



**HAL**  
open science

# Adaptations comparées de *Mycobacterium abscessus* à la phagocytose amibienne et macrophagique : recherche de gènes de virulence par des approches globales

Violaine Dubois

## ► To cite this version:

Violaine Dubois. Adaptations comparées de *Mycobacterium abscessus* à la phagocytose amibienne et macrophagique : recherche de gènes de virulence par des approches globales. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLV064 . tel-02050301

**HAL Id: tel-02050301**

**<https://theses.hal.science/tel-02050301>**

Submitted on 27 Feb 2019

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

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



# Adaptations comparées de *Mycobacterium abscessus* à la phagocytose amibienne et macrophagique : recherche de gènes de virulence par des approches globales

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)

Thèse présentée et soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 19 Décembre 2018, par

**Violaine Dubois**

## Composition du Jury

<b>Jean-Louis Gaillard</b> PU-PH, Univ. de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (U1173, Infection et Inflammation)	<b>Président</b>
<b>Carmen Buchrieser</b> Directrice de Recherche, Institut Pasteur de Paris (Biologie des bactéries intracellulaires)	<b>Rapportrice</b>
<b>Stephen Gordon</b> Professeur, University College Dublin	<b>Rapporteur</b>
<b>Oana Dumitrescu</b> MCU-PH, Université Claude Bernard Lyon-1 (Centre International de Recherche en Infectiologie)	<b>Examinatrice</b>
<b>Yann Héchard</b> PU, Université de Poitiers (Microbiologie de l'eau)	<b>Examineur</b>
<b>Jean-Louis Herrmann</b> PU-PH, Univ. de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (U1173, Infection et Inflammation)	<b>Directeur</b>
<b>Fabienne Misguich</b> MCU, Univ. de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (U1173, Infection et Inflammation)	<b>Co-Directrice</b>



# REMERCIEMENTS

## **Aux membres du jury,**

Le Dr Carmen Buchrieser et le Pr Stephen Gordon,  
Pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs de ce manuscrit.

Le Dr Oana Dumitescu et le Pr Yann Héchard,  
Pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant qu'examineurs.

Le Pr Jean-Louis Gaillard,  
Pour présider ce jury de thèse.

A mon directeur de thèse et à ma co-directrice de thèse, le Pr Jean-Louis Herrmann et le Dr Fabienne Girard-Misguich,  
Pour avoir dirigé mon projet de thèse tout au long de ces trois dernières années, pour leur patience et leur bienveillance.

## **A nos collaborateurs,**

L'équipe de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée et de la plateforme Transcriptome et Epigénome de l'Institut Pasteur de Paris,  
Pour la contribution apportée à ce travail. Un remerciement particulier au Dr Alexandre Pawlik et au Dr Laleh Majlessi pour leur disponibilité et leur aide.

L'équipe de l'Institut de Recherche en Infectiologie du CNRS de Montpellier et l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Lille,  
Pour la contribution apportée à ce travail. Un remerciement particulier au Dr Albertus Viljoen et au Dr Audrey Bernut, ainsi qu'au Dr Laurent Kremer et au Dr Yann Guérardel pour leur expertise.

L'équipe d'Ecologie Systématique & Evolution (E.S.E) et notamment les Dr R. C Rodriguez de la Vega et E. Dumas pour leur contribution aux travaux de phylogénomique, le temps qu'ils m'ont accordé et le savoir qu'ils m'ont transmis.

## **A tous mes collègues et amis,**

Pour m'avoir soutenue, conseillée et aidée lors de ma thèse. Merci tout particulièrement au Dr Vincent Le Moigne et au Dr Sabine Blouquit pour leurs enseignements et leur amitié.

## **A ma famille.**

## **A la mémoire de mon grand-père.**

## **A celles et ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenue.**

## **A Romain,**

Sans qui ce travail n'aurait pas abouti.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>INDEX DES FIGURES</b>	<b>4</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre 1 : <i>Mycobacterium abscessus</i>, une mycobactérie atypique pathogène</b>	<b>11</b>
<b>I. CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES</b>	<b>11</b>
1.1 PROPRIETES TINCTORIALES	11
1.2 PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX MYCOBACTERIES ET CLASSIFICATION	11
1.3 PHYLOGENIE DES MYCOBACTERIES	12
<b>II. ÉMERGENCE DU PATHOGENE OPPORTUNISTE <i>M. ABSCESSUS</i> PARMIS LES MYCOBACTERIES ATYPIQUES</b>	<b>13</b>
2.1 DECOUVERTE HISTORIQUE DE <i>M. ABSCESSUS</i>	13
2.2 ÉVOLUTION DU COMPLEXE <i>M. ABSCESSUS</i> ET PATHOADAPTATION	14
2.3 DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DES INFECTIONS A <i>M. ABSCESSUS</i>	15
<b>III. IMPORTANCE DES INFECTIONS A <i>M. ABSCESSUS</i> PARMIS LES INFECTIONS PULMONAIRES A MNT</b>	<b>15</b>
3.1 GENERALITES EPIDEMIOLOGIQUES SUR LES INFECTIONS PULMONAIRES A MNT	15
3.2 <i>M. ABSCESSUS</i> ET LA MUCOVISCIDOSE	17
<b>Chapitre 2 : Origine de la virulence de <i>M. abscessus</i></b>	<b>19</b>
<b>I. VIE INTRACELLULAIRE DE <i>M. ABSCESSUS</i></b>	<b>19</b>
<b>II. ANALYSE DU GENOME DE <i>M. ABSCESSUS</i> ET GENOMIQUE COMPARATIVE</b>	<b>20</b>
2.1 GENES DE VIRULENCE NON-MYCOBACTERIENS	20
2.2 GENES DE VIRULENCE MYCOBACTERIENS	21
<b>Chapitre 3 : Virulence et adaptations intracellulaires comparées de <i>M. abscessus</i> et <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>24</b>
<b>I. SINGULARITE DE LA VIRULENCE DES MYCOBACTERIES : IMPORTANCE DE L'ENVELOPPE MYCOBACTERIENNE</b>	<b>24</b>
<b>II. ENVELOPPE ET INTERACTIONS HOTES-PATHOGENES</b>	<b>26</b>
2.1 VIRULENCE ASSOCIEE AUX MORPHOTYPES ET AUX COMPOSES EXTRACTIBLES	26
2.2 VIRULENCE ASSOCIEE AUX SYSTEMES DE SECRETION	29
<b>III. METABOLISME DES LIPIDES ET ADAPTATIONS INTRACELLULAIRES</b>	<b>33</b>
<b>Chapitre 4 : La famille de transporteurs MmpL et protéines accessoires</b>	<b>36</b>
<b>I. GENERALITES SUR LES TRANSPORTEURS MMPL : CLASSIFICATION, STRUCTURE ET TOPOLOGIE</b>	<b>36</b>
<b>II. FONCTIONS DES TRANSPORTEURS MMPL</b>	<b>38</b>
2.1 TRANSPORT DE LIPIDES	38
2.2 ACQUISITION DU FER	39
<b>III VIRULENCE MYCOBACTERIENNE : ROLE DES PROTEINES MMPL ET DE LEUR REGULATION</b>	<b>40</b>
3.1 CONTRIBUTION DES MMPL A LA VIRULENCE DES MYCOBACTERIES PATHOGENES	40
3.2 REGULATION DES MMPL ET VIRULENCE	40
<b>IV. LES DEUX VISAGES DES MMPL : EFFLUX D'ANTIBIOTIQUES ET CIBLES THERAPEUTIQUES / ANTIGENES</b>	<b>41</b>
4.1 EFFLUX D'ANTIBIOTIQUES	41
4.2 LA PROTEINE MMPL3, UNE CIBLE ATTRACTIVE POUR LE DESIGN D'ANTI-MYCOBACTERIENS	41
4.3 MMPL ET VACCINS	42
<b>V. PERSPECTIVES EVOLUTIVES</b>	<b>43</b>
<b>Chapitre 5 : Les modèles amibiens d'étude des pathogènes intracellulaires appliqués aux mycobactéries</b>	<b>45</b>
<b>I. L'INCUBATEUR AMIBIEN</b>	<b>45</b>
1.1 LES AMIBES LIBRES SONT DES PHAGOCYTES ENVIRONNEMENTAUX	45
1.2 LES AMIBES LIBRES : UN « MELTING POT » BACTERIEN ?	46
1.3 ÉVOLUTION DES ARB AU SEIN DES AMIBES LIBRES	47
1.4 AMIBES ET EMERGENCE DE MALADIES CHEZ L'HOMME	48
<b>II. LES AMIBES, DES MODELES D'ETUDE DE LA VIRULENCE DES ARB ?</b>	<b>50</b>
2.1 L'AMIBE, UN ANCE TRE DU MACROPHAGE ?	50
2.2 APPRETEMENT AMIBIEN A LA VIE INTRA-MACROPHAGIQUE : L'EXEMPLE DE <i>L. PNEUMOPHILA</i>	50
<b>III. LES MODELES AMIBIENS APPLIQUES A L'ETUDE DES INTERACTIONS MACROPHAGES-MYCOBACTERIES</b>	<b>52</b>
3.1 INTERACTIONS DE <i>M. MARINUM</i> ET <i>M. TUBERCULOSIS</i> AVEC L'AMIBE <i>D. DISCOIDEUM</i>	52

3.2 APPRETEMENT AMIBIEN DES MNT <i>M. ABSCESSUS</i> ET <i>M. AVIUM</i> CHEZ <i>A. CASTELLANII</i>	53
3.3 ETUDE DE LA VIRULENCE DE <i>M. ABSCESSUS</i> DANS LE MODELE AMIBIEN <i>A. CASTELLANII</i>	54
<b>OBJECTIFS</b>	<b>55</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>57</b>
<b>Partie 1 : adaptations de <i>M. abscessus</i> a la vie intracellulaire</b>	<b>58</b>
<b>APPROCHES METHODOLOGIQUES</b>	<b>58</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>59</b>
ARTICLE 1 (MANUSCRIT EN PREPARATION)	59
<b>Partie 2 : importance des lipides pariétaux et pathogénicité</b>	<b>62</b>
<b>APPROCHES METHODOLOGIQUES</b>	<b>62</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>62</b>
<b>I. RESULTATS PRINCIPAUX ET COMPARAISON AUX DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE</b>	<b>62</b>
LA PROTEINE FAP MYCMA_RS12265	63
LA PROTEINE MMPL MYCMA_RS19030 (MYCMA_0439)	63
ARTICLE 2	64
<b>II. CONTROLE DE LA VIRULENCE DE <i>M. ABSCESSUS</i> PAR LA MMPL8</b>	<b>65</b>
ARTICLE 3	67
<b>III. PERSPECTIVES EVOLUTIVES</b>	<b>68</b>
ARTICLE 4	68
IDENTIFICATION DES FAMILLES DE GENES <i>MMPL/MMPS</i> PAR UNE APPROCHE PHYLOGENOMIQUE ET DEFINITION DES PROFILS PHYLOGENOMIQUES DES ESPECES	68
HISTOIRE EVOLUTIVE DES FAMILLES DE GENES <i>MMPL</i> ET <i>MMPS</i> AU SEIN DES ESPECES (« PHYLTRACK »)	68
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>71</b>
ADAPTATIONS DE <i>M. ABSCESSUS</i> A LA VIE PHAGOCYTAIRE	71
DES PREUVES DE L'APPRETEMENT DE <i>M. ABSCESSUS</i> PAR L'AMIBE ?	72
A LA RECHERCHE DE PREUVES D'UN RESERVOIR AMIBIEN DANS L'ENVIRONNEMENT FAVORABLE A LA TRANSMISSION ET AU SUCCES PATHOGENE DE <i>M. ABSCESSUS</i>	73
CONTROLE DE LA VIRULENCE DE <i>M. ABSCESSUS</i> PAR LES LIPIDES COMPLEXES	74
L'EIS2 TEMOIGNE DE L'EXISTENCE DE PATHOADAPTATIONS PROPRES A LA VIE INTRA-MACROPHAGIQUE	75
PERSPECTIVES APORTEES PAR LES DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE	76
LES VOIES DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES, LE TURNOVER PROTEIQUE ET LES CHAPERONNES MOLECULAIRES	76
LES VOIES DE BIOSYNTHESE DU MOCO ET DU TRANSPORT DES POLYAMINES	78
AUTRES VOIES D'INTERET ET MODELES D'ETUDES	78
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>81</b>
<b>I. IDENTIFICATION DE FACTEURS DE VIRULENCE CHEZ <i>M. ABSCESSUS</i></b>	<b>81</b>
<b>ARTICLE 5</b>	<b>81</b>
<b>II. ANALYSE <i>IN SILICO</i> DES DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE</b>	<b>82</b>
2.1 SOUCHES BACTERIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE	82
2.2 CORE-GENOMES <i>M. MASSILIENSE</i> GO 06 - <i>M. ABSCESSUS</i> ATCC 19977 ET <i>M. MASSILIENSE</i> GO 06 - <i>M. CHELONAE</i> CCUG 47445	82
2.3 COMPARAISON DES JEUX DE DONNEES	82
2.4 ANNOTATION COG	82
2.5 ANALYSE D'ENRICHISSEMENT DES GENE ONTOLOGY	82
<b>III. ETUDES FONCTIONNELLES ISSUES DES DONNEES DE TRANSCRIPTOMIQUE</b>	<b>83</b>
3.1 CONSTRUCTION DE MUTANTS PAR DOUBLE RECOMBINAISON, TESTS DE LA VIABILITE DES MUTANTS <i>IN VITRO</i> ET COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE	83
3.2 ANALYSE DE LA VIRULENCE DES MUTANTS EN MODELES CELLULAIRE ET ANIMAL	83
3.3 TEST DE L'APPRETEMENT A LA VIE INTRA-MACROPHAGIQUE	83
3.4 TEST DE L'ADHESION DES MYCOBACTERIES AUX MACROPHAGES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	84
3.5 DETERMINATION DU DEVENIR INTRACELLULAIRE : MESURE DE L'ACIDIFICATION ET DE LA RUPTURE PHAGOSOMALE	84
3.6 TEST DE LA SENSIBILITE AU PEROXYDE D'HYDROGENE	84
3.7 TEST DE LA CROISSANCE EN MILIEU DEplete EN FER	84
3.8 REponse DES CELLULES A L'INFECTION : MESURE DE LA PRODUCTION DE ROS, VIABILITE CELLULAIRE ET AUTOPHAGIE	84
<b>IV. ETUDES PHYLOGENOMIQUES</b>	<b>85</b>
4.1 PHYLOGENIE DES MYCOBACTERIES	85
4.2 OBTENTION D'UN HMM DES MMPL ET MMPS MYCOBACTERIENNES	85
4.3 IDENTIFICATION DES SEQUENCES DE MMPL ET MMPS CHEZ 76 GENOMES MYCOBACTERIENS	85

4.4 IDENTIFICATION DES ORHTOGROUPES ET PROFILS PHYLOGENOMIQUES DES MMPL ET DES MMPS	85
4.5 PHYLOTRACK DES MMPL ET DES MMPS	86
4.6 PHYLONETWORK DES MMPL ET DES MMPS	86
<b>REFERENCES</b>	<b>87</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>114</b>
<b>Annexe 1 : Régulation des gènes codant des protéines Fe-S et des protéines d'assemblage des centres Fe-S en amibes et en macrophages</b>	<b>115</b>
<b>Annexe 2: Régulation de gènes codant des NAP parmi les gènes induits en amibes</b>	<b>116</b>
<b>Annexe 3 : Régulation du métabolisme et du transport du triacylglycérol en amibes et en macrophages</b>	<b>117</b>
<b>Annexe 4 : Comparaison des adaptations intra-amibiennes de <i>M. abscessus</i> et <i>M. chelonae</i></b>	<b>118</b>
GENERALITES	118
ADAPTATIONS SPECIFIQUES ET OPPOSEES DE <i>M. ABSCESSUS</i> ET <i>M. CHELONAE</i> A LA VIE INTRA-AMIBIENNE	118
<b>Annexe 5 : Fonctions moléculaires enrichies parmi les gènes les plus induits de <i>M. abscessus</i> en macrophages</b>	<b>120</b>
<b>Annexe 6 : Article 6 : Laencina <i>et al.</i>, 2018</b>	<b>121</b>
<b>Annexe 7 : Article 7 : Misquich <i>et al.</i>, 2018</b>	<b>122</b>
<b>Annexe 8 : Analyse IP5 de la protéine MmpL8<sub>MAB</sub> et des protéines MmpL-8, -10 et -12 de <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>123</b>
<b>Annexe 9 : Conservation du locus <i>mmpL8</i><sub>MAB</sub> chez les mycobactéries</b>	<b>124</b>





# INDEX DES FIGURES

<b>FIGURE 1</b>	STRUCTURE ATYPIQUE DE L'ENVELOPPE DES MYCOBACTERIE ET PROPRIETES TINCTORIALES.	11
<b>FIGURE 2</b>	ARBRE PHYLOGENETIQUE DE 61 ESPECES MYCOBACTERIENNES PAR UNE APPROCHE MULTIGENIQUE.	13
<b>FIGURE 3</b>	PHYLOGENOMIQUE MYCOBACTERIENNE SUR 1941 PROTEINES CORES ET PATHOGENICITE.	13
<b>FIGURE 4</b>	NOMBRE DE PUBLICATIONS CONCERNANT <i>M. ABSCESSUS</i> CES DERNIERES ANNEES (PUBMED).	13
<b>FIGURE 5</b>	ARBRE COUVRANT DE POIDS MINIMAL (ACM) DES ESPECES DU COMPLEXE <i>M. ABSCESSUS</i> .	14
<b>FIGURE 6</b>	NOMBRE D'ESPECES MYCOBACTERIENNES ISOLEES CHEZ LES INDIVIDUS CF EN 2016 AUX ETATS-UNIS.	17
<b>FIGURE 7</b>	GRANULOME FIBROCASEEUX CHEZ UN INDIVIDU CF PRESENTANT UNE INFECTION PULMONAIRE CHRONIQUE A <i>M. ABSCESSUS</i> .	18
<b>FIGURE 8</b>	DERNIERES RECOMMANDATIONS POUR LE TRAITEMENT DES INFECTIONS A <i>M. ABSCESSUS</i> CHEZ LES INDIVIDUS CF.	18
<b>FIGURE 9</b>	GENOME DE <i>M. ABSCESSUS</i> SUBSP. <i>ABSCESSUS</i> .	20
<b>FIGURE 10</b>	MODELE, CONSTITUANTS ET ULTRASTRUCTURE DE L'ENVELOPPE MYCOBACTERIENNE.	19
<b>FIGURE 11</b>	CARACTERISATION DES SOUCHES STB K LISSE ( $K_S$ ) ET RUGEUSE ( $K_R$ ) DE <i>M. CANETTII</i> .	26
<b>FIGURE 12</b>	DIFFERENCE DE PATHOGENICITE DES SOUCHES STB K LISSE ( $K_S$ ) ET STB K RUGUEUSE ( $K_R$ ).	26
<b>FIGURE 13</b>	CARACTERISATION DES VARIANTS LISSES ( $MA^{SM}$ ) ET RUGUEUX ( $MA^{RG}$ ) DE LA SOUCHE TYPE DE <i>M. ABSCESSUS</i> .	27
<b>FIGURE 14</b>	MODELISATION DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS A <i>M. ABSCESSUS</i> CHEZ LE POISSON ZEBRE.	28
<b>FIGURE 15</b>	MODULATION DE LA VIRULENCE DES VARIANTS S ET R DE <i>M. ABSCESSUS</i> PAR LES GPL ET INTERACTIONS AVEC LES MACROPHAGES DES VARIANTS.	29
<b>FIGURE 16</b>	ORGANISATION GENETIQUE DU LOCUS ESX-1 DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> ET MODELE DU SYSTEME DE SECRETION DE TYPE VII (T7SS) CORRESPONDANT.	31
<b>FIGURE 17</b>	ACTIVATION DES VOIES DE SURVEILLANCE CYTOSOLIQUE PAR LE SYSTEME ESX-1 ET CONSEQUENCES.	31
<b>FIGURE 18</b>	PHENOTYPES INTRACELLULAIRES ASSOCIES AU GENE <i>ECCB<sub>4</sub></i> DU SYSTEME ESX-4 DE <i>M. ABSCESSUS</i> .	32
<b>FIGURE 19</b>	PRINCIPALES ADAPTATIONS METABOLIQUES DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> A LA VIE INTRACELLULAIRE.	33
<b>FIGURE 20</b>	ADAPTATIONS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> AUX STRESS REDOX INTRACELLULAIRES.	34
<b>FIGURE 21</b>	GRAPHIQUE CIRCOS REPRESENTANT LES GENES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES CHEZ LE VARIANT S DE <i>M. ABSCESSUS</i> DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE.	35
<b>FIGURE 22</b>	CLASSIFICATION DES TRANSPORTEURS DE LA FAMILLE MMPL.	36
<b>FIGURE 23</b>	STRUCTURE DES TRANSPORTEURS RND CANONIQUES TRIPARTITES (A) ET AUTRES (B).	37
<b>FIGURE 24</b>	STRUCTURE (A) ET REPRESENTATION TOPOLOGIQUE DES TRANSPORTEURS RND CANONIQUES (B) ET DES TRANSPORTEURS MMPLS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> APPARTENANT AUX FAMILLES HAE2 (CLUSTER I) ET HAE3	37
<b>FIGURE 25</b>	PRINCIPALES FONCTIONS DES MMPL DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> (A) ET <i>M. SMEGMATIS</i> (B) ET STRUCTURE CHIMIQUE DE LEURS PRINCIPAUX SUBSTRATS.	38
<b>FIGURE 26</b>	MODELE DU TRANSPORT DES LIPIDES DE SURFACE DES MYCOBACTERIES.	39

<b>FIGURE 27</b>   ACQUISITION DU FER MEDIEE PAR LES PROTEINES DES FAMILLES MMPL ET MMPS CHEZ <i>M. TUBERCULOSIS</i> .	<b>39</b>
<b>FIGURE 28</b>   INHIBITEURS DE LA PROTEINE MMPL3 CHEZ <i>M. TUBERCULOSIS</i> (MTB) ET <i>M. ABSCESSUS</i> (MABS).	<b>42</b>
<b>FIGURE 29</b>   PLACE DES AMIBES AU SEIN DES EUCARYOTES (A) ET PROTEINES CONSERVEES (B).	<b>44</b>
<b>FIGURE 30</b>   LES AMIBES SONT UN RESERVOIR DE MICRO-ORGANISMES RESISTANT A LA PHAGOCYTOSE AMIBIENNE.	<b>45</b>
<b>FIGURE 31</b>   ECHANGES GENETIQUES ENTRE BACTERIES RESISTANTES AUX AMIBES ET AMIBES.	<b>46</b>
<b>FIGURE 32</b>   EXTENSION GENIQUE DES MICRO-ORGANISMES RESISTANT AUX AMIBES (A) ET MODELE D'ADAPTATION EVOLUTIVE (B).	<b>46</b>
<b>FIGURE 33</b>   REPNSES COMMUNES DU MACROPHAGE ET DE L'AMIBE AU CONTACT DE BACTERIES.	<b>48</b>
<b>FIGURE 34</b>   ROLE DES AMIBES LIBRES DANS L'ECOLOGIE ET LA PATHOGENICITE DES BACTERIES RESISTANTES A LA PHAGOCYTOSE AMIBIENNE.	<b>50</b>
<b>FIGURE 35</b>   MECANISMES D'INTERACTION ENTRE <i>M. MARINUM</i> ET L'AMIBE <i>D. DISCOIDEUM</i> .	<b>51</b>
<b>FIGURE 36</b>   APPRETEMENT AMIBIEN DE <i>M. AVIUM</i> (A) ET <i>M. ABSCESSUS</i> (MABS) (B).	<b>52</b>
<b>FIGURE 37</b>   MISE EN EVIDENCE DE GENES REQUIS POUR LA SURVIE INTRACELLULAIRE DE <i>M. ABSCESSUS</i> EN AMIBES ET EN MACROPHAGES.	<b>53</b>
<b>FIGURE 38</b>   DISTRIBUTION DES MMPL ET MMPS CHEZ 61 ESPECES MYCOBACTERIENNES.	<b>68</b>
<b>FIGURE 39</b>   PHYLOGENIE DES MYCOBACTERIES SELON 396 ORTHOGROUPES CONSERVES CHEZ 76 ESPECES ET SUPERPOSITION DES ANALYSES « PHYLOTRACK » DES MMPL ET DES MMPS.	<b>68</b>
<b>FIGURE 40</b>   PHYLONETWORK DES ORTHOGROUPES DE MMPL ET MMPS.	<b>69</b>
<b>FIGURE 41</b>   IMPACT DE LA CO-CULTURE AMIBIENNE SUR LA VIRULENCE DE <i>M. ABSCESSUS</i> ET <i>M. CHELONAE</i> .	<b>118</b>
<b>FIGURE 42</b>   <i>M. CHELONAE</i> ET <i>M. ABSCESSUS</i> NE REPNENT PAS DE LA MEME FAÇON A L'ENVIRONNEMENT AMIBIEN.	<b>118</b>
<b>FIGURE 43</b>   MISE EN EVIDENCE DES VOIES BIOLOGIQUES REFLETANT DES ADAPTATIONS PROPRES DE <i>M. CHELONAE</i> A LA VIE INTRA-AMIBIENNE.	<b>118</b>
<b>FIGURE 44</b>   ANALYSE DE MOTIF PROTEIQUE AVEC IP5 DES PROTEINES MMPL8 <sub>MAB</sub> DE <i>M. ABSCESSUS</i> ET DES PROTEINES MMPL8, -10 ET -12 DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> .	<b>123</b>
<b>FIGURE 45</b>   CONSERVATION DU LOCUS MMPL8 <sub>MAB</sub> ( <i>MAB_0855</i> ) CHEZ LES MYCOBACTERIES A CROISSANCE RAPIDE.	<b>124</b>
<b>FIGURE 46</b>   CONSERVATION DU LOCUS MMPL8 <sub>MAB</sub> ( <i>MAB_0855</i> ) CHEZ LES MYCOBACTERIES A CROISSANCE LENTE.	<b>124</b>

# INDEX DES TABLEAUX

<b>TABLEAU 1</b>	PREVALENCE DES MICRO-ORGANISMES CLEFS DANS LA MUCOVISCIDOSE EN 2016 AUX ETATS-UNIS.	<b>17</b>
<b>TABLEAU 2</b>	GENES DE VIRULENCE MYCOBACTERIENS DE <i>M. ABSCESSUS</i> .	<b>21</b>
<b>TABLEAU 3</b>	PRINCIPAUX ACTEURS SUPPOSES ET AVERES DU TRANSPORT DES LIPIDES DE SURFACE DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> (MTB) ET <i>M. SMEGMATIS</i> (MSM).	<b>38</b>
<b>TABLEAU 4</b>	PROTEINES MMPL IMPLIQUEES DANS LA VIRULENCE DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> (MTB) ET <i>M. ABSCESSUS</i> (MABS).	<b>40</b>
<b>TABLEAU 5</b>	MYCOBACTERIES ISOLEES NATURELLEMENT AU SEIN D'AMIBES LIBRES.	<b>45</b>
<b>TABLEAU 6</b>	MYCOBACTERIES IDENTIFIEES PAR LA CO-CULTURE AMIBIENNE.	<b>46</b>
<b>TABLEAU 7</b>	DESCRIPTION DES TRANSCRIPTOMES OBTENUS.	<b>57</b>
<b>TABLEAU 8</b>	GENES IMPLIQUES DANS LA SURVIE INTRACELLULAIRE DE <i>M. ABSCESSUS</i> IDENTIFIES PAR LE CRIBLAGE D'UNE BANQUE DE MUTANTS DE TRANSDUCTION AVEC L'AMIBE <i>A. CASTELLANII</i> ET EXPRESSION DE CES GENES APRES UNE CO-CULTURE COURTE (4 H) ET PROLONGEE (16 H) AVEC L'AMIBE.	<b>58</b>
<b>TABLEAU 9</b>	POURCENTAGE DE SEQUENCES CORRESPONDANT A UN BEST HIT CONTRE LES MMPL DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> PARMIS LES ORTHOGROUPES DE LA SUPERFAMILLE DE MMPL.	<b>70</b>
<b>TABLEAU 10</b>	POURCENTAGE DE SEQUENCES CORRESPONDANT A UN BEST HIT CONTRE LES MMPL DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> PARMIS LES ORTHOGROUPES LIES A LA SUPERFAMILLE DE MMPL.	<b>70</b>
<b>TABLEAU 11</b>	ANNOTATION DES MMPL SELON LEUR HISTOIRE NATURELLE.	<b>70</b>
<b>TABLEAU 12</b>	ANNOTATION DES MMPs SELON LEUR HISTOIRE NATURELLE.	<b>70</b>
<b>TABLEAU 13</b>	REGULATION DES GENES CODANT DES PROTEINES FE-S OU DES PROTEINES D'ASSEMBLAGE DES CENTRES FE-S CHEZ <i>M. ABSCESSUS</i> EN AMIBES ET EN MACROPHAGES COMPAREE A <i>M. TUBERCULOSIS</i> .	<b>115</b>
<b>TABLEAU 14</b>	GENES CODANT DES PROTEINES ASSOCIEES AU NUCLEOIDE INDUITS EN AMIBES.	<b>116</b>
<b>TABLEAU 15</b>	REGULATION DU METABOLISME ET DU TRANSPORT DES TRIACYLGLYCEROLS EN AMIBES ET EN MACROPHAGES.	<b>117</b>
<b>TABLEAU 16</b>	REGULATION DE SENS CONTRAIRE DE <i>M. ABSCESSUS</i> ET <i>M. CHELONAE</i> EN AMIBES 16 HPI.	<b>119</b>
<b>TABLEAU 17</b>	REGULATIONS PROPRES DE GENES DE <i>M. ABSCESSUS</i> EN AMIBES COMPAREES A <i>M. CHELONAE</i> SELON LEUR NIVEAU D'INDUCTION.	<b>119</b>
<b>TABLEAU 18</b>	ANALYSE D'ENRICHISSEMENT ONTOLOGIQUE DES FONCTIONS MOLECULAIRES DES GENES FORTEMENT INDUITS DE <i>M. ABSCESSUS</i> EN MACROPHAGES	<b>120</b>



# ABRÉVIATIONS

**%G+C** : pourcentage en guanine et cytosine

**ABC** : ATP-Binding Cassette

**ACM** : arbre couvrant de poids minimal

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ADP** : adénosine diphosphate

**AG** : arabinogalactane

**ALD** : alanine déshydrogénase

**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique

**ARB** : amoeba-resistant bacteria

**ARG2** : arginase 2

**ARM** : amoeba-resistant microorganisms

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATP** : adénosine triphosphate

**ATPase** : adénosine triphosphatase

**BAAR** : bacille acido-alcoolo-résistant

**BBH** : bidirectional best hit

**BCG** : bacille de Calmette et Guérin

**BDI** : Birth Death Innovation

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**BPCO** : broncho-pneumopathie chronique obstructive

