome membrane to maintain the maturation block and this apposition is re-established when it rescues itself from phagolysosomes. *Cell Microbiol.* **11**, 1190–1207. (doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01324.x)
- Pethe K, Swenson DL, Alonso S, Anderson J, Wang C, Russell DG. 2004 Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 13 642–13 647. (doi:10.1073/pnas. 0401657101)
- Yates RM, Hermetter A, Russell DG. 2005 The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. *Traffic* 6, 413–420. (doi:10.1111/ j. 1600-0854.2005.00284.x)
- de Chastellier C. 2009 The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology* 214, 526-542. (doi:10.1016/j.imbio.2008.12.005)
- de Chastellier C, Thilo L. 1997 Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 49–62.
- Pietersen R, Thilo L, de Chastellier C. 2004 Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium modify the composition of the phagosomal membrane in infected macrophages by selective depletion of cell surface-derived glycoconjugates. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 153–158. (doi:10.1078/0171-9335-00370)
- Stamm LM *et al.* 2003 *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actinbased motility. *J. Exp. Med.* **198**, 1361–1368. (doi:10.1084/jem.20031072)

- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. 2007 *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287–1298. (doi:10.1016/j.cell.2007.05.059)
- Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, Enninga J. 2012 Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* 8, e1002507. (doi:10.1371/journal.ppat.1002507)
- Dubée V *et al.* 2015 β- Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 1051–1058. (doi:10.1093/jac/dku510)
- Huang J, Brumell JH. 2014 Bacteria autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 101–114. (doi:10.1038/nrmicro3160)
- Zullo AJ, Lee S. 2012 Mycobacterial induction of autophagy varies by species and occurs independently of mammalian target of rapamycin inhibition. *J. Biol. Chem.* 287, 12 668–12 678. (doi:10.1074/jbc.M111.320135)
- Bah A, Lacarrière C, Vergne I. 2016 Autophagyrelated proteins target ubiquitin-free mycobacterial compartment to promote killing in macrophages. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 6, 53 (doi:10.3389/ fcimb.2016.00053)
- Bryant JM, Grogono DM, Parkhill J, Floto RA. 2013 Transmission of *M. abscessus* in patients with cystic fibrosis—authors' reply. *Lancet* 382, 504. (*London, England*). (doi:10.1016/S0140-6736(13)61709-2)
- Davidson LB, Nessar R, Kempaiah P, Perkins DJ, Byrd TF. 2011 *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by HD2 gene expression and IL-8 release. *PLoS ONE* 6, e29148. (doi:10.1371/journal.pone. 0029148)
- Baltierra-Uribe SL, de García-Vásquez MJ, Castrejón-Jiménez NS, Estrella-Piñón MP, Luna-Herrera J, García-Pérez BE. 2014 Mycobacteria entry and trafficking into endothelial cells. *Can. J. Microbiol.* **60**, 569–577. (doi:10.1139/cjm-2014-0087)
- Simeone R, Sayes F, Song O, Gröschel MI, Brodin P, Brosch R, Majlessi L. 2015 Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence *in vivo*. *PLoS Pathog*. **11**, e1004650. (doi:10.1371/journal.ppat.1004650)
- Deretic V, Saitoh T, Akira S. 2013 Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 722–737. (doi:10.1038/nri3532)
- Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, Av-Gay Y. 2015 Immunoevasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol. Rev.* 264, 220–232. (doi:10.1111/imr. 12268)
- Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. 2003 Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 5437–5442. (doi:10.1073/pnas.0737613100)
- 59. Corrales RM, Molle V, Leiba J, Mourey L, de Chastellier C, Kremer L. 2012 Phosphorylation of

mycobacterial PcaA inhibits mycolic acid cyclopropanation: consequences for intracellular survival and for phagosome maturation block. *J. Biol. Chem.* **287**, 26 187–26 199. (doi:10.1074/ jbc.M112.373209)

- Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, Cosma CL, Ramakrishnan L. 2014 Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505, 218–222. (doi:10.1038/nature12799)
- Villeneuve C, Etienne G, Abadie V, Montrozier H, Bordier C, Laval F, Daffe M, Maridonneau-Parini I, Astarie-Dequeker C. 2003 Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages: identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J. Biol. Chem.* 278, 51 291–51 300. (doi:10.1074/jbc.M306554200)
- 62. Rhoades ER, Archambault AS, Greendyke R, Hsu F-F, Streeter C, Byrd TF. 2009 *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF- α by preventing interaction with TLR2. *J. Immunol.* **183**, 1997–2007. (doi:10.4049/jimmunol.0802181)
- Frehel C, de Chastellier C, Lang T, Rastogi N. 1986 Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic Mycobacterium avium. Infect Immun. 52, 252–262.
- 64. Tereletsky MJ, Barrow WW. 1983 Postphagocytic detection of glycopeptidolipids associated with the superficial L1 layer of *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun.* **41**, 1312–1321.
- Shimada K, Takimoto H, Yano I, Kumazawa Y. 2006 Involvement of mannose receptor in glycopeptidolipid-mediated inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Microbiol. Immunol.* 50, 243–251. (doi:10.1111/j.1348-0421.2006. tb03782.x)
- Kano H, Doi T, Fujita Y, Takimoto H, Yano I, Kumazawa Y. 2005 Serotype-specific modulation of human monocyte functions by glycopeptidolipid (GPL) isolated from *Mycobacterium avium* complex. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 335–339. (doi:10.1248/bpb. 28.335)
- 67. Ripoll F *et al.* 2007 Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae. BMC Genomics* **8**, 114. (doi:10.1186/1471-2164-8-114)
- Harriff MJ, Wu M, Kent ML, Bermudez LE. 2008 Species of environmental mycobacteria differ in their abilities to grow in human, mouse, and carp macrophages and with regard to the presence of mycobacterial virulence genes, as observed by DNA microarray hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 275–285. (doi:10.1128/AEM.01480-07)
- 69. Kocincova D, Winter N, Euphrasie D, Daffe M, Reyrat J-M, Etienne G. 2009 The cell surface-exposed glycopeptidolipids confer a selective advantage to the smooth variants of *Mycobacterium smegmatis in vitro. FEMS Microbiol. Lett.* **290**, 39–44. (doi:10. 1111/j.1574-6968.2008.01396.x)

12 rsob.royalsocietypublishing.org Open Biol. 6: 160185

- 70. Pawlik A et al. 2013 Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus. Mol. Microbiol. 90, 612-629. (doi:10. 1111/mmi.12387)
- 71. Houben D et al. 2012 ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. Cell Microbiol. 14, 1287-1298. (doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x)
- 72. Wassermann R et al. 2015 Mycobacterium tuberculosis differentially activates cGAS- and inflammasome-dependent intracellular immune responses through ESX-1. Cell Host Microbe 17, 799-810. (doi:10.1016/j.chom.2015. 05.003)
- 73. Wang J et al. 2015 Insights on the emergence of Mycobacterium tuberculosis from the analysis of Mycobacterium kansasii. Genome

Biol. Evol. 7, 856-870. (doi:10.1093/ gbe/evv035)

- 74. Bakala N'Goma JC et al. 2015 Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. Infect Immun. 83, 780-791. (doi:10.1128/IAI.02032-14)
- 75. Choo SW et al. 2014 Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen Mycobacterium abscessus reveals high evolutionary potential. Sci. Rep. 4, 4061. (doi:10. 1038/srep04061)
- 76. Sapriel G et al. 2016 Genome-wide mosaicism within Mycobacterium abscessus: evolutionary and epidemiological implications. BMC Genomics 17, 118. (doi:10.1186/s12864-016-2448-1)
- 77. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O. Koller BH. 1992 An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting.

Science 257, 1083-1088. (doi:10.1126/science. 257.5073.1083)

- 78. Colledge WH et al. 1995 Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. Nat. Genet. 10, 445-452. (doi:10.1038/ ng0895-445)
- 79. Dulphy N, Herrmann J-L, Nigou J, Rea D, Boissel N, Puzo G, Charron D, Lagrange PH, Toubert A. 2007 Intermediate maturation of Mycobacterium tuberculosis LAM-activated human dendritic cells. Cell Microbiol. 9, 1412-1425. (doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00881.x)
- 80. Guerardel Y, Maes E, Briken V, Chirat F, Leroy Y, Locht C, Strecker G, Kremer L. 2003 Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of Mycobacterium kansasii: novel structural features and apoptosis-inducing properties. J. Biol. Chem. 278, 36 637-36 651. (doi:10.1074/jbc. M305427200)







Sup. Figure 2: In vitro growth of the S and R variants of M. abscessus.



Sup. Figure 3: Comparative intracellular growth of the S (A) and R (B) variants in wild type and $\Delta F508$ murine M φ respectively.



Sup. Figure 4: M. abscessus S variant is able to damage the phagosome membrane of THP-1 cells as assessed by FRET.

ANNEXE 3 – Bakala N'Goma *et al.* 2015 Article Interaction *M. abscessus* et *A. castellanii* et rôle de la PLC

L'analyse du génome de *M. abscessus* montre que cette mycobactérie possède les voies métaboliques typiquement trouvées chez les micro-organismes environnementaux qui sont en contact avec le sol, les plantes, et les milieux aquatiques, où les amibes sont souvent présentes. *M. abscessus* possède également plusieurs gènes caractérisés seulement chez les bactéries pathogènes, notamment un gène codant pour une phospholipase C absente de la plupart des autres MCR. En collaboration avec l'équipe de Stéphane Canaan (Enzymologie Interfaciale et Physiologie de la Lipolyse UMR7282, CNRS, Marseille), nos équipes ont montré que la PLC purifiée de *M. abscessus* était hautement cytotoxique pour les macrophages de souris et que la perte d'activité PLC était délétère pour *M. abscessus* en terme de survie intracellulaire dans les amibes. Cette protéine PLC s'est révélée être exprimée uniquement en co-culture avec les amibes et ainsi une pré-culture en amibes améliorait significativement l'infectivité pulmonaire de *M. abscessus* dans un modèle animal de souris. La PLC apparait donc importante pour la virulence de *M. abscessus*.

Malgré les difficultés d'isolement de *M. abscessus* à partir de sources environnementales, les résultats de cette étude suggèrent que *M. abscessus* a évolué en étroite relation avec les protozoaires environnementaux, ce qui soutient l'argument que les amibes peuvent contribuer à la virulence des mycobactéries opportunistes.