**CCF-4** : Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein-4

**CCUG** : Culture Collection University of Gothenburg

**CDS** : Coding DNA Sequence

**CEMOVIS** : cryo-electron-nanoscopia of vitreous sections

**CF** : Cystic Fibrosis (mucoviscidose)

**CFDA-se** : carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

**CFP-10** : culture-filtrate protein of 10 kDa

**CFTR** : Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator

**CIP** : Collection de l'Institut Pasteur

**CLR** : récepteur lectine de type C

**cMBT** : carboxymycobactines

**CMH-II** : complexe majeur d'histocompatibilité de type 2

**CoA** : coenzyme A

**COG** : Cluster of Orthologous Groups

**D/PAT** : diacyl/penta-acyltréhaloses

**DAG** : diacylglycérol

**DEGs** : Differentially Expressed Genes

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium

**Dpi** : day post-infection

**Dps** : DNA starvation/stationary phase protein

**Ecc** : ESX conserved component

**Eis** : enhanced intracellular survival

**erm** : erythromycin resistance methylase

**ESAT-6** : Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa

**ESH** : Eukaryotic Sterol Homeostasis

**EM** : esters de mycolates

**ETZ** : electron transparent zone

**EXC** : exochélines

**Fad** : fatty acid degradation

**FAP** : Fibronectin Attachment Protein

**FAS** : fatty acid synthase

**FC** : Fold Change

**Fe-S** : Fer-Soufre

**FISH** : Fluorescent In Situ Hybridization

**FITC** : fluorescein isothiocyanate

**FPM** : force proton-motrice

**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfer

**Gap** : GPL addressing protein

**GDND** : glycosyl diacylated nonadecyl diol

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**GI** : Growth Index

**GO** : Gene Ontology

**GPL** : glycopeptidolipides

**GTPase** : guanosine triphosphatase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène

**HAE1** : Hydrophobe/Amphiphile Efflux-1

**HAE2** : Hydrophobe/Amphiphile Efflux-2

**HAE3** : Hydrophobe/Amphiphile Efflux-3

**HBD** : Heme Binding Domain

**HBSS** : Hank's Balanced Salt Solution

**HGT** : horizontal gene transfer

**HMB-PP** : 1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate

**HME** : Heavy Metal Efflux

**HMM** : Hidden Markov Model

**Hpi** : hour post-infection

**HSP** : heat shock protein

**ICL** : isocitrate lyase

<b>IFN</b> : interféron	<b>NLR</b> : récepteur Nod-like
<b>IL</b> : interleukine	<b>NO</b> : monoxyde d'azote
<b>ILI</b> : Intracytoplasmic Lipid Inclusions	<b>NOS2</b> : nitric oxyde synthase 2
<b>IMP</b> : Inner Membrane Protein	<b>NRAMP-1</b> : Natural Resistance-Associated Macrophages Protein-1
<b>IPP</b> : Isoprenoid Precursor Pathway	<b>NRPS</b> : non-ribosomal peptide synthetase
<b>IS</b> : insertion sequence	<b>OD</b> : optical density
<b>IWGMT</b> : International Working Group on Mycobacteria Taxonomy	<b>OG</b> : orthogroupe
<b>Kas</b> : ketoacyl-ACP synthase	<b>OL</b> : couche externe de l'enveloppe mycobactérienne
<b>kDa</b> : kilo Dalton	<b>OM</b> : membrane externe de l'enveloppe mycobactérienne
<b>KO</b> : knockout	<b>OMF</b> : Outer Membrane Factor
<b>LAM</b> : lipoarabinomannane	<b>OP</b> : opéron
<b>Lip</b> : lipid-binding lipoproteins	<b>p-HBADs</b> : dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque
<b>LM</b> : lipomannane	<b>PAI</b> : plasminogen activator inhibitor
<b>LOS</b> : lipooligosaccharides	<b>PAMPs</b> : Pathogen Associated Molecular Patterns
<b>LPS</b> : lipopolysaccharide	<b>pb</b> : paire de bases
<b>MA</b> : malate synthase	<b>PBMC</b> : peripheral blood mononuclear cell
<b>MAC</b> : <i>Mycobacterium avium</i> complex	<b>PBS</b> : phosphate buffered saline
<b>MaGe</b> : Microbial Genome Annotation	<b>PCN</b> : pyocyanine
<b>mAGP</b> : mycolylarabinogalactan-peptidoglycan	<b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction
<b>MAPK</b> : Mitogen-Activated Protein Kinase	<b>PDIM</b> : phtiocéroidimycosérosate
<b>MATE</b> : Multidrug And Toxic compound Extrusion	<b>PE</b> : Proline-Glutamate
<b>MBT</b> : mycobactines	<b>PG</b> : peptidoglycane
<b>MCC</b> : <i>Mycobacterium chelonae</i> complex	<b>PGL</b> : phénolglycolipides
<b>MCL</b> : mycobactéries à croissance lente	<b>PGRS</b> : Polymorphic GC-Repetitive Sequence
<b>MCR</b> : mycobactéries à croissance rapide	<b>PI</b> : phosphatidylinositol
<b>ME</b> : microscopie électronique	<b>PIM</b> : phosphatidylinositol mannosides
<b>MEC</b> : 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate	<b>PLC</b> : phospholipase C
<b>MEP</b> : methylerythritol-4-phosphate	<b>PPE</b> : Proline-Proline-Glutamate
<b>MFP</b> : Membrane Fusion Protein	<b>PRR</b> : pattern recognition receptors
<b>MFS</b> : Major Facilitator Superfamily	<b>PTM</b> : post-translational modification
<b>mip</b> : <i>macrophage infectivity potentiator</i>	<b>qRT-PCR</b> : quantitative real-time reverse transcription-PCR
<b>MMDAG</b> : monomeromycolyl diacylglycerol	<b>R</b> : rough (rugueux)
<b>MMP</b> : métalloprotéinase matricielle	<b>RD1</b> : région de différenciation 1
<b>MmpL</b> : mycobacterial membrane protein large	<b>RNAseq</b> : RNA sequencing
<b>MmpS</b> : mycobacterial membrane protein small	<b>RND</b> : Resistance Nodulation Division
<b>MNT</b> : mycobactéries non-tuberculeuses	<b>RNI</b> : intermédiaires réactifs de l'azote
<b>Mo</b> : molybdène	<b>ROS</b> : espèces réactives de l'oxygène
<b>MoCo</b> : Molybdopterin Cofactor	<b>S</b> : smooth (lisse)
<b>MOI</b> : multiplicity of infection	<b>SAP</b> : Sulfur Assimilation Pathway
<b>MSRA</b> : <i>Staphylococcus aureus</i> multirésistant	<b>SCID</b> : Severe Combined Immunodeficiency
<b>MTBC</b> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	<b>Sec</b> : secretion
<b>NAP</b> : nucleoid-associated protein	
<b>Ndh</b> : NADH déshydrogénase	
<b>NFE</b> : Nodulation Factor Exporter	

**Seed** (alignment) : alignement multiple curé d'un petit nombre de protéines représentatif d'une famille de protéines  
**SL** : sulfolipides  
**SMR** : Small Multidrug Resistance  
**SSD** : sterol-sensing domain  
**STB** : Smooth Tubercle Bacillus  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**T2SS** : type-2 secretion system  
**T4SS** : type-4 secretion system  
**T7SS** : type-7 secretion system  
**TAG** : triacylglycérol  
**Tat** : Twin-arginine translocation  
**TCA** (cycle) : cycle des acides tricarboxylique

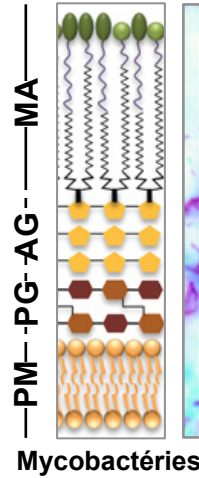
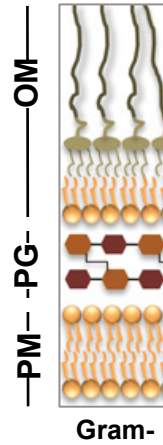
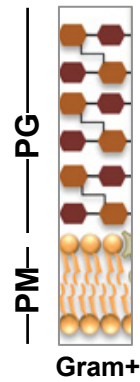
**TCSS** : Two-Component Signal transduction Systems  
**Tgs** : triacylglycerol synthase  
**TIR** : Toll/Interleukin-1 Receptor  
**TLC** : thin layer chromatography  
**TLR** : récepteur Toll-like  
**TM/DM** : mono/dimycolates de tréhalose  
**TMD** : transmembrane domain  
**TNF** : tumor necrosis factor  
**TPP** : tréhaloses polyphléates  
**UFC** : unités formant colonies  
**V-ATPase** : ATPase vacuolaire  
**VFDB** : Virulence Factor Database  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine  
**WT** : wild type



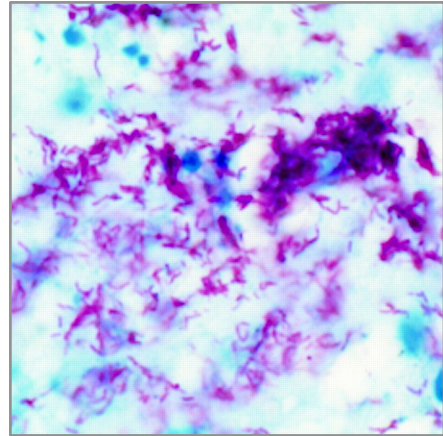


# ***INTRODUCTION***

PM : membrane plasmique  
 PG : peptidoglycane  
 OM : membrane externe  
 AG : arabinogalactane  
 MA : acides mycoliques



Coloration de Ziehl-Neelsen



**Figure 1 | Structure atypique de l'enveloppe des mycobactérie et propriétés tinctoriales.**

Comparées aux bactéries Gram- et Gram+, les mycobactéries possèdent une couche de lipides en surface à base d'acides mycoliques, organisés de façon perpendiculaire à la surface, conférant ainsi une forte imperméabilité à de nombreux composés. Lors de la coloration de Ziehl-Neelsen des mycobactéries, la fuschine, colorant rosé, est capturée entre la paroi de peptidoglycane et d'arabinogalactane et la membrane plasmique. Contrairement, aux bactéries Gram- et Gram+, les mycobactéries ne perdent pas le colorant initial après traitement avec des alcools ou des acides forts et elles apparaissent rosées.

(Adapté de Gerstmans *et al.*, 2016 et Chen, 1997 (coloration de Ziehl-Neelsen))

## **I. Caractérisation et identification des mycobactéries**

Caractérisées pour la première fois par Lehmann et Neumann en 1896, les mycobactéries sont des bacilles non-sporulants, non-flagellés, mesurant de 0,2 à 0,6 µm par 1 à 10 µm (Lehmann, 1896). Le préfixe « myco », d'origine grecque, signifie à la fois « champignon » et « cire », le terme « cire » faisant référence à la composition et à la nature cireuse de la paroi mycobactérienne. Les mycobactéries présentent un métabolisme aérobie strict ou micro-aérophile et des optimums de croissance entre 25 et 50 °C selon les espèces.

### **1.1 Propriétés tinctoriales**

On divise communément les bactéries en trois grands groupes selon leurs propriétés pariétales, mises en évidence par différentes méthodes de coloration : les bactéries à Gram positif (Gram+), les bactéries à Gram négatif (Gram-) et les Mycobactéries. La coloration de Gram, permet de distinguer les bactéries Gram+, dotées d'une simple paroi comportant une couche épaisse de peptidoglycane, des bactéries Gram-, dont la paroi comprend une couche fine de peptidoglycane et une membrane externe supplémentaire. Les mycobactéries présentent un phénotype intermédiaire (**Figure 1**). En effet, elles possèdent, comme les bactéries Gram+, une épaisse couche de peptidoglycane, mais aussi une épaisse couche d'acides mycoliques, des acides gras à longue chaîne orientés de façon perpendiculaire à la surface. De ce fait, les acides mycoliques confèrent à l'enveloppe mycobactérienne une forte imperméabilité à différents composés (1000 fois supérieure) comparée aux bactéries Gram- *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ; et par conséquent, une résistance à un mélange d'acide et d'alcool (Jarlier and Nikaido, 1990). On parle de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) (Shinnick and Good, 1994). Cette propriété tinctoriale, mise en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen (**Figure 1**), ou bien par la coloration de

Degommier utilisant un colorant fluorescent (l'auramine), peut être exploitée comme critère d'identification des mycobactéries lors d'un examen microscopique des échantillons cliniques (Audrin and Degommier, 1957; Kurup and Chester, 2014). Bien que difficile à lire et nécessitant parfois une double lecture, l'examen microscopique reste le premier examen rapide de diagnostic. Il est de plus en plus fréquemment associé à des tests moléculaires (Slim-Saidi et al., 2015).

### **1.2 Pathologies associées aux mycobactéries et classification**

Parmi les mycobactéries, 95% sont des micro-organismes environnementaux saprophytes retrouvés dans les sols, l'air et l'eau (Angenent et al., 2005; Lavania et al., 2008; Falkinham et al., 2008; Gomila et al., 2008; Ben Salah et al., 2009a). Une dizaine d'espèces seulement sont pathogènes, responsables de pathologies pulmonaires et extrapulmonaires chez l'homme et/ou l'animal. Parmi ces mycobactéries pathogènes strictes de l'homme et/ou de l'animal, on distingue deux grands groupes de pathogènes majeurs, les mycobactéries tuberculeuses (ou typiques) et l'agent étiologique de la lèpre. Les mycobactéries tuberculeuses comprennent les espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, *M. tuberculosis* complex) : *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium mungii*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium surricatae*). La lèpre est causée par *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium lepromatosis*.

D'autres infections, nommées mycobactérioses, sont dues à des mycobactéries pathogènes dites atypiques ou non-tuberculeuses (MNT) et responsables d'infections pulmonaires et extrapulmonaires. Leur découverte est récente. En effet, c'est Calmette qui, en 1920, affirma l'existence de mycobactéries « atypiques », puisque différentes de *M. tuberculosis* et de *M. bo-*



vis. Puis, en 1954, Timpe et Runyon ont prouvé de manière définitive que les mycobactéries atypiques ont un pouvoir pathogène (Timpe and Runyon, 1954). Parmi les MNT, on distingue 2 pathogènes stricts, *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium ulcerans*, cette dernière étant responsable d'infections cutanéomuqueuses graves (l'ulcère du Buruli). La majorité des MNT responsables d'infections chez l'homme, sont en fait des pathogènes opportunistes telles que les espèces du complexe *Mycobacterium avium* (MAC : *M. avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaerae*) et du complexe *Mycobacterium chelonae* (MCC : *M. chelonae*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *boletti*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*) tandis que d'autres comme *Mycobacterium smegmatis* sont dites saprophytes (non-pathogènes).

Dans les années 1960, Runyon souligne l'importance de distinguer les mycobactéries tuberculeuses des MNT afin de mieux appréhender l'épidémiologie des infections à mycobactéries (Runyon, 1965) :

“ Continued progress in our understanding of these mycobacterial diseases will be furthered when in our thinking, in our writing, and in our reporting we clearly differentiate among these pathogens and their diseases and do not lump them all as tubercle bacilli and tuberculosis. In recording morbidity and mortality statistics, distinguishing among these diseases is a prerequisite for accurate epidemiologic information ”

Runyon propose une classification des mycobactéries selon des critères morphologiques, de pigmentation et de vitesse de croissance sur milieu gélosé. Ce dernier critère permet de distinguer les mycobactéries à croissance rapide (MCR), formant des colonies apparentes sur milieu gélosé en moins de 7 jours, des mycobactéries à croissance lente (MCL), formant des colonies apparentes sur milieu gélosé au-delà de 7 jours. De façon générale, les MCL regroupent l'essentiel des mycobactéries pathogènes strictes et opportunistes.

Actuellement, 188 espèces de mycobactéries ont été répertoriées<sup>1</sup>, présentant des modes de vie variés, se distinguant par une grande diversité morphologique, biochimique et physiologique. La complexité des mycobactéries est telle que des études phylogénétiques sont nécessaires à leur identification précise.

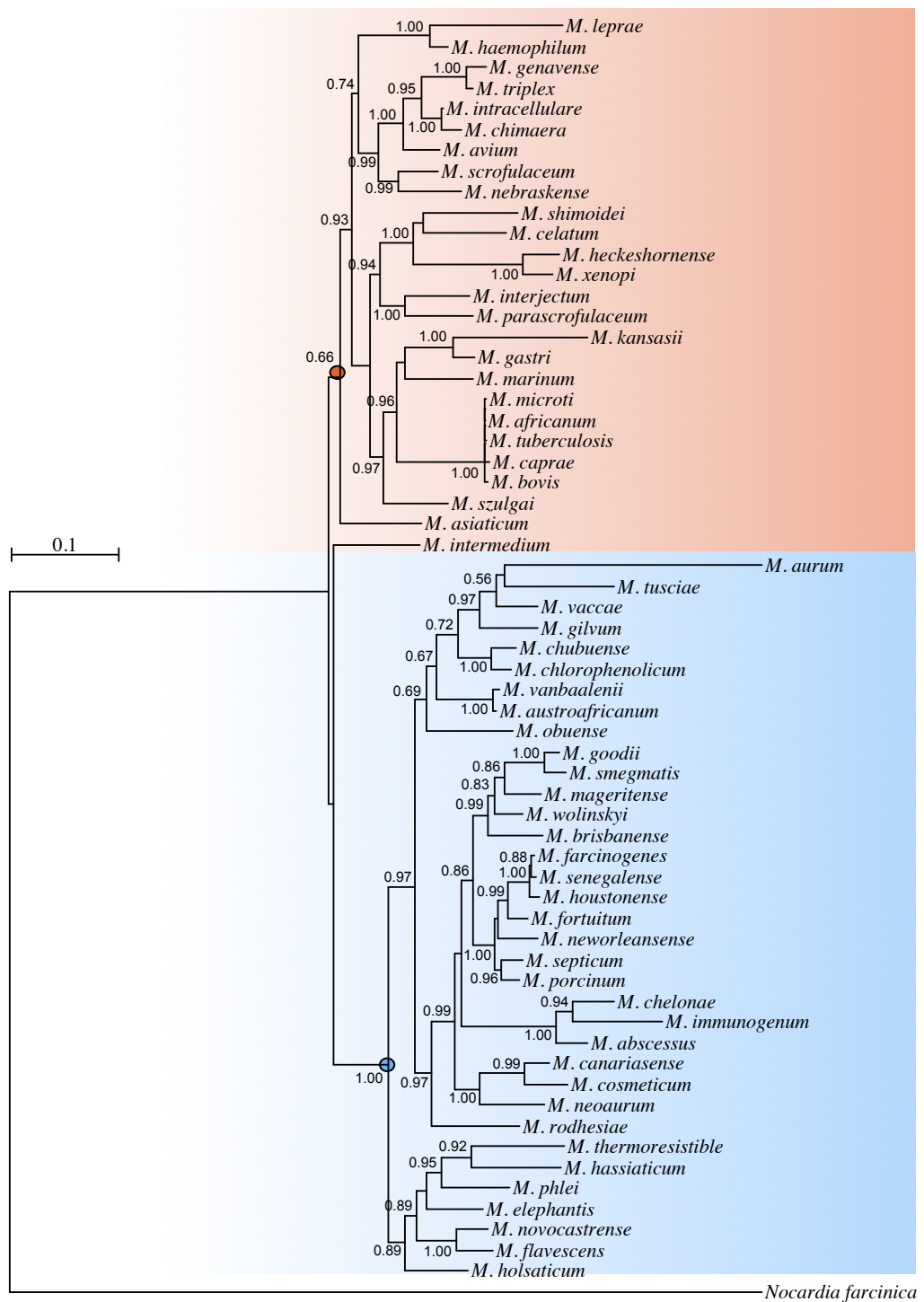
### 1.3 Phylogénie des mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent au phylum des *Actinobacteria*, et plus précisément à l'ordre des *Actinomycetales*, un ensemble de micro-organismes caractérisé par une croissance sous forme de filaments ramifiés. Les mycobactéries figurent parmi les actinobactéries à haut pourcentage en guanine et cytosine (%G+C) et appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille comprend le genre *Mycobacterium* et un genre peu diversifié, *Amycolicoccus*, ne comprenant qu'une espèce.

Les analyses taxonomiques du genre *Mycobacterium* requièrent de tester une douzaine de caractères (activité enzymatique, croissance, morphologie, susceptibilité aux antibiotiques...). Dès 1970, l'International Working Group on Mycobacteria Taxonomy (IWGMT, 1970) a compilé une série d'études taxonomiques permettant une classification plus précise des MCL, mais aussi des MCR (Wayne *et al.*, 1971; Kubica *et al.*, 1972; Goodfellow *et al.*, 1974; Meissner *et al.*, 1974). Cependant, certaines espèces restaient encore mal définies, nécessitant la mise au point de nouvelles techniques d'identification comme la technique d'hybridation des acides désoxyribonucléiques (ADN) dite ADN-ADN (Wayne and Diaz, 1985; Wada *et al.*, 2000). Puis, le séquençage partiel du gène codant l'ARN ribosomal 16S (*rrs*) a progressivement remplacé cette technique. Selon cette méthode-ci, deux mycobactéries appartiennent à des espèces différentes si leurs séquences *rrs* présentent moins de 97% d'homologie. Toutefois, le gène *rrs* est hautement conservé au sein des mycobactéries (94-100%), de sorte que certaines espèces demeureraient indifférenciables par simple séquençage de ce gène, comme les

<sup>1</sup> <https://www.bacterio.net/mycobacterium.html/>

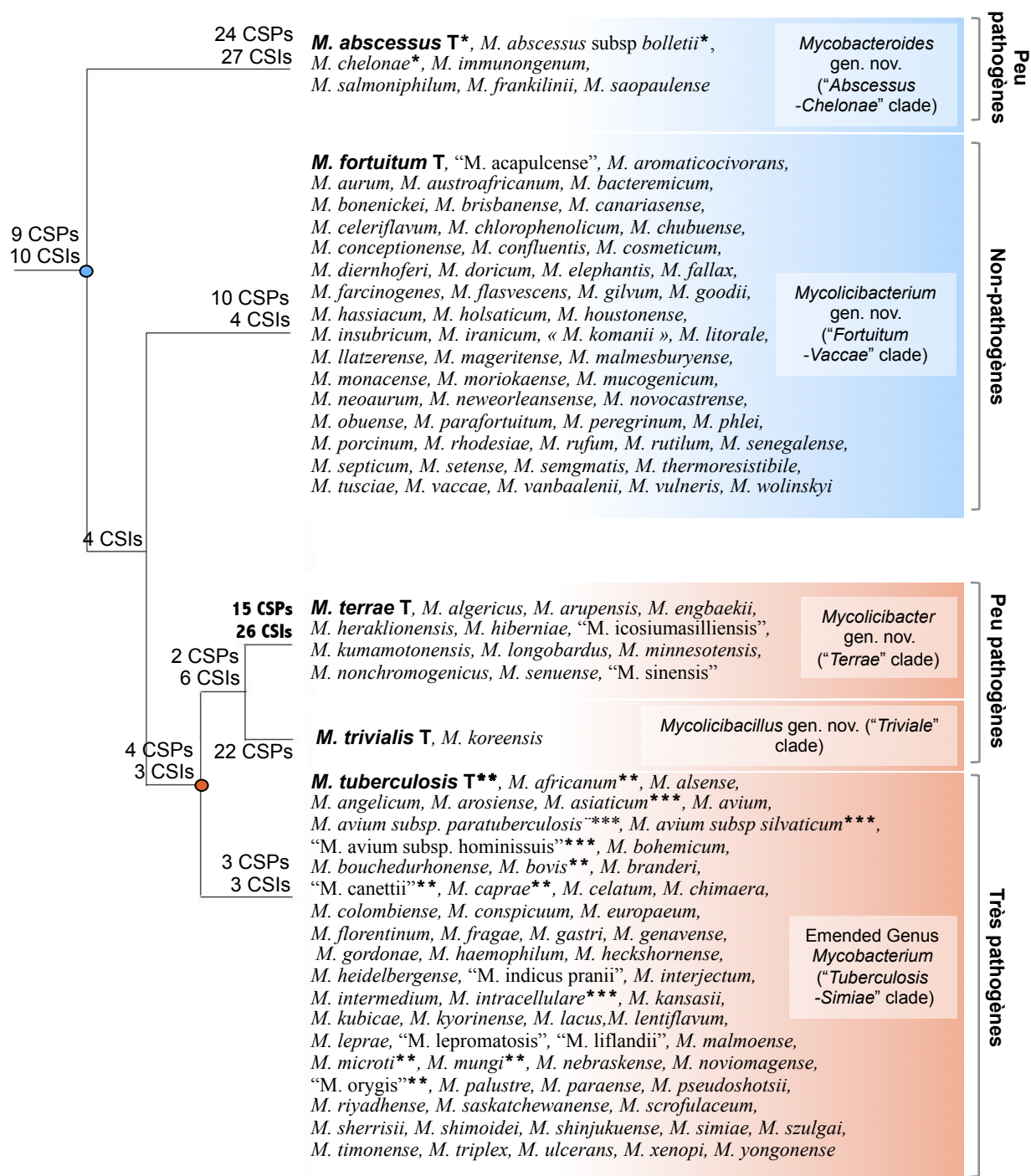
<sup>2</sup> <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR006311/protei>



**Figure 2 | Arbre phylogénétique de 61 espèces mycobactériennes par une approche multigénique.**

La phylogénie de 61 espèces a été reconstruite d’après la méthode décrite par Mignard and Flandrois, 2008. Les MCL (en rouge) forment un groupe phylogénétiquement distinct des MCR (en bleu). L’ancêtre commun aux MCL et l’ancêtre commun aux MCR sont représentés par un cercle à la base de chaque clade.

(Adapté de Viljoen *et al.*, 2017)



**Figure 3 | Phylogénomique mycobactérienne sur 1941 protéines cores et pathogénicité.**

En bleu figurent les MCR, en rouge les MCL. L'ancêtre commun aux MCR et aux MCL est représenté par un cercle bleu. L'ancêtre commun aux MCL est représenté par un cercle rouge.

\* espèces du complexe *Mycobacterium chelonae* (MCC). \*\* espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). \*\*\* espèces du complexe *Mycobacterium avium* (MAC). CSI : « conserved signature indels ». CSP : « conserved signature proteins ». T : espèce type du « genre ».

(Adapté de Gupta et al., 2018)





espèces du MTBC ou les espèces du MCC. D'autres gènes ont par la suite été utilisés, en addition du *rrs*, tels que *recA*, *rpoB*, *hsp65* et *sodA* afin de discriminer ces espèces (Zolg and Philippi-Schulz, 1994; Kim *et al.*, 1999; Ringuet *et al.*, 1999; Blackwood *et al.*, 2000). L'utilisation séquentielle ou combinée de plusieurs gènes permettait de raffiner les approches phylogénétiques (Devulder *et al.*, 2005). La concaténation des 7 gènes *hsp65*, *rpoB*, *rrs*, *smpB*, *sodA*, *tmRNA* et *tuf* a finalement permis de construire une phylogénie robuste des mycobactéries où les MCL forment un groupe phylogénétiquement distinct des MCR, et où les MCR et les MCL possèdent un ancêtre commun qui leur est propre (Mignard and Flandrois, 2008) (**Figure 2**). Récemment, une étude fondée sur la comparaison de 1941 protéines cores des mycobactéries, 136 protéines cores du phylum des *Actinobacteria* et 8 autres protéines conservées a été réalisée (Gupta *et al.*, 2018). Cette étude a défini 5 groupes monophylétiques (ou clades) portés par des espèces types au sein du genre *Mycobacterium* (**Figure 3**). Les groupes monophylétiques définis portent des espèces plus ou moins pathogènes. Parmi, les MCL le clade porté par les espèces *M. tuberculosis* - *M. simiae* comprend les mycobactéries les plus pathogènes (espèces du MTBC, du MAC et *M. leprae* et *M. lepromatosis*). Parmi les MCR, un clade comprenant le MCC regroupe des mycobactéries opportunistes à croissance rapide parmi les plus fréquents. D'après cette phylogénie, les MCL (majoritairement pathogènes) auraient évolué de MCR (majoritairement environnementales).

## II. Émergence du pathogène opportuniste *M. abscessus* parmi les mycobactéries atypiques

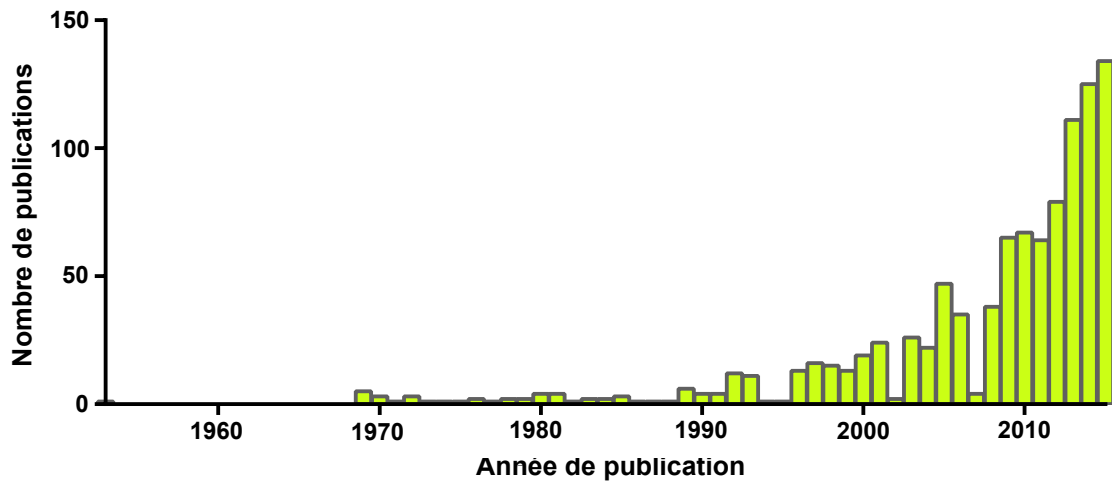
Les travaux de Runyon, mais aussi ceux de Wayne, ont contribué à la reconnaissance du potentiel pathogène de certaines mycobactéries atypiques (Wayne and Good, 1985). Ces dernières décennies ont vu l'émergence de pathogènes mycobactériens opportunistes parmi les mycobactéries atypiques, concomitante avec la forte augmentation du nombre de personnes

présentant diverses formes d'immunosuppression. Parmi ces pathogènes opportunistes, les premiers à avoir fait leur entrée sont les espèces du MAC, responsables d'infections mycobactériennes disséminées chez les patients porteurs du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), signant l'entrée des patients dans la maladie (Nightingale *et al.*, 1992). Plus récemment, à la suite de progrès diagnostics importants, de nouvelles espèces émergentes ou ré-émergentes ont été identifiées, notamment parmi les MCR atypiques (De Groote and Huitt, 2006). Parmi celles-ci, *M. abscessus* est la seule MCR à provoquer des pathologies pulmonaires chez des patients immunocompétents (Griffith *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010; Varghese *et al.*, 2012). De plus, *M. abscessus* est résistante à de nombreux antibiotiques, entraînant des échecs thérapeutiques (Nessar *et al.*, 2012). De ce fait, l'intérêt pour cette MCR n'a cessé de grandir ces dernières années (**Figure 4**).

### 2.1 Découverte historique de *M. abscessus*

*M. abscessus* est actuellement considérée comme la MCR la plus pathogène chez l'homme, responsable d'infections pulmonaires et extra-pulmonaires, majoritairement cutanées et pour la plupart d'origine nosocomiale (Chadha *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999; Toy and Frank, 2003; Furuya *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009). *M. abscessus* est également responsable d'infections disséminées chez les individus immunodéprimés et peut engendrer des infections pulmonaires chez des individus sains, témoignant de sa pathogénicité particulière (Griffith *et al.*, 1993; Mueller and Edson, 2001; Sanguinetti *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2003; Besada, 2011).

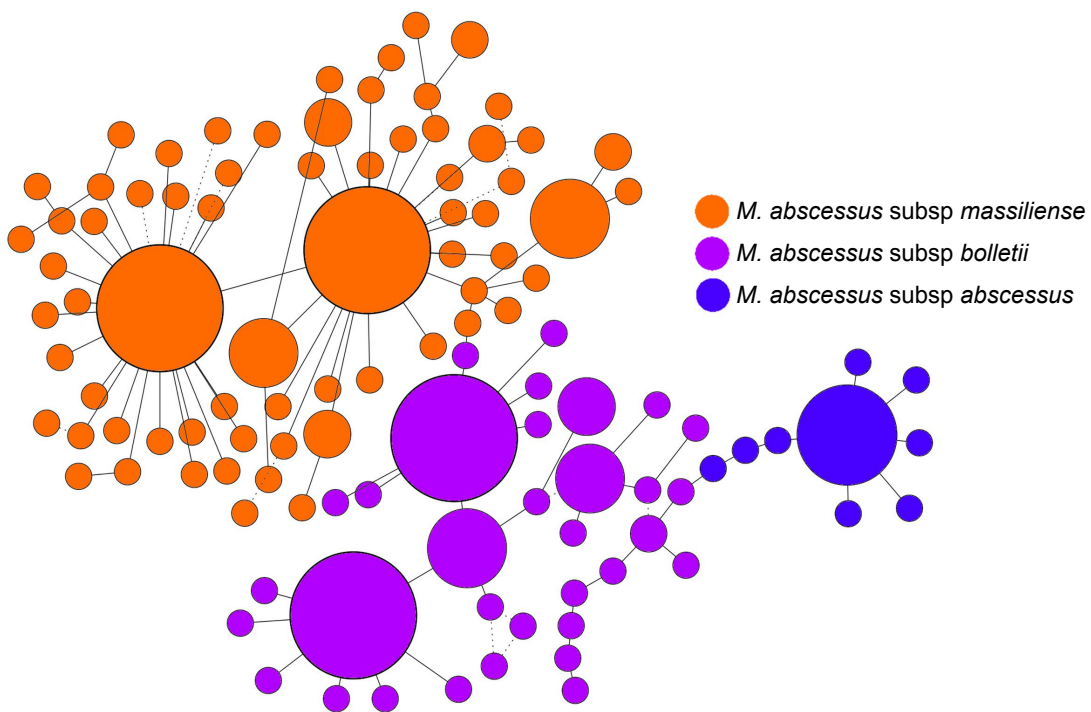
*M. abscessus* tient son nom de la formation d'abcès durant l'infection, symptôme observé pour la première fois chez une patiente présentant un abcès sous-cutané du genou (Moore and Frerichs, 1953). Les manifestations cliniques des infections à *M. abscessus* sont en effet souvent associées à la formation d'abcès et à une réponse inflammatoire sévère, pouvant nécessiter une intervention chirurgicale (Mougari *et al.*, 2016). Comparativement, *M. chelonae* en-



**Figure 4 | Nombre de publications concernant *M. abscessus* ces dernières années (PUBMED).**

Le nombre d'études sur *M. abscessus* n'a cessé d'augmenter ces dernières années, depuis la reconnaissance de *M. abscessus* comme une espèce à part entière et l'importance clinique des infections à *M. abscessus*.

(Adapté de Mougari *et al.*, 2016)



**Figure 5 | Arbre couvrant de poids minimal (ACM) des espèces du complexe *M. abscessus*.**

L'ACM de 243 souches du complexe *M. abscessus* a été construit avec 50 gènes informatifs. La taille de chaque cercle correspond au nombre de génomes dans chaque nœud. Les souches d'une même sous-espèce sont regroupées. Les branches solides représentent un soutien de 90%. Les branches discontinues représentent un soutien de 50 à 70%. Celles-ci sont terminales et ne remettent donc pas en cause la séparation des 3 sous-espèces.

(Adapté de Tan *et al.*, 2015)

genre exclusivement des abcès au niveau des tissus cutanés ou des tissus mous et non des poumons (Stelzmueller *et al.*, 2005; Uslan *et al.*, 2006; Shim *et al.*, 2012; Roukens *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2015).

La première description d'un isolat du MCC a été faite par Friedman en 1903. Isolé des poumons d'une tortue marine malade, Friedman le qualifia de « bacille tuberculeux de la tortue ». Jusqu'en 1953, *M. chelonae* et *M. abscessus* n'étaient pas distinguées l'une de l'autre. Elles étaient groupées avec *Mycobacterium fortuitum* sous la désignation « complexe *M. fortuitum* », *M. fortuitum* étant alors considérée comme l'espèce la plus pathogène parmi les MCR (Kubica *et al.*, 1972; Brown-Elliott and Wallace, 2002). La proximité de *M. abscessus* avec *M. chelonae* a été pendant longtemps source de confusion, la plupart des tests biochimiques n'étant pas discriminatoires. Ainsi *M. abscessus* fut d'abord considérée comme une sous-espèce de *M. chelonae* (Kubica *et al.*, 1972). Puis, il a été admis que les deux sous-espèces devaient être en fait considérées comme deux espèces à part entière (Stanford *et al.*, 1972). *M. abscessus* a été finalement élevée au rang d'espèce en 1992 (Kusunoki and Ezaki, 1992). En 2006, trois sous-espèces parmi ce que l'on appelle le complexe *M. abscessus* (comprenant *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* et *M. abscessus* subsp. *massiliense*) ont été individualisées (Macheras *et al.*, 2009). Si cette classification a été remise en cause en 2011 (Leao *et al.*, 2011), plusieurs études fondées sur le séquençage complet du génome, des analyses de spectrométrie de masse (MALDI-Tof) et des analyses phylogénétiques, ont depuis soutenu l'existence de trois sous-espèces (Cho *et al.*, 2013; Macheras *et al.*, 2014; Sassi and Drancourt, 2014; Fangous *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2015) (**Figure 5**).

## 2.2 Évolution du complexe *M. abscessus* et pathoadaptation

Depuis le séquençage de la souche Collection de l'Institut Pasteur (CIP) 104536T de *M. abscessus*, une cinquantaine d'isolats cliniques a été séquencée (Ripoll *et al.*, 2009;

Tettelin *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012; Choo *et al.*, 2014). Au sein des gènes conservés (core-génome) du complexe *M. abscessus*, des preuves de la sélection positive d'une petite portion de gènes sont observées ; ces gènes codent des enzymes modulant la croissance des bactéries (leur métabolisme et leur réplication), ainsi que des protéines de virulence, de résistance à différents antibiotiques et impliquées dans la réponse à des stimuli externes (Tan *et al.*, 2017). La présence de gènes impliqués dans la pathogénicité et la résistance aux antibiotiques au sein des 3 sous-espèces de *M. abscessus* peut refléter l'adaptation de ces bactéries environnementales à l'homme ou l'animal par exemple. L'évolution génomique des espèces du complexe *M. abscessus* semble principalement régit par des événements de recombinaisons géniques intra- et inter-espèces (Sapriel *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2017). La fréquence de ces événements est particulièrement élevée chez *M. massiliense* comparativement aux autres espèces du complexe et notamment *M. bolletii*, dont le génome est particulièrement bien conservé d'un génotype à l'autre. Ces événements de recombinaison contribuent à une évolution génomique plus rapide comparée à la sélection positive de gènes (Lefébure and Stanhope, 2007). *M. abscessus* et *M. massiliense* sont les sous-espèces les plus fréquemment identifiées dans les études de cohortes de patients présentant des infections pulmonaires et la fréquence des infections à l'une ou l'autre sous-espèce dépend de la région géographique considérée : *M. abscessus* est davantage fréquente dans les pays occidentaux alors que *M. massiliense* est davantage fréquente en Orient et notamment en Corée du Sud et à Taiwan (van Ingen *et al.*, 2009; Zelazny *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; O'Driscoll *et al.*, 2016). L'aptitude de ces deux sous-espèces à évoluer rapidement pourrait expliquer leur succès infectieux.

## 2.3 Diagnostic et traitement des infections à *M. abscessus*

*M. abscessus* et *M. chelonae* ne présentant pas la même sensibilité aux antibiotiques, il



est donc important de différencier les deux espèces pour traiter les infections dont elles sont la cause. Comme moyen présomptif d'identification, la résistance à la tobramycine a été utilisée pour les séparer. Le séquençage de gènes de ménage (*rrs*, *hsp65*, *rpoB*) et les techniques commercialisées utilisant une approche de reverse-dot-blot, permettent de distinguer *M. abscessus* de *M. chelonae*, et des autres MCR (Kehrmann *et al.*, 2016). L'évolution la plus intéressante s'est faite récemment grâce au développement de la spectrométrie de masse de type MALDI-Tof, qui est maintenant employée en routine pour l'identification des mycobactéries avec un coût très réduit et un degré de précision équivalent.

La distinction des sous-espèces de *M. abscessus* a également son importance puisqu'elles ne présentent pas la même sensibilité aux macrolides, antibiotiques piliers de la polychimiothérapie utilisée pour traiter les infections dues aux espèces du complexe *M. abscessus* (Jeon *et al.*, 2009; Floto *et al.*, 2016). Le taux de conversion des cultures est plus élevé avec un régime à base de clarithromycine chez les patients infectés par la sous-espèce *massiliense* (88%) comparativement à ceux infectés par la sous-espèce *abscessus* (25%) (Koh *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2012; Roux *et al.*, 2015). Une identification par amplification du gène responsable de la résistance inductible au macrolides (*erm41*, erythromycin resistance methylase) s'avère nécessaire afin d'identifier les séquévars (ou formes alléliques de ce gène) car la sous-espèce *abscessus* présente deux séquévars dont un sensible à la clarithromycine (Lee *et al.*, 2014; Brown-Elliott *et al.*, 2015).

### III. Importance des infections à *M. abscessus* parmi les infections pulmonaires à MNT

#### 3.1 Généralités épidémiologiques sur les infections pulmonaires à MNT

Les infections pulmonaires à MNT sont majoritaires parmi les mycobactérioses. Elles représentent 75 % des mycobactérioses (Griffith *et al.*, 2012). Les espèces les plus fréquemment

rencontrées sont les espèces appartenant au MAC, *Mycobacterium kansasii*, les espèces du complexe *M. abscessus* et l'espèce *Mycobacterium xenopi*. *M. abscessus* est la première MCR responsable d'infections respiratoires et pourrait représenter jusqu'à 80% des isolats de MCR parmi les infections respiratoires à MNT (Griffith, 2003). Les MNT provoquent le plus souvent des infections pulmonaires chez des individus présentant une pathologie pulmonaire comme des séquelles de tuberculose, une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), une pneumoconiose, une fibrose pulmonaire, une dilatation des bronches, un cancer broncho-pulmonaire ou bien la mucoviscidose (CF, Cystic Fibrosis) (Rosenzweig, 1979). Néanmoins, on observe également des infections à MNT chez des individus ne présentant aucune pathologie pulmonaire (Prince *et al.*, 1989; Griffith *et al.*, 1993). Plusieurs signes cliniques sont observables : toux, expectoration et parfois hémoptysie (Wallace *et al.*, 1998; Griffith, 2003). Chez certains individus, une asthénie, un amaigrissement et une fébricule peuvent être observés. Toutefois ces symptômes sont aspécifiques et couplés avec l'évolution lente de la maladie. Le diagnostic est par conséquent souvent tardif.

La prévalence des infections pulmonaires à MNT varie entre 0,2 et 300 cas pour 100 000 patients par an, selon la localisation géographique (Maugein *et al.*, 2005; Dailloux *et al.*, 2006; Winthrop *et al.*, 2010; Adjemian *et al.*, 2017). L'incidence des maladies pulmonaires à MNT est en augmentation en Amérique du Nord et dans de nombreuses régions du monde alors que l'incidence de la tuberculose a diminué dans les pays industrialisés au cours de la même période (Marras *et al.*, 2007; Adjemian *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Ringshausen *et al.*, 2013; Marras *et al.*, 2013; Brode *et al.*, 2014; Prevots and Marras, 2015). En fait, dans de nombreux pays, et notamment dans les pays où l'incidence de la tuberculose est importante, le diagnostic de la tuberculose reposant essentiellement sur la détection des BAAR par coloration de crachats ou par radiographie, il est impossible de distinguer une infection pulmonaire à MNT d'une infection à mycobactéries tuberculeuses. Ainsi, dans ces



pays, un nombre substantiel de patients diagnostiqués pour une tuberculose sont infectés par des MNT exclusivement (Nishiuchi *et al.*, 2017). Deux études indépendantes réalisées en Afrique montrent qu'une proportion de patients présentant une suspicion de tuberculose (3,7-15%) pourraient en réalité présenter une infection à MNT (Aliyu *et al.*, 2013; Agizew *et al.*, 2017). De la même façon, d'autres études ont suggéré qu'une proportion significative de patients présentant une suspicion de tuberculose multirésistante (18%) pourrait être en fait atteinte d'une infection pulmonaire à MNT (Newman *et al.*, 2007; Asiimwe *et al.*, 2013).

L'augmentation générale des infections à MNT ces dernières années peut s'expliquer par :

- (1) l'amélioration de la détection des MNT ;
- (2) une augmentation du nombre de patients présentant une maladie propice à l'infection à MNT comme les individus porteurs du VIH au stade SIDA,
- (3) des pratiques médicales avec des matériels contaminés.

Une étude récente, en faveur de l'hypothèse d'une transmission interhumaine de *M. abscessus*, suggère que celle-ci serait véhiculée par des fomites (Malcolm *et al.*, 2017). La capacité de *M. abscessus* à résister à la dessiccation et à d'autres contraintes physiques ainsi que sa résistance à de nombreux désinfectants pourraient favoriser une telle transmission (Wallace *et al.*, 1998). La génération d'aérosols pendant la physiothérapie et les tests de la fonction respiratoire pourrait entraîner une infection croisée entre patients par inhalation de gouttelettes d'eau en suspension (Wendt *et al.*, 1980). Bryant *et coll.* supposent que l'inoculum nécessaire à un tel mode d'infection pourrait être faible (Bryant *et al.*, 2013). Toutefois, le risque d'une transmission interhumaine de *M. abscessus* pourrait être mineur (Tortoli *et al.*, 2017).

Par ailleurs, quelques études étant parvenues à lier génétiquement des souches retrouvées dans l'environnement des patients aux souches infectieuses rendent également probable l'hypothèse d'une source environnementale des

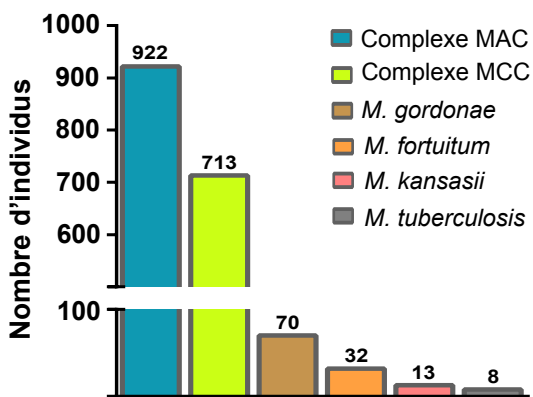
infections pulmonaires au MAC et au complexe *M. abscessus* (Nishiuchi *et al.*, 2007; Falkinham *et al.*, 2008; Nishiuchi *et al.*, 2009; Kuo *et al.*, 2011; Thomson *et al.*, 2013). Dans ces études les bactéries sont retrouvées dans les salles d'eau. Cette hypothèse d'une source environnementale des infections à MNT est d'autant plus probable que certaines espèces, dont les espèces du MAC, sont retrouvées dans l'environnement et notamment dans les systèmes de distribution des eaux, y compris des hôpitaux, dans les approvisionnements en eau des centres d'hémodialyse, ou encore dans les eaux des bains publics (Goslee and Wolinsky, 1976; Saito and Tsukamura, 1976; Scarlata *et al.*, 1985; Stine *et al.*, 1987; Graham *et al.*, 1988; Carson *et al.*, 1988; du Moulin *et al.*, 1988; Glover *et al.*, 1994; Montecalvo *et al.*, 1994; Peters *et al.*, 1995; Falkinham *et al.*, 2001). En outre, d'autres mycobactéries ont été récupérés de l'eau potable dont *M. abscessus* (Wallace *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1997; Dubrou *et al.*, 2013).

Finalement afin de prévenir de telles infections à MNT, il est essentiel d'éviter l'eau du robinet pour alimenter les instruments contenant de l'eau comme les respirateurs artificiels (Mougari *et al.*, 2016). Chez les patients immunocompromis ou présentant des maladies pulmonaires, le remplacement périodique des pommeaux de douche ou la prescription de régimes alimentaires spécifiques ont été proposés. Si les mycobactéries ne sont pas incluses dans les critères de qualité des eaux dans de nombreux pays, le risque d'infections à MNT dans l'environnement proche des patients devrait être contrôlé afin d'identifier les meilleures pratiques de prévention et de gestion de telles infections. Au Royaume-Uni, le guide de la CF Trust recommande d'isoler les patients CF les uns des autres et des autres patients CF. Les chambres des patients doivent être ventilées et closes : elles doivent être fermées, avec au moins une heure de pause entre chaque patient pour permettre la dispersion d'éventuels agents aéroportés, puis nettoyées conformément aux directives locales de contrôle des infections. Par ailleurs, une étude récente suggère l'emploi d'acide acétique pour disloquer les agrégats bactériens possible-



**Tableau 1 | Prévalence des micro-organismes clés dans la mucoviscidose en 2016 aux Etats-Unis.** (Adapté de Cystic Fibrosis Foundation, 2016)

Bactéries	Infection (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46,4
<i>Staphylococcus aureus</i> multi-résistant (MSRA)	26,0
<i>Streptomyces maltophilia</i>	13,3
Mycobactéries non-tuberculeuses	12,6
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	6,3
Complexe <i>Burkholderia cepacia</i>	2,7



**Figure 6 | Nombre d'espèces mycobactériennes isolées chez les individus CF en 2016 aux Etats-Unis.**

Parmi les espèces mycobactériennes isolées chez les individus CF, les espèces du complexe *Mycobacterium chelonae* (MCC) sont les plus abondantes derrière les espèces du complexe *Mycobacterium avium* (MAC). Les espèces tuberculeuses ne représentent qu'un centième des isolats totaux.

(Adapté de Cystic Fibrosis Foundation, 2016)

ment véhiculés par les fomites (Clary *et al.*, 2018). Le port de masque n'est pas obligatoire. Enfin l'emploi de matériel à usage unique doit être privilégié.

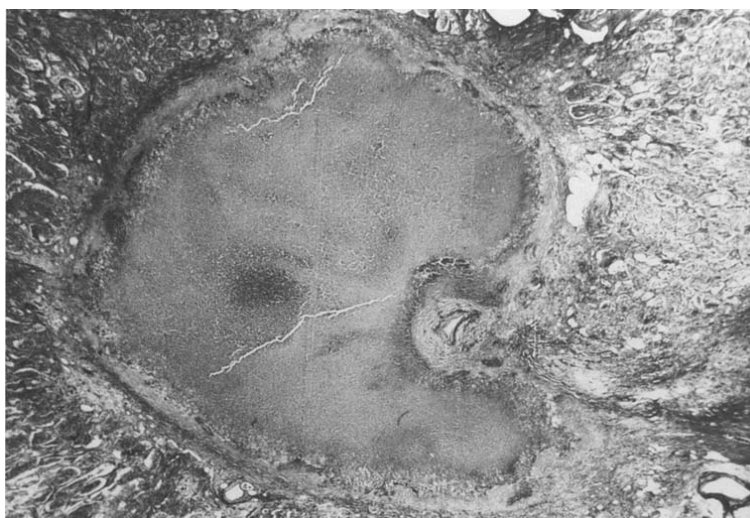
### 3.2 *M. abscessus* et la mucoviscidose

Chez les individus CF, la composition ionique du milieu et la fonction mucociliaire des voies respiratoires sont altérées due à des mutations du gène *cftr* codant le canal CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator) présent à la surface des cellules épithéliales et assurant l'efflux du chlore. En conséquence, la clairance de différentes espèces bactériennes diminue chez les patients CF, les prédisposant à des infections par différents agents pathogènes. Selon le registre américain de la mucoviscidose, parmi les espèces les plus prévalentes en 2016 figurent par ordre d'importance : **(1) *Pseudomonas aeruginosa***, **(2) *Staphylococcus aureus*** multirésistant (MSRA), **(3) *Streptomyces maltophilia***, **(4) les MNT**, **(5) *Achromobacter xylosoxydans*** ainsi que **(6) les espèces du complexe *Burkholderia cepacia*** (Cystic Fibrosis Foundation, 2016) (**Tableau 1**). Selon le registre français de la mucoviscidose, 1,2% des patients présentaient une infection à MNT en 2006 et, en 2016, 1,9% des patients étaient infectés (Bellis *et al.*, 2016).

Parmi les MNT isolées d'individus CF en 2016, les espèces du MAC et du MCC sont majoritaires tandis que les mycobactéries tuberculeuses ne représentent qu'un pourcent des isolats totaux (Cystic Fibrosis Foundation, 2016) (**Figure 6**). Des études épidémiologiques ont montré une incidence variable de ces mycobactérioses ainsi qu'une variabilité des espèces incriminées selon la distribution géographique de la maladie : ainsi, aux Etats-Unis, ces infections sont majoritairement causées par les espèces du MAC, alors qu'en France et au Royaume-Uni, les espèces du complexe *M. abscessus* sont plus fréquemment isolées (Olivier *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2009; Seddon *et al.*, 2013). Des rapports soulignent que les isolats de *M. abscessus* issus de patients CF peuvent représenter jusqu'à 56% des MNT isolées (Esther *et al.*, 2010). Ces dernières années, il est apparu clairement que les individus CF ont une propension particulière à la

colonisation et aux infections par *M. abscessus* (Hayes, 2005). La proportion d'individus porteurs de mycobactéries du complexe MCC par rapport au nombre d'individus porteurs de mycobactéries du complexe MAC a été multipliée par 5 comparée à l'étude menée par Olivier et coll. en 2003 (Olivier *et al.*, 2003; Cystic Fibrosis Foundation, 2016). De plus, une étude prospective réalisée en 2003 montra que *M. abscessus* est de loin la MNT la plus prévalente chez les enfants CF (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2009). Une étude comparant la prévalence des infections au complexe *M. abscessus* et aux espèces du MAC en fonction de l'âge des patients montre que les espèces du MAC sont observées chez les individus de plus de 15 ans alors que *M. abscessus* est observée à tout âge, avec un pic de prévalence chez les adolescents (Pierre-Audigier *et al.*, 2005; Roux *et al.*, 2009). En France, les sous-espèces *bolletii* et *massiliense* représentent 40% des infections à *M. abscessus*. Une étude récente montre des différences cliniques significatives entre infections pulmonaires à *M. abscessus* et à *M. massiliense*, la malnutrition, corrélée à la sévérité des signes cliniques chez les individus CF, étant particulièrement associée aux infections à *M. massiliense* (Roux *et al.*, 2015). Bien que la prévalence des infections à *M. abscessus* est probablement encore sous-estimée (Ferroni *et al.*, 2006), la détection de *M. abscessus* dans les sécrétions respiratoires, et particulièrement chez les patients CF, pourrait avoir augmenté au cours du temps grâce à une meilleure surveillance microbiologique combinée à une optimisation des méthodes de laboratoire permettant sa détection.

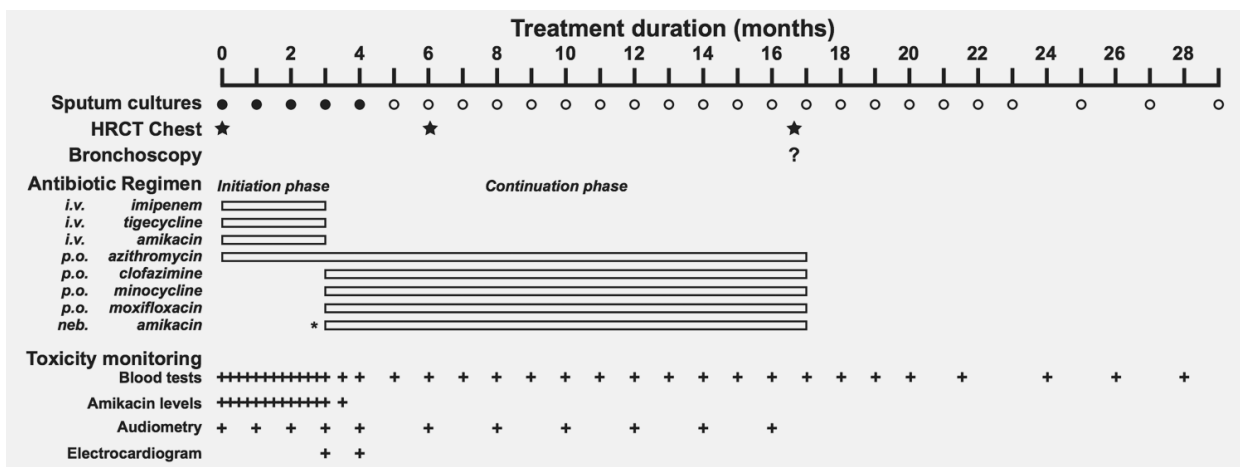
De plus, les infections pulmonaires à *M. abscessus* sont les plus délétères, avec déclin des fonctions ventilatoires des patients, comparativement à l'impact des infections causées par les MNT, et notamment des espèces du MAC (Qvist *et al.*, 2016). *M. abscessus* est capable de provoquer des infections chroniques persistantes chez les individus CF avec la formation de granulomes inflammatoires avec ou sans nécrose caséuse (Tomashefski *et al.*, 1996; Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007)



**Figure 7 | Granulome fibrocaséux chez un individu CF présentant une infection pulmonaire chronique à *M. abscessus*.**

Marquage au Movat pentachrome. Grossissement X16.

(Adapté de Tomaszefski *et al.*, 1996)



**Figure 8 | Dernières recommandations pour le traitement des infections à *M. abscessus* chez les individus CF.**

Chez les individus CF, le traitement est divisé en deux phases. Une phase de traitement intensif, ou phase d'initiation, où l'administration des antibiotiques se fait essentiellement par voie intraveineuse afin de réduire rapidement la charge bactérienne, et une phase dite de perpétuation où les antibiotiques sont administrés par voie orale. La toxicité liée au traitement est suivie par différents tests (tests sanguins, taux d'amikacine, tests audiométriques et électrocardiogrammes).

i.v. : administration intraveineuse. p.o. : administration par voie orale. neb. : administration par nébulisation.

(Adapté de Floto *et al.*, 2016)

(**Figure 7**). Cette pathologie sévère, communément associée aux mycobactéries tuberculeuses, impacte la morbidité et la mortalité (Tomashefski *et al.*, 1996 ; Ehlers and Schaible, 2012).

Enfin, en raison de la résistance de *M. abscessus* à de nombreux antibiotiques, les mycobactérioses à *M. abscessus* sont particulièrement difficiles à traiter et particulièrement les infections pulmonaires pour lesquelles un taux élevé d'échec thérapeutique est observé (20 à 52%) (Griffith *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2010; Jarand *et al.*, 2011; Lyu *et al.*, 2011; Nessar *et al.*, 2012). Chez les patients CF, une phase intensive de traitement par voie intraveineuse s'étend sur plusieurs mois (**Figure 8**). Cette forte résistance aux antibio-

tiques et le fait que les infections à *M. abscessus* (incluant les infections de la peau et des tissus mous ou des maladies pulmonaires) constituent un facteur de risque à la récurrence de l'infection, peuvent conduire à une impasse thérapeutique et l'impossibilité d'avoir recourt à la transplantation (Chalermkulrat *et al.*, 2006). Toutefois, dans plusieurs cas, la transplantation a été bénéfique malgré un contexte d'infection à *M. abscessus* (Gilljam *et al.*, 2010). La contre-indication à la transplantation dans un tel contexte n'est donc pas absolue et, lorsque les traitements antibiotiques ne suffisent pas, une transplantation peut être envisagée, mais un traitement adéquat doit être adopté afin de prolonger la qualité du transplant.



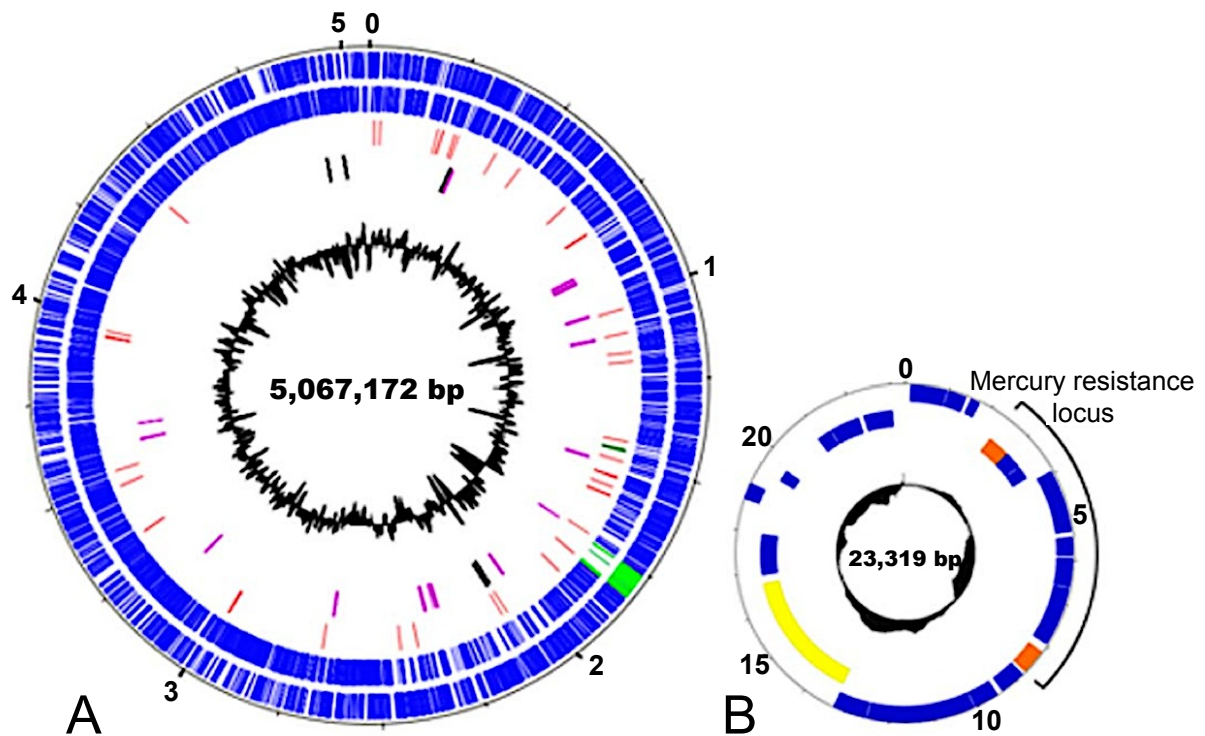
### I. Vie intracellulaire de *M. abscessus*

Parmi les questions cliniques d'importance concernant *M. abscessus* et autres infections à MNT environnementales est la question de l'analyse des expectorations ; à savoir si le fait de retrouver ces MNT dans un échantillon respiratoire définit une colonisation ou une infection et si la colonisation des poumons conduit inévitablement au développement d'infections pulmonaires, comme cela est communément décrit dans les cas d'infection à mycobactéries tuberculeuses (Cullen *et al.*, 2000). Nous avons déjà évoqué le comportement pseudo-tuberculeux de *M. abscessus* du fait de sa capacité à induire des infections pulmonaires persistantes, associées à la formation de granulomes inflammatoires pouvant évoluer en des formes nécrotiques.

En fait, au sein des MCR, composées essentiellement d'espèces saprophytes, *M. abscessus* fait particulièrement figure d'exception, possédant la capacité de survivre et/ou de se multiplier au sein de plusieurs types cellulaires, un comportement généralement observé chez les MCL. Parmi les hôtes potentiels de *M. abscessus* figurent les cellules épithéliales de l'endothélium, les fibroblastes, les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages et les cellules dendritiques humaines et murines (Byrd and Lyons, 1999; Oberley-Deegan *et al.*, 2009; Nessar *et al.*, 2011; Baltierra-Uribe *et al.*, 2014; Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Roux *et al.*, 2016). *M. abscessus* résiste aussi à l'action des polynucléaires neutrophiles, des phagocytes particulièrement microbicides, ceux-ci étant peu actifs suite à l'internalisation de *M. abscessus* en comparaison à *S. aureus* (Malcolm *et al.*, 2013). D'autres études montrent que *M. abscessus* est particulièrement retrouvée au sein des macrophages dans lesquels elle parvient à se multiplier contrairement à d'autres MCR pas ou peu pathogènes comme *M. smegmatis* et *M. chelonae* éliminées par les macrophages, *in vitro* et *in vivo* (Rottman *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2015; Ganbat *et al.*, 2016). Au sein des macrophages,

*M. abscessus* peut être en proie à divers stress. En effet, suite à la phagocytose de micro-organismes, les macrophages induisent la maturation du compartiment phagosomal en un compartiment microbicide, acidifié par l'import de protons H<sup>+</sup> médié par une adénosine triphosphatase (ATPase) vacuolaire (V-ATPase) qui peut fusionner avec un lysosome contenant des enzymes lysosomales de dégradation, actives à pH acide. De plus, les macrophages produisent des dérivés oxygénés (ROS) et nitrosatifs (RNI) toxiques ou encore des peptides antimicrobiens (Flannagan *et al.*, 2009). Enfin, les macrophages peuvent induire l'efflux du fer et du manganèse, essentiels à l'activité de certaines enzymes bactériennes, via des transporteurs tels que NRAMP-1 (Natural Resistance-Associated Macrophages Protein), la calprotectine et des ferroportines ; tandis que les concentrations en cuivre et en zinc, des métaux toxiques pour les bactéries, sont augmentées (Forbes and Gros, 2001; Chung *et al.*, 2004; Cellier *et al.*, 2007; White *et al.*, 2009; Botella *et al.*, 2011; Achard *et al.*, 2012; Madejczyk and Ballatori, 2012; Damo *et al.*, 2013). Les radicaux libres peuvent se fixer aux groupes hème des complexes respiratoires et, combinés aux ROS, le cuivre et le zinc peuvent endommager les centres Fer-Soufre (Fe-S) d'enzymes requises pour le métabolisme cellulaire (Jang and Imlay, 2007; Macomber and Imlay, 2009; Xu and Imlay, 2012). Le tout contribue à l'élimination des micro-organismes ingérés.

La capacité des mycobactéries à résister à la phagocytose dépend de processus adaptatifs spécifiques à ces bactéries. En effet, les mycobactéries sont dépourvues de facteurs de virulence dits classiques comme la toxine de *Bordetella pertussis*, bactérie responsable de la coqueluche ou de *Corynebacterium diphtheriae*, responsable de la diphtérie. Les bactéries Gram-ont notamment développé de nombreux systèmes de sécrétion contribuant à l'export de toxines dont les systèmes de sécrétion de type III et IV, absents des mycobactéries, et permettant le relargage direct de facteurs de virulence dans



**Figure 9 | Génome de *M. abscessus* subsp. *abscessus*.**

A : Représentation circulaire du chromosome bactérien (échelle : Mb). Les deux cercles les plus externes montrent les gènes mycobactériens (en bleu), et les gènes de phage (en vert). Le troisième cercle montre les gènes codant les ARN de transfert et l'opéron ARN ribosomique (en vert foncé). Le quatrième cercle montre les gènes possiblement acquis en bloc par transfert horizontal (en violet) et les éléments d'insertion (en noir). Le pourcentage de GC est représenté par un histogramme (échelle : 50-69%).

B : Représentation circulaire du plasmide de résistance au mercure (échelle kb). L'opéron de résistance au mercure est indiqué, flanqué de deux recombinaisons (orange). Un gène codant une relaxase-hélicase est présent qui pourrait être impliqué dans la conjugaison bactérienne et l'acquisition de gènes (en jaune).

(Adapté de Ripoll *et al.*, 2009)

l'hôte (Christie *et al.*, 2005; Cornelis, 2006; Saier, 2006). Afin de survivre à la phagocytose, *M. abscessus* doit posséder des facteurs de virulence propres permettant de lutter contre les stress rencontrés dans les cellules.

Chez des pathogènes émergents tels que *M. abscessus*, les analyses de génomique comparative permettent d'identifier des gènes de virulence putatifs, pouvant expliquer l'origine de leur virulence.