Article

Mycobacterium abscessus Phospholipase C Expression Is Induced during Coculture within Amoebae and Enhances *M. abscessus* Virulence in Mice

Auteurs

Jean Claude Bakala N'Goma, Vincent Le Moigne, Nathalie Soismier, <u>Laura Laencina</u>, Fabien Le Chevalier, Anne-Laure Roux, Isabelle Poncin, Carole Serveau-Avesque, Martin Rottman, Jean-Louis Gaillard, Gilles Etienne, Roland Brosch, Jean-Louis Herrmann, Stéphane Canaan, Fabienne Girard-Misguich

Infect Immun. 2015 Feb;83(2):780-91. doi: 10.1128/IAI.02032-14. Epub 2014 Dec



Mycobacterium abscessus Phospholipase C Expression Is Induced during Coculture within Amoebae and Enhances *M. abscessus* Virulence in Mice

Jean Claude Bakala N'Goma,^a Vincent Le Moigne,^b Nathalie Soismier,^{b,c} Laura Laencina,^b Fabien Le Chevalier,^{d,e} Anne-Laure Roux,^{b,c} Isabelle Poncin,^a Carole Serveau-Avesque,^a Martin Rottman,^{b,c} Jean-Louis Gaillard,^{b,c} Gilles Etienne,^{f,g} Roland Brosch,^d Jean-Louis Herrmann,^{b,c} Stéphane Canaan,^a Fabienne Girard-Misguich^b

CNRS—Aix-Marseille Université—Enzymologie Interfaciale et Physiologie de la Lipolyse UMR7282, Marseille, France^a; EA 3647, EPIM, UFR des Sciences de la Santé—Simone Veil, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Montigny le Bretonneux, France^b; Service de Microbiologie, Hôpital Raymond Poincaré, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Garches, France^c; Institut Pasteur, Unit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, Paris, France^d; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Cellule Pasteur, Paris, France^e; Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (Unité Mixte de Recherche 5089), Département Tuberculose Biologie des Infections, Toulouse, France^f; Université de Toulouse (Université Paul Sabatier, Toulouse III), Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France^g

Mycobacterium abscessus is a pathogenic, rapidly growing mycobacterium involved in pulmonary and cutaneo-mucous infections worldwide, to which cystic fibrosis patients are exquisitely susceptible. The analysis of the genome sequence of *M. abscessus* showed that this bacterium is endowed with the metabolic pathways typically found in environmental microorganisms that come into contact with soil, plants, and aquatic environments, where free-living amoebae are frequently present. *M. abscessus* also contains several genes that are characteristically found only in pathogenic bacteria. One of them is *MAB_0555*, encoding a putative phospholipase C (PLC) that is absent from most other rapidly growing mycobacteria, including *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium smegmatis*. Here, we report that purified recombinant *M. abscessus* PLC is highly cytotoxic to mouse macrophages, presumably due to hydrolysis of membrane phospholipids. We further showed by constructing and using an *M. abscessus* PLC knockout mutant that loss of PLC activity is deleterious to *M. abscessus* intracellular survival in amoebae. The importance of PLC is further supported by the fact that *M. abscessus* PLC was found to be expressed only in amoebae. Aerosol challenge of mice with *M. abscessus* strains that were precultured in amoebae enhanced *M. abscessus* lung infectivity relative to *M. abscessus* grown in broth culture. Our study underlines the importance of PLC for the virulence of *M. abscessus*. Despite the difficulties of isolating *M. abscessus* from environmental sources, our findings suggest that *M. abscessus* has evolved in close contact with environmental protozoa, which supports the argument that amoebae may contribute to the virulence of opportunistic mycobacteria.

The recognition of the role of *Mycobacterium abscessus* in human pathology has taken several decades, due to confusion in many studies between this mycobacterium and the very closely related species *Mycobacterium chelonae*. It was only in 1992 that these two species were distinguished and *M. abscessus* elevated to the rank of species (1).

These two phylogenetically closely related, rapidly growing mycobacteria (RGM), which have identical 16S ribosomal rRNA gene sequences, are distinguished by different pathogenicity patterns. *M. chelonae*, generally less pathogenic than *M. abscessus*, is implicated in skin and soft tissue infections and only occasionally involved in lung infections. *M. abscessus* is currently the most frequently isolated RGM in human pathology and the main RGM involved in lung infections (2, 3), with a particular link to cystic fibrosis (CF) patients (4–6). *M. abscessus* is also the main RGM responsible for iatrogenic infections, and plastic surgery infections) (7–9).

The environmental source of *M. abscessus* that might serve as a reservoir for human infection is currently unknown (10). Although the gene pool of *M. abscessus* (11) suggests that this bacterium has evolved in an aquatic environment at the interface with plants, as shown by the presence of genes coding for resistance to arsenic, i.e., cysteine desulfurases, which are found mainly in en-

vironmental organisms (11), some other genes of M. *abscessus* indicate that this bacterium tends to specialize in intracellular parasitism (12). The hypothesis that M. *abscessus* has evolved in an

Received 12 May 2014 Returned for modification 13 June 2014 Accepted 26 November 2014

Accepted manuscript posted online 8 December 2014

Citation Bakala N'Goma JC, Le Moigne V, Soismier N, Laencina L, Le Chevalier F, Roux A-L, Poncin I, Serveau-Avesque C, Rottman M, Gaillard J-L, Etienne G, Brosch R, Herrmann J-L, Canaan S, Girard-Misguich F. 2015. *Mycobacterium abscessus* phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances *M. abscessus* virulence in mice. Infect Immun 83:780–791. doi:10.1128 /IAI.02032-14.

Editor: C. R. Roy

Address correspondence to Jean-Louis Herrmann, jean-louis.herrmann@rpc.aphp.fr, or Fabienne Girard-Misguich, fabienne.girard-misguich@uvsq.fr. J.C.B.N., V.L.M., and N.S. contributed equally to this study.

J.-L.H. and F.G.-M. are co-senior authors.

Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128 /IAI.02032-14.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/IAI.02032-14 infections (13). Amoebae are an integral part of this aquatic and telluric environment, and several reports have already shown an association of mycobacteria with free-living amoebae in water networks (14– 17), although some species, including *M. abscessus*, were not recovered at all (18, 19), mainly due to aggressive methods of decontamination (20). Mycobacteria can grow in amoebae (21–25), and amoebic coculture has been successfully used to isolate *Mycobacterium massiliense* (26), a member of the *M. abscessus* complex. *M. abscessus* was also described as being able to multiply in trophozoites and to survive in amoeba cysts, the persistent stage of amoebae (12, 23), supporting the idea that factors other than rapid growth may be involved in mycobacterium-amoeba interactions.

Comparative genomic analyses of M. abscessus, M. chelonae, and Mycobacterium smegmatis genomes has allowed the confirmation of differences observed between these RGM in terms of pathogenicity (27) and intracellular behavior (28; A.-L. Roux, T. Deramaudt, R. Simeone, A. Viljoen, A. Bernut, A. Bah, N. Dulphy, M. Rottman, A. Toubert, J.-L. Gaillard, L. Tailleux, L. Kremer, I. Vergne, C. de Chastellier, L. Majlessi, R. Brosch, and J.-L. Herrmann, unpublished data) by highlighting several M. abscessus key genes encoding virulence factors (11). Interestingly, these genes seem to have been acquired by horizontal gene transfer (HGT) mainly from aquatic and telluric pathogenic bacteria, including those playing a major role in patients with CF: Pseudomonas spp. and Burkholderia spp. (11). One key determinant acquired by HGT is phospholipase C (PLC), encoded by the plcC gene (MAB_0555) (11). PLC was reported to be involved in the intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis (29) and is absent from both M. chelonae and M. smegmatis. However, neither its role in the pathogenicity of M. abscessus nor its interaction with eukaryotic cells has been investigated yet.

Bacterial PLCs are known to play important roles in bacterial pathogenesis, increasing bacterial survival by inducing inappropriate host cellular signaling mechanisms and direct cytotoxicity or by impairing lung inflammatory responses (for reviews, see references 30, 31, and 32). In mycobacteria, PLC (and sphingomyelinase) activity seems to be associated with the most virulent species (33).

Association of PLC activity with virulent species prompted us to initiate a detailed molecular characterization of the *M. abscessus* PLC activities. Here, we describe the biological activities of the *M. abscessus* PLC. Data were obtained from experiments with purified recombinant PLC, as well as from analysis of its role in three different eukaryotic infection models, for which we employed a PLC knockout mutant of *M. abscessus* and its complemented derivative that were both constructed in this study.

MATERIALS AND METHODS

Mycobacterial and amoeba strains, reagents, and antibodies. Smooth *M. abscessus* CIP104536^{TS} (CIP-S) and the recombinant strain *M. smegmatis* mc²155 groEL1 Δ C (34) were grown aerobically at 37°C in Middlebrook 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol. *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010) was grown at 28°C without CO₂ in PYG broth (35). *p*-Nitrophenylphosphorylcholine (*p*-NPPC) and the unlabeled phospholipids phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylinositol (PI) were from Sigma-Aldrich. Radiolabeled 1-palmitoyl-2-[¹⁴C]palmitoyl-glycerophosphocholine (DPPC) and [1-¹⁴C]palmitic acid were from GE Healthcare. *Bacillus cereus* PC-PLC enzyme was from Sigma-Aldrich. Polyclonal mouse anti-PLC antibodies were obtained after three DNA immunizations of mice with a plasmid containing the PLC sequence under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter ((V. Le Moigne, M. Rottman, C. Goulard, B. Barteau, I. Poncin, N. Soismier, S. Canaan, B. Pitard, J.-L. Gaillard, and J.-L. Herrmann, unpublished results).

Cloning of PLC (MAB_0555). MAB_0555, encoding M. abscessus PLC with its predicted Tat signal sequence, was amplified by PCR (see Table S1 in the supplemental material), gel purified, and cloned after ligation into pCR2.1-TOPO (Life Technologies, France) (pTOPO-MAB_0555). MAB_0555 was again amplified from pTOPO-MAB_0555 with a second set of primers (see Table S1 in the supplemental material), which includes restriction sites for HindIII and NcoI. Amplified products were then digested, purified, and cloned into pMyC (pMyC-MAB_0555) as previously described (36). pMyc-MAB_0555 was transformed into the recombinant strain M. smegmatis mc²155 groEL1ΔC, which was further used for protein purification of PLC.

PLC purification, enzymatic activity, and cell experiments with purified recombinant M. abscessus PLC. PLC was purified from a single transformed colony of M. smegmatis::pMyc-MAB_0555 as described previously for M. tuberculosis PLCs (36). Recombinant M. abscessus PLC (rPLC_{Ma}) was concentrated to 1 mg/ml, analyzed by MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) mass spectrometry and N-terminal sequencing, and stored at -80°C. Phospholipase C activity was measured with p-NPPC, PC, or sphingomyelin (SM) as the substrate, as previously described (36), using the fluorescent Amplex red PC-PLC kit assay or the fluorescent Amplex red sphingomyelinase kit assay (Molecular Probes, Life Technologies) as described by the supplier. Competition assays between PC and PE (or PI) (30 mg/ml and 25 mg/ml in chloroform, respectively) were performed using the Amplex red PC-PLC assay for substrate preference. Inhibition assays were performed using the D609 compound (9.38 mM final concentration in water) (Sigma), at molecular inhibitor/enzyme ratios of 200 and 600. The residual activity was measured using the Amplex red PC-PLC kit as described above. The hemolytic and cytotoxic effects of purified rPLC_{Ma} were evaluated as previously described (36). Incorporation of labeled fatty acids ([1-14C] palmitic acid) into macrophages and rPLC_{Ma} activity on radiolabeled macrophages were evaluated as described previously (36, 37).

Construction of the PLC KO (MAB_0555) mutant in M. abscessus. The M. abscessus PLC knockout (KO) mutant was obtained by allelic exchange in M. abscessus CIP-S using the strategy previously reported (38). Briefly, the zeocin cassette (Streptoalloteichus hindustanus ble) was inserted into the HindIII-ClaI region spanning the 3' end of MAB_0554 and into MAB_0555 (nucleotides 731 to 801 in MAB_0554 to nucleotides 1 to 590 in MAB_0555). The overall fragment was cloned into pMVZ261 and further restricted by PvuII-HpaI for purification and electroporation in M. abscessus CIP-S bearing the recombineering plasmid pJV53 (39). Homologous recombination was checked by a first PCR screen using forward and reverse primers outside the deleted region (see Table S1 in the supplemental material) and then by Southern blotting using a zeocin probe and a 532-bp probe matching the 3' end of MAB_0555 and prepared by amplification using forward and reverse primers (see Table S1 in the supplemental material). To complement the M. abscessus PLC KO mutant, pTOPO-MAB_0555 was digested and MAB_0555 was cloned under the control of the hsp60 promoter into the integrative plasmid pMVZ361-Kan-Zeo. The plasmid was then electroporated into the wildtype (WT) and PLC KO strains. In vitro growth of WT, PLC KO, and PLC-complemented M. abscessus strains was monitored at 600 nm.

TLC and mass spectrometry comparative analysis of the WT and PLC KO mutant of *M. abscessus*. Mycobacterial wet cells were sequentially extracted with CHCl₃-CH₃OH (1:2, vol/vol), with CHCl₃-CH₃OH (1:1, vol/vol) and then three times with CHCl₃-CH₃OH (2:1, vol/vol). The

organic phases were pooled, extensively washed with water, and evaporated to dryness. Lipids were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel 60-precoated plates (0.25-mm thickness; Merck) developed with $CHCl_3$ - CH_3OH (90:10 [vol/vol]) for glycolipids or $CHCl_3$ - CH_3OH - H_2O (60:35:8) for phospholipids. Sugar-containing compounds were visualized by spraying plates with 0.2% anthrone in concentrated sulfuric acid, followed by heating, whereas the Dittmer-Lester reagent and ninhydrin were used to detect phosphorus- and amino group-containing substances, respectively.

For mass spectrometry (MS) experiments, total lipids were extracted from bacterial cell pellets with methanol (MeOH)-CHCl₃ (2:1, vol/vol) overnight at room temperature (RT). Supernatants were filtered and then poured into new tubes for evaporation under nitrogen flow. CHCl₃-MeOH (2:1, vol/vol) was then added to cell pellets and incubated at RT for 24 h. After incubation, the contents of the glass tubes were filtered on glass pipettes and poured into the corresponding tube containing the previously evaporated materials. After solvent evaporation, H₂O-CHCl₃ (1:1, vol/vol) was added, and the tube was incubated for 24 h. After water-lipid separation, water was removed until the organic phase was limpid. Lipids extracts were evaporated and dissolved in isopropanol-methanol (70:30, vol/vol), 0.02% (mass/vol) formic acid, 0.01% (mass/vol) ammonium hydroxide. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry was performed as previously described (40). Briefly, lipid extracts were injected by infusion into the MS. Ionization was maintained at 325°C with a 5-liter/min drying gas flow, a 200,000-Pa nebulizer pressure, and 5,500 V. Spectra were collected in positive-ion mode from m/z 200 to 3,000 at 1 spectrum/s. Spectrometer was calibrated in positive-ion mode with a sodium iodide solution (NaI at 2 µg/ml in 50% isopropanol). Collision-induced dissociation (CID) MS was performed with energy of 30 V. Data were collected and processed through Analyst QS 1.1 software from AB-MDS-Sciex.

Coculture of *M. abscessus* strains and murine macrophages. Bone marrow-derived murine macrophages (BMDMs) were prepared as previously described (41). BMDMs were grown in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C with 5% CO_2 . Coculture experiments were performed as previously described (36, 41, 42) at a multiplicity of infection (MOI) of one bacterium per macrophage. After 3 h of incubation, the cells were washed 3 times with RPMI to remove extracellular bacteria and incubated with amikacin (250 µg/ml) to kill the remaining extracellular bacteria. Fresh medium containing 50 µg/ml of amikacin was then added. The number of CFU/ml was determinate at days 0, 1, 3, and 6 of the culture after cold-water lysis of macrophages.

Coculture of M. abscessus strains and A. castellanii. For amoeba infection assays, M. abscessus cultures were washed 3 times in 30 ml of Page's modified Neff's amoeba saline (PAS), which contains no source of carbon or azote (35). The mycobacterial inoculum was thoroughly mixed, and mycobacteria were then dispersed by 10 passages of the bacterial suspension through a 25-gauge needle attached to a 5-ml syringe followed by 10 passages through a 29.5-gauge needle attached to a 1-ml syringe. Mycobacterial suspensions were then adjusted in PAS buffer to a concentration of 2.5×10^7 bacteria per ml by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀). CFU counts were also confirmed on the inocula. Five hundred microliters of the A. castellanii suspension was washed three times in PAS buffer and dispatched into a 48-well plate. Following 1 h of incubation at 32°C, the amoeba monolayer was inoculated with 200 µl of a bacterial suspension (MOI, 25 bacteria/amoeba). After 3 h of incubation at 32°C, extracellular mycobacteria were removed by three thorough washings in PAS buffer, followed by one supplementary 2-h incubation in the presence of 100 µg/ml of amikacin, in order to kill all extracellular mycobacteria. PAS (500 µl) was the added. Every 24 h, 50 µl (107) heatinactivated Escherichia coli (70°C for 60 min) was added to each well to slow the transition from trophozoite to cyst. The number of CFU/ml was determined for each M. abscessus strain after lysis of the A. castellanii monolayer with 1% SDS for 30 min at 32°C, at 1, 2, 3, and 5 days of coculture.

Western blotting for PLC expression. *M. abscessus* strains, either grown in 7H9 or cocultured 1 to 2 days with amoebae, were lysed by sonication on ice (three times for 30 s each) with proteases inhibitors (Complete Mini; Roche) plus E64 (20 μ M final concentration) and leupeptin (20 μ M final concentration). Thirty micrograms of cell lysates was separated on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes, which were then incubated with murine anti-PLC antibodies diluted 1/300. After addition of a rabbit anti-mouse antibody linked to peroxidase, the signal was revealed using the Sirius chemiluminescent substrate (Advansta, USA).

RT-PCR for PLC mRNA expression. For total mRNA extraction of mycobacteria from macrophage cocultures, macrophages were infected for 5 days with *M. abscessus* (MOI = 1) in F75 flasks. Each day, the culture medium was discarded, and the infected monolayer was washed with $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS) and then resuspended in 10 ml of guanidine thiocyanate solution (4 M) to lyse macrophages. The lysates were then centrifuged at 2,500 \times g for 30 min to concentrate intracellular bacteria. The pellet of intracellular mycobacteria or pellet of mycobacteria cultivated at 30°C or 37°C was then resuspended in TRIzol, and totalmRNA extraction was performed using TRIzol in the presence of zirconia/silica beads and after bead beating at maximum speed for 30 s twice. After a chloroform-and-isopropanol precipitation, RNA samples were treated twice with DNase I Amp Grade (Invitrogen) (1 U/µg of RNA). Total RNA integrity and concentration were assessed with the Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad). One microgram of total RNA was used for a reverse transcription reaction with oligo(dT)₁₂₋₁₈ primers and SuperScript II reverse transcriptase (SuperScript first-strand synthesis system for reverse transcription-PCR [RT-PCR]; Invitrogen, Carlsbad, CA). Negative controls were made by replacing the reverse transcriptase with diethyl pyrocarbonate-treated water. Diluted cDNA was combined with primer/probe sets (see Table S1 in the supplemental material) and SYBR green I master mix (Roche) according to the manufacturer's recommendations. Samples were normalized internally using the average cycle threshold (C_T) of sigA as the reference (42). sigA was used as the constitutive gene as previously described (43). The concentration ratio (target/sigA mRNA) was calculated using ReLQuant Roche software and expressed in arbitrary units.

Mouse model of M. abscessus aerosol infection. BALB/c mice were challenged with aerosolized M. abscessus using an aerosol generator under agreement number B92-033-01. This apparatus used a Micro Mist smallvolume nebulizer (Hudson RCI-Teleflex Medical, Research Triangle Park, NC, USA) containing 6 ml of mycobacterial solution at various concentrations. Presleeping mice (isoflurane; Abbott, Rungis, France) were anesthetized with 200 µl of Hypnomidate (etomidate; Janssen-Cilag, France) and placed in an open 50-ml syringe fixed on top of a closed compartment containing the nebulizer. The nebulization in this device lasted 15 min, the time necessary to vaporize all the bacterial solution. Aerosol infections were performed with fresh aliquots of M. abscessus strains grown on 7H9 as described previously (41), to achieve an inoculum of 1×10^8 mycobacteria. When mice were infected by aerosolized M. abscessus strains cocultured with amoebae, the infected amoebae were prepared by rapping the flasks vigorously and centrifuging at $1,000 \times g$ for 5 min. The resulting pellet was suspended in 10 ml of PBS and adjusted to a concentration of 2 \times 10⁶ CFU/ml after SDS lysis of amoebae. Lungs, livers, and spleens were collected in sterile distilled water and homogenized, and 10-fold serial dilutions were then plated on VCA3 plates (vancomycin, colimycin, and amphotericin B; bioMérieux, France) for CFU enumeration. Plates were incubated at 37°C up to 5 days. Results were expressed as the mean \log_{10} CFU per organ. The minimum detection limit per organ was 20 CFU (or 1.3 log₁₀ CFU) per lung, spleen, or liver. A two-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey posttest were performed using GraphPad prism program version 5 for statistical compar-

Statistical analysis. Fisher's exact test and Student's *t* test were used. A *P* value of < 0.05 was considered significant.