## II. Analyse du génome de *M. abscessus* et génomique comparative

### 2.1 Gènes de virulence non-mycobactériens

Séquencé en 2009, le génome de *M. abscessus* est constitué d'un chromosome circulaire d'environ 5 millions de paires de base (pb) avec un GC% de 67, d'un plasmide de résistance au mercure d'environ 2 milles pb, et d'un prophage complet de 81 kilobases (Ripoll *et al.*, 2009) (**Figure 9**). Le génome de *M. abscessus* se distingue également par la présence d'un seul opéron ARN ribosomique caractéristique des MCL, et ne présente que quelques séquences d'insertion (IS, insertion sequence) comme l'ISMab1 (Lyons *et al.*, 2002; Ripoll *et al.*, 2009). L'analyse du génome de *M. abscessus* a montré l'existence de gènes de virulence non-mycobactériens, possiblement acquis par transfert horizontal (HGT, horizontal gene transfer). Ces gènes sont présents chez les trois sous-espèces de *M. abscessus* et pourraient contribuer à sa virulence.

**Parmi ces gènes figurent des gènes d'actinobactéries** tel que le gène *mgtC* (MAB\_3593), absent du génome de *M. smegmatis*. Chez divers pathogènes, ce gène est nécessaire à la survie en milieu carencé en magnésium, et donc à la survie dans le phagosome où ce nutriment vient à manquer. Cela a tout d'abord été rapporté chez le pathogène intracellulaire *Salmonella enterica*, puis chez *M. tuberculosis* (Moncrief and Maguire, 1998; Buchmeier *et al.*, 2000). De plus, une étude a prouvé le rôle de MgtC dans la virulence de *P. aeruginosa* en montrant l'implication de la

protéine dans le contrôle de la formation de biofilm en cas de carence en magnésium (Belon *et al.*, 2015). Nous avons confirmé le rôle de ce gène dans la capacité de *M. abscessus* à s'adapter à un milieu carencé en magnésium, un mutant de ce gène présentant une croissance ralentie dans un milieu pauvre en magnésium tandis que chez la souche sauvage, le gène est particulièrement induit suite à une carence en magnésium *in vitro* et dans des macrophages murins (Le Moigne *et al.*, 2016). De plus, la protéine MgtC de *M. abscessus* est détectée dans les sera d'individus CF et est immunogène dans un modèle d'aérosolisation de souris, faisant d'elle un candidat vaccin pour les infections à *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2016). Par ailleurs, d'autres gènes pourraient avoir été acquis du genre *Rhodococcus* parmi les actinobactéries comme le gène *msrA* (MAB\_0120), codant une méthionine sulfoxyde réductase, une enzyme antioxydante. Chez *M. tuberculosis*, une protéine MsrA protège la bactérie contre les dommages oxydatifs causés par les dérivés azotés produits par les macrophages (John *et al.*, 2001). Chez *M. abscessus*, le gène *msrA* est à proximité du gène *sodA* codant une superoxyde dismutase permettant la détoxification des ROS (Fridovich, 1995). Comme les espèces du genre *Rhodococcus* et *Burkholderia*, *M. abscessus* possède des gènes impliqués dans la captation du fer tels que MAB\_1501-MAB\_1504, codant des transporteurs de fer de type ABC (ATP-Binding Cassette), afin de s'adapter aux conditions de vie *in vivo* où ce nutriment vient à manquer (Ripoll *et al.*, 2009; Letek *et al.*, 2010). Enfin, *M. abscessus* présente dans son génome des gènes impliqués dans la dégradation de l'ADN comme le locus *dnd* (MAB\_1093c-MAB\_1098) codant des cystéines désulfurases (Zhang *et al.*, 2004). De tels gènes sont aussi présents chez *Streptomyces lividans*, au sein du locus *dndA-E* donnant son nom au phénotype de dégradation de l'ADN *in vitro* dit phénotype « Dnd » (Zhou *et al.*, 2005). Chez les individus CF, l'utilisation d'un traitement rhDNase pourrait permettre aux bactéries Dnd+ comme *M. abscessus* d'utiliser l'ADN libéré lors de la réponse inflammatoire et la lyse des polynucléaires au sein des poumons



**Tableau 2 | Gènes de virulence mycobactériens de *M. abscessus*.** Les orthologues de gènes de virulence de *M. tuberculosis* sont donnés et une fonction leur est assignée selon la classification réalisée par Forrellad et coll. (Forrellad et al., 2013).

Gène Mabs	Gène Mtb	Fonction
MAB_3148c	Rv1527c	<i>pks5</i> métabolisme des lipides et des acides gras, synthèse de lipides complexes
MAB_4095c	Rv0467	<i>icl1</i> métabolisme des lipides et des acides gras, autres gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et des lipides
MAB_3719c	Rv3409c	<i>choD</i> métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0585	Rv3568c	<i>hsaC</i> métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0613	Rv3545c	<i>cyp125</i> métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0614	Rv3544c	<i>fadE28</i> métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0615	Rv3543c	<i>fadE29</i> métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0616	Rv3542c	métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0617	Rv3541c	métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0618	Rv3540	<i>ltp2</i> métabolisme des lipides et des acides gras, catabolisme du cholestérol
MAB_0169c	Rv3810	<i>erp</i> protéine d'enveloppe, fonction inconnue
MAB_4569c	Rv0166	<i>mce1</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi impliquée dans le transport de lipides
MAB_3018	Rv0586	<i>mce2</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire
MAB_4150c	Rv3496c	<i>mce4</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi impliquée transport du cholestérol
MAB_4153c	Rv3499c	<i>mce4</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi impliquée dans le transport du cholestérol
MAB_4155c	Rv3501c	<i>mce4</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi impliquée dans le transport du cholestérol
MAB_4083c	Rv0475	<i>hbhA</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi, adhésine
MAB_0749	Rv0820	<i>phoT</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi transporteur de phosphate inorganique
MAB_1918	Rv2224c	<i>caeA</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi, carboxyestérase
MAB_0429	Rv3663c	<i>oppA</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi, transporteur d'oligopeptides
MAB_0428	Rv3664c	<i>oppB</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi, transporteur d'oligopeptides
MAB_0427	Rv3665c	<i>oppC</i> protéine d'enveloppe, protéine de paroi, transporteur d'oligopeptides
MAB_0885c	Rv3763	<i>lpqH</i> protéine d'enveloppe, lipoprotéine, antigène apoptogénique
MAB_2807	Rv1410c	<i>p55</i> protéine d'enveloppe, lipoprotéine, pompe d'efflux d'antibiotiques
MAB_1372	Rv1235	<i>lpqY</i> protéine d'enveloppe, lipoprotéine, système de recyclage des tréhaloses
MAB_2433	Rv1857	<i>modA</i> protéine d'enveloppe, lipoprotéine, transporteur de molybdène
MAB_0115c	Rv3849	<i>espR</i> protéine d'enveloppe, système de sécrétion de type 7, NAP
MAB_2397	Rv1821	<i>secA2</i> protéine d'enveloppe, système de sécrétion spécialisé
MAB_4402	Rv0251c	<i>acr2</i> protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages, chaperonne moléculaire
MAB_2108	Rv2136c	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (stress oxydatif et nitrosatif), probablement impliquée dans la synthèse du peptidoglycane
MAB_4408c	Rv2428	<i>ahpC</i> protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (stress oxydatif et nitrosatif), alkyl hydroxyréductase
MAB_4184c	Rv0432	<i>sodC</i> protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (stress oxydatif et nitrosatif), superoxyde dismutase
MAB_2470c	Rv1908c	<i>katG</i> protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (stress oxydatif et nitrosatif), catalase-peroxydase
MAB_2140	Rv3151	<i>nuoG</i> protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (inhibition de l'apoptose), sous-unité de la déshydrogénase de type NADH-1
MAB_4224	Rv0410c	<i>pknG</i> protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (inhibition de la maturation phagosomale), protéine kinase

NAP : nucleoid-associated protein

infectés, comme une source de nutriments (Catherinot *et al.*, 2013).

**Des gènes probablement acquis de  $\beta$ -protéobactéries** sont également retrouvés dans le génome de *M. abscessus* comme les gènes *MAB\_0906-MAB\_0910*, présents chez *Burkholderia cenocepacia*, impliqués dans la dégradation de l'acide phénylacétique et dont l'homologue de *MAB\_0910* est requis pour la survie intracellulaire dans un modèle d'infection pulmonaire chronique de rat (Hunt *et al.*, 2004). De plus, des gènes liés à la biosynthèse de la phénazine, produite par *P. aeruginosa*, sont identifiés dans le génome de *M. abscessus* (*MAB\_0295-MAB\_0298*). Parmi les métabolites produits, il a été montré que la pyocyanine (PCN) contribue à la virulence de *P. aeruginosa* en modèle murin d'infection, induisant des dommages aux poumons (Lau *et al.*, 2004). Son importance clinique chez les individus CF a été également suggérée, de grandes quantités de PCN étant détectées dans les expectorations des patients CF (Wilson *et al.*, 1988). Parmi les facteurs clefs de la virulence de *P. aeruginosa* retrouvés chez *M. abscessus* figurent aussi des facteurs liés à la voie de biosynthèse de la pyomélanine qui pourrait contribuer à la résistance au stress oxydatif chez *P. aeruginosa* mais aussi induire une inflammation des tissus de l'hôte (Hegedus, 2000; Nosanchuk and Casadevall, 2003). Enfin, le gène *MAB\_0555* codant une phospholipase C (PLC), présente une forte homologie avec la PLC-N de *P. aeruginosa*, dépourvues toutes deux d'une activité hémolytique (Ostroff *et al.*, 1990; Bakala N'Goma *et al.*, 2015). Ce gène est absent de la plupart des MCR dont *M. smegmatis*, *M. chelonae* et de la MCL *M. avium*. L'hydrolyse des phospholipides par la PLC de *M. abscessus* conduit à la production de diacylglycérol (DAG), un second messager lipidique connu pour activer la protéine kinase C modulant l'activation des neutrophiles et des macrophages (Ostroff *et al.*, 1990). Cette activité participe à la réponse inflammatoire observée dans les poumons des individus CF (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

## 2.2 Gènes de virulence mycobactériens

Chez *M. abscessus*, environ 90 gènes de virulence putatifs ont été identifiés en utilisant la base de données Virulence Factor Database (VFDB), dont la majorité (78) sont conservés chez 5 souches de *M. tuberculosis*. Cela représente environ 40% des gènes de virulence de ces souches (196) (Choo *et al.*, 2014). Toutefois, en comparaison avec *Mycobacterium vaccae* (MCR saprophyte), chez qui seulement 4 gènes de virulence sont annotés, les 78 gènes conservés entre *M. tuberculosis* et les espèces du complexe *M. abscessus* jouent potentiellement un rôle dans la virulence de *M. abscessus*. Une étude antérieure a rapporté l'existence de 209 facteurs de virulence chez les espèces du MTBC (Forrellad *et al.*, 2013). La majorité des gènes de virulence de *M. tuberculosis* de la VFDB est citée dans cette revue à l'exception des gènes impliqués dans le métabolisme général de la bactérie comme les gènes *trpD*, *purC*, *proC*, *leuD*, *lysA* (métabolisme des acides aminés) et le gène *glnA1* (métabolisme de l'azote). Les gènes du locus ESX-3 et ceux du locus ESX-4 du système de sécrétion mycobactérien de type 7 (T7SS) ne sont pas cités non plus ; le premier locus étant essentiel à la viabilité des mycobactéries alors qu'aucun rôle direct dans la virulence des mycobactéries tuberculeuses n'a été rapporté pour le second. Une recherche d'orthologues putatifs par identification de hits bijectifs réalisée au laboratoire montre la conservation de 66 des 209 gènes de virulence du MTBC répertoriés par Forrellad et coll. chez *M. abscessus* (32%) (**Tableau 2**). Ces gènes codent :

- **des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et des acides gras** (10) et notamment le catabolisme du cholestérol (8) ;
- **des protéines d'enveloppe** (18) dont des protéines de la paroi (12) contribuant au transport de lipides (Mce2 et Mce4), d'oligopeptides (OppABC) et du phosphate (PhoT) mais aussi une protéine contribuant à l'adhésion aux cellules-hôtes (HbhA) et des lipoprotéines (4) pouvant être impliquées dans divers processus comme le transport de composés, le métabolisme associé à la

**Tableau 2 (suite)**

Gène Mabs	Gène Mtb	Fonction
MAB_4224	Rv0410c <i>pknG</i>	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages (inhibition de la maturation phagosomale), protéine kinase
MAB_1078	Rv0983 <i>htrA2 (pepD)</i>	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages, protéase et chaperonne moléculaire impliquée dans l'homéostasie de la paroi
MAB_0421	Rv3671c	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages, protéase protégeant de l'acidification et des stress oxydatifs
MAB_3068c	Rv2745c <i>clgR</i>	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages, régulateurs transcriptionnel (cible HtrA2)
MAB_2183	Rv2097c <i>pafA</i>	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages, protéine accessoire du protéasome protégeant des stress nitrosatifs
MAB_2162	Rv2115c <i>mpa</i>	protéine inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages, protéine accessoire du protéasome protégeant des stress nitrosatifs
MAB_2124	Rv2383c <i>mbtB</i>	transporteur de métaux, transport du fer
MAB_2262c	Rv1348 <i>irtA</i>	import de métaux, protéine régulatrice dépendante du fer (cible les loci mbt)
MAB_3029	Rv2711 <i>ideR</i>	import de métaux, régulateur transcriptionnel impliqué dans l'homéostasie du fer
MAB_3593	Rv1811 <i>mgtC</i>	import de métaux, import du magnésium
MAB_4703c	Rv0450c <i>mmpL4</i>	import de métaux (fer)
MAB_0956c	Rv0903c <i>prrA</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_0955c	Rv0902c <i>prrB</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_0673	Rv0757 <i>phoP</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_0674	Rv0758 <i>phoR</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_4048c	Rv0490 <i>senX3</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_4047c	Rv0491 <i>regX3</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_3891c	Rv3133c <i>dosR (devR)</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_3890c	Rv2027c <i>dosT</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_1076	Rv0981 <i>mprA</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_1077	Rv0982 <i>mprB</i>	régulateur transcriptionnel, système à deux composantes
MAB_3430c	Rv2069 <i>sigC</i>	régulateur transcriptionnel, facteur sigma
MAB_3724c	Rv3414c <i>sigD</i>	régulateur transcriptionnel, facteur sigma
MAB_1362	Rv1221 <i>sigE</i>	régulateur transcriptionnel, facteur sigma
MAB_2511	Rv3286c <i>sigF</i>	régulateur transcriptionnel, facteur sigma
MAB_3543c	Rv3223c <i>sigH</i>	régulateur transcriptionnel, facteur sigma
MAB_4059c	Rv0485	régulateur transcriptionnel, membre de la famille de répresseur nagc/xylr
MAB_4270c	Rv0353 <i>hspR</i>	régulateur transcriptionnel, répresseur transcriptionnel
MAB_3726	Rv3416 <i>whiB3</i>	régulateur transcriptionnel, régulateur transcriptionnel de la famille WhiB
MAB_1251c	Rv1099c	protéine PE-PPE
MAB_4524	Rv0204c	protéine PE-PPE
MAB_1835c	Rv1980c <i>mpt64</i>	autre gène de virulence, gène de la région de différenciation 2 (antigène)
MAB_4591	Rv0153c <i>ptpB</i>	autre gène de virulence, tyrosine phosphatase impliquée dans la pathogenèse de <i>M. tuberculosis</i>
MAB_1083c	Rv0990c <i>hsp22.5</i>	autre gène de virulence, protéine de type heat shock (synthèse augmentée suite à une élévation de températures et des stress oxydatifs et alcalins)

paroi, l'adhésion aux cellules, la signalisation cellulaire et la dégradation des protéines. Chez *M. abscessus*, quatre gènes (*MAB\_0885c*, *MAB\_2379*, *MAB\_3261c* et *MAB\_4074c*) codent des lipoprotéines de la famille LpqH, connues sous le nom de lipoprotéines de 19 kDa. Ces protéines jouent un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire (Garbe *et al.*, 1993; Thoma-Uszynski *et al.*, 2001; Pennini *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2012). De la même façon, chez *M. abscessus* ces protéines sont impliquées dans la reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire et dans l'activation des macrophages (Roux *et al.*, 2011; Sekizuka *et al.*, 2014). Enfin, les systèmes de sécrétion spécialisés sont conservés chez *M. abscessus* comme le système SecA2 et le T7SS ;

- **des protéines inhibant les effecteurs antimicrobiens des macrophages** (11) dont des protéases/chaperonnes moléculaires (3), des protéines associées au protéasome (2) et des protéines permettant de lutter contre les stress oxydatifs et nitrosatifs rencontrés dans les cellules ou encore une protéine inhibant l'apoptose des cellules (NuoG) et la protéine PknG inhibant la maturation phagosomale (Walburger *et al.*, 2004; Velmurugan *et al.*, 2007; Pradhan *et al.*, 2018) ;
- **des protéines impliquées dans le transport de métaux** (5) et notamment l'apport du fer (4) ;
- **des régulateurs transcriptionnels** (18) parmi lesquels figurent des systèmes à deux composantes (TCSS, Two-Component Signal transduction Systems) (10) et des régulateurs propres aux mycobactéries régulant des gènes de virulence, les facteurs Sigma (5), des répresseurs transcriptionnels (2) et le régulateur WhiB3 de la famille WhiB parmi des protéines à centre Fe-S, senseurs des stress intracellulaires. Il existe également des régulateurs globaux de transcription, comme les protéines de type histone ou protéines associées au nucléoïde (NAP, nucleoid-associated protein). Ces protéines

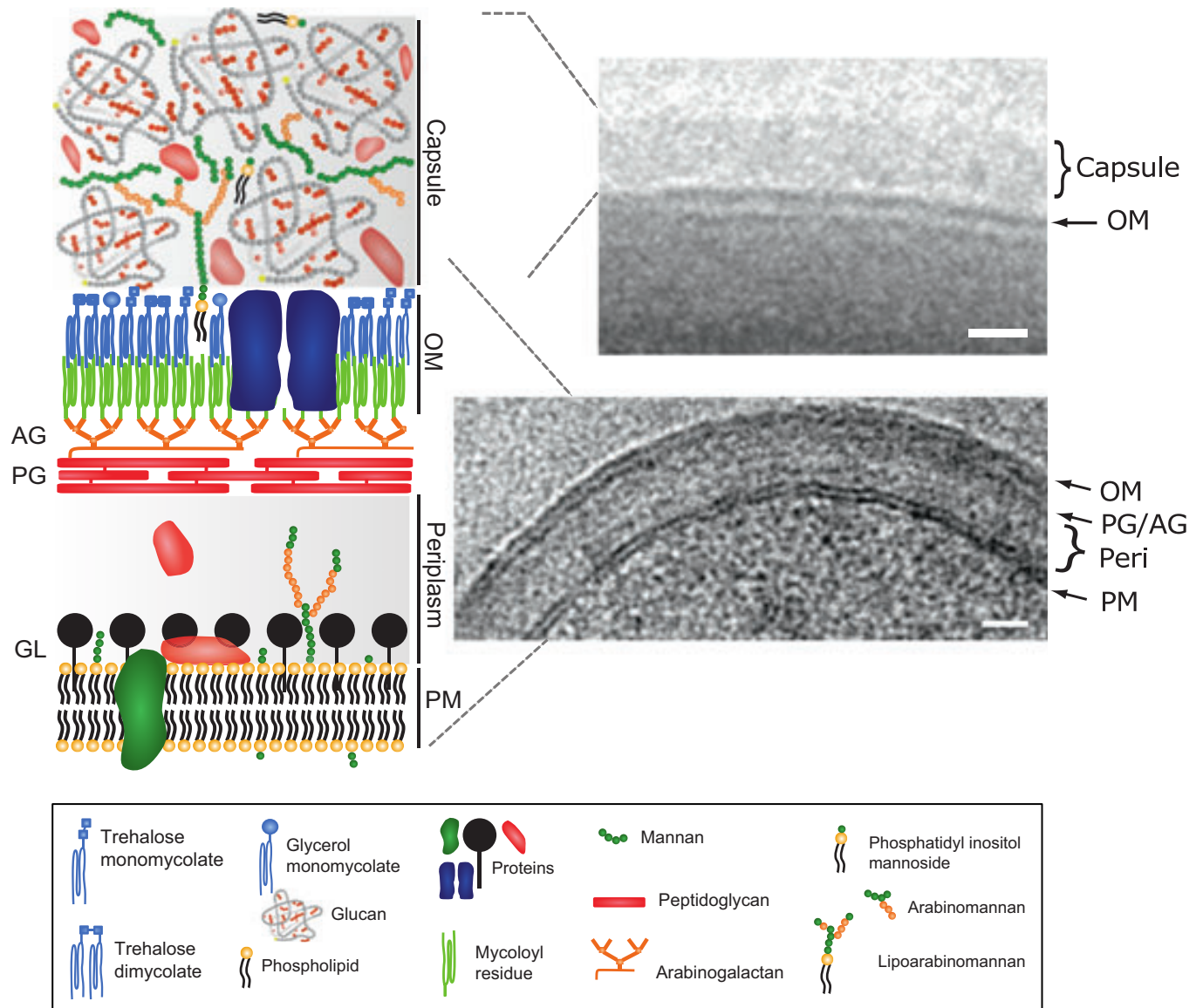
sont particulièrement abondantes chez les bactéries Gram- et se répartissent en 12 familles : Dps, Fis, H-NS, HU, IHF, Lrp, MukB, StpA, CbpA, CbpB, EbfC, MvaT (Dillon and Dorman, 2010). Si chez *M. tuberculosis*, les régulateurs de transcription de la famille Sigma sont particulièrement abondants (13 gènes), seuls 4 gènes codent des NAP dont la fonction est avérée, à savoir *espR* (appartenant au T7SS), *hupB* (HU-like), *lsr2* (H-NS-like), *miHF* (HIF-like). Le rôle des protéines Lsr2 et EspR dans la virulence de *M. tuberculosis* a été montré récemment (Raghavan *et al.*, 2008; Bartek *et al.*, 2014). Ces gènes sont conservés chez *M. abscessus*. De plus, *M. abscessus* possède aussi une protéine homologue au facteur de transcription VirS, facteur absent chez *M. smegmatis* et impliqué dans le remodelage de l'enveloppe bactérienne et la persistance de *M. tuberculosis* (Amit Singh *et al.*, 2005) ;

- **des protéines PE (Proline-Glutamate) et PPE (Proline-Proline-Glutamate)** (2), hautement immunogènes (Brennan and Delogu, 2002; Demangel *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Sayes *et al.*, 2012). Dans le génome de *M. abscessus*, 5 gènes codent des protéines possédant un motif PE et 6 codent des protéines possédant un motif PPE (Laencina *et al.*, 2018) ;
- **des protéines peu ou mal décrites** telles que l'antigène Mpt64, la tyrosine phosphatase PtpB influant la pathogénèse des infections (Ramandeep Singh *et al.*, 2005) et la protéine heat shock Hsp22.5 dont la synthèse est augmentée suite à divers stress tels que la hausse de température et les stress alcalins et oxydatifs (Abomoelak *et al.*, 2011).

Finalement, il apparaît que l'enveloppe mycobactérienne concentre la moitié des facteurs de virulence conservés entre *M. abscessus* et les espèces du MTBC. La contribution de l'enveloppe à la virulence de *M. abscessus* sera décrite dans le chapitre suivant et mise en perspective par rapport à ce qui est connu chez les espèces du MTBC et notamment *M. tuberculosis*. Le rôle du métabolisme des lipides dans les



adaptations à la vie intracellulaire sera également décrit.



**Figure 10 | Modèle, constituants et ultrastructure de l'enveloppe mycobactérienne.**

A gauche : Modèle de l'enveloppe mycobactérienne.

A droite : Images de microscopie électronique à transmission de l'enveloppe mycobactérienne. Panneau haut : cryoEM montrant l'enveloppe. Panneau bas : CEMOVIS montrant l'ultrastructure de l'enveloppe mycobactérienne.

AG : arabinogalactan. PG : peptidoglycane. GL : glycolipides. OM : membrane externe. PM : membrane plasmique.

(Adapté de Daffé, 2018)

## I. Singularité de la virulence des mycobactéries : importance de l'enveloppe mycobactérienne

Un paramètre, communément employé pour mesurer la virulence des mycobactéries est la charge bactérienne (Smith, 2003), directement liée à la capacité des mycobactéries à survivre et à se multiplier au sein de l'hôte via la résistance aux antibactériens naturels (produits par l'hôte) et synthétiques (antibiotiques et dérivés organomercuriels). Cette résistance est conférée principalement par la barrière imperméable formée par l'enveloppe mycobactérienne, première ligne de défense des mycobactéries (Daffé and Draper, 1998). L'enveloppe se caractérise par une forte teneur en lipides (40%) tandis que chez les bactéries Gram+ et Gram-, le taux de lipides est de 5 et 10% respectivement (Daffé, 2015). Les mycobactéries sont singulières car elles possèdent à la fois une enzyme de synthèse des acides gras (FAS, fatty acid synthase) de mammifères (FAS-I) et de bactéries (FAS-II), dont les produits sont convertis en acides mycoliques et lipides complexes (Mukhopadhyay et al., 2012). Parmi ces lipides complexes, certains sont à base de polykétides, des métabolites secondaires synthétisés par des enzymes spécialisées, les polykétides synthases (PKS). L'enveloppe peut être visualisée grâce à des techniques de cryo-microscopie électronique (ME) telle que la cryoEM et la technique CEMOVIS (cryo-electron-nanoscopy of vitreous sections) (Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008; Sani et al., 2010; Marrakchi et al., 2014) (**Figure 10**). L'enveloppe est structurée en 3 entités : une membrane plasmique conventionnelle (surplombée de la paroi mycobactérienne, elle-même recouverte d'une couche externe (OL) aussi appelée capsule chez les mycobactéries pathogènes (Daffé and Draper, 1998). La membrane plasmique et la paroi mycobactérienne sont séparées par un espace périplasmique. La paroi comprend une couche de peptidoglycane (PG) liée covalamment à l'ara-

binogalactane (AG), estérifié par des acides mycoliques, ainsi qu'une membrane plasmique externe dénommée mycomembrane (OM, membrane externe). Ce complexe tripartite est aussi connu sous le nom de mAGP (mycolylarabino-galactan-peptidoglycan) (Daffé and Draper, 1998). L'OM est constituée d'une bicouche lipidique organisée de façon asymétrique et comprenant des acides mycoliques pouvant être libres ou liés à l'AG. Des lipides complexes sont présents dans l'OM aussi dénommés lipides extractibles : ces lipides sont associés à l'enveloppe par des interactions hydrophobes non-covalentes, ce qui permet de les extraire avec des solvants sans les détruire. Les lipides extraits sont ensuite visualisés sur des chromatographies sur couche mince (TLC, thin layer chromatography) (Chiaradia et al., 2017). Parmi ces lipides, on distingue :

- **les lipides à base de tréhalose** tels les mono/dimycolates de tréhalose (TM/DM), des glycolipides ubiquitaires et essentiels *in vitro*, que l'on retrouve chez les Corynébactéries (Korduláková et al., 2003), les tréhaloses polyphléates (TPP) présents chez les MNT, les diacyl/penta-acyltréhaloses (D/PAT) produits par les espèces du MTBC, les lipooligosacharrides (LOS) produits par certaines MNT dont *M. smegmatis* (mais aussi *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium gordonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium szulgai*) et *M. canettii* (Etienne et al., 2009) et les sulfolipides (SL) permettant de différencier certaines espèces mycobactériennes (Tsukamura et al., 1984) ;
- **les cires**, composées de mycosérosates comme les phénolglycolipides (PGL) et le phtiocéroidimycosérosate (PDIM) qui sont retrouvés exclusivement chez les mycobactéries du MTBC, *M. leprae*, *M. lepromatosis* et quelques MCL non-tuberculeuses (*M. kansasii*, *M. gastri*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. microti*, *Mycobacterium haemophilum*) (Daffe and Laneelle, 1988; Onwueme





et al., 2005). Si toutes les mycobactéries du MTBC ne produisent pas de PGL, toutes sont capables de produire et de sécréter des dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque (p-HBADs) présentant le même noyau aromatique glycosylé que les PGL ;

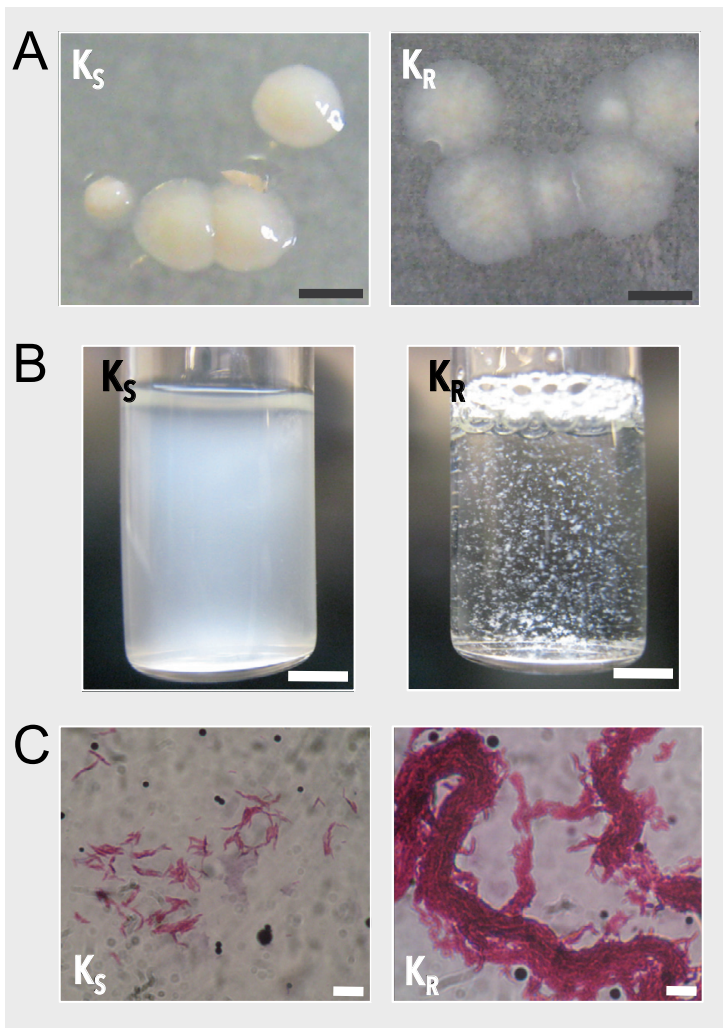
- **les dérivés glycosylés du phosphatidylinositol (PI) ou lipoglycannes** parmi les phospholipides majoritaires des mycobactéries, essentiels à la viabilité (Fukuda et al., 2013). Des PI dérivent les phosphatidylinositol mannosides (PIM), comportant entre un et six mannoses. Chez *M. tuberculosis*, les PIM les plus communs comportent deux (PIM<sub>2</sub>) et six mannoses (PIM<sub>6</sub>) (Khoo et al., 1995a). Des PIM sont également présents au niveau de la membrane plasmique. Le lipomannane (LM) correspond à des PIM auxquels a été ajouté un domaine mannane. L'ajout d'un domaine arabinane donne le lipoarabinomannane (LAM). Chez les espèces pathogènes, et particulièrement chez les MCL, le LAM se coiffe d'un domaine mannose, ce qui forme le manLAM (Chatterjee et al., 1992). Chez les MCR, le LAM peut comprendre une coiffe phosphoinositol donnant l'AraLAM (Khoo et al., 1995b).
- **les glycopeptidolipides** (GPL) retrouvés dans la majorité des MNT pathogènes opportunistes et non-pathogènes, MCL (espèces du MAC, *M. xenopi*...) et MCR (*M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*...). Les GPL sont les déterminants des sérotypes de nombreuses MNT, comme par exemple, les espèces du MAC (Kitada et al., 2002). Ils impactent la morphologie des colonies bactériennes, contribuent à la capacité des mycobactéries à former du biofilm et sont impliqués dans la mobilité bactérienne (Etienne et al., 2002).

La mycomembrane comprend également des protéines telles que des porines permettant le passage de molécules hydrophiles, des transporteurs Mce, des protéines impliquées dans la sécrétion de facteurs de virulence comme les protéines du T7SS ainsi que le complexe FbpABC (aussi connue sous le nom de complexe anti-

génique 85), impliqué dans le transfert et la transestérification des acides mycoliques (Belisle et al., 1997; Senaratne et al., 1998; Stahl et al., 2001). Ce complexe est également retrouvé en surface (dans l'OL) ou bien sécrété et possède des propriétés antigéniques (Wiker and Harboe, 1992; Horwitz et al., 1995; Wolfe et al., 2010).

Dans l'OL baignent le LM et ses dérivés (ancrés dans la mycomembrane) mais aussi des lipides extractibles, des phospholipides et une proportion importante de protéines, comparée aux autres entités de l'enveloppe (Daffé and Draper, 1998). Des molécules de triacylglycérol (TAG) sont également retrouvées dans l'OL de *M. smegmatis* et *Mycobacterium aurum*, ayant probablement une origine cytosolique (Chiaradia et al., 2017).