Organism	Uniprot no.	Protein name	Size (aa)	Maximal % identity	Length of homology region (aa)
Nonmycobacterial bacteria					
Pseudomonas aeruginosa	P15713*	Nonhemolytic PLC	692	45	503
Burkholderia cenocepacia	A0KBL6	PLC	723	43	538
Ralstonia pickettii	B2UDZ8	PLC, phosphocholine specific	700	42	521
Burkholderia cenocepacia	A0B2U2	PLC	704	42	519
Pseudomonas aeruginosa	P06200	Hemolytic PLC	730	42	515
Bordetella avium	Q2KUR2	Nonhemolytic PLC	693	42	509
Stenotrophomonas maltophilia	B2FL44	Putative nonhemolytic PLC	706	41	525
Burkholderia cenocepacia	A0K5Z1	PLC	714	41	516
Burkholderia multivorans	B3CZ34	PLC	718	41	515
Burkholderia multivorans	A9ADA7	PLC, phosphocholine specific	752	41	496
Bordetella avium	Q2L0W2	Nonhemolytic PLC	723	40	530
Ralstonia pickettii	B2UCT8	PLC, phosphocholine specific	719	40	520
Burkholderia multivorans	A9ALB9	PLC	771	39	519
Bordetella bronchiseptica	Q7WH05	Putative phospholipase	627	39	425
Burkholderia cenocepacia	A0B3P1	PLC	777	38	559
Pseudomonas fluorescens	Q4KC01	PLC, phosphocholine specific	715	38	546
Ralstonia pickettii	B2UJE7	PLC	474	30	456
Burkholderia multivorans	B3CZQ1	PLC	528	30	214
Burkholderia multivorans	B3D7M3	PLC	554	30	204
Burkholderia multivorans	A9AKI0	PLC	556	29	182
Burkholderia cenocepacia	A0B0A3	PLC	557	29	180
Mycobacteria					
Mycobacterium tuberculosis	P9WIA8*	PLC 4	514	42	465
Mycobacterium tuberculosis	P9WIB0*	PLC 3	517	40	496
Mycobacterium tuberculosis	P9WIB2*	PLC 2	521	39	504
Mycobacterium tuberculosis	P9WIB4*	PLC 1	520	38	503
Fungi					
Aspergillus fumigatus	B0XWP7	Phosphatidylglycerol specific phospholipase, putative	492	29	392
Aspergillus fumigatus	B0YCK0	Phosphatidylglycerol specific PLC, putative	509	26	406
Aspergillus fumigatus	B0XPD6	Phosphoesterase superfamily protein	456	26	396
^a Alignments were performed with Basic	Local Alignment Se	earch Tool (BLAST) program at http://blast.ncbi.plm.nih.gov.using	the protein BLA	ST algorithm as as	nino acide *

 TABLE 1 Maximal percentage of identity between the different PLC amino acid sequences from M. abscessus and M. tuberculosis or nonmycobacterial microorganisms^a

^{*a*} Alignments were performed with Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program at http://blast.ncbi.nlm.nih.gov, using the protein BLAST algorithm. aa, amino acids. *, PLC was biochemically characterized.

RESULTS

M. abscessus PLC resembles the PLC from CF pathogens. Ripoll et al. (11) reported the presence of a PLC-encoding gene (MAB_0555) in the M. abscessus genome. MAB_0555 has a length of 1,440 bp and encodes a 479-amino-acid protein (11). Inspection of the syntenic genomic regions and comparison with other mycobacterial genomes suggest that MAB_0555 was inserted just downstream of MAB_0554, which encodes a potential hydrolase/ lipase (11) that is conserved in a wide range of fast-growing and slowly growing mycobacteria (see Fig. S1 in the supplemental material). Phylogenetic analysis demonstrated a nonmycobacterial origin of MAB_0555, and more recent protein comparison performed for this study confirmed this trait (Table 1). The strongest identities were observed with several recently discovered Actinomycetes but more importantly in several major CF pathogens (Table 1): Burkholderia cenocepacia PLC (43% identity), Pseudomonas aeruginosa nonhemolytic and hemolytic PLCs (45% and 41% identity, respectively), Burkholderia multivorans PLC (41% identity), and Stenotrophomonas maltophilia putative nonhemolytic PLC (41% identity). Of note, a 29% identity was also observed with PLC of another CF pathogen, Aspergillus fumigatus putative

phosphatidylglycerol PLC. By comparison, the percent identity with the 4 PLCs present in *M. tuberculosis* varied between 38 and 42% (Table 1).

M. abscessus purified recombinant PLC hydrolyzes eukaryotic cells. (i) Expression in *M. smegmatis* and purification. rPLC_{Ma} was purified after acetamide induction. The ionic detergent Sarkosyl (1%) in the lysis buffer allowed solubilization and purification of the recombinant enzyme using immobilized metal ion affinity chromatography and fast protein liquid chromatography (IMAC-FPLC). Under these conditions, 10 to 15 mg of pure rPLC_{Ma} was obtained per liter of culture. SDS-PAGE and MALDI-TOF analysis of purified PLC showed that the apparent molecular mass of recombinant protein was compatible (Fig. 1A) with the expected theoretical molecular mass (52 kDa) based on the amino acid sequence, including the full-length TAT signal peptide (noncleaved), as previously noticed for *M. tuberculosis* PLCs (36). We then used approaches similar to those described previously (36) for the evaluation of *M. abscessus* PLC.

(ii) Biochemical hydrolytic activity of $rPLC_{Ma}$. $rPLC_{Ma}$ was able to hydrolyze *p*-NPPC with turnover and specific activity (5.68 mmol min⁻¹ mg⁻¹) similar to those of *B. cereus* and *C. perfringens*



FIG 1 (A, B, and C) Biochemical characterization of rPLC_{Ma}. (A) Purified rPLC_{Ma} was loaded on 12% SDS-PAGE. Molecular weight standards are on the left. Lane 1 contained purified rPLC_{Ma} (10 µg). The sample was loaded under reducing conditions, and the gel was then stained with Coomassie brilliant blue. (B) Time course hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) by 60 µg of rPLC_{Ma} (■) or 5 ng of recombinant B. cereus PC-PLC (○). The release of phosphocholine was measured indirectly by the fluorescence measurement of resorufin released using the Amplex red phosphatidylcholine kit and continuously monitored at a λ_{exc} of 510 nm and λ_{em} of 590 nm, (C) Substrate preference of rPLC_{Ma} and recombinant *B. creus* PC-PLC. Competition assays between PC and phosphatidylethan nolamine (PE) (or phosphatidylinositol [PI]) were carried out using different phospholipid ratios (PE [or PI]/PC = 2 or 5) and pure PC. A final PC quantity of 0.1 µmol was used in the pure-PC assay, and 0.2 µmol and 0.5 µmol of PE (or PI) were used for the other PE (PI)/PC ratios. The PC-PLC activity was continuously measured using the Amplex red PC-PLC kit. The relative activity (percent) of PC hydrolysis was calculated from the ratio of PC activity in the presence of PE (or PI) over PC activity in the absence of PE (or PI). (D, E, and F) Cytotoxic effects of rPLC_{Ma} on mouse macrophages. (D) Macrophage cellular state after 24 h of incubation, with no recombinant PLC (buffer only [negative control]), with 50 μ g of purified rPLC_{Ma} (rPLC_{Ma}), and with 50 μ g of heat-inactivated purified rPLC_{*Ma*} (rPLC_{*Ma*}, heat inactivated), as shown by light microscopy (magnification, ×200; bar, 25 μ m). (E) Purified rPLC_{*Ma*} (50 μ g; and 15 μ g of PC-PLC from *B. cereus* (O) were incubated with 1 \times 10⁶ RAW264.7 mouse macrophages. The values are shown as percent lysis, in which the amount of LDH released in wells with macrophages incubated with enzymes was compared to total LDH released in control wells in which all of the macrophages had been deliberately lysed. LDH released was quantified at 16, 24, and 48 h. The values are the means for triplicate samples. (F) Autoradiography of TLC plate showing the release of radiolabeled DAG, the product of phospholipid hydrolysis (indicated by the black arrow), after incubation of rPLC_{Ma} (50 µg, lane 2) and PC-PLC from *B. cereus* (15 µg, lane 3) with radiolabeled macrophages. For the negative control (lane 1), only the buffer without any pure enzyme was added in the incubation medium. Abbreviations: DAG; diacylglycerol; FA, free fatty acid; DPPC, dipalmitoyl-glycerophosphocholine.
M. abscessus Phospholipase C during Infection

PLCs (7.75 mmol min⁻¹ mg⁻¹ and 3.1 mmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively) (see Fig. S2A in the supplemental material). Comparatively, rPLC_{Ma} specific activity (0.1 nmol min⁻¹ mg⁻¹) measured using PC as the substrate (Fig. 1B) was far below the specific activity observed for *B. cereus* PC-PLC (165 nmol min⁻¹ mg⁻¹). It is noteworthy that both *B. cereus* PC-PLC and rPLC_{Ma} hydrolyze the same substrate; however, the catalytic mechanisms differ between the proteins, since the effect of D609 inhibitor totally abolished the activity of *B. cereus* PLC, while it had no effect on rPLC_{Ma} activity (data not shown).

rPLC_{*Ma*} was active within a large range of temperatures (25 to 55°C), its optimal temperature being 37°C, with an optimal pH of 7 to 7.5 (see Fig. S2B and C in the supplemental material). This activity was stable for the first 48 h but was completely abolished upon heat inactivation.