Les composés de la surface bactérienne constituent des motifs moléculaires (PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns) reconnus par les cellules du système immunitaire inné via des récepteurs PRRs (pattern recognition receptors) comme les récepteurs Toll-like (TLRs), Nod-like (NLRs) et les récepteurs lectine de type C (CLRs) tel que Dectin-1 et DC-SIGN (Tailleux et al., 2003; Ishikawa et al., 2017). Cette reconnaissance active des cascades de signalisation intracellulaires, culminant par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et de la protéine kinase MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) chez les cellules immunitaires innées (Basu et al., 2012; Killick et al., 2013). L'activation de ces cellules conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires dont le tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  et les interleukines (IL)-6, IL-1 $\beta$  et IL-12 et joue de ce fait un rôle important dans la pathogénicité des mycobactéries (Basu et al., 2012; Hossain and Norazmi, 2013). Par ailleurs, les dérivés glycosylés du PI peuvent s'insérer directement dans la membrane plasmique des lymphocytes T helper via leur ancre phosphatidyl-*myo*-inositol au niveau des rafts membranaires ou être reconnus par le récepteur CD1b (Ilangumaran et al., 1995; Sieling et al., 1995). Des modifications dans la composition et la structure des composés de la surface bactérienne impactent également la



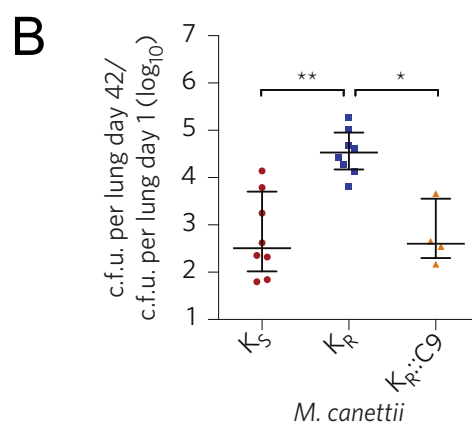
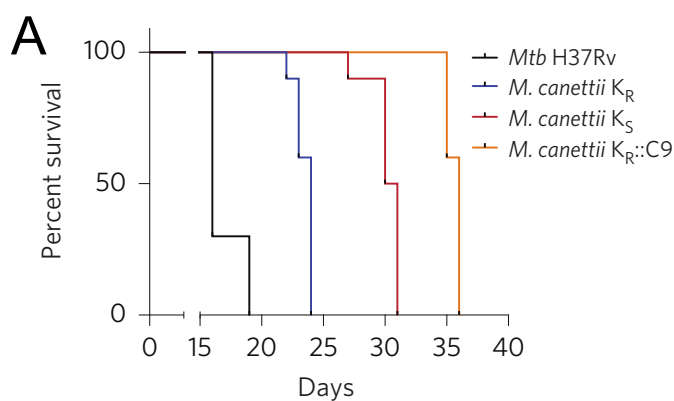
**Figure 11 | Caractérisation des souches STB K lisse ( $K_S$ ) et rugueuse ( $K_R$ ) de *M. canettii*.**

A : Morphologie des colonies sur gélose. Echelle : 2,5 mm.

B : Culture liquide en milieu 7H9, supplémenté avec de l'ADC (albumin-dextrose-catalase). La souche  $K_R$  forme des agrégats. Echelle : 5 mm.

C : Coloration de Ziehl-Neelsen. La souche  $K_R$  forme des cordes. Echelle : 10  $\mu$ m.

(Adapté de Boritsch *et al.*, 2016)



**Figure 12 | Différence de pathogénicité des souches STB K lisse ( $K_S$ ) et STB K rugueuse ( $K_R$ ).**

A : Survie des souris immunodéprimées (SCID, severe combined immunodeficiency) après infection avec  $10^6$  unités formant colonies injectées par voie intraveineuse.

B : Charge bactérienne 42 jours pots-infection dans les poumons de cochons d'Inde infectés avec  $2,5 \cdot 10^6$  unités formant colonies.

(Adapté de Boritsch *et al.*, 2016)

morphologie des mycobactéries et leur virulence *per se*.

## II. Enveloppe et interactions hôtes-pathogènes

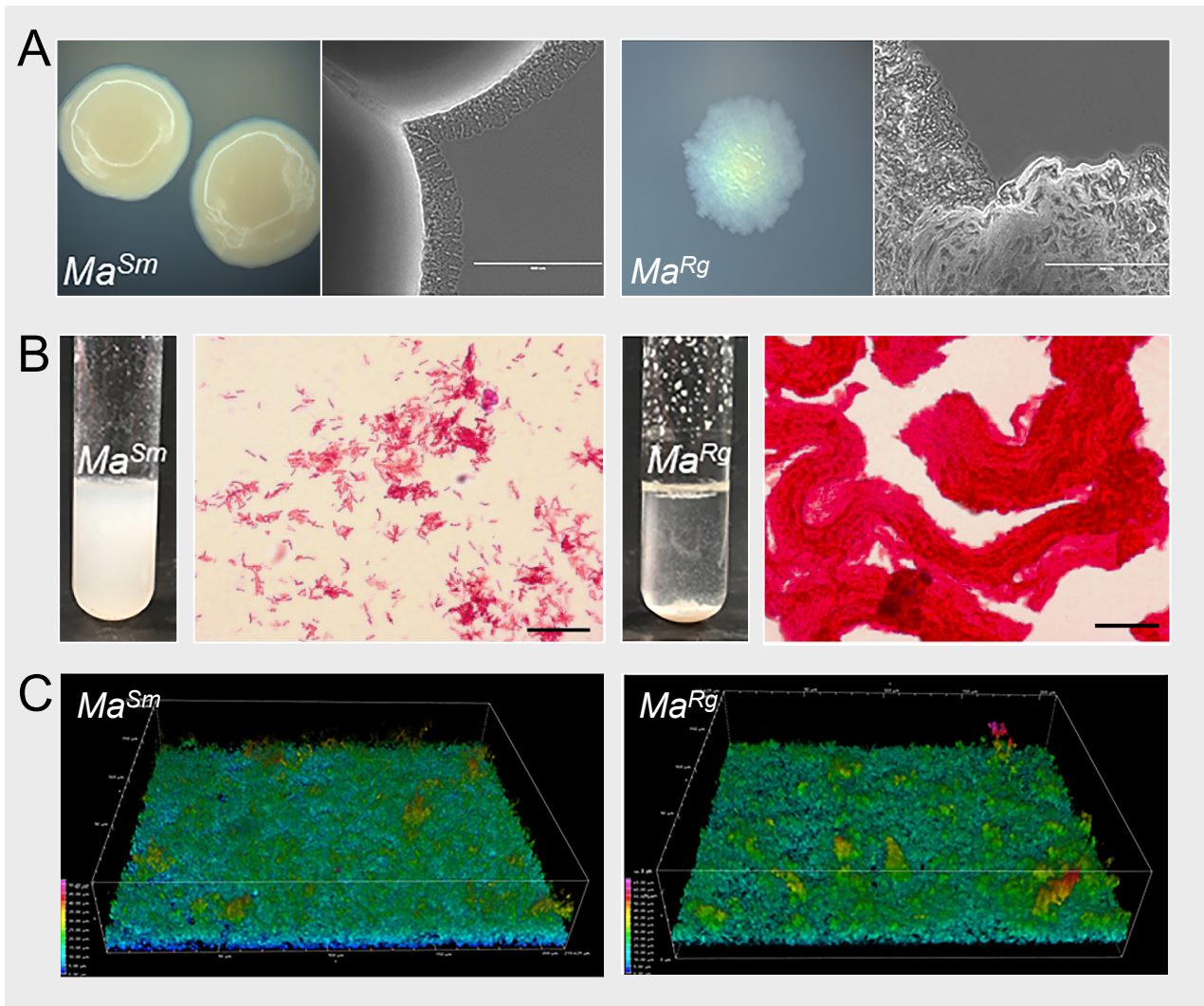
### 2.1 Virulence associée aux morphotypes et aux composés extractibles

Chez les mycobactéries, une hétérogénéité phénotypique peut être observée chez des souches d'une même espèce ou d'espèces différentes. On distingue le morphotype lisse (smooth, S) du morphotype rugueux (rough, R). Sur gélose, les colonies de morphotype S ont des contours réguliers et sont brillantes alors que les colonies de morphotype R ont des contours irréguliers et ont un aspect sec.

Des variants morphotypiques naturels S de l'espèce *M. canettii*, considérée comme une forme ancestrale des bacilles du MTBC de morphotype rugueux, ont été découverts, dénommés STB (Smooth Tubercle Bacillus) et qui infectent rarement l'homme, uniquement dans une région de l'Afrique, autour de Djibouti (Corne de l'Afrique) (Soolingen *et al.*, 1997; Koeck *et al.*, 2011; Blouin *et al.*, 2014). Le dimorphisme phénotypique entre les souches STB et les mycobactéries rugueuses du MTBC est lié à des mutations au sein du locus *pks5* et des recombinaisons géniques entre les gènes *pks5*, associées à la perte des LOS (Boritsch *et al.*, 2016). Le dimorphisme au sein même d'une souche STB K est observable sur milieu gélosé et en culture liquide (**Figure 11A-B**). Le variant R forme des agrégats qui dessinent des cordes révélées par la coloration de Ziehl-Neelsen (**Figure 11C**). Ces cordes mycobactériennes sont des réseaux bactériens tridimensionnels formés de long « cordons » compacts, constitués chacun de multiples chaînettes parallèles de bactéries organisées bout à bout. Cette capacité à former des cordes a été associée à la virulence de *M. tuberculosis* dans un modèle murin d'infection (Middlebrook *et al.*, 1947; Glickman *et al.*, 2000). Cela explique que le variant R de la souche STB K soit plus virulent que le variant S, et qu'il induise une réponse pro-inflammatoire plus intense (Boritsch *et al.*, 2016) (**Figure 12**).

La structure des acides mycoliques peut influencer sur la capacité de *M. tuberculosis* et *M. bovis* à former des cordes. Chez *M. tuberculosis*, la modification de la chaîne de méromycolates des acides mycoliques par ajout d'un cyclopropane est nécessaire pour induire des formes d'infection à *M. tuberculosis* chroniques et létales induisant des dommages pulmonaires sévères et notamment l'induction de granulomes pulmonaires dans un modèle murin d'infection après une injection par intraveineuse (Rao *et al.*, 2005). Cette modification est impliquée dans la modulation directe de la réponse immune des macrophages en contrôlant la production du TNF- $\alpha$ . D'autres études, chez *M. tuberculosis*, ont révélé le rôle de certains acides mycoliques dans la modulation de la différenciation cellulaire en induisant par exemple la formation de cellules riches en lipides (les macrophages spumeux) chez lesquelles le bacille peut survivre et acquérir un état de dormance, état également observé chez les individus infectés (Korf *et al.*, 2005; Peyron *et al.*, 2008). Les acides mycoliques jouent également un rôle important dans le cadre d'une infection par leur implication dans la formation de biofilms (Ojha *et al.*, 2005). Comme décrit chez *M. tuberculosis*, la capacité à former du biofilm peut contribuer à la pathogénicité des bactéries, la production de biofilm étant un mécanisme universel de défense pour faciliter la survie microbienne dans des conditions de croissance défavorables, permettant de persister dans l'hôte et d'entraîner des infections chroniques (Phillips and Schultz, 2012; Kumar *et al.*, 2017; Brennan, 2017).

Néanmoins, les changements morphologiques n'expliquent pas à eux seuls le potentiel pathogène inné de certaines souches particulièrement virulentes. Par exemple, la morbidité associée à la souche CDC 1551 de *M. tuberculosis* n'est pas due à des changements morphologiques, ni à une virulence augmentée de la mycobactérie, mais à la réponse immune de l'hôte (Manca *et al.*, 1999; Bishai *et al.*, 1999). Cette modulation de la réponse immunitaire est associée à des lipides extractibles, suggérant que d'autres molécules de la mycomembrane n'impactant pas la morphologie de la bactérie



**Figure 13 | Caractérisation des variants lisses ( $Ma^{Sm}$ ) et rugueux ( $Ma^{Rg}$ ) de la souche type de *M. abscessus*.**

A : Colonies sur gélose 7H10. A faible grossissement des cordes sont visibles à la périphérie des colonies.

B : Culture liquide en milieu 7H9 et coloration de Ziehl-Neelsen. Le variant R forme des agrégats en culture. La coloration de Ziehl-Neelsen met en évidence la présence de corde dans la culture du variant R à fort grossissement (Echelle : 20  $\mu$ m).

C : Reconstitution 3D à partir d'images de microscopie confocale du biofilm formé par les variants S et R après 48h de culture.

(Adapté de Clary *et al.*, 2018 (A, B : culture liquide, C) et Sánchez-Chardi *et al.*, 2012 (B : coloration de Ziehl-Neelsen))

jouent également un rôle clef dans le devenir infectieux. Par ailleurs, il a été montré que *M. tuberculosis* parvient à échapper à l'action de macrophages bactéricides via le PDIM, en masquant des motifs moléculaires de surface constituant des PAMPs. D'autres lipides complexes, les PGL, augmentent le pouvoir infectieux de *M. tuberculosis*, en augmentant ses chances d'atteindre une niche favorable à sa survie et à sa multiplication. De plus, les PGL et les dérivés des acides p-HDABs inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , qui joue un rôle clef dans la réponse inflammatoire de l'hôte visant à éliminer les mycobactéries (Reed *et al.*, 2004). Des monocytes humains stimulés avec un extrait comprenant des PGL de *M. tuberculosis* induisent préférentiellement des cytokines désactivant les phagocytes (Manca *et al.*, 2004). Un mutant du PDIM induit également une sécrétion plus importante de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 comparée à la souche sauvage (Rousseau *et al.*, 2004). De la même façon, le ManLam exerce une activité anti-inflammatoire sur les cellules dendritiques en inhibant la production de l'interleukine pro-inflammatoire IL-12 et du TNF- $\alpha$  et en augmentant la production de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10 (Nigou *et al.*, 2001; Nigou *et al.*, 2002; Geijtenbeek *et al.*, 2003).

Dans les cellules, *M. tuberculosis* est retrouvée dans des endosomes précoces (non-acidifiés) ou bien dans des lysosomes (acidifiés), une portion des bactéries pouvant éventuellement rompre le phago(lyso)some et résider dans le cytosol (Cosma *et al.*, 2003; Wel *et al.*, 2007; Simeone *et al.*, 2012). En 1985, Silva et collaborateurs montrèrent la contribution des TDM à la virulence : *M. bovis* dépourvue de TDM était significativement moins virulente que la souche sauvage après infection de souris (Silva *et al.*, 1985). Plus récemment, des études ont suggéré la contribution de ces lipides à l'arrêt de la maturation phagosomale induit par *M. tuberculosis* (Spargo *et al.*, 1991; Indrigo *et al.*, 2002). Le ManLAM participe également à ce phénotype (Fratti *et al.*, 2001; Fratti *et al.*, 2003). Enfin, il a été démontré que le PDIM est également impliqué dans le contrôle de la

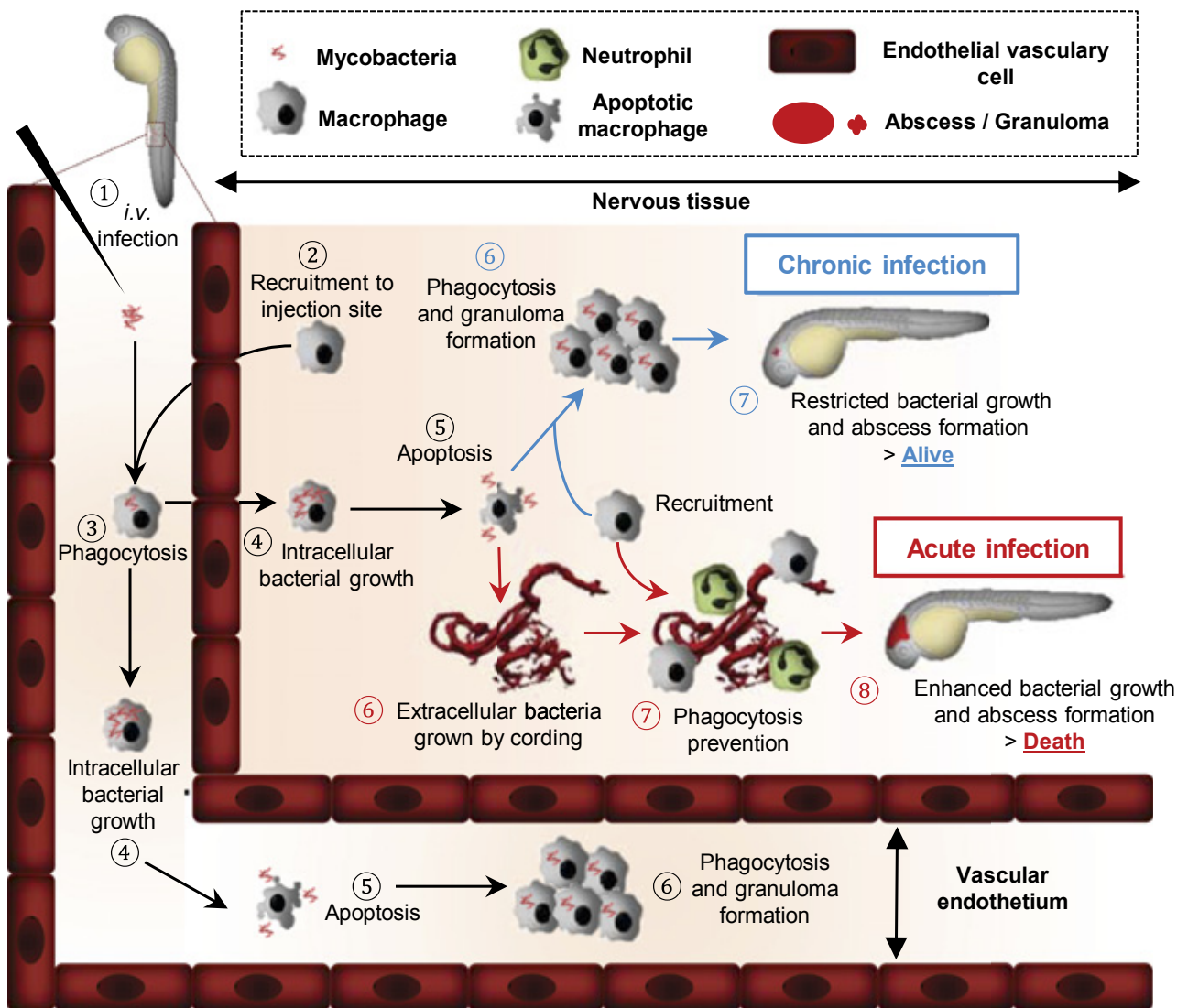
maturation phagosomale et dans la capacité de la mycobactérie à s'échapper du phagosome (Pethe *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005; Quigley *et al.*, 2017).

L'inhibition de la présentation d'antigènes par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH-II) via l'activation des récepteurs TLR-2 des macrophages contribue également à la survie de *M. tuberculosis* chez son hôte. Parmi les ligands de TLR-2 impliqués dans ce processus figurent les lipoglycanes comme le PIM et le LM. D'autres lipides de surface participent à la virulence de *M. tuberculosis* comme le SL ou bien les DAT et PAT et limitent la réponse immunopathologique de l'hôte (Pabst *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1991; Camacho *et al.*, 1999; Saavedra *et al.*, 2001; Converse *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2003).

Finalement, les lipides de l'enveloppe modulent l'apoptose des cellules ainsi que l'autophagie, des processus de défense contre les microbes intracellulaires dont *M. tuberculosis* (Nigou *et al.*, 2002; Dao *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2004; Zullo and Lee, 2012).

Chez *M. abscessus*, un mécanisme d'échappement à la phagocytose et de modulation de la réponse immune a été décrit, impliquant notamment les GPL et les TPP, des lipides propres aux MNT et pouvant influencer sur leur morphotype. L'expression des GPL détermine le morphotype (Howard *et al.*, 2006; Pawlik *et al.*, 2013). Ainsi, la présence de GPL en surface est associée à un morphotype S de *M. abscessus*, alors qu'un défaut de synthèse de ces lipides est associé à l'apparition d'un morphotype R, agrégatif (**Figure 13**). Contrairement au variant S, le variant R forme des « cordes » sur milieu solide ou liquide *in vitro* mais aussi *in vivo* dans le modèle d'infection du poisson zèbre (Sánchez-Chardi *et al.*, 2011; Bernut *et al.*, 2014; Clary *et al.*, 2018) (**Figure 13A-B**). Cette capacité des variants R de *M. abscessus* à produire des cordes est conférée par les TPP de type A (Collin *et al.*, 2017). Les deux variants S et R forment du biofilm et cela les protège de stress oxydatifs et alcalins (Clary *et al.*, 2018).

Chez l'homme, une transition d'un morphotype S à un morphotype R est observée chez



**Figure 14 | Modélisation de la physiopathologie des infections à *M. abscessus* chez le poisson zèbre.**

Après injection par voie sanguine (1), *M. abscessus* est rapidement engloutie par des macrophages attirés par chimiotactisme vers le site d'injection (2 et 3). Les macrophages infectés migrent du système vasculaire vers les tissus nerveux, deviennent fortement infectés (4) et finissent par mourir (5). L'apoptose des macrophages conduit à la libération de variants lisses S (voie bleue) qui sont ensuite phagocytés par les macrophages nouvellement recrutés pour former des agrégats cellulaires (6). La multiplication bactérienne est contrôlée et une infection chronique est établie. Concernant le variant R de *M. abscessus* (voie rouge), l'apoptose des macrophages est corrélée à l'apparition de cordes en extracellulaire (6), empêchant la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles (7), *M. abscessus* continue à produire des cordes et un abcès se forme, associé à une destruction tissulaire et à la mort des embryons de poisson (8).

(Adapté de Bernut *et al.*, 2014)

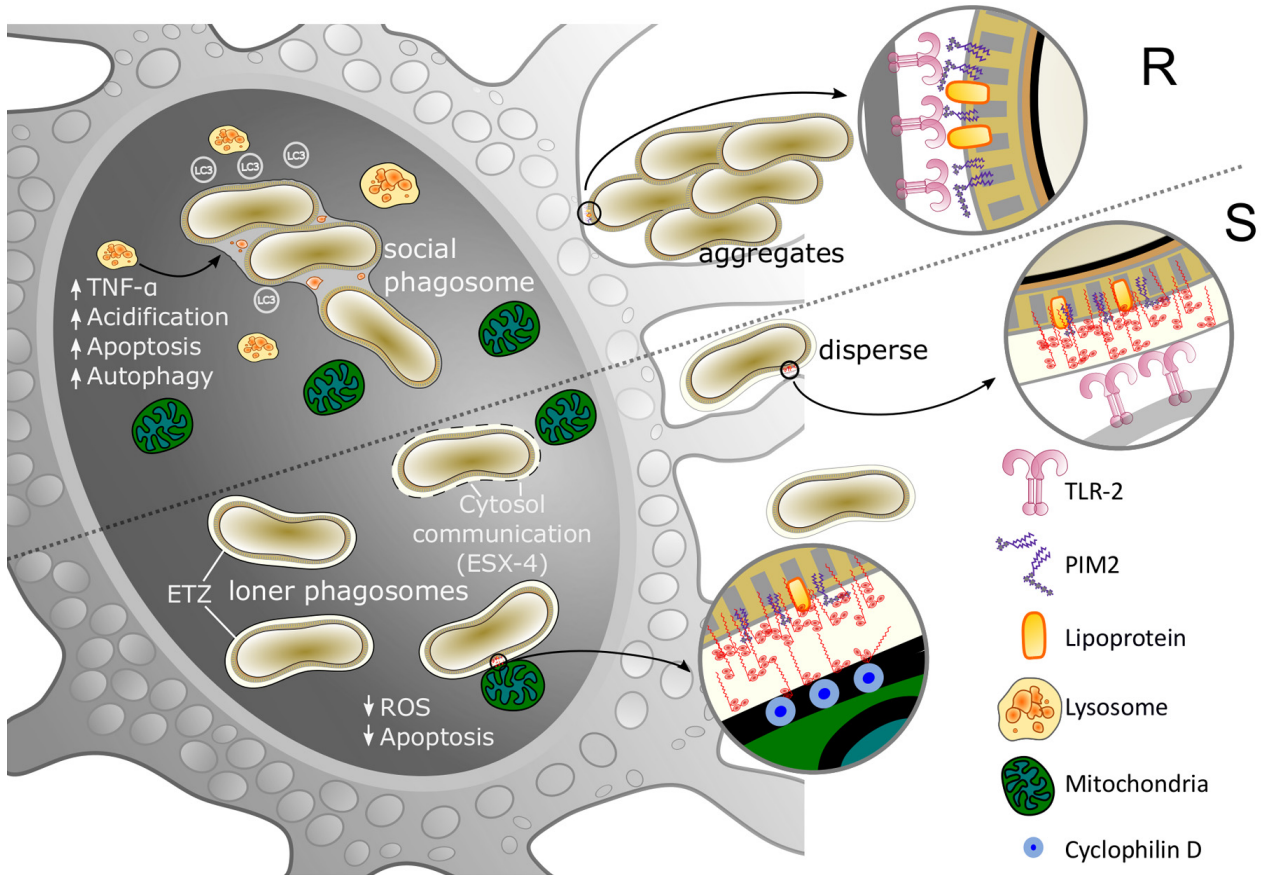
les patients atteints d'infections pulmonaires à *M. abscessus*. Chez les patients CF, les formes R apparaissent fréquemment suite à l'affaiblissement des défenses immunitaires dues à la transplantation et au traitement immunosuppresseur ou au choc septique (Sanguinetti *et al.*, 2001; Chalermkulrat *et al.*, 2006; Taylor and Palmer, 2006; Catherinot *et al.*, 2009). Cette transition est observée dans un modèle murin d'infection, où le morphotype R de *M. abscessus* est impliqué dans la persistance et la virulence de la mycobactérie et est associé au développement de lésions caséuses (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007). Récemment, un modèle de la physiopathologie des infections à *M. abscessus* a pu être établi chez le poisson zèbre (Bernut *et al.*, 2014) (**Figure 14**). Dans ce modèle, le variant S est capturé par les macrophages. La mort éventuelle des macrophages infectés s'accompagne d'un relargage des bacilles qui sont à nouveau phagocytés. La multiplication du variant S est contrôlée et une infection chronique se met en place. Par contre, lorsque les macrophages sont infectés par le variant R, l'apoptose des cellules est corrélée avec l'apparition de cordes bactériennes dans le milieu extracellulaire, empêchant la phagocytose du variant R par les macrophages et les neutrophiles recrutés au site de l'infection; ce qui conduit *in fine* à la formation d'abcès, à la nécrose et à la mort des poissons.

Les infections par le variant R sont associées à une réponse pro-inflammatoire particulièrement intense dépendante de la voie de signalisation TLR-2 et se manifestant notamment par une production accrue de TNF- $\alpha$  par les macrophages (Catherinot *et al.*, 2007; Rhoades *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2011). Ce médiateur est essentiel pour le contrôle de l'infection à *M. abscessus*, l'infection à *M. abscessus* étant létale chez les souris et le poisson zèbre ne produisant pas de TNF- $\alpha$  (Rottman *et al.*, 2007; Bernut *et al.*, 2016a). Ceci explique l'hypermensibilité aux infections à *M. abscessus* des individus sous traitement immunomodulateur, comme les anti-TNF. Le contrôle des infections à *M. abscessus* dépend également de l'interféron (IFN)- $\gamma$  et de l'IL-8 dont la production par les

macrophages stimulera le recrutement d'autres macrophages et de neutrophiles (Rottman *et al.*, 2007; Bernut *et al.*, 2016a). La phagocytose de *M. abscessus* et l'activation des phagocytes se traduit par la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les macrophages, liées à l'activation des kinases ERK1/2 et à la coopération entre les récepteurs Dectine-1 et TLR-2 (Shin *et al.*, 2008). L'absence des GPL chez le variant R permettrait de démasquer un ou plusieurs composants pro-inflammatoires, localisés à la surface du bacille et qui induiraient cette réponse inflammatoire. Par une approche de décapage à l'isopropanol du variant S afin de le rendre R, Rhoades et coll. ont individualisé PIM<sub>2</sub> comme le ligand du TLR-2 masqué par les GPL, et activant la réponse pro-inflammatoire (Rhoades *et al.*, 2009). Néanmoins, la réponse inflammatoire et la virulence du variant R obtenu par décapage restait très inférieures à celles du variant R sauvage, indiquant la présence potentielle d'autres composés pro-inflammatoires impliqués dans la réponse cellulaire liée au variant R. La comparaison des extraits pariétaux, après extraction eau/méthanol/chloroforme du variant R et du variant S, a permis la mise en évidence d'un composé nommé interphase, et présent en plus grande quantité chez le variant R. Ce composé, à lui seul, joue un rôle dans la réponse pro-inflammatoire accrue du variant R (Roux *et al.*, 2011). Dans l'interphase, la présence de lipoprotéines ainsi exposées à la surface du bacille favorise l'induction d'une réponse pro-inflammatoire intense, TLR-2 dépendante (Roux *et al.*, 2011). Le variant R surexprime également certains gènes, comme *lpd* et *nrd*, impliqués respectivement dans la résistance aux stress oxydatifs et nitrosatifs et dans la réparation des dommages de l'ADN (Pawlik *et al.*, 2013).

Chez le variant S, la production de GPL contribuerait à l'échappement de la phagocytose et, en masquant des PAMPs, les GPL retarderaient la réponse immune de l'hôte dans les premiers stades de l'infection, ce qui faciliteraient la colonisation des cellules-hôtes en prévenant la signalisation médiée par le TLR-2 chez les cellules épithéliales respiratoires (Etienne *et al.*, 2002; Villeneuve *et al.*, 2003; Davidson et





**Figure 15 | Modulation de la virulence des variants S et R de *M. abscessus* par les GPL et interactions avec les macrophages des variants.**

Les variants R, phagocytés sous la forme d'agrégats, sont présents dans des phagosomes contenant plusieurs bactéries (« social phagosome »). L'absence de GPL chez le variant R de *M. abscessus* révèle des agonistes de TLR-2 immunostimulants, tels que PIM<sub>2</sub> et des lipoprotéines, conduisant à une réponse pro-inflammatoire exacerbée qui contribue aux infections aiguës et sévères. Les variants S, moins agrégatifs, sont phagocytés un à un et retrouvés au sein de phagosomomes ne contenant qu'une bactérie (« loner phagosome »). Chez le variant S, la couverture de GPL contribue à l'inhibition de la réponse apoptotique des macrophages par ciblage mitochondrial et interaction avec la cyclophiline D, et à la réduction de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cela limite la propagation de *M. abscessus* tandis que l'absence d'acidification du compartiment phagosomal et la capacité du variant S a établir des connexions cytosoliques avec l'hôte favoriseraient sa survie intracellulaire.

(Adapté de Gutiérrez *et al*, 2018)

*al.*, 2011). Il semblerait que les GPL confèrent également un avantage à la survie intracellulaire du variant S de *M. abscessus* qui résiste aux mécanismes antibactériens des phagocytes de l'immunité innée en bloquant la maturation phagosomale et en résistant à l'apoptose et à l'autophagie (Roux *et al.*, 2016). En effet, le pH intraphagosomal de *M. abscessus* chez les macrophages et les cellules dendritiques est non-acide et similaire au pH intraphagosomal de *M. tuberculosis* (Clemens and Horwitz, 1995; Roux *et al.*, 2016). Récemment, Halloum *et coll.* ont montré que le gène *MAB\_4780*, codant une déshydratase impliquée dans le métabolisme des acides mycoliques, est impliqué dans l'inhibition de la fusion phagolysosomale (Halloum *et al.*, 2016). Les mycobactéries semblent prévenir la maturation du phagosome par une interaction étroite avec les constituants de la membrane phagosomale (Chastellier and Thilo, 1997; Pietersen *et al.*, 2004). Contrairement au variant R, qui est phagocyté sous forme d'agrégats dans un modèle *in vitro* de macrophages humains, les macrophages phagocytent le variant S de façon individuelle (Roux *et al.*, 2016). Dans le phagosome, le variant S présente une zone translucide aux électrons (ETZ, electron transparent zone) épaisse, apposée à la membrane du phagosome, tandis que le variant R est retrouvé au sein d'un phagosome avec une membrane phagosomale fine (Roux *et al.*, 2016). Au cours d'un événement de fusion phagosome-lysosome, l'ETZ protège efficacement les bactéries contre les mécanismes microbicides de l'hôte (Frehel *et al.*, 1986; Rastogi and David, 1988). Chez les mycobactéries non-pathogènes, la fréquence d'observation de l'ETZ diminue au cours de l'infection tandis que chez *M. tuberculosis*, la fréquence d'observation de l'ETZ est faible mais constante. Chez *M. abscessus*, la présence de l'ETZ dépend des GPL, un mutant déficient pour l'export des GPL devenu R, est retrouvé dans un phagosome avec une membrane phagosomale fine (Roux *et al.*, 2016). Ainsi les GPL favorisent la survie du variant S à l'intérieur du compartiment phagosomal. De façon notable, les infections aux variants S (et non celles au variant R) sont associées avec des lésions de la

membrane phagosomale, suggérant que comme les MCL pathogènes, *M. abscessus* S est capable d'établir des communications entre le phagosome et le cytosol de la cellule (Roux *et al.*, 2016; Laencina *et al.*, 2018). Toutefois, comparativement à *M. tuberculosis*, la contribution des lipides de *M. abscessus* à ce phénotype de dommage de la membrane phagosomale n'a pas encore été décrite (Quigley *et al.*, 2017). Enfin, le variant S inhibe probablement l'apoptose des cellules en inhibant la production de ROS, le relargage du cytochrome C et en préservant le potentiel de membrane des mitochondries en interagissant avec la cyclophiline D (Roux *et al.*, 2016; Whang *et al.*, 2017). Un rôle du variant S dans l'inhibition de l'autophagie des cellules infectées a également été rapporté (Roux *et al.*, 2016).