No sphingomyelinase activity was observed for rPLC_{Ma} (data not shown). However, the rPLC_{Ma} and B. cereus PC-PL substrate preferences and the activities of both enzymes were determined in the presence of different ratios of PI/PC or PE/PC (PE [or PI]/PC ratios = 2 and 5) (Fig. 1C). Under these experimental conditions, the hydrolysis of only the PC can be detected, and the substrate preference was deduced by the increasing or decreasing activity on PC. The PC-PLC activity of the B. cereus enzyme increased significantly (by a factor of 1.5) in the presence of PE, suggesting a better PC substrate presentation in the presence of PE. In contrast, the PC-PLC activity of $rPLC_{Ma}$ decreased by a factor of 1.5 in the presence of PE (Fig. 1C). Similar results were obtained in the presence of PI (Fig. 1C), suggesting no substrate preference. Finally, when a mixture of phospholipids was used as the substrate (Fig. 1C), the behavior of both enzymes can vary, again suggesting a different hydrolysis mechanism between B. cereus PC-PLC and rPLC_{Ma}.

(iii) rPLC_{*Ma*} lyses eukaryotic cells. rPLC_{*Ma*} did not lyse erythrocytes, unlike *B. cereus* or *C. perfringens* PLCs (data not shown). Comparatively, rPLC_{*Ma*} exhibited a strong cytotoxic effect on mouse macrophages (Fig. 1D) and on the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released (Fig. 1E). A level of macrophage lysis of 17% was detected after 16 h of incubation and increased over time to reach 55% after 48 h, while the cell monolayer was not affected in the presence of heat-inactivated rPLC_{*Ma*}.

We next evaluated rPLC_{*Ma*} macrophage cytotoxicity with [1-¹⁴C]palmitic acid incorporation into membrane phospholipids, and measuring the amount of radiolabeled membrane phospholipids released after membrane degradation. Purified rPLC_{*Ma*} released radiolabeled diacylglycerol (DAG), unlike the control sample (Fig. 1F). Altogether, we demonstrated that rPLC_{*Ma*} is active and possesses cytotoxic activity against macrophages, mainly by degrading the phospholipids of the cell membrane.

M. abscessus PLC as a virulence factor in eukaryotic cell infection models. (i) Construction of an *M. abscessus* PLC KO mutant. An *M. abscessus* PLC KO mutant was obtained by allelic exchange using the recombineering system (38). For the construction of the mutant, a zeocin cassette was inserted between the 3' end of *MAB_0554* and the 5' end of *MAB_0555*, thereby completely disrupting the PLC-encoding gene *MAB_0555* (Fig. 2A). Southern blot analysis allowed us to confirm that double crossingover and disruption of *MAB_0555* had occurred (Fig. 2B). We then constructed a PLC-complemented version by inserting a pMVZ361-*hsp60*pro-*MAB_0555* plasmid into the KO mutant. For control purposes, we also inserted the same plasmid into the

WT M. abscessus strain. Measurement of the PLC activity of the parental CIP-S strain, the PLC KO mutant, the complemented mutant, and the WT strain carrying the additional copy of PLC supplied by pMVZ361-hsp60pro-MAB_0555 revealed low and no PLC activity for the WT strain and the PLC M. abscessus KO mutant, respectively. These findings argue for low expression of PLC under in vitro conditions and confirmed the disruption of MAB_0555 in the KO mutant (Fig. 2C). In contrast, expression of PLC in either of the pMVZ361-hsp60pro-MAB_0555-carrying strains was associated with high and comparable activity (Fig. 2C). Of note, in vitro growth characteristics of the WT, the PLC M. abscessus KO mutant, and its complemented version were similar (Fig. 2D). In addition, lipid extract comparison by TLC (Fig. 2E) and MS (data not shown) between the WT strain and PLC M. abscessus KO mutant did not highlight qualitative or quantitative differences in parietal lipid composition between both strains.

(ii) Survival of the PLC *M. abscessus* KO mutant in BMDMs. To investigate the role of PLC in intracellular survival of *M. abscessus*, BMDMs were cocultivated with the WT strain, the PLC *M. abscessus* KO mutant, and the complemented PLC *M. abscessus* KO mutant. The absence of *MAB_0555* (PLC) failed to alter the growth of the WT strain in BMDMs, as the WT, PLC mutant, and complemented strains exhibited similar growth throughout the experiment (Fig. 3A). The comparable intracellular growth rate strongly suggests that the PLC activity does not confer any supplementary advantage to *M. abscessus* within murine macrophages.

(iii) Survival of the PLC M. abscessus KO mutant in A. castellanii. A. castellanii and M. abscessus strains were cocultured in order to evaluate the PLC contribution to M. abscessus survival in amoebae (23). As shown in Fig. 3B, WT M. abscessus was able to replicate and survive inside amoebae, although it was unable to grow in the PAS amoeba medium used during the coculture (data not shown). By comparison, the M. abscessus PLC KO mutant was greatly impaired and unable to survive throughout the course of the experiment (Fig. 3B). The lack of PLC seems to have been directly involved in this result, since the complemented PLC M. abscessus KO mutant strain was able to grow (although less than the WT) and to survive inside amoebae (Fig. 3B). Of note, the PLC M. abscessus KO mutant strain complemented only with the MAB_0554 gene behaved like the PLC M. abscessus KO mutant strain, confirming that the observed defect was not due to the 3' loss of MAB_0554 when the PLC KO mutant was being constructed (data not shown). Finally, we could not evaluate if growth in amoebae affects the production of the mycobacterial glycolipids, as the number of mycobacteria obtained after coculturing is insufficient to carry out a glycolipid analysis by TLC. In addition, the smooth morphotype was very stable after coculturing in amoebae, as previously demonstrated (13, 41, 43).

The different behavior of the mutant in amoebae or BM-DMs suggested the putative occurrence of *de novo* synthesis of PLC when *M. abscessus* is cocultivated with *A. castellanii*, which is of particular importance given the very low PLC production in *in vitro*-grown *M. abscessus* (Fig. 2C). We therefore further assessed this phenomenon by analyzing and comparing PLC expression at a transcriptional and translational level.

Expression of PLC is induced when *M. abscessus* is cocultured in *A. castellanii. MAB_0555* mRNA expression was quantified by RT-PCR after intramacrophage coculture (Fig. 3C) and *in vitro* growth (30°C and 37°C) of the different strains (Fig. 3D). Under both *ex vivo* and *in vitro* conditions, specific *MAB_0555*



FIG 2 Construction of the *M. abscessus plc* KO mutant by homologous recombination (HR). (A) *MAB_0554* and *MAB_0555* are separated by 4 bp. The *M. abscessus plc* KO mutant was thus constructed by amplifying a nearly 2-kbp *M. abscessus* fragment encompassing this region and cloning the zeocin resistance gene (*S. hindustanus ble*) into the HindIII (position 731 in *MAB_0554*)-ClaI (position 590 in *MAB_0555*) sites. The entire fragment was then electroporated into *M. abscessus* CIP-S containing the pJV53 plasmid inserted by HR into the *M. abscessus* chromosome. (B) Southern blotting analysis was performed after genomic DNA restriction by KpnI and gel electrophoresis. A 532-bp probe targeting the 3' conserved region of *MAB_0555* was used for hybridization with DNA fragments: a 2,704-bp band is observed with the WT strain (lane 1), and a 2,635-bp band is observed with the *M. abscessus* KO mutant (lane 2). (C) Respective PLC activity of the different constructed *M. abscessus* strains. Phospholipase C activity was measured with *p*-NPPC for the CIP-S, *plc* KO, CIP-S *plc* KO, *plc*-complemented, and CIP-S-*hsp60-plc* (*M. abscessus* pMVZ361-*hsp60*pro-*MAB_0555*, used as a control for PLC activity) strains. (D) *In vitro* growth curves estimated by spectrophotometry (OD₆₀₀) of CIP-S (circles), CIP-S *plc* KO (squares), and CIP-S *plc* KO *plc*-complemented (triangles) strains. (E) Glycolipid and phospholipid patterns of the different constructed *M. abscessus* strains. Total lipid contents of the WT *M. abscessus* strain (lane 1) and the *plc* KO *M. abscessus* strain strain. Total lipid and CHCl₃-CH₃OH-H₂O (60:35:8, vol/vol/vol) (right) as the solvent systems and anthrone revelation (GPLs, glycopeptidolipids; TDM, trehalose dimycolate; TMM, trehalose monomycolate; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PIMs, phosphatidylinositol mannosides).

transcriptional expression was observed only in the complemented strains carrying the pMVZ361::*MAB_0555* driving *PLC* expression under the control of the constitutive *hsp60* promoter (Fig. 3C and D). Absence of specific *MAB_0555* mRNA expression was observed for the wild-type and the PLC-KO *M. abscessus* strains in macrophages (Fig. 3C) and between the two growth temperatures *in vitro* (Fig. 3D). In order to confirm the presence of the expressed PLC by the wild-type strain in amoebae, Western blot (WB) analysis using polyclonal antibodies was preferred to RT-PCR. WB clearly revealed the presence of PLC when bacteria were cocultured in amoebae compared to mycobacteria grown in 7H9 rich medium, despite a strong amoeba proteolytic activity during preparation of the protein extract (Fig. 3E). A 47-kDa protein,



FIG 3 Survival of *plc M. abscessus* mutant in eukaryotic cells. (A) Growth of mycobacterial strains within BMDMs recorded by CFU evaluation after 1, 3, and 6 days of coculture. The CIP-S (circles), CIP-S *plc* KO (squares), and CIP-S *plc* KO *plc*-complemented (triangles) strains were used. (B) Growth of mycobacterial strains within amoebae recorded by CFU evaluation after 1.5 h and 1, 2, and 4 days of coculture. CIP-S (white bars), CIP-S *plc* KO (black bars), and CIP-S *plc* KO *plc*-complemented (gray bars) strains were used. Experiments were repeated five times in triplicate at different times for both panels A and B (***, P < 0.001). (C) mRNA *plc/sigA* ratio (in arbitrary units) for the CIP-S, CIP-S *plc* KO, and CIP-S *plc* KO *plc*-complemented strains cocultivated with macrophages for 5 days. (D) mRNA *plc/sigA* ratio (in arbitrary units) for the CIP-S, *plc* KO, and CIP-S *plc* KO *plc*-complemented strains cultivated in rich medium (7H9) at 30°C or 37°C. The results are representative of two independent experiments (C and D). (E) Western blot analysis of PLC expression during coculture of mycobacterial strains with *A. castellanii*. Lane 1, total extract (30 µg) of CIP-S cultivated in 7H9 medium; lane 2, total extract (30 µg) of amoebae cocultivated for 3 h (lane 3), 24 h (lane 4), 48 h (lane 5), 72 h (lane 6), or 96 h (lane 7) in PAS buffer in the presence of CIP-S; lane 8, total extract (30 µg) of amoebae cocultivated for 48 h in PAS buffer in the presence of the CIP-S *plc* KO *plc*-complementes.

which corresponds to the native molecular mass of PLC (without the TAT signal peptide), was detected only in the presence of amoebae after 48 h until 96 h of coculture with either the WT (Fig. 3E, lanes 5 to 7) or the complemented strains (Fig. 3E, lane 8).