La **Figure 15** résume le modèle intracellulaire des infections aux variants S et R de *M. abscessus*.

## 2.2 Virulence associée aux systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétions jouent un rôle clef dans les interactions hôtes-pathogènes en assurant l'export de protéines impliquées dans la pathogénicité bactérienne. Deux clusters de gènes considérés comme des acteurs de la pathogénicité chez les mycobactéries codent des protéines sécrétées dans l'environnement via des voies générales et spécifiques.

Des voies générales de sécrétion, essentielles à la physiologie de la bactérie, la voie Sec (secretion) et la voie Tat (twin-arginine translocation), sont présentes chez les mycobactéries et correspondent au système de sécrétion de type 2 (T2SS) des bactéries Gram-. Un système Sec supplémentaire, SecA2, est également présent et est propre aux mycobactéries (Braunstein *et al.*, 2001).

La voie Sec prend en charge des pré-protéines caractérisées par la présence d'un peptide signal en région N-terminale. La voie Sec correspond à un complexe protéique hétérotrimérique composé des protéines SecY, SecE et SecG (Brundage *et al.*, 1990). Le complexe SecYEG forme un canal dans la membrane



cytoplasmique à travers lequel les protéines synthétisées dans le cytoplasme sont transportées dans l'environnement extracytoplasmique. L'ATPase cytoplasmique SecA, associée à SecYEG, comprend la translocase. SecA cible les protéines vers le canal SecYEG et conduit ces protéines à travers le canal avec des cycles répétés de liaison à l'ATP et d'hydrolyse (Economou and Wickner, 1994). Parmi les protéines sécrétées par le système SecA1 figurent la porine MspA, principale porine participant au passage de molécules hydrophiles au travers de la membrane externe chez *M. smegmatis* (Stahl *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2007; Rigel *et al.*, 2009). Cette voie permet également la maturation des lipoprotéines après clivage de leur peptide signal, et acylation (Sander *et al.*, 2004). Elle contribue à la virulence des mycobactéries. Ainsi, chez *M. tuberculosis*, un mutant du gène *lspA* de la voie Sec, impliqué dans ce processus, est atténué *in vitro* (en macrophages) et *in vivo* (dans un modèle murin d'infection) (Sander *et al.*, 2004; Rampini *et al.*, 2008).

Le système SecA2 est impliqué plus spécifiquement dans le transport de protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles (PTM, post-translational modifications) et jouerait un rôle dans le contrôle de la réponse inflammatoire en limitant la production de cytokines pro-inflammatoires (Kurtz *et al.*, 2006; Hinchey *et al.*, 2007). Parmi les autres substrats du système SecA2 figurent les gènes *pknG* et *sapM*, participant tous deux, et de façon non-redondante, à l'arrêt de la maturation phagosomale et autophagosomale (Zulauf *et al.*, 2018). Par ailleurs, le système SecA2 participerait, dans une moindre mesure, à des processus de détoxification via la sécrétion d'antioxydants tels que la superoxyde dismutase SodA et la catalase KatG, catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en dioxygène et en eau (Braunstein *et al.*, 2003; Kurtz *et al.*, 2006). Les β-lactamases, des protéines pouvant cliver les peptides antimicrobiens et impliquées dans la résistance de *M. abscessus* à une large classe d'antibiotiques, sont aussi transportées par le système SecA2 (McDonough *et al.*, 2005). Le

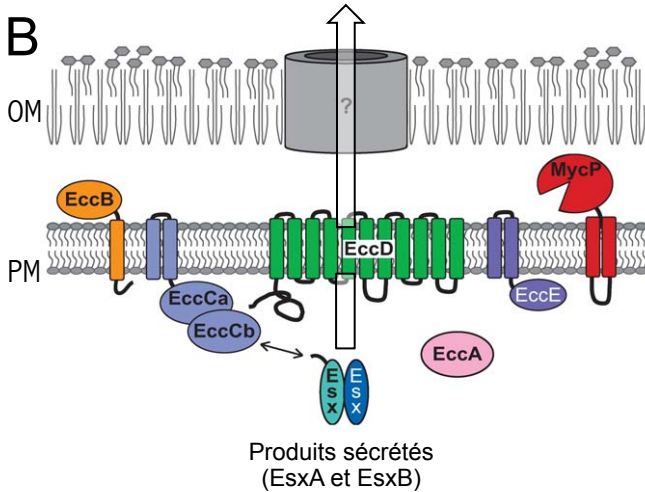
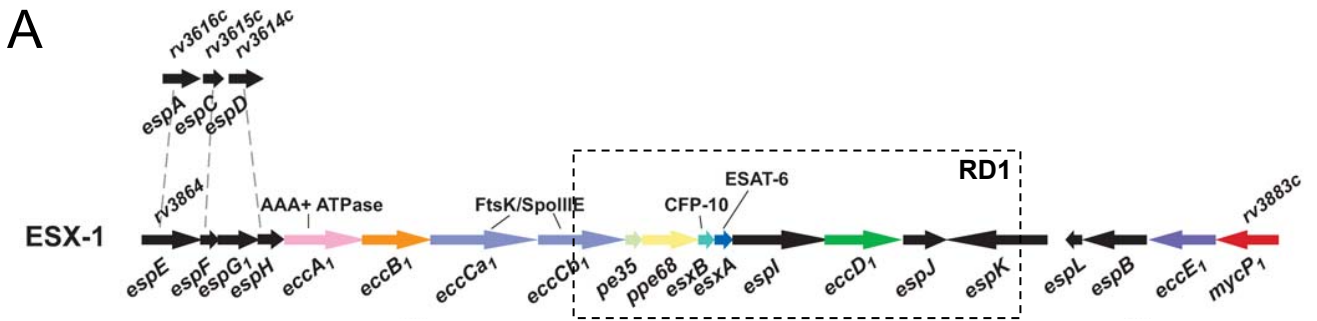
tout fait de ce système une cible thérapeutique privilégiée (Feltcher *et al.*, 2010).

Enfin la voie Tat, contrairement à la voie Sec, ne prend en charge que des protéines d'ores-et-déjà repliées dans le cytoplasme. La voie Tat comprend deux composants principaux : les protéines membranaires intégrales TatA et TatC. Une troisième protéine, TatB, est similaire à TatA dans sa séquence d'acides aminés, mais toutes les bactéries ne possèdent pas d'orthologue de TatB. Les protéines prises en charge par la voie Tat possèdent un peptide signal avec une paire de résidus arginine. Une préprotéine présentant un signal Tat est reconnue par le complexe TatBC dans la membrane cytoplasmique. Avec l'énergie fournie par la force motrice des protons, TatA est ensuite recrutée dans le complexe TatBC pour former un canal homooligomérique permettant la translocation de la protéine (Lee *et al.*, 2006). Une protéine reconnue par le système Tat et jouant un rôle dans la virulence de *M. tuberculosis* est la protéine Rv2525c, impliquée dans l'hydrolyse du peptidoglycane. Cette protéine est également impliquée dans la résistance de *M. tuberculosis* aux β-lactamines. Chez *M. tuberculosis*, 4 gènes codent une PLC pouvant être exportée par cette voie, mais qui ne sont pas impliqués dans la virulence du bacille (Le Chevalier *et al.*, 2015).

Chez *M. abscessus* la contribution de la voie Sec et du système spécialisé SecA2 à la physiologie et à la virulence de la bactérie n'a pas été étudiée à ce jour. Parmi les substrats de la voie Tat figure la PLC, qui, nous l'avons évoquée, contribue à la survie de *M. abscessus* dans un modèle murin d'infection après passage en amibes (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). Une recherche de substrats putatifs de la voie Tat chez la souche type de *M. abscessus* montre que 33 protéines peuvent être potentiellement transportées par ce système<sup>2</sup>.

Un autre système de sécrétion mycobactérien, absent des bactéries Gram- et propre aux actinobactéries à haut %G+C, est le T7SS. Ce système est codé par les loci ESX, au nombre de 5 chez *M. tuberculosis* (ESX-1-ESX-5). Le locus 1

<sup>2</sup> <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR006311/proteins-matched?taxonomy=561007>



**Figure 16 | Organisation génétique du locus ESX-1 de *M. tuberculosis* et modèle du système de sécrétion de type VII (T7SS) correspondant.**

A : Locus ESX-1 de *M. tuberculosis*. La région de différenciation 1 (RD1) est absente chez la souche atténuée BCG de *M. bovis*.

B : Modèle du T7SS et des substrats Esx sécrétés. Les protéines transmembranaires EccB, EccC, EccD et EccE forment la structure centrale du T7SS au niveau de la membrane plasmique.

PM : membrane plasmique. OM : membrane externe.

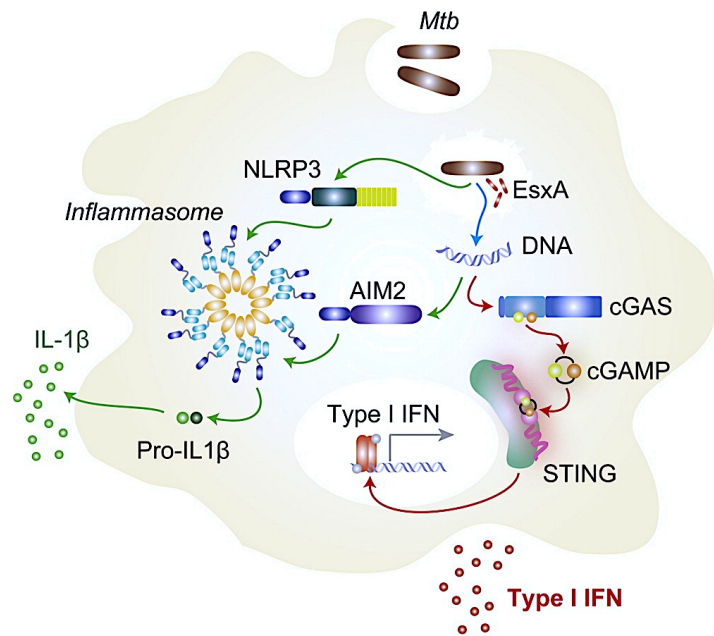
(Adapté de Bitter *et al.*, 2009)

**Figure 17 | Activation des voies de surveillance cytosolique par le système ESX-1 et conséquences.**

Au cours de l'infection des macrophages par *M. tuberculosis* (Mtb), l'activation des voies de surveillance cytosoliques dépend du système ESX-1 et conduit à la production d'interféron de type I (type I IFN) et de production d'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

AIM2 : interferon inducible protein (absent in melanoma 2). cGAMP : cyclic GMP-AMP. cGAS : cytosolic DNA sensor nucleotidyltransferase cyclic GMP-AMP synthase. NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3. STING : stimulator of interferon genes.

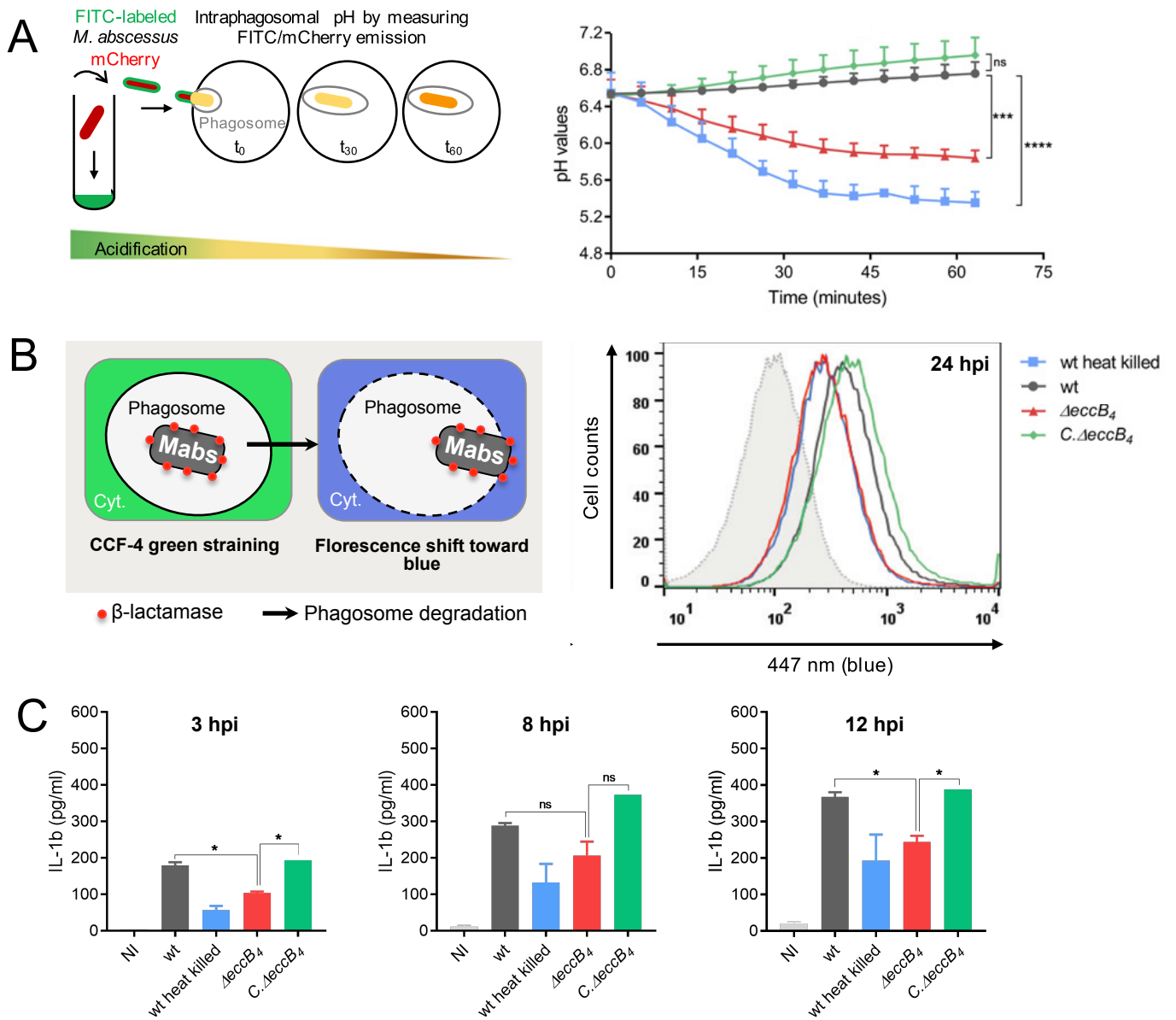
(Adapté de Wassermann *et al.*, 2015)



(ESX-1), qui comprend le gène codant l'antigène ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa) ou ESXA, a été le premier système de sécrétion bactérien de type VII à être découvert. Il est essentiel à la virulence des espèces du MTBC (Wards *et al.*, 2000; MacGurn and Cox, 2007). Il comprend des protéines transmembranaires codées par des gènes dénommés ecc (ESX conserved component) et qui forment le corps du système ESX au niveau de la membrane plasmique (**Figure 16**). Des souches atténuées de *M. bovis* utilisées comme vaccin contre la tuberculose (BCG, Bacille de Calmette et Guérin) ne possèdent pas de système ESX-1 fonctionnel (Mahairas *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 1999; Behr *et al.*, 1999) (**Figure 16A**). Cette observation a été la première à suggérer un rôle du système ESX-1 dans la virulence des souches pathogènes du MTBC. Une souche virulente de *M. tuberculosis* mutée pour RD1 (région de différenciation 1) est particulièrement atténuée dans des modèles cellulaires et animaux tandis que l'ajout de cette région chez *M. bovis* BCG augmente la virulence du bacille, mesurée en termes de persistance et de croissance chez la souris. La virulence associée à la région RD1 est due à la sécrétion des protéines ESAT-6 et CFP-10 (culture filtrate protein of 10 kDa) ou ESXB, toutes deux codées par cette région (Lewis *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003). La protéine ESAT-6 est une petite protéine de 6 kDa possédant des propriétés antigéniques, exportée sous la forme d'un hétérodimère avec la protéine CFP-10 (Brodin *et al.*, 2005). Cet hétérodimère est reconnu par les lymphocytes T chez l'homme et l'animal et est à la base des tests de détection de la tuberculose latente chez l'homme (Ravn *et al.*, 1999; Herrmann, 2004; Aagaard *et al.*, 2010). L'expression ectopique chez des macrophages des protéines ESAT-6 et CFP-10 fusionnées diminue de façon drastique la formation d'autophagosomes (Lei Zhang *et al.*, 2012). De plus ESAT-6 et CFP-10 inhibent, seuls ou en complexe, la production de ROS induite par un PAMPs, le lipopolysaccharide (LPS), chez des macrophages murins (Ganguly *et al.*, 2008). Cela a pour conséquence une diminution de l'activité de fixation à l'ADN du NF- $\kappa$ B dépendante du LPS,

et donc la diminution de l'expression de gènes sous le contrôle de ce facteur de transcription, impliqué dans l'activation des cellules phagocytaires. ESAT-6 a par ailleurs une activité lytique envers les membranes lipidiques : elle participe à la perforation de la membrane phagosomale et favorise ainsi la libération de *M. tuberculosis* dans le cytosol (Gao *et al.*, 2004; Wel *et al.*, 2007). S'ensuit l'activation du système immunitaire inné par la reconnaissance des composés bactériens ou du bacille dans le cytosol, se manifestant par la sécrétion d'IFN de type I qui contribuent à la pathogénèse de *M. tuberculosis* et de cytokines protectrices comme l'IL-1 $\beta$ , ou encore la sécrétion d'IL-18 par les cellules T CD8<sup>+</sup> via l'activation de la caspase-1 par l'inflammasome (Manca *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 2007; Wong and Jacobs Jr, 2011; McNab *et al.*, 2015; Kupz *et al.*, 2016) (**Figure 17**). En addition de son rôle dans l'échappement de *M. tuberculosis* du phagosome, ESAT-6 induit également la mort des cellules infectées et favorise ainsi la propagation du bacille : ESAT-6 fonctionne de pair avec le PDIM dans ces processus, le PDIM étant requis pour une activité optimale de ESAT-6 (Augenstreich *et al.*, 2017). Enfin ESAT-6 permet le recrutement de macrophages en induisant une métalloprotéinase matricielle de l'hôte (MMP9) dans les cellules épithéliales entourant le granulome, ce qui est associé à une virulence accrue du pathogène (Volkman *et al.*, 2010; Aagaard *et al.*, 2011).

D'autres protéines codées par les gènes *esp* des loci ESX sont aussi des substrats de la voie ESX. Les protéines Esp et ESX ne possèdent pas de peptide signal Sec ou Tat et dépendent donc exclusivement des systèmes ESX pour leur sécrétion. De façon notable la sécrétion des unes semblent dépendre des autres et réciproquement tel que le couple ESXA/EspA (Fortune *et al.*, 2005). Chez *M. tuberculosis*, la délétion de l'opéron *espACD* conduit à une diminution conséquent de la charge bactérienne dans un modèle murin SCID (Severe Combined Immunodeficiency) probablement via le rôle de cet opéron dans la sécrétion des protéines ESX (Garces *et al.*, 2010). Parmi les gènes ecc impliqués dans le transport des protéines ESX et Esp, le



**Figure 18 | Phénotypes intracellulaires associés au gènes  $eccB_4$  du système ESX-4 de *M. abscessus*.**

A : Evaluation de l'acidification des phagosomes de macrophages infectés avec la bactérie marquée au FITC (fluorescein isothiocyanate, sensible au pH) et exprimant le plasmide mCherry. La fluorescence émise par le FITC et le plasmide mCherry sont mesurées et la mesure du pH est extrapolée à partir d'une courbe standard.

B : Evaluation de la rupture phagosomale induite par *M. abscessus* par la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Les macrophages infectés sont marqués avec le composé fluorescent CCF-4 (coumarin-cephalosporin-fluorescein-4) qui émet dans le vert. Lorsque la  $\beta$ -lactamase bactérienne a accès au cytosol, Le CCF-4 est clivé et émet dans le bleu suite au découplage des deux fluorochromes qui le constituent (fluoresceine et coumarine). Ce shift est observé en imagerie à cytométrie en flux.

C : Mesure de la sécrétion d'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) par les macrophages infectées.

(Adapté de Laencina *et al.*, 2018)

gène *eccA* code une ATPase fournissant probablement l'énergie requise au transport des substrats ESX (Stanley *et al.*, 2003; Brodin *et al.*, 2006). La sécrétion de ces protéines dépend aussi d'une protéine nommée MycP, codée par un locus distant. Cette sérine protéase réprime l'export des substrats de la voie ESX en clivant EspB (Ohol *et al.*, 2010). Le régulateur transcriptionnel EspR exerce quant à lui un contrôle positif sur l'opéron *espACD* lorsque non sécrété, et un rétrocontrôle négatif lorsque sécrété (Raghavan *et al.*, 2008).

Enfin, des protéines aux propriétés immunomodulatrices dépendent de la voie ESX telles que les protéines PE-PPE et PGRS (polymorphic GC-repetitive sequence), un sous-groupe de protéines PE possédant des séquences polymorphes avec un %GC élevé (Poulet and Cole, 1995). Ces protéines sont codées par les loci ESX et d'autres loci dispersés. Chez *M. marinum*, la sécrétion de protéines PGRS, telle que la protéine PE\_PGRS33, dépend du locus ESX-5 et notamment de la chaperonne EspG (Abdallah *et al.*, 2009; Cascioferro *et al.*, 2011; Daleke *et al.*, 2011). Chez *M. tuberculosis*, des mutants du gène *PE\_PGRS33*, qui participe à la fois à l'entrée du bacille dans les cellules et à sa survie intracellulaire en inhibant l'acidification du phagosome, sont atténués (Brennan *et al.*, 2001; Iantomasi *et al.*, 2012; Palucci *et al.*, 2016). De plus, EspG, en complexe avec EspH, inhibe la maturation phagosomale (Mehra *et al.*, 2013). L'étude de mutants du locus ESX-5 montre que celui-ci est impliqué dans l'export de protéines PPE, dans l'intégrité de la paroi cellulaire et dans la virulence de la mycobactérie (Bottai *et al.*, 2012).

Par ailleurs, le locus ESX-3, hautement conservé chez les mycobactéries, essentiel à la vie *in vitro* de *M. tuberculosis*, est impliqué dans l'homéostasie du fer et du zinc et participe à la virulence de *M. tuberculosis* par la sécrétion d'effecteurs participant ou non à la captation du fer (Siegrist *et al.*, 2009; Serafini *et al.*, 2013; Tufariello *et al.*, 2016). La captation du fer par ESX-3 est dépendante des protéines PE5-PPE4 et s'effectue via la sécrétion de mycobactines (MBT), des petites molécules insolubles dans

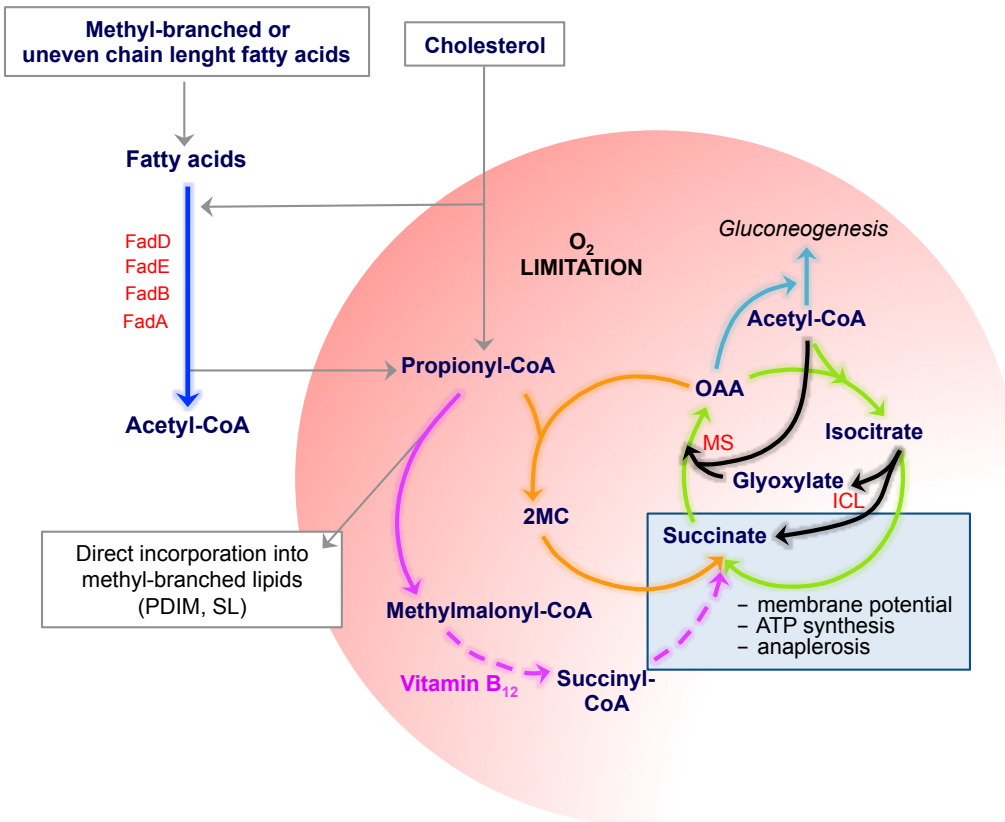
l'eau, capables de lier le fer avec une grande affinité et de libérer celui-ci dans la bactérie dans des conditions de carence en fer (Rodriguez, 2006).

Enfin, les loci ESX-2 et ESX-4 ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans la vie des espèces du MTBC *in vitro* et *in vivo* (Sasseti *et al.*, 2003; Målen *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2008; Felcher *et al.*, 2010).

Chez *M. abscessus*, deux loci ESX, ESX-3 et ESX-4, sont présents. Plusieurs gènes du locus ESX-4 de *M. abscessus* sont requis pour sa survie intracellulaire, notamment le gène *eccB<sub>4</sub>* (Laencina *et al.*, 2018). Par un double marquage avec des fluorochromes sensibles ou non au pH, il apparaît que l'infection de macrophages par le mutant *eccB<sub>4</sub>* est associée à une acidification du pH phagosomal au cours du temps, contrairement à l'infection par la souche sauvage (Pethe *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2016; Laencina *et al.*, 2018) (**Figure 18A**). Par ailleurs, nous avons évoqué l'aptitude de *M. abscessus* à établir des connexions cytosoliques avec l'hôte, suggérée par des expériences de microscopie électronique à transmission (Roux *et al.*, 2016). Parmi les techniques permettant d'estimer la rupture phagosomale induite par les pathogènes bactériens, figure une technique de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer). Cette technique repose sur le clivage d'un composé fluorescent exclusivement cytosolique (CCF-4, Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein-4) par la  $\beta$ -lactamase bactérienne et permet de détecter rapidement, par cytométrie en flux, et de manière fiable par un second marquage mesurant l'intégrité des cellules, le contact cytosolique établi par les bactéries au sein des cellules. Cette technique a été appliquée avec succès à des macrophages humains THP-1 infectés avec *M. tuberculosis* (Simeone *et al.*, 2012; Simeone *et al.*, 2015). En employant cette technique, nous avons pu montrer l'aptitude de *M. abscessus* à établir des contacts phagosome-cytosol au sein des cellules, dépendant du gène *eccB<sub>4</sub>* (Laencina *et al.*, 2018) (**Figure 18B**). Un marquage de la galectine-3, également utilisé auparavant pour mesurer les dommages induits au phagosome par *M. tuber-*



## LIPID RICH/CARBOHYDRATES POOR ENVIRONMENT



**Figure 19 | Principales adaptations métaboliques de *M. tuberculosis* à la vie intracellulaire.**

*In vivo*, *M. tuberculosis* dépend du catabolisme des lipides de l'hôte (acide gras, cholestérol). La  $\beta$ -oxydation des acides gras (en bleu), sous l'action de différentes Fad, et le catabolisme du cholestérol génèrent notamment du propionyl-CoA, particulièrement toxique pour la bactérie. La bactérie a développé trois stratégies différentes pour détoxifier le propionyl-CoA : (1) celui-ci peut entrer dans le cycle du méthylcitrate (en orange) ou dans (2) la voie du méthylmalonyl (en mauve) pour être *in fine* transformé en succinate ou bien (3) être directement incorporé dans des lipides méthyl-branchés comme le PDIM et le SL. Un autre produit issu de la  $\beta$ -oxydation des acides gras est l'acétyl-CoA, qui alimente le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) (en vert). L'alimentation de ce cycle permet à la bactérie de survivre dans des conditions d'hypoxie et de déplétion en nutriments via l'action de l'enzyme ICL, participant à l'accumulation de succinate, impliqué dans le maintien du potentiel membranaire, la synthèse d'ATP et l'anaplerose. Toutefois l'activité d'ICL induit également la production de glyoxylate, toxique pour la bactérie. Ce produit sera métabolisé par la malate synthase (MS) de la voie du shunt du glyoxylate (en noir) afin d'assurer la survie et la persistance du bacille. Enfin une partie des lipides est convertie en glucose par gluconéogenèse (en turquoise).

OAA : oxaloacétate. 2MC : isométhylcitrate.

(Adapté de Russell *et al.*, 2010 et Eoh and Rhee, 2014)

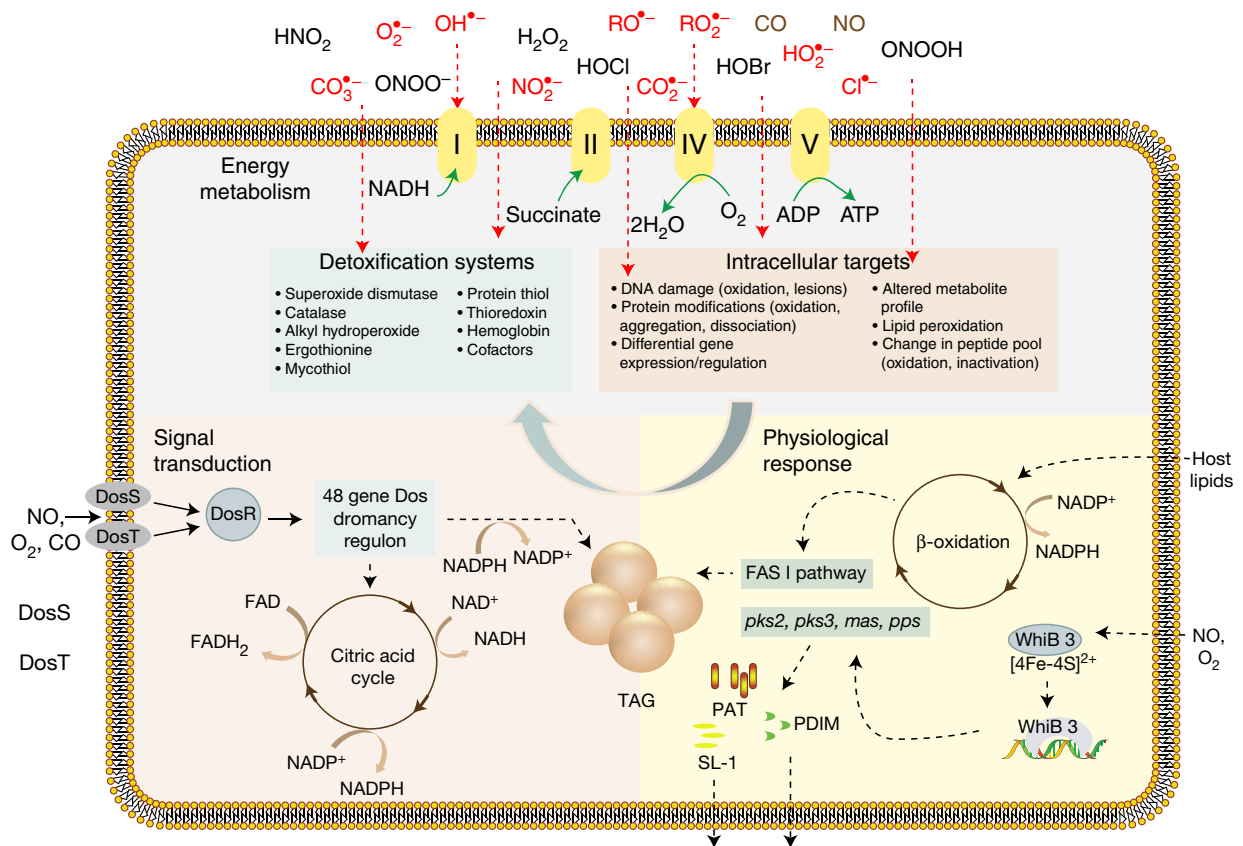
*culosis* a permis de confirmer ce résultat (Wong and Jacobs Jr, 2011; Laencina *et al.*, 2018). La rupture phagosomale dépendante d'*eccB<sub>4</sub>* s'accompagne également de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les macrophages, comme cela est décrit lors de l'échappement phagosomal de *M. tuberculosis* (Laencina *et al.*, 2018). Ainsi, le locus ESX-4 de *M. abscessus* semble remplir une fonction semblable à celle du locus ESX-1 de *M. tuberculosis*. De façon intéressante, et contrairement au locus ESX-4 de *M. tuberculosis*, ce locus comprend le gène *eccE<sub>4</sub>* chez *M. abscessus* (Dumas *et al.*, 2016). Ce gène *eccE* est présent dans les locus ESX-1 et ESX-5 de *M. tuberculosis* et code une protéine retrouvée au sein du corps de la structure des systèmes ESX. Connaissant l'interdépendance des composants structuraux des systèmes ESX dans la sécrétion des produits par ces systèmes, il est probable que la présence du gène *eccE* dans le locus ESX-4 de *M. abscessus* contribue à la fonctionnalité de celui-ci. Enfin, l'étude du sécrétome du mutant *eccB<sub>4</sub>* de *M. abscessus* suggère que le locus ESX-4 de *M. abscessus* serait impliqué dans la sécrétion des protéines EsxT et EsxU (orthologue de ESXB et ESXA respectivement) codées par les gènes *MAB\_3753c* et *MAB\_3754c* (Laencina *et al.*, 2018).

### III. Métabolisme des lipides et adaptations intracellulaires

Afin d'identifier des gènes de virulence chez *M. tuberculosis*, des analyses de génomique comparative ont été réalisées avec des espèces non-pathogènes comme *M. smegmatis*. Contrairement à *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* ne parvient pas à stopper la maturation du phagosome et est rapidement éliminée par les macrophages (Sousa *et al.*, 2015). De façon intéressante, le gène *pknG* de *M. smegmatis* complémente le déficit de survie intracellulaire d'un mutant *pknG* chez *M. tuberculosis* (Houben *et al.*, 2009). Toutefois, chez *M. smegmatis*, la protéine codée par le gène *pknG* n'est pas détectable *in vitro* et après infection de macrophages, suggérant que l'identification de gènes de virulence requiert une caractérisation des

adaptations à la vie intracellulaire, la « virulence » apportée par un gène étant fonction d'un contexte génomique et sous la dépendance de régulations au niveau transcriptomique (Houben *et al.*, 2009).

Les premières études rapportant les adaptations des mycobactéries pathogènes à la vie intracellulaire furent réalisées *in vitro*, avec des macrophages murins issus de moelle osseuse (Schnappinger *et al.*, 2003). Des gènes différentiellement exprimés par rapport au bacille cultivé dans un milieu standard ont été identifiés par microarray. Les profils d'expression du bacille exposé à 10 conditions de croissance différentes *in vitro* ont été utilisés pour identifier les conditions mimant l'environnement phagosomal. Cette étude révèle que la bactérie perçoit l'environnement des macrophages naïfs et activés comme un environnement riche en acides gras, contenant peu de fer et de carbohydrates, pouvant potentiellement causer des dommages à l'enveloppe de la bactérie, et à son matériel génétique. Parmi les adaptations majeures de la mycobactérie à l'hôte figurent le catabolisme des lipides de l'hôte (acide gras et cholestérol) et l'activation du cycle des acides tricarboxylique (TCA) qui s'ensuit (Schnappinger *et al.*, 2003) (**Figure 19**). Cette observation concorde avec des études antérieures démontrant que la perturbation du flux de carbone provenant du métabolisme des lipides réduit la virulence de *M. tuberculosis* (McKinney *et al.*, 2000). D'autres études ont par la suite confirmé que les mycobactéries sont davantage lipolytiques que lypogéniques dans les cellules-hôtes (Russell *et al.*, 2010; Aguilar-Ayala *et al.*, 2017). Les mycobactéries possèdent donc un arsenal protéique dédié à la dégradation des lipides. Celui-ci est codé par les gènes *fadAB* (fatty acid degradation) et de multiples autres gènes impliqués dans ce processus (Cole *et al.*, 1998). L'activation du cycle TCA est également la marque d'une adaptation à un milieu hypoxique (discuté plus bas) et induit la consommation de co-facteurs comme le NAD<sup>+</sup> et l'accumulation de composés toxiques tels que le glyoxylate et le propionyl-CoA. L'induction de certains gènes comme *ndh* (NADH deshydrogenase) et *ALD* (alanine deshydrogena-



**Figure 20 | Adaptations de *M. tuberculosis* aux stress rédox intracellulaires.**

L'hôte génère des radicaux libres, des molécules non-radicalaires et de nombreux gaz pour lutter contre l'infection à *M. tuberculosis*. Ces molécules ciblent l'ADN, les protéines et les lipides mycobactériens, et peuvent altérer l'expression de gènes, modifier le profil métabolique global ou le pool de peptides du bacille. Les radicaux libres peuvent réagir avec les groupes prosthétiques tels que les groupes Fer-Soufre (Fe-S) ou les groupes hémiques des complexes respiratoires. *M. tuberculosis* répond à ces contraintes en ajustant son métabolisme énergétique et sa réponse physiologique via une cascade de transduction de signaux. La plupart des dommages médiés par les radicaux libres sont contrecarrés par des processus de détoxification comprenant : **(1)** des enzymes telles que des catalases, des superoxydes dismutases, des alkyls hydroperoxydes ; **(2)** des antioxydants comme les thiorédoxines, le mycothiol, l'ergothionéine, et les protéines thiol ou encore les polyamines ; **(3)** des hémoglobines tronquées et de cofacteurs (NAD<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup>, coenzyme A). La bactérie est également capable de détecter des gaz modulant l'équilibre rédox intracellulaire (tels que le dioxygène, et le monoxyde de carbone ou le monoxyde d'azote) via des enzymes contenant des centres Fe-S comme WhiB3 ou bien des protéines kinases senseurs de stress parmi des systèmes à deux composants comme DosS/DosT. WhiB3 et l'effecteur DosR vont tous deux agir au niveau transcriptionnel pour rediriger les équivalents rédox générés par la β-oxidation des lipides de l'hôte et l'activation du cycle des acides tricarboxyliques dans la biosynthèse de lipides complexes et de lipides de stockages (le triacylglycérol ou TAG). Le tout contribue à la persistance du bacille, sa dormance et l'accomode à une réactivation prochaine.

(Adapté de Kumar *et al.*, 2011)

se) permettrait de restaurer le pool de NAD<sup>+</sup> consommé par  $\beta$ -oxydation des acides gras (Schnappinger *et al.*, 2003). Au sein du cycle TCA, des gènes codant l'isocitrate lyase (ICL) et la malate synthase (MS), impliquées dans le shunt du glyoxylate, sont induits (Schnappinger *et al.*, 2003). L'enzyme ICL va participer à la biosynthèse de succinate permettant à la bactérie de résister à l'hypoxie et au manque de nutriments, tandis que la MS permet la détoxification du glyoxylate produit par l'activité d'ICL (Gengenbacher *et al.*, 2010; Eoh and Rhee, 2013; Eoh and Rhee, 2014; Puckett *et al.*, 2017) (**Figure 19**). Les enzymes ICL et MS sont essentielles à la survie de *M. tuberculosis* lors d'infections aiguës et chroniques en modèle murin : elles participent à la persistance du bacille en assurant l'assimilation des acides gras de l'hôte et la survie en conditions hypoxiques (Muñoz-Elías and McKinney, 2005; Blumenthal *et al.*, 2010; Puckett *et al.*, 2017). Enfin, le propionyl-CoA serait détoxifié en entrant dans le cycle du méthylcitrate et par la voie de synthèse du méthylmalonyl-CoA, un précurseur de lipides méthyl-branchés comme le PDIM et le SL (**Figure 19**).

Par ailleurs, l'équilibre rédox joue un rôle particulièrement important dans les adaptations de la bactérie à la vie intracellulaire (Kumar *et al.*, 2011) (**Figure 20**). Celui-ci est particulièrement perturbé au sein du phagosome, par les radicaux libres produits par l'hôte, mais aussi en conséquence de la  $\beta$ -oxydation des acides gras de l'hôte par l'accumulation de NADH. Des systèmes de détoxification, induits en macrophages, permettent de lutter contre la toxicité des radicaux libres produits par les cellules. Il s'agit :

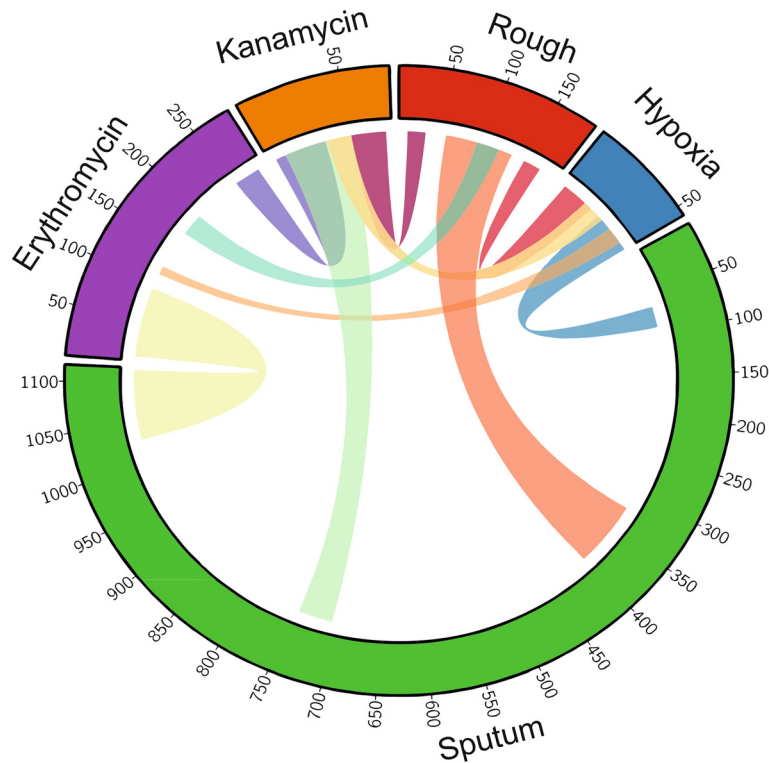
- **d'enzymes** telles que des catalases, des superoxydes dismutases, des alkyls hydroperoxydes ;
- **d'antioxydants** comme les thiorédoxines, le mycothiol, l'ergothionéine, et les protéines thiol ou encore les polyamines ;
- **d'hémoglobines tronquées et de co-facteurs** (NAD<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup>, coenzyme A).

La bactérie est également capable de détecter des molécules modulant l'équilibre ré-

dox intracellulaire. En effet, les protéines contenant des centres Fe-S confèrent à la cellule microbienne une capacité unique à détecter et répondre transcriptionnellement aux gaz diatomiques et aux agents de cyclage rédox. La protéine WhiB3 est par exemple impliquée dans le sensing du monoxyde d'azote (NO) et du dioxygène (O<sub>2</sub>) (Singh *et al.*, 2007). Le gène *whiB3* est induit en macrophages et est requis pour la virulence complète de *M. tuberculosis* chez l'animal (Steyn *et al.*, 2002; Rohde *et al.*, 2007). WhiB3 agit au niveau transcriptionnel en induisant l'expression de gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras et l'anabolisme de lipides et redirigerait de la sorte les équivalents réducteurs comme le propionate et le NADH accumulés dans la production de composants pariétaux, de lipides de virulence (SL, PDIM, PAT, DAT) et l'accumulation de lipides de stockage, les TAG (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009). Les macrophages spumeux des granulomes, particulièrement riches en lipides, sont favorables à ce type d'adaptation (Santucci *et al.*, 2016).

D'autres protéines participent aux réponses au stress intracellulaire en agissant au niveau transcriptionnel comme les TCSS, largement décrits pour leur rôle dans la physiologie et la pathogénicité de *M. tuberculosis* (Bretl *et al.*, 2011). Parmi ces TCSS, le système DosR-DosS est impliqué, tout comme WhiB3, dans la détection de l'oxygène et du NO via les protéines de l'hème DosS et DosT, mais aussi du monoxyde de carbone, et induit en conséquence l'expression de gènes impliqués dans la production d'énergie, dans la disparition des équivalents rédox et dans la production de TAG (Ioanoviciu *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2007; Shiloh *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Ainsi, les stress rédox liés à la vie intracellulaire conditionnent la persistance du bacille. Le TAG constitue une source d'énergie possible lors de l'entrée en dormance du bacille et pourrait également être favorable à sa réactivation (Gomez and McKinney, 2004; Zhang, 2004; Low *et al.*, 2009; Daniel *et al.*, 2011).

Chez *M. abscessus*, l'analyse de la composition lipidique des variants R montre l'accu-



**Figure 21 | Graphique Circos représentant les gènes différentiellement exprimés chez le variant S de *M. abscessus* dans différentes conditions de cultures.**

La largeur de chaque bande est directement proportionnelle au nombre de gènes différentiellement exprimés entre deux conditions. La circonférence de chaque portion de cercle correspondant à une condition est directement proportionnelle au nombre de gènes différentiellement exprimés dans cette condition. Ainsi, un grand nombre de gènes est différentiellement exprimé dans la condition « crachat », mimant les conditions retrouvées chez un crachat d'individu CF. Des gènes sont différentiellement exprimés dans cette condition et les conditions « érythromycine », « kanamycine », « rugueux » et « hypoxie », montrant que *M. abscessus* perçoit le crachat comme un environnement pauvre en oxygène, qui induit une réponse transcriptomique ressemblant à celle du variant R et la régulation de gènes impliqués dans la réponse à différents antibiotiques.

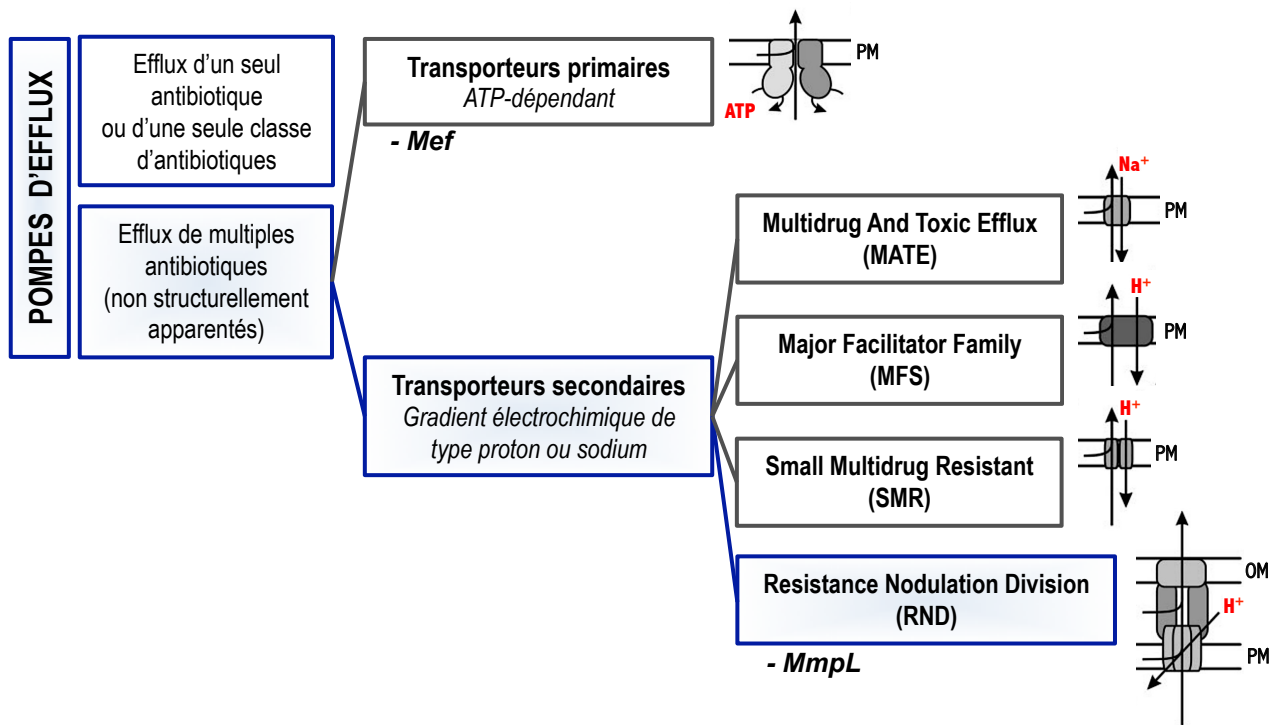
(Adapté de Miranda-CasoLuengo *et al.*, 2016)

mulation de TAG (Park *et al.*, 2015). A l'instar de *M. tuberculosis*, *M. abscessus* stocke les acides gras sous forme de TAG lorsqu'il se trouve dans les poumons (Daniel *et al.*, 2004; Pandey and Sasseti, 2008; Shi *et al.*, 2010; Baek *et al.*, 2011). Viljoen *et coll.* montrent en effet que dans un contexte intracellulaire où les lipides sont abondants, comme au sein des macrophages spumeux, *M. abscessus* est capable d'assimiler les lipides de l'hôte et cela est corrélé à la production et l'accumulation de TAG au sein de petites vésicules intracytoplasmiques, les Intracytoplasmic Lipid Inclusions ou ILI (Viljoen *et al.*, 2016).

A l'heure actuelle, une seule étude a décrit les adaptations du variant S de *M. abscessus* à des conditions cliniques rencontrées dans le cadre des infections des individus CF par une approche transcriptomique. La réponse transcriptomique de *M. abscessus* à l'hypoxie et à l'exposition à une concentration subinhibitrice d'antibiotiques dans un crachat artificiel mimant les conditions retrouvées chez les individus CF a été évaluée (Miranda-CasoLuengo *et al.*, 2016). Cette étude a montré des stratégies métaboliques communes de *M. abscessus* avec d'autres pathogènes infectant les patients CF comme

*P. aeruginosa* et reflètent des réponses de la bactérie contribuant à sa persistance, telles que celles observées chez *M. tuberculosis*. Parmi ces stratégies, Miranda-CasoLuengo *et coll.* évoquent une dépendance accrue au métabolisme des acides aminés, au catabolisme des acides gras et à la voie du shunt du glyoxylate (**Figure 19**). De façon générale, *M. abscessus* perçoit le crachat comme un environnement pauvre en oxygène, qui induit une réponse transcriptomique ressemblant à celle du variant R (Pawlik *et al.*, 2013) (**Figure 21**).

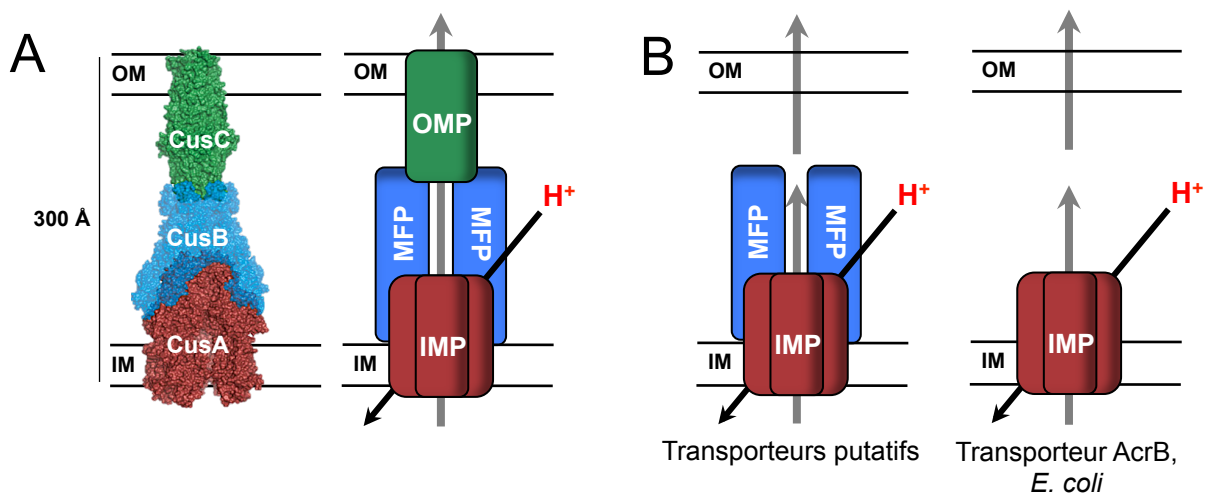
En conclusion, parmi les facteurs de virulence de l'enveloppe, il apparaît que les lipides mycobactériens complexes jouent un rôle important. Ces lipides sont transportés par la famille des protéines MmpL (mycobacterial membrane protein large) et des protéines accessoires, les MmpS (mycobacterial membrane protein small) ainsi que des lipoprotéines. Certaines protéines des familles MmpS et MmpL contribuent également à l'adaptation à un environnement pauvre en fer. L'intérêt pour ces transporteurs n'a cessé de grandir ces dernières années, ceux-ci pouvant contribuer à l'efflux d'antibiotiques mais aussi être la cible pour de nouveaux antibiotiques. Ils font l'objet du chapitre suivant.



**Figure 22 | Classification des transporteurs de la famille MmpL.**

Les transporteurs MmpL appartiennent la superfamille des transporteurs Resistance Nodulation Division (RND) parmi la catégorie des transporteurs secondaires puisant leur énergie d'un gradient électrochimique de type proton (H<sup>+</sup>) ou sodium (Na<sup>+</sup>) (antiports).

OM : membrane externe. PM : membrane plasmique.



**Figure 23 | Structure des transporteurs RND canoniques tripartites (A) et autres (B).**

A : La majorité des transporteurs RND des bactéries Gram négatif est organisée en un complexe tripartite comportant une partie ancrée dans la membrane interne (IMP), une partie périplasmique dénommée protéine de fusion (MFP) et une partie ancrée dans la membrane externe (OMP).

B : Certains transporteurs RND, bien que putatifs, peuvent être constitués d'une protéine IMP associée à deux protéines MFP ou bien composés d'une seule protéine IMP comme le transporteur AcrB d' *E. coli*.

OM : membrane externe. IM : membrane interne.

(Adapté de Long *et al.*, 2012)

## I. Généralités sur les transporteurs MmpL : classification, structure et topologie

L'appartenance à la famille de transporteurs MmpL peut être identifiée par l'analyse de motifs protéiques. Les transporteurs de cette famille possèdent un domaine PF03176. Ce domaine est présent chez différents phyla bactériens et notamment les Firmicutes, les Proteobacteria et les Actinobacteria<sup>3</sup>. Le nombre moyen de séquences protéiques comportant des domaines MmpL est le plus élevé chez les Actinobacteria et plus particulièrement chez les Corynebacteria et les Streptomyces. Chez les *Mycobacteriaceae* et les *Streptomyceae*, plus de 10 séquences MmpL ont été identifiées par espèce. Les protéines MmpL sont les plus abondantes chez les mycobactéries avec 3 fois plus de séquences par espèce présentant au moins un domaine MmpL (Viljoen *et al.*, 2017).

Les familles de transporteurs mycobactériens MmpL appartiennent à des pompes d'efflux à large spectre antibiotique, en opposition aux transporteurs impliqués dans l'efflux d'un seul antibiotique ou une seule classe d'antibiotiques tel que le transporteur de macrolides Mef (**Figure 22**). Ces pompes nécessitent de l'énergie et sont classées en deux catégories selon la source d'énergie : les transporteurs primaires, tels que les transporteurs ABC, utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP ; et les transporteurs secondaires, dépendant de l'énergie générée par un gradient électrochimique transmembranaire de protons ou de sodium (Lubelski *et al.*, 2007). Parmi les transporteurs secondaires figurent la famille de protéines Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE) dépendant de l'énergie du gradient sodique ; la famille des Small Multidrug Resistance (SMR), celle des superfamilles Major Facilitator (MFS) et des Resistance Nodulation Division (RND) dépendant de l'énergie du gradient de protons ou force proton-motrice (FPM). L'appartenance des transporteurs MmpL à la superfamille RND a été

décrite à partir de traits évolutifs et topologiques conservés et d'après leur rôle putatif de transporteur lipidique suggéré par l'étude de leur contexte génomique, un tel rôle ayant été rapporté auparavant pour certaines protéines RND de *Rhizobium* (Saier *et al.*, 1994; Tekaiia *et al.*, 1999). Plusieurs études, indirectes, suggèrent que les MmpLs, comme les transporteurs RND, sont dépendantes de la FPM, certains inhibiteurs induisant un effondrement de celle-ci (Paulsen *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2014; Poce *et al.*, 2016). De plus, au sein des *Corynebacterineae*, des orthologues des protéines MmpL, présents chez *Corynebacterium glutamicum* (CmpL1-4), dépendent de la FPM (Yang *et al.*, 2014).

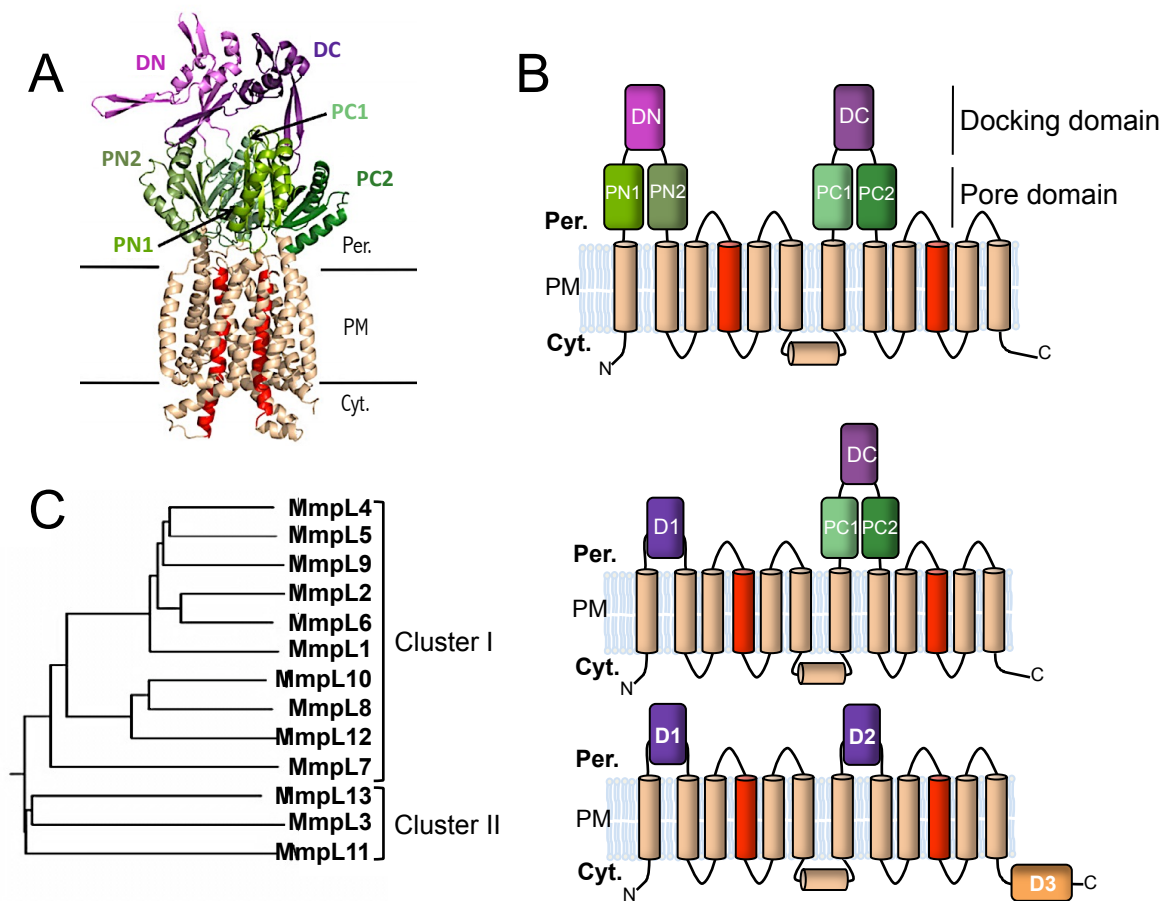
Les transporteurs RND ont été identifiés, initialement, chez le groupe des bactéries Gram- où ils sont particulièrement abondants (Saier *et al.*, 1994). En réalité, les transporteurs RND sont largement répandus chez les êtres vivants et présentent une grande diversité structurale et fonctionnelle. Une étude phylogénétique a permis de définir 7 familles au sein des transporteurs RND (Tseng *et al.*, 1999) :

- (1) Heavy Metal Efflux (HME) ;
- (2) Hydrophobe/Amphiphile Efflux-1 (HAE1) (chez les bactéries Gram-);
- (3) Nodulation Factor Exporter (NFE) (chez les bactéries Gram-);
- (4) SecDF protein-secretion accessory protein (SecDF) (chez les bactéries Gram-/+ et chez les archaebactéries) ;
- (5) Hydrophobe/Amphiphile Efflux-2 (HAE2) (chez les bactéries Gram+);
- (6) Eukaryotic Sterol Homeostasis (ESH)
- (7) Hydrophobe/Amphiphile Efflux-3 (HAE3) (chez les archaebactéries et les spirochètes).

Les protéines appartenant aux familles HME et HAE transportent de nombreux substrats tels que des métaux, des antibiotiques, des détergents, des colorants ainsi que des lipides (Tseng *et al.*, 1999; Delmar *et al.*, 2014).

<sup>3</sup><https://pfam.xfam.org/family/MMPL#tabview=tab7>





**Figure 24 | Structure (A) et représentation topologique des transporteurs RND canoniques (B) et des transporteurs MmpLs de *Mycobacterium tuberculosis* appartenant aux familles HAE2 (cluster I) et HAE3 (cluster II).**

A, B : Les protéines RND canoniques sont constituées de 12 domaines transmembranaires hélicoïdaux (TMD), ici représentés en beige, à l'exception des hélices transmembranaires centrales (TMD4 et -10) impliquées dans le transport de protons, représentées en rouge. La région périplasmique des transporteurs RND canoniques consiste en un « pore domain » constitué de 4 sous-domaines (PN1, PN2, PC1, PC2), représentés en vert ; et d'un « docking domain » composé de 2 sous-domaines (DN et DC), représentés en violet. Les sous-domaines PN1, PN2 et DN sont portés par la boucle extracytoplasmique reliant les TMD1 et -2, à l'extrémité N-terminale de la protéine. Les sous-domaines PC1, PC2 et DC sont portés par la boucle extracytoplasmique reliant les TMD7 et -8, à l'extrémité C-terminale de la protéine.

C : Chez *M. tuberculosis* le domaine D1 des transporteurs MmpL et le domaine D2 des MmpL du cluster II est constitué d'un unique « pore domain », représenté en bleu. Chez *M. tuberculosis*, les MmpL du cluster II présentent un domaine intracytoplasmique additionnel à l'extrémité C-terminale de la protéine (D3), représenté en orange.

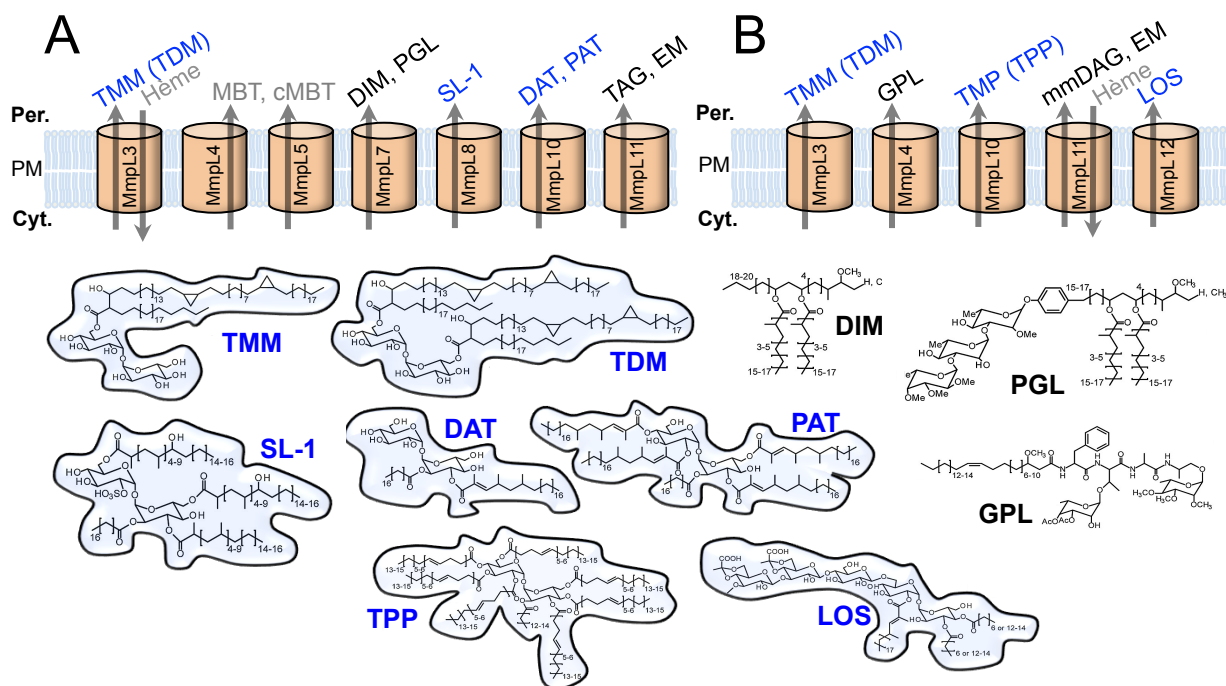
Cyt. : cytosole. PM : membrane plasmique. Per. : périplasme.