In vivo behavior of the PLC *M. abscessus* KO mutant in the aerosol mouse model of infection. All three *M. abscessus* strains were independently used to infect mice by aerosol for 15 min using an inoculum of 1×10^8 mycobacteria. CFU were enumerated in lungs, livers, and spleens at days 1, 7, 14, 21, and 28. A similar decline was observed for WT strain, the PLC *M. abscessus* KO mutant, and the complemented PLC *M. abscessus* KO mutant (Fig. 4A), in agreement with results from the BMDM infection studies.

Since coculture of *M. abscessus* and *A. castellanii* significantly induces the expression of PLC in *M. abscessus*, we therefore addressed the question of whether a previous coculture of *M. abscessus* with *A. castellanii* would impact the *M. abscessus* virulence phenotype in the mouse model of infection. As shown in Fig. 3B, we recovered from cocultures of *M. abscessus* in amoebae only 2×10^6 mycobacteria, which was 100 times less than the *in vitro*-prepared inoculum. At this infectious dose, CFU counts only in the lungs were performed, as no mycobacteria could be recovered from livers and spleens (Le Moigne et al., unpublished). However, after only one expansion in amoebae, we obtained significantly higher bacterial loads in the lungs at 3 and 7 days postinfection (CFU per lungs) than with the same strain grown *in vitro* in rich 7H9 medium (Fig. 4B). Amoeba lysate itself added to *M. abscessus*



FIG 4 Effect of coculture of mycobacterial strains within amoebae on virulence in mice. (A) BALB/c mice were aerosolized with the CIP-S (white bars), CIP-S plc KO (black bars), and CIP-S plc KO plc-complemented (gray bars) strains cultivated in 7H9 medium. Mice were challenged with 10⁸ mycobacteria and sacrificed at days 1, 7, 14, 21, and 28. Lungs, livers, and spleens were collected, homogenized, diluted (1/1, 1/5, 1/25, and 1/125), and cultured on VCA3 agar plates. CFU were counted after 5 days of growth. Twenty-five mice per group were challenged. (B) BALB/c mice were aerosolized with CIP-S cultivated in 7H9 medium (\bigcirc) or obtained after 3 days of coculture in amoebae (\blacksquare). Mice were sacrificed at days 3 and 7. Lungs were collected, diluted (1/1, 1/5, 1/25, and 1/125), and 1/125), and 1/125), and cultured on VCA3 agar plates. CFU were aerosolized with the CIP-S (were sacrificed at days 3 and 7. Lungs vere collected, diluted (1/1, 1/5, 1/25, and 1/125), and 1/125), and cultured on VCA3 agar plates. CFU were aerosolized with the CIP-S (empty bars) or CIP-S plc KO (black bars) strain cultivated in 7H9 medium or obtained after 3 days of coculture within amoebae. Mice were sacrificed at days 3 and 7. Lungs were collected, diluted (1/1, 1/5, 1/25, and 1/125), and cultured on VCA3 agar plates. CFU were counted after 5 days of growth. Ten mice per group were challenged. (****, P < 0.001). (C) BALB/c mice were aerosolized with the CIP-S (empty bars) or CIP-S plc KO (black bars) strain cultivated in 7H9 medium or obtained after 3 days of coculture within amoebae. Mice were sacrificed at days 3 and 7. Lungs were collected, diluted (1/1, 1/5, 1/25, and 1/125), and cultured on VCA3 agar plates. CFU were counted after 5 days of growth. Ten mice per group were challenged. (***, P < 0.001).

before aerosol challenge was ineffective in increasing *M. abscessus* bacterial load in the lungs compared to coculturing *M. abscessus* within amoebae (data not shown).

The role of PLC expression in the enhanced survival in the lungs of immunocompetent mice was then explored by testing the phenotype of the PLC-deficient isogenic mutant cocultured with *A. castellanii*. Experiments demonstrated that the bacterial burden achieved by the *M. abscessus plc* KO mutant was significantly lower at 3 days (P < 0.01) and at 7 days (P < 0.001) postinfection than the one achieved by the WT *M. abscessus* strain (Fig. 4C). Taken together, these results indicate that growth of *M. abscessus* in *Acanthamoeba* increases virulence of *M. abscessus* in mice, most likely by inducing the expression of PLC.

DISCUSSION

Phospholipases are considered key virulence factors and are synthesized by bacterial species causing disparate infectious disease, from infection causing massive tissue destruction to food-borne diseases. Some well-studied PLCs involved in virulence are the α toxin of *Clostridium perfringens*, the PLC-H and PLC-N of *P. aeruginosa*, and the two PI-PLCs of *Listeria monocytogenes*. Cytolysis is the most common characteristic attributed to bacterial phospholipase virulence factors (31, 32). We demonstrated that *M. abscessus* synthesizes a PLC with lytic activity against eukaryotic cells, with membrane phospholipid degradation and DAG production. We were not able to demonstrate a hemolytic activity for *M. abscessus* PLC, indicating that it resembles *P. aeruginosa* PLC-N, which also lacks hemolytic activity (44). This aspect might be crucial for degradation and penetration of the mucus layer present in the lungs, as observed for *P. aeruginosa* (31, 32). As with eukaryotic PLC, the hydrolysis of phospholipids by *M. abscessus* PLC leads to the production of DAG, a well-known lipid second messenger. DAG has been shown to activate protein kinase C, which is known to modulate the activation of neutrophils and macrophages (45). This activity further emphasizes the inflammatory response observed in CF lungs and participates in the increased virulence of *M. abscessus* in CF patients compared to other mycobacteria (46).

Apart from playing a role in virulence, PLCs are thought to function in phosphate and carbon source acquisition (32). Synthesis of both *P. aeruginosa* PLC-H and PLC-N is regulated by inorganic phosphate at the transcriptional level by the positive regulator PhoB (47). Induction of PI-PLC synthesis was also shown for other bacteria in such a limited-resource environment. PI-PLC activity of *Lactobacillus rhamnosus* markedly depends on the amount of carbohydrate in the culture medium (48). Similar

reports showed that PI-PLC-producing bacteria, including B. cereus, Bacillus thuringiensis, L. monocytogenes, and Staphylococcus aureus, required glucose-free medium for PLC activity to be detected (49-51). We demonstrated the absence of growth of M. abscessus in low-nutrient medium like PAS (data not shown) and correlatively a growth in the presence of amoebae, indicating that amoebae helped M. abscessus survive in a low-nutrient and/or eukaryotic environment. More importantly, amoeba-cocultured M. abscessus expressed virulence factors to be able to infect more aggressively the host as shown by the *de novo* production of PLC, as observed with the increased virulence of M. abscessus in mice when cocultured with Acanthamoeba compared to culture in 7H9 medium. Several mycobacteria were shown to survive in amoebae (12), but increased virulence after passage on amoebae was only shown for M. avium (21). PLC expression was stimulated when M. abscessus was grown intracellularly in Acanthamoeba but not in macrophages, thus pointing out the possible existence of regulatory networks similar to those observed in low-nutrient environments. In contrast, not much is presently known about induction of M. tuberculosis PLCs (29) and the role of the PhoP/PhoR regulatory network in the synthesis of PLC (52).

From the present data, we conclude that M. abscessus does not exhibit a clear substrate preference, as it was not possible to distinguish the phospholipids (PE, PI, or PC) preferentially hydrolyzed by M. abscessus PLC. An advantage conferred by the M. abscessus PLC activity might thus be the local degradation in the lungs of the dipalmitoyl-phosphatidylcholine, a major component of the surfactant, which would provide nutrients and/or osmoprotectants (47) necessary for M. abscessus survival in lung tissue. In CF patients, the thickening of the surfactant may thereby promote colonization and implementation of bacteria benefiting from PLC activity (Table 1). Colonizing CF lungs with already de novo-synthesized PLC would represent a major advantage for M. abscessus and might explain its specific tropism compared to other closely related RGM, such as M. chelonae. It remains to be established whether M. abscessus expresses PLC activity in infected patients. However, we have preliminary serological data confirming an anti-PLC antibody response in M. abscessus-infected CF patients (Le Moigne et al., unpublished).

Of importance was the choice of three different ex vivo and in vivo models to decipher the role of the PLC in M. abscessus virulence, as it helped us define the eukaryotic environment, where PLC activity was crucial for M. abscessus survival. Amoeba-bacterium interactions have recently been well defined (53), notably for mycobacteria (54, 55), and helped us in this study to consider the role of amoebae in shaping virulence of the bacteria toward a pathogenic phenotype (18, 53, 56, 57). Exchange and acquisition of genetic material have helped M. abscessus in gaining key virulence factors compared to other RGM. These de novo-synthesized virulence factors might explain the peculiar link between M. abscessus and CF lungs. Finally, it should be mentioned that identification of an environmental source where M. abscessus might come into contact with environmental amoebae would be very important for learning more about the potential contamination risks for CF patients. We are presently seeking such hidden sources of M. abscessus infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laurent Kremer for critical reading of the manuscript. We thank Vaincre La Mucoviscidose (VLM IC1014 and RF20120600689) and the Région Ile-de-France (Domaine d'Intérêt Majeur Maladies Infectieuses et Emergentes) for funding the postdoctoral fellowship to V.L.M. and a Ph.D. program for F.L.C. We are also grateful for the support from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

REFERENCES

- Kusunoki S, Ezaki T. 1992. Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: Mycobacterium abscessus comb. nov. Int J Syst Bacteriol 42:240–245. http://dx.doi.org/10.1099/00207713-42-2 -240.
- Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ. 1993. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. Am Rev Respir Dis 147:1271–1278.
- Brown-Elliott BA, Wallace RJ. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 15:716–746. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15 .4.716-746.2002.
- Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Faiz AR, Lee J-H, Zhang Y, Brown-Elliot BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR. 2003. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 167:828–834. http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC.
- Jönsson BE, Gilljam M, Lindblad A, Ridell M, Wold AE, Welinder-Olsson C. 2007. Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. J Clin Microbiol 45:1497–1504. http://dx.doi .org/10.1128/JCM.02592-06.
- Roux A-L, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, Bellis G, Vibet M-A, Le Roux E, Lemonnier L, Gutierrez C, Vincent V, Fauroux B, Rottman M, Guillemot D, Gaillard J-L. 2009. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. J Clin Microbiol 47:4124–4128. http://dx.doi.org/10 .1128/JCM.01257-09.
- Wallace RJ, Brown BA, Griffith DE. 1998. Nosocomial outbreaks/pseudooutbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. Annu Rev Microbiol 52: 453–490. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.453.
- Viana-Niero C, Lima KVB, Lopes ML, da Silva Rabello MC, Marsola LR, Brilhante VCR, Durham AM, Leão SC. 2008. Molecular characterization of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. J Clin Microbiol 46:850–855. http://dx.doi.org /10.1128/JCM.02052-07.
- Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, Conlan S, McNulty S, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Olivier KN, Holland SM, Sampaio EP. 2009. Cohort study of molecular identification and typing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium massiliense, and Mycobacterium bolletii. J Clin Microbiol 47:1985–1995. http://dx.doi.org /10.1128/JCM.01688-08.
- Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, Reacher M, Haworth CS, Curran MD, Harris SR, Peacock SJ, Parkhill J, Floto RA. 2013. Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. Lancet 381:1551–1560. http://dx.doi.org/10.1016 /S0140-6736(13)60632-7.
- Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann J-L, Daffé M, Brosch R, Risler J-L, Gaillard J-L. 2009. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. PLoS One 4:e5660. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005660.
- 12. Lamrabet O, Merhej V, Pontarotti P, Raoult D, Drancourt M. 2012. The genealogic tree of mycobacteria reveals a long-standing sympatric life into free-living protozoa. PLoS One 7:e34754. http://dx.doi.org/10.1371/journal .pone.0034754.
- Bernut A, Herrmann J-L, Kissa K, Dubremetz J-F, Gaillard J-L, Lutfalla G, Kremer L. 2014. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. Proc Natl Acad Sci U S A 111:E943– E952. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1321390111.
- Falkinham JO. 2009. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J Appl Microbiol 107:356–367. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x.
- 15. Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G. 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network.

Appl Environ Microbiol 72:2428–2438. http://dx.doi.org/10.1128/AEM .72.4.2428-2438.2006.

- von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, Arbeit RD, Maslow JN, Barber TW, Brindle RJ, Gilks CF, Lumio J, Lähdevirta J. 1993. Isolation of Mycobacterium avium complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. J Clin Microbiol 31:3227–3230.
- 17. Montecalvo MA, Forester G, Tsang AY, du Moulin G, Wormser GP. 1994. Colonisation of potable water with Mycobacterium avium complex in homes of HIV-infected patients. Lancet 343:1639. http://dx.doi.org/10 .1016/S0140-6736(94)93093-7.
- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev 17:413–433. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.17 .2.413-433.2004.
- Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proc Natl Acad Sci U S A 106:16393–16399. http://dx.doi.org/10.1073 /pnas.0908446106.
- Radomski N, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Moilleron R, Lucas FS. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. Appl Environ Microbiol 76:3514– 3520. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02659-09.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. 1997. Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence. Infect Immun 65:3759–3767.
- Steinert M, Birkness K, White E, Fields B, Quinn F. 1998. Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with Acanthamoeba polyphaga and survive within cyst walls. Appl Environ Microbiol 64: 2256–2261.
- Adékambi T, Ben Salah S, Khlif M, Raoult D, Drancourt M. 2006. Survival of environmental mycobacteria in Acanthamoeba polyphaga. Appl Environ Microbiol 72:5974–5981. http://dx.doi.org/10.1128/AEM .03075-05.
- 24. Thomas V, McDonnell G. 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. Lett Appl Microbiol 45:349–357. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02206.x.
- Mba Medie F, Ben Salah I, Henrissat B, Raoult D, Drancourt M. 2011. Mycobacterium tuberculosis complex mycobacteria as amoeba-resistant organisms. PLoS One 6:e20499. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone .0020499.
- Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan M-J, La Scola B, Raoult D, Drancourt M. 2004. Amoebal coculture of "Mycobacterium massiliense" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J Clin Microbiol 42:5493–5501. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42 .12.5493-5501.2004.
- Rottman M, Catherinot E, Hochedez P, Emile J-F, Casanova J-L, Gaillard J-L, Soudais C. 2007. Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower Mycobacterium abscessus in C57BL/6 mice. Infect Immun 75:5898–5907. http: //dx.doi.org/10.1128/IAI.00014-07.
- Byrd TF, Lyons CR. 1999. Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection. Infect Immun 67:4700–4707.
- 29. Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, Jackson M. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol 45:203–217. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03009.x.
- 30. Titball RW. 1993. Bacterial phospholipases C Microbiol Rev 57:347-366.
- Songer JG. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol 5:156–161. http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01005-6.
- Schmiel DH, Miller VL. 1999. Bacterial phospholipases and pathogenesis. Microbes Infect 1:1103–1112. http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579 (99)00205-1.
- 33. Johansen KA, Gill RE, Vasil ML. 1996. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. Infect Immun 64:3259–3266.
- 34. Noens EE, Williams C, Anandhakrishnan M, Poulsen C, Ehebauer MT, Wilmanns M. 2011. Improved mycobacterial protein production using a Mycobacterium smegmatis groEL1ΔC expression strain. BMC Biotechnol 11:27. http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-11-27.
- 35. Rowbotham TJ. 1983. Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J Clin Pathol **36**:978–986. http://dx.doi.org/10.1136/jcp.36 .9.978.

- Bakala N'goma JC, Schué M, Carrière F, Geerlof A, Canaan S. 2010. Evidence for the cytotoxic effects of Mycobacterium tuberculosis phospholipase C towards macrophages. Biochim Biophys Acta 1801:1305– 1313. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.08.007.
- Garcia JR, Curi R, Martins EF, Carpinelli AR. 2001. Macrophages transfer [14C]-labelled fatty acids to pancreatic islets in culture. Cell Biochem Funct 19:11–17. http://dx.doi.org/10.1002/cbf.887.
- Medjahed H, Reyrat J-M. 2009. Construction of Mycobacterium abscessus defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. Appl Environ Microbiol 75:1331–1338. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01914-08.
- van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. 2008. Recombineering mycobacteria and their phages. Nat Rev Microbiol 6:851–857. http://dx.doi.org /10.1038/nrmicro2014.
- Layre E, Collmann A, Bastian M, Mariotti S, Czaplicki J, Prandi J, Mori L, Stenger S, De Libero G, Puzo G, Gilleron M. 2009. Mycolic acids constitute a scaffold for mycobacterial lipid antigens stimulating CD1-restricted T cells. Chem Biol 16:82–92. http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.11.008.
- Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, Ripoll F, Emile J-F, Daffé M, Perronne C, Soudais C, Gaillard J-L, Rottman M. 2007. Hypervirulence of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain. Infect Immun 75:1055–1058. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00835-06.
- 42. Roux A-L, Ray A, Pawlik A, Medjahed H, Etienne G, Rottman M, Catherinot E, Coppée J-Y, Chaoui K, Monsarrat B, Toubert A, Daffé M, Puzo G, Gaillard J-L, Brosch R, Dulphy N, Nigou J, Herrmann J-L. 2011. Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. Cell Microbiol 13:692–704. http: //dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01565.x.
- 43. Pawlik A, Garnier G, Orgeur M, Tong P, Lohan A, Le Chevalier F, Sapriel G, Roux A-L, Conlon K, Honoré N, Dillies M-A, Ma L, Bouchier C, Coppée J-Y, Gaillard J-L, Gordon SV, Loftus B, Brosch R, Herrmann JL. 2013. Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus. Mol Microbiol 90:612– 629. http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12387.
- Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 172:5915–5923.
- Nishizuka Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258:607–614. http://dx.doi.org /10.1126/science.1411571.
- 46. Catherinot E, Roux A-L, Vibet M-A, Bellis G, Ravilly S, Lemonnier L, Le Roux E, Bernède-Bauduin C, Le Bourgeois M, Herrmann J-L, Guillemot D, Gaillard J-L. 2013. Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. J Cyst Fibros 12:74–80. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.06 .009.
- 47. Shortridge VD, Lazdunski A, Vasil ML. 1992. Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol 6:863–871. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365 -2958.1992.tb01537.x.
- 48. Rodriguez AV, Baigorí MD, Alvarez S, Castro GR, Oliver G. 2001. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in Lactobacillus rhamnosus with capacity to translocate. FEMS Microbiol Lett 204:33–38. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10858.x.
- Goldfine H, Knob C. 1992. Purification and characterization of Listeria monocytogenes phosphatidylinositol-specific phospholipase C Infect Immun 60:4059–4067.
- Low MG. 1981. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from Staphylococcus aureus. Methods Enzymol 71:741–746. http://dx.doi.org /10.1016/0076-6879(81)71087-5.
- Griffith OH, Volwerk JJ, Kuppe A. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipases C from Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis. Methods Enzymol 197:493–502. http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(91)97175-X.
- 52. Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, Winter N, Daffé M, Gicquel B, Martín C, Jackson M. 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem 281:1313–1316. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C500388200.
- Gomez-Valero I, Buchrieser C. 2013. Genome dynamics in Legionella: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication. Cold Spring Harb Perspect Med 3:a009993. http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a009993.
- 54. Hagedorn M, Soldati T. 2007. Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of Dictyostelium to Mycobacterium marinum infection.

Cell Microbiol 9:2716-2733. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007 .00993.x.

- 55. Hagedorn M, Rohde KH, Russell DG, Soldati T. 2009. Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. Science 323:1729–1733. http://dx.doi.org/10.1126/science.1169381.
 56. Cosson P, Soldati T. 2008. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria.

Curr Opin Microbiol 11:271-276. http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008 .05.005.

57. Boritsch EC, Supply P, Honoré N, Seeman T, Stinear TP, Brosch R. 2014. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. Mol Microbiol **93:**835–852. http://dx .doi.org/10.1111/mmi.12720. Supp. Fig. 1



ww.genoscope.cns.fr/agc/micr er.php

Supp. Fig. 2



Supplementary Figure 1: Representation of the gene content of the genomic locus harboring the gene encoding phospholipase C (*MAB_0555*) of *M. abscessus* (top panel) and comparisons shown with other *mycobacteria* (bottom panel).

Supplementary Figure 2: (A) Time-course hydrolysis of p-NPPC by phospholipases C. rMabs-PLC (50 μ g) was incubated at 37°C with 5 mM of p-NPPC in 1 mL (final volume) of Tris-HCl (pH 7.2) buffer with 5 mM CaCl₂ and 1.5% sorbitol. The release of p-nitrophenol was monitored at various times at 410 nm. Fifteen microgram of each PLC from *B. cereus* and *C. perfringens* (Sigma) were used as positive control in similar conditions. (B) Temperature effect on rMabs-PLC activity. The optimal temperature was determined by incubating the reaction mixture at different temperatures from 25°C to 55°C in 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.2. (C) Effect of pH on rMabs-PLC. The optimal pH was determined by measuring the activity of rPLC at 37°C for 48 h incubation between pH 4 and pH 10 using 10 mM sodium acetate (pH 4-5); 10 mM Mes (pH 6-6.5); 10 mM Tris/HCl (pH 7.8) and 10 mM glycine (pH 9.0) and 10 mM sodium bicarbonate (pH 10) using p-NPPC as substrate.

Supplementary Table 1: List of Primers used in this study.

Primer	Primer sequence	Restriction
name		site
	Construction of KO PLC mutant	
PLCF1	5'-CGGTCGTAGCCTGAAGCGATG-3'	
PLCR1	5'-ACGGCATGAAATGGAAGCCAT-3'	
KMulIF1	5'-CG <u>ACGCGT</u> TAAAACGACGGCCAGTGAAT-3'	MluI
KMluIR1	5'-CG <u>ACGCGT</u> CAGGAAACAGCTATGACCATGA-3'	MluI
PLCF2	5'-ATG <u>CCATGG</u> TCAGCCCGCTGACCGCCGC-3'	NcoI
PLCR2	5'-AACATGAAGCTTGGCGGCGTGGGTACCGC-3'	HindIII
HyPLCF1	5'- <u>CAGCTG</u> ACCTCGAACTCCAACAGGTGA-3'	PvuII
HyPLCR1	5'- <u>GTTAAC</u> ACGGCATGAAATGGAAGCCAT-3'	HpaI
ZeoF1	5'-CCC <u>AAGCTT</u> CAGGCATCAAATAAAACGAAA-3'	HindIII
ZeoR1	5'-CCATCGATTCAGTCCTGCTCCTCGGCCAC-3'	ClaI
RHF1	5'-ATCTGATGCACGACGAATCA-3'	
RHR1	5'-CGTAGGTGGTCCAGCCATAG-3'	
0555F	5'-CCCGCGGTGTCCTGGCTCATC-3'	
0555R	5'-TGATACCGCCAGCGCCGCAGA-3'	
	Quantitative PCR	
PLCRTF	5'CATTACTTCGGCACCCTGTC3'	
PLCRTR	5'ATGAGCAGCCATCCAGTTGT3'	

ANNEXE 4 – Génération de la banque de mutants Tn de *M. abscessus*

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour obtenir différents mutants comme par exemple choisir un gène pour le muter par comparaison d'homologies mycobactériennes de ce qui est connu en tant que facteurs de virulence chez une mycobactérie reconnue pour sa forte pathogénicité comme M. tuberculosis; ou encore par recherche de différences dans les génomes entre une mycobactérie non pathogène comme M. smegmatis et la mycobactérie pathogène opportuniste que l'on veut étudier M. abscessus. Ces manières de faire sont largement utilisées au laboratoire. Un autre moyen connu dans la littérature pour obtenir des mutants est de créer une banque de mutants par insertion aléatoire d'un transposon dans le génome. Cette technique n'avait pas encore été expérimentée pour M. abscessus du fait de la difficulté à obtenir une telle banque de mutants à cause de la complexité de la composition de la paroi mycobactérienne. Une équipe de recherche américaine a réussi à surmonter ces difficultés en créant un système d'insertion de transposon dérivé d'un élément appelé Himarl des transposons de la famille mariner largement répandus parmi les organismes eucaryotes (Rubin et al., 1999). Les auteurs ont développé des systèmes de transposition simples en utilisant des mini-transposons, constitués de marqueurs de résistance aux antibiotiques flanqués de courtes séquences de répétitions inversées. Ces éléments peuvent se transposer efficacement après l'expression d'une transposase à partir d'un promoteur bactérien approprié. Ces transposons basés sur le modèle mariner ont fourni des outils précieux pour la mutagénèse et la manipulation génétique des mycobactéries qui manquent de systèmes génétiques bien développés, et leur ont permis de créer une banque de mutants par transposition chez M. abscessus dont ils ont fait don à notre équipe.

La banque de mutants Tn a été créé grâce au système de transposition dérivé de *Himar1* dans une souche clinique de *M. abscessus* sous-espèce *massiliense* nommée Mabs43S. Ce système se compose d'un transposon appelé *magellan4* contenant un gène de résistance à la kanamycine dérivé originellement de Tn5. Ce mini-transposon est cloné dans un vecteur qui contient la transposase *Himar1* et un promoteur artificiel T6. Le promoteur T6/transposase et *magellan4* ont été clonés dans le réplicon mycobactérien sensible à la température pPR23 pour créer le plasmide *pMycoMar* (Rubin *et al.*, 1999). Pour produire des mutants d'insertion, *pMycoMar* a été introduit dans Mabs43S par électroporation. Les mycobactéries ont été cultivées une nuit dans un milieu à 30°C pour permettre la transposition, puis ont été étalées sur du milieu contenant de la kanamycine à 30°C (permettant une réplication du plasmide) ou à 39°C (non permissif à la réplication du plasmide). Les plaques incubées à 39°C contiennent alors environ 1 000 fois moins de colonies que les plaques incubées à 30°C. Toutes les colonies qui ont survécu à 39°C sont sensibles à la gentamicine, une résistance aux antibiotiques codée par *pMycoMar* mais pas à l'intérieur de *magellan4*, et ont donc perdu le plasmide en ayant bien intégrer le transposon.



Titre : Avantages génomiques conférés à Mycobacterium abscessus pour une existence intracellulaire

Mots clés : Mycobacterium abscessus, amibe, macrophage, système de sécrétion de type VII, ESX

Résumé : *Mycobacterium* abscessus est une mycobactérie à croissance rapide, et un pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires notamment chez les patients atteints de la mucoviscidose, et d'infections cutanéomuqueuses. La source de contamination pourrait être environnementale mais des contaminations interhumaines ne sont pas exclues. Les amibes environnementales pourraient jouer un rôle de réservoir. M. abscessus est capable de résister aux mécanismes de défense bactéricides des phagocytes environnementaux et humains. Le génome complet de M. abscessus a été séquencé mettant en évidence de nombreux facteurs de virulence non mycobactériens. Certains sont des facteurs de virulence connus dans le monde bactérien, comme la phospholipase C ou le facteur de captation du magnésium MgtC. Ces facteurs ont été montré induits en présence d'amibes, mais ne peuvent à eux seuls expliquer la survie intracellulaire et la virulence de M. abscessus. Nous avons donc, au cours de ce projet, criblé une banque de mutants générée par transposition chez M. abscessus, à la recherche de mutants dénués de croissance intracellulaire en amibes et macrophages.

Cette approche a permis d'identifier, de façon majeure, 5 gènes du locus ESX-4 de M. abscessus codant un système de sécrétion de type VII avec tous ces composants cœur conservés. Pour mieux comprendre la contribution d'ESX-4 dans la survie intracellulaire de M. abscessus, un mutant obtenu par double recombinaison au sein du gène $eccB_4$ dans la souche type de *M. abscessus* ($\triangle eccB_4$) a été construit. EccB₄ est un élément structurel central du système de sécrétion codé par ESX-4. $\triangle eccB_4$ présente un défaut de survie au sein des cellules, lié à déficit de blocage de l'acidification phagosomale ainsi qu'un défaut de dégradation de la membrane phagosomale, empêchant un contact phagosome-cytosol. Ce travail a permis de révéler pour la première fois dans le monde mycobactérien le rôle d'un locus ancestral de sécrétion ESX-4 au sein d'une mycobactérie. L'étude des protéines secrétées par ce locus est actuellement en cours au laboratoire, afin d'envisager des approches thérapeutiques et vaccinales pour contrer cette mycobactérie multirésistante aux antibiotiques.

Title: Genomic advantages acquired by Mycobacterium abscessus for an intracellular survival

Keywords: Mycobacterium abscessus, amoeba, macrophage, ESX, type VII secretion system

Abstract: Mycobacterium abscessus is a fast growing mycobacterium, and an opportunistic pathogen responsible for lung infections particularly in patients with cystic fibrosis, and for mucocutaneous infections. The source of contamination could be environmental but human-to-human contaminations are not excluded. Environmental amoeba could play a role as a reservoir. *M. abscessus* is able to resist to the bactericidal defense mechanisms of environmental and human phagocytes. The complete genome of *M. abscessus* has been sequenced and presents numerous non-mycobacterial virulence factors. Some are known virulence factors in the bacterial world, such as phospholipase C or the magnesium uptake factor MgtC. These factors have been shown to be induced in the presence of amoeba, but cannot alone explain the intracellular survival and virulence of *M. abscessus*. We thus, in the course of this project, screened a library of mutants generated by transposition in M. abscessus, in search of mutants lacking intracellular growth in amoeba and macrophages.

This approach made it possible to identify, in a major way, 5 genes of the ESX-4 locus of M. abscessus encoding a type VII secretion system with all these conserved core components. In order to better understand the contribution of ESX-4 to the intracellular survival of *M. abscessus*, a mutant obtained by double recombination within the $eccB_4$ gene in the *M. abscessus* type strain $(\triangle eccB_4)$ was constructed. EccB₄ is a central structural element of the secretion system encoded by ESX-4. $\triangle eccB4$ has a defect of survival within the cells, linked to deficiency of blockage of the phagosomal acidification as well as a defect of degradation of the phagosomal membrane, preventing phagosome-cytosol contact. This work made it possible to reveal for the first time in the mycobacterial world the role of an ancestral locus ESX-4 secretion within a mycobacterium. The study of the proteins secreted by this locus is currently underway in the laboratory, in order to consider therapeutic and vaccine approaches to counter this multiresistant antibiotic mycobacterium.