(Adapté de Chim *et al.*, 2015)

Parmi les transporteurs RND, la plupart des protéines (canoniques), comme le complexe CusCBA d'*Escherichia coli*, présente une structure et une topologie similaire (**Figure 23**). Les transporteurs RND sont généralement associés à une protéine de fusion périplasmique (MFP, Membrane Fusion Protein) et à une protéine de la membrane externe (OMF, Outer Membrane Factor). Le tout forme un système d'efflux tripartite. Cependant, il existerait également des systèmes dipartites, constitués d'une protéine IMP (Internal Membrane Protein) et de deux protéines MFP, ou monopartite ne comprenant qu'une protéine IMP (**Figure 23**). Jusqu'à présent 5 transporteurs RND ont été entièrement cristallisés (Murakami *et al.*, 2002; Sennhauser *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011a; Nakashima *et al.*, 2013; Pak *et al.*, 2013). Des analyses structurales de la partie ancrée dans la membrane interne (IMP, CusA) révèlent de larges chaînes polypeptidiques organisées en homotrimère, où chaque monomère comporte 12 domaines transmembranaires hélicoïdaux (TMD, transmembrane domain), 2 grandes boucles extracytoplasmiques entre les TMD1 et -2 et entre les TMD7 et -8, et deux domaines N-terminal et C-terminal cytosoliques (**Figure 24A-B**). Les 6 premiers domaines correspondent à la partie N-terminale de la protéine, les 6 derniers à sa partie C-terminale. Les domaines centraux des parties N-ter (TMD4) et C-ter (TMD10) sont probablement impliqués dans le transport des protons (Su *et al.*, 2011b; Bernut *et al.*, 2016b). Chaque boucle extracytoplasmique comprend un « pore domain » constitué de 2 sous-domaines N-terminaux (PN1, PN2) et C-terminaux (PC1, PC2) ainsi qu'un « docking domain » composé d'un sous-domaine N-terminal (DN) et C-terminal (DC) (Ruggerone *et al.*, 2013).

Des modèles virtuels d'oligomérisation montrent que les protéines MmpL présentent probablement une conformation homotrimérique similaire à celles des transporteurs RND (Murakami *et al.*, 2002; Viljoen *et al.*, 2017). Toutefois, les protéines MmpL ne ressemblent pas au complexe tripartite des transporteurs RND canoniques, n'étant constituées que d'une protéine IMP. Parmi les 14 gènes de *M. tuber-*

*culosis* codant des protéines à domaines MmpL, 11 gènes (*mmpL1-5*, *mmpL7-12*) codent des protéines à 11 ou 12 TMD présentant deux larges boucles extracytoplasmiques entre les TMD1 et -2 et entre les TMD7 et -8, comme la protéine IMP des transporteurs RND canoniques ; à l'exception de la MmpL10 qui ne présente qu'une seule boucle extracytoplasmique (Chim *et al.*, 2015). D'autres variations topologiques sont observables au niveau des régions périplasmiques. Deux clusters de protéines apparentées ont été identifiés chez *M. tuberculosis*, les clusters I et II, correspondant aux familles HAE2 et HAE3 respectivement (Sandhu and Akhter, 2015; Chim *et al.*, 2015). Comparée à CusA, la boucle extracytoplasmique N-terminale des protéines MmpL de *M. tuberculosis* ne comprend qu'un « pore domain » (D1) (**Figure 24**). Les protéines du cluster II n'ont qu'un « pore domain » en C-terminal (D2) et possèdent un domaine intracytoplasmique additionnel à l'extrémité C-terminal (D3) (**Figure 24C**). Les domaines D1 et D2 des MmpL sont de ce fait plus courts que les domaines périplasmiques des RND canoniques. Néanmoins, la résolution par cristallographie aux rayons X du domaine D2 de la MmpL11 de *M. tuberculosis* a révélé une structure homologue à celle des transporteurs RND (Chim *et al.*, 2015). Sandhu et Akhter ont identifié deux motifs conservés dans les TMD4 et -10 des MmpL de *M. tuberculosis* présentant une prévalence de résidus aspartiques et glutamiques chargés négativement (Sandhu and Akhter, 2015). Dans les mécanismes de symport/antiport, ces résidus seraient requis pour l'interaction du transporteur avec les protons ou autres substrats chargés positivement et leur transport subséquent (Zani *et al.*, 1993). Récemment, des études menées sur la MmpL3 de *M. smegmatis* et la MmpL4a de *M. abscessus*, ont démontré l'importance de résidus asparagine et tyrosine hautement conservés des TMD4 et -10 pour l'activité de transport des MmpL (Bernut *et al.*, 2016b; Belardinelli *et al.*, 2016). Par analogies au résidus des TMD4 et -10 associés à la FPM chez la protéine AcrB de *E. coli*, il est probable que ces résidus soient impliqués dans le maintien de la FPM (Su *et al.*,



**Figure 25 | Principales fonctions des MmpL de *M. tuberculosis* (A) et *M. smegmatis* (B) et structure chimique de leurs principaux substrats.**

Les MmpL sont principalement impliquées dans le transport de lipides (en bleu et noir) mais aussi dans la captation du fer (en gris). Les substrats lipidiques des MmpL sont principalement des lipides à base de tréhalose (en bleu).

(Adapté de Székely and Cole, 2016 ; Chalut, 2016 ; Wright et al., 2017)

**Tableau 3 | Principaux acteurs supposés et avérés du transport des lipides de surface de *M. tuberculosis* (Mtb) et *M. smegmatis* (Msm).**

Substrat	Mtb	Msm	MmpL	MmpS	Famille/type de protéine			
					Gap	ABC	MFS	Lipoprotéine
TMM <sup>a</sup>	✓	✓	MmpL3					
DAT <sup>a</sup>	✓		MmpL10 <sup>c</sup>					
PAT <sup>a</sup>	✓		MmpL10 <sup>c</sup>					
SL <sup>a</sup>	✓		MmpL8 <sup>c</sup>		Sap			
TPP <sup>a</sup>		✓	MmpL10 <sup>c</sup>		GapL			
LOS <sup>a</sup>		✓	MmpL12 <sup>c</sup>		Gap2			
GPL <sup>b</sup>		✓	MmpL4a/ MmpL4b <sup>c</sup>	MmpS4	Gap			
MBT <sup>b</sup>	✓		MmpL4	MmpS4				
cMBT <sup>b</sup>	✓		MmpL5	MmpS5				
mmDAG		✓	MmpL11					
EM	✓	✓	MmpL11					
PDIM	✓					DrrABC		LppX
PGL	✓		MmpL7 <sup>c</sup>					
TAG	✓	✓	MmpL11				Rv1410c	LprG

ABC (transporter) : ATP-binding cassette. MFS (transporter) : major facilitator family. a : Lipides à base de tréhalose. b : Lipides à base peptidique. c : Les gènes codant les transporteurs co-localisent avec des gènes impliqués dans la biosynthèse des lipides. ✓ : présence du substrat.

(Adapté de Touchette and Seeliger, 2017)

TM/DM : mono/dimycolate de tréhalose. (c)MBT : (carboxy)mycobactine. PDIM : phtiorécol dimycosérosate. PGL : phénolglycolipides. SL : sulfolipide. D/PAT : diacyl/penta-acyltréhalose. TAG : triacylglycérol. GPL : glycopeptidolipides. TM/PP : tréhaloses mono/polyphléates. mmDAG : monomeromycolyl-diacylglycérol. EM : ester de mycolates. LOS : lipooligosaccharides.

2006; Eicher *et al.*, 2014). En effet, la modification de ces résidus suite à des mutations ponctuelles conduit à l'inactivation des transporteurs et confirme leur essentialité, probablement liée au maintien de la FPM.

## II. Fonctions des transporteurs MmpL

### 2.1 Transport de lipides

Nous avons auparavant évoqué le rôle de l'enveloppe mycobactérienne et notamment des lipides de surface dans la virulence de *M. tuberculosis* et de *M. abscessus*. La biosynthèse et l'export de ces lipides sont indispensables pour la survie et la virulence des mycobactéries (Camacho *et al.*, 1999; Domenech *et al.*, 2005). Synthétisés dans le cytoplasme, les lipides de surface sont transférés à la membrane externe par des mécanismes encore mal définis. Cependant, la plupart des protéines MmpL identifiées, chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, sont associées au transport de ces composés, dont la majorité sont des glycolipides contenant des tréhaloses (Székely and Cole, 2016; Chalut, 2016) (**Figure 25**). Une seule protéine, MmpL3, conservée chez toutes les mycobactéries, transporte un lipide essentiel à la viabilité mycobactérienne, le TMM : ainsi l'inhibition progressive de l'expression du gène *mmpL3* entraîne un arrêt de la division cellulaire et la mort des bactéries *in fine* (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2012; Degiacomi *et al.*, 2017).

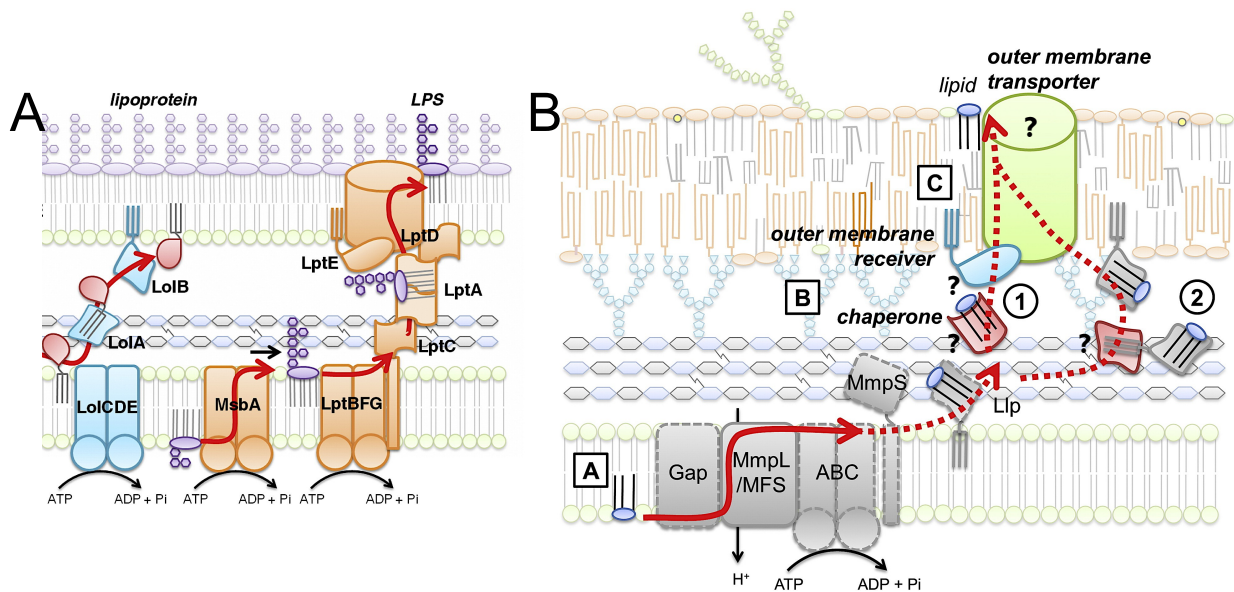
Chez *M. tuberculosis*, deux études indépendantes ont tout d'abord démontré que la protéine MmpL7 assure le transport du PDIM de *M. tuberculosis* (Cox *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2001). Par la suite, il a été démontré que cette protéine était aussi impliquée dans le transport des PGL (Reed *et al.*, 2004) (**Figure 25**). MmpL7 interagirait également avec la machinerie de synthèse du DIM. De la même façon, la protéine MmpL8 est requise pour la biosynthèse et le transport du SL-1 (Converse *et al.*, 2003). Ce couplage entre synthèse et transport des lipides illustrés par les protéines MmpL7 et -8 pourrait entraîner une spécificité des processus de transport lipidique (Jain and Cox, 2005). Enfin, plus récemment, des études ont

montré l'implication de la protéine MmpL10 dans le transport des DAT/PAT (Belardinelli *et al.*, 2014; Touchette *et al.*, 2015).

Chez les MNT comme *M. smegmatis*, *M. abscessus* ou encore *M. avium*, la protéine MmpL10 est impliquée dans le transport des TPP (Burbaud *et al.*, 2016). Chez les MNT produisant des LOS, la protéine MmpL12 serait impliquée dans le transport des LOS (Etienne *et al.*, 2009) (**Figure 25**). La protéine MmpL4 est impliquée dans le transport des GPL chez *M. smegmatis* et *M. abscessus* (Medjahed and Reyrat, 2009; Pawlik *et al.*, 2013; Bernut *et al.*, 2016b). Par ailleurs, Pacheco et coll. ont prouvé le rôle de la MmpL11 dans l'export du monomerycolyl diacylglycerol (MMDAG) et des esters de mycolates (EM), assurant la formation de biofilm chez *M. smegmatis* (Pacheco *et al.*, 2013). L'introduction du gène *mmpL11* de *M. tuberculosis* chez un mutant *mmpL11* de *M. smegmatis* restaure le transport du MMDAG, suggérant une fonction similaire de ce gène chez les deux espèces (Pacheco *et al.*, 2013). De plus, un mutant *mmpL11* de *M. tuberculosis* présente des modifications pariétales et la formation du biofilm est altérée chez ce mutant, renforçant l'hypothèse que *mmpL11* remplit la même fonction chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Wright *et al.*, 2017).

Les mécanismes de transport des lipides par les MmpL sont actuellement mal définis bien qu'il ait été démontré récemment que la protéine MmpL3 remplit la fonction de flipase des acides mycoliques (Xu *et al.*, 2017). Les MmpL sont fonctionnellement et génétiquement associées à des gènes codant des protéines qui pourraient participer à ces mécanismes (**Tableau 3**) :

- **des petites protéines accessoires**, les MmpS (~150 acides aminés versus ~1000 acides aminés pour les MmpL).
- **des transporteurs de type ABC** ;
- **des petites protéines à 6 domaines transmembranaires associées aux GPL** que sont les Gap (GPL addressing protein) ;
- **des lipoprotéines** se liant aux lipides (Lip, lipid-binding lipoproteins).



**Figure 26 | Modèle du transport des lipides de surface des mycobactéries.**

A : Chez les bactéries Gram négatif, des systèmes mettant en jeu des protéines de la membrane interne, des chaperonnes périplasmiques (telles que LolA, LolB et LptC), des lipoprotéines de la membrane externe et des protéines à feuillet bêta, coordonnent le transport de protéines à feuillet bêta, de lipoprotéines et de lipopoligosaccharides (LPS) à la membrane externe.

B : Chez les mycobactéries, les lipides de surface ou leurs précurseurs sont transportés à travers la membrane interne par une ou plusieurs protéines membranaires (A). Après plusieurs modifications menant à une forme mature des lipides, si nécessaire, les lipides sont extraits de la membrane par des protéines chaperonnes périplasmiques transférant leur substrat à l'interface avec la membrane externe. Soit les lipides sont transférés via une protéine MmpS ou une protéine Llp à une protéine périplasmique qui pourrait médier le transport à la membrane externe par diffusion ou en formant un pont continu entre la membrane interne et la membrane externe (modèle 1) ; soit la protéine Llp est solubilisée par une chaperonne et médie le transport des lipides à la membrane externe (modèle 2) (B). Enfin, les lipides pourraient être réceptionnés par d'autres protéines qui faciliteraient leur insertion et leur transport dans la membrane. L'hydrophobicité de certains lipides requière probablement une étape de solubilisation dans le périplasma et une source d'énergie pour l'extraction des lipides depuis la membrane interne, comme observé dans le transport des lipoprotéines et des lipopolysaccharides des bactéries Gram négatif. Dans ce cadre, deux familles de protéines joue un rôle clef : Llp et les MmpS. En effet, les lipides pourraient être transférés de la membrane interne au périplasma par l'une de ces deux familles.

(Adapté de Touchette and Seeliger, 2017)

Étant donné la taille et l'extrême hydrophobicité de certains lipides, une étape de solubilisation dans le périplasma et une source d'énergie sont nécessaires pour le passage des lipides depuis la membrane interne, comme observé dans le transport des lipoprotéines et des LPS des bactéries Gram- (**Figure 26**). Dans ce cadre, deux familles de protéines jouent un rôle clef : les Llp et les MmpS. Les lipides seraient transférés de la membrane interne au périplasma par l'une de ces deux familles de protéines. Par exemple, la protéine LlpX, impliquée dans le transport du PDIM, est structurellement homologue aux protéines LolA et LolB des bactéries Gram-, assurant la translocation périsplasmique des composés de la membrane interne, et pourrait de la même façon participer à la translocation des lipides mycobactériens de surface (Matsuyama *et al.*, 1995; Matsuyama *et al.*, 1997; Tajima *et al.*, 1998) (**Figure 26**). Quant aux MmpS, ces protéines sont observées uniquement chez les mycobactéries et chez quelques *Streptomyces* (12 espèces) : aucun homologue n'est trouvé chez les bactéries Gram-<sup>4</sup>. Néanmoins, des modèles prédictifs montrent que les MmpS sont constituées d'une partie transmembranaire N-terminale et d'une extrémité C-terminale faisant face à l'espace périsplasmique, ce qui n'est pas sans rappeler la structure des MFP des transporteurs RND tripartites des bactéries Gram- (**Figure 26**). Touchette M. et Seeliger J. comparent également les MmpS à la protéine LptC, transporteur du LPS des bactéries Gram-. En effet, tout comme les protéines MmpS, LptC est composée d'un domaine C-ter soluble ancré par une seule hélice transmembranaire et associé à un transporteur membranaire (Touchette and Seeliger, 2017). Ainsi, les protéines MmpS pourraient transférer des lipides de la membrane interne à une chaperonne périsplasmique (**Figure 26**). Par exemple, la protéine MmpS4 de *M. smegmatis* est impliquée dans le transport des GPL en formant un complexe avec les protéines MmpL4a et -4b et des enzymes impliquées dans la biosynthèse des GPL (Deshayes *et al.*, 2010). Les protéines

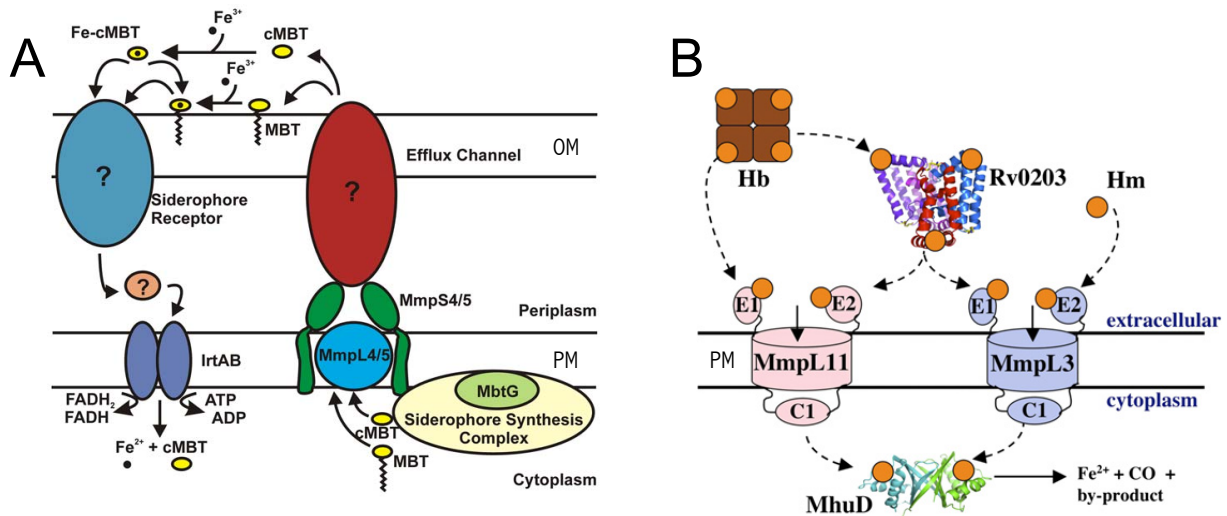
Gap semblent être impliquées dans le transport de lipides particuliers : en effet, les protéines de la famille Gap, y compris la protéine Sap, sont principalement associées au transport des glycolipides à base de tréhalose (LOS, TPP, SL), à l'exception de la protéine Gap associée au transport des GPL (Sondén *et al.*, 2005) (**Tableau 3**). Les fonctions des autres gènes *mmpS* (*mmpS1*, *mmpS2*, *mmpS3*) demeurent inconnues bien que la haute conservation du gène *mmpS3* suggère un rôle important de ce gène.

## 2.2 Acquisition du fer

Le rôle des MmpL dans l'acquisition du fer, un co-facteur essentiel à de nombreux processus cellulaires, a été mis en évidence récemment chez *M. tuberculosis*. Les protéines MmpL4 et -5 seraient impliquées dans l'export et le recyclage des MBT et carboxymycobactines (cMBT) (**Figure 27A**), se liant au fer avec une grande affinité et le libérant dans la bactérie dans des conditions de carence en fer (Rodriguez, 2006; Wells *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014). Ces deux MmpL agissent de concert avec les protéines MmpS4 et MmpS5 respectivement (Wells *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014). Les MBT et les cMBT synthétisées dans le cytoplasme sont transportées dans le milieu extracellulaire par les complexes MmpS4-MmpL4 et MmpS5-MmpL5 respectivement. Le fer extracellulaire capturé par ces molécules est ensuite capté par la cellule via un récepteur de sidérophore au niveau de l'OM et par le récepteur IrtAB au niveau de la membrane plasmique, puis dissocié des sidérophores dans le cytoplasme. D'autre part, au-delà de leur rôle de transporteurs des MBT et des cMBT, les complexes MmpS4-MmpL4 et MmpS5-MmpL5 joueraient un rôle essentiel dans le recyclage de ces composés, toxiques quand accumulés dans la bactérie (Jones *et al.*, 2014).

Parmi les sidérophores synthétisés par les mycobactéries figurent également les exochélines (EXC), qui, en opposition aux MBT et cMBT, sont solubles dans l'eau. Les EXC, parmi les protéines les plus abondamment sécrétées par *M. tuberculosis*, peuvent extraire le fer de la transferrine humaine et de la lactoferrine et le

<sup>4</sup><http://pfam.xfam.org/family/PF05423#tabview=tab7>



**Figure 27 | Acquisition du fer médiée par les protéines des familles MmpL et MmpS chez *M. tuberculosis*.**

A : Export de mycobactines et carboxymycobactines. Les mycobactines (MBT) et les carboxymycobactines (cMBT) sont synthétisées dans le cytoplasme et transportées par les complexes MmpS4-MmpL4 et MmpS5-MmpL5 respectivement. Le fer extracellulaire capturé par ces molécules est ensuite capté par la cellule via un récepteur de sidérophore au niveau du feuillet externe (OM) et par le récepteur IrtAB au niveau de la membrane plasmique (PM), puis dissocié des sidérophores dans le cytoplasme.

B : Import de l'hème. L'hème extracellulaire est capturé par la protéine Rv0203 qui transmet la molécule aux MmpL3 et -11 permettant sa translocation vers le cytosol où il est pris en charge par l'exochéline MhuD pour libérer le fer.

(Adapté de Wells *et al.*, 2013 (A) et de Tullius *et al.*, 2011 (B))

**Tableau 4 | Protéines MmpL impliquées dans la virulence de *M. tuberculosis* (Mtb) et *M. abscessus* (Mabs).**

Mycobactérie	MmpL	Méthode	Références
Mtb	MmpL2, 4, 7	Souris, UFC/poumons	Camacho <i>et al.</i> , 1999
	MmpL4, 7, 8, 11	Souris, UFC/poumons + létalité	Domenech <i>et al.</i> , 2005
	MmpL4, 5, 7, 8, 10, 11	Souris, UFC/poumons	Lamichhane <i>et al.</i> , 2005
	Complexe MmpS4/5-MmpL4/5	Souris, UFC/poumons, rate + létalité	Wells <i>et al.</i> , 2013
	MmpL11	Granulome de cellules humaines <i>in vitro</i> , UFC	Wright <i>et al.</i> , 2017
Mabs	MmpL4a, MmpL4b	Poisson zèbre, granulome + létalité	Bernut <i>et al.</i> , 2016b

UFC : unités formant colonies.

transporter aux mycobactines ou au système de transport du fer. Les parties périplasmiques N-ter et C-ter des protéines MmpL3 et MmpL11 de *M. tuberculosis* lient l'hème et le capturent pour le transférer dans le cytosol où il est dégradé pour libérer le fer par l'exochéline MhuD (Tullius *et al.*, 2011). Ce rôle de transporteur d'hème a également été rapporté pour MmpL11 chez *M. smegmatis* (Owens *et al.*, 2013) (**Figure 27B**).

### III Virulence mycobactérienne : rôle des protéines MmpL et de leur régulation

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les stratégies de survie développées par les mycobactéries pathogènes sont fortement liées à la présence d'une enveloppe atypique (Daffé and Draper, 1998). En réponse à des environnements changeants, les mycobactéries pathogènes comme *M. tuberculosis* activent ou répriment l'expression de gènes clefs pour s'adapter rapidement à de tels modifications comme le montre notamment l'étude transcriptomique de Schnappinger *et coll.* (2003). La biosynthèse et le remodelage de l'enveloppe mycobactérienne sont par conséquent des fonctions importantes de la bactérie pour établir et maintenir l'infection.

#### 3.1 Contribution des MmpL à la virulence des mycobactéries pathogènes

La contribution des protéines MmpL à la virulence des mycobactéries pathogènes a été mise en évidence chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus* (**Tableau 4**). Les toutes premières preuves expérimentales ont été apportées par Camacho *et coll.* en 1999 : parmi 1927 mutants d'une banque de mutants de transposition chez *M. tuberculosis*, 3 souches mutées pour la *mmpL2*, -4 ou -7 présentaient une survie atténuée en souris (Camacho *et al.*, 1999). Puis, deux études indépendantes ont confirmé le rôle des MmpL4 et -7 dans la virulence de *M. tuberculosis* en modèle murin d'infection par mesure de la charge bactérienne intrapulmonaire et/ou de la létalité des souches (Lamichhane *et al.*, 2005; Domenech *et al.*, 2005). Ces deux études

ont également permis d'identifier deux autres protéines MmpL contribuant à la virulence de *M. tuberculosis* : les protéines MmpL8 et MmpL11. Une seule étude a rapporté le rôle de la protéine MmpL10 dans la virulence de *M. tuberculosis* (Lamichhane *et al.*, 2005). Les protéines MmpL4 et -5 de *M. tuberculosis* (associées aux protéines MmpS4 et -5) ont été également impliquées dans la virulence du bacille (Wells *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014). De plus, MmpL11 jouerait un rôle dans la virulence de *M. tuberculosis* ; ce qui a été mis en évidence à l'aide d'un modèle de granulome de cellules humaines *in vitro* (Wright *et al.*, 2017). Enfin, la protéine MmpL7 interviendrait dans la capacité de *M. tuberculosis* à s'échapper du phagosome, un rôle probablement médié par le produit transporté par cette MmpL, le PDIM (Pethe *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005; Quigley *et al.*, 2017).

Chez *M. abscessus*, des mutations des *mmpL4a* et *mmpL4b* conduisent à une transition vers un phénotype rugueux, associée à une virulence augmentée de la bactérie (Catherinot *et al.*, 2007; Medjahed and Reyrat, 2009; Nessar *et al.*, 2011; Pawlik, *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Bernut *et al.*, 2016b). Seule la fonction des gènes *mmpL4a* et *mmpL4b* est connue chez *M. abscessus* alors que 31 gènes *mmpL* sont annotés chez la souche type de *M. abscessus* (soit 2 fois plus que chez *M. tuberculosis* H37Rv),

En contribuant à l'intégrité de la paroi mycobactérienne, les MmpL assurent le maintien de la perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne et la résistance des mycobactéries à des stress, tel qu'une exposition à des détergents ou encore la carence en oxygène et en nutriments (Camacho *et al.*, 2001 ; Wright *et al.*, 2017).

#### 3.2 Régulation des MmpL et virulence

Afin de contrôler la biosynthèse et le remodelage de son enveloppe, la bactérie doit réguler la biosynthèse de lipides et les transporteurs de ces composés. Différents acteurs ont été identifiés qui participent à la régulation de l'expres-





sion des MmpL et de leur activité, au niveau transcriptionnel et post-traductionnel.

Au niveau transcriptionnel, la famille de régulateur TetR exerce une action répressive sur l'expression des MmpL (Richard *et al.*, 2018). Il semblerait que la régulation de l'expression des MmpL soit liée à la progression de la pathologie. Une étude récente montre que les gènes codant les transporteurs MmpL8 et MmpL10 de *M. tuberculosis* sont impliqués dans sa virulence en souris (Lamichhane *et al.*, 2005; Domenech *et al.*, 2005). Ces transporteurs ne sont induits que tardivement au cours de l'infection des souris (28 jours post-infection), et participeraient à la réactivation du bacille et à la progression de la maladie, la transcription des transporteurs étant augmentée à 120 jours post-infection (Rodríguez *et al.*, 2013).

Au niveau post-traductionnel, la protéine MmpL7 serait un substrat de la protéine kinase PknD, qui pourrait ainsi moduler l'activité du transporteur et donc l'export du PDIM (Pérez *et al.*, 2006).

## IV. Les deux visages des MmpL : efflux d'antibiotiques et cibles thérapeutiques / antigènes

### 4.1 Efflux d'antibiotiques

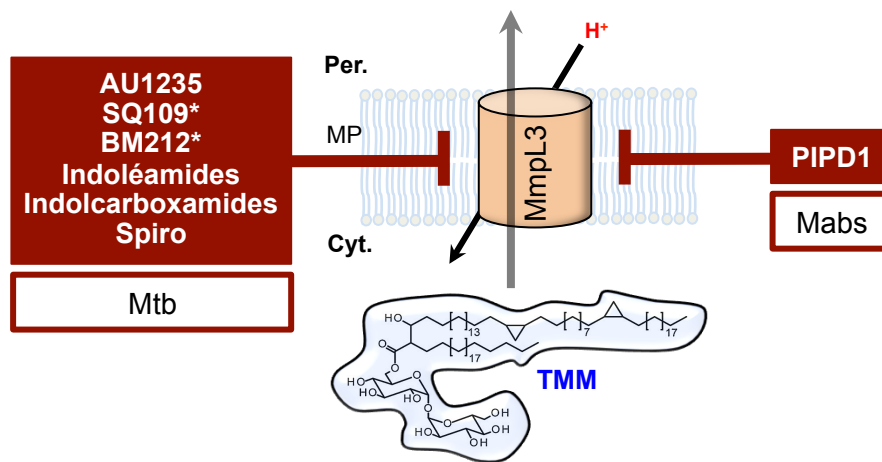
La contribution des MmpL à la résistance aux antibiotiques a été démontrée il y a peu. La première preuve expérimentale remonte à 2005 lorsque Pasca *et coll.* ont montré l'implication de la protéine MmpL7 de *M. tuberculosis* dans l'efflux de l'isoniazide, un des antibiotiques de première intention employés dans le traitement des infections à *M. tuberculosis* (Pasca *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2012). L'induction du couple *MmpS5-MmpL5* interviendrait dans la résistance de *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG à l'éconazole (Milano *et al.*, 2009). De plus, des mutations inactivant le régulateur Rv0678 lèvent la répression de l'opéron *mmpS5-mmpL5* et engendrent l'efflux de la clofazimine, un antibiotique employé pour le traitement de la lèpre multirésistante (Zhang *et al.*, 2015). L'absence du couple *MmpS5-MmpL5* chez *M. leprae* explique très probablement l'efficacité de ce traite-

ment chez les patients. Chez *M. tuberculosis*, les clones résistant à la clofazimine, suite à l'induction des gènes *mmpS5-mmpL5*, résistent également à la bédaquiline, un antibiotique clef dans le traitement de la tuberculose multirésistante, par un mécanisme de résistance croisée (Hartkoorn *et al.*, 2014; Andries *et al.*, 2014). Enfin, il a été montré que la MmpL5 de *M. tuberculosis* capture le linezolid et la pyrazinamide du cytoplasme et les relargue dans le périplasme, confirmant le rôle prédominant de cette protéine dans l'évolution de la résistance de *M. tuberculosis* à divers antibiotiques (Sandhu and Akhter, 2016; Briffotiaux *et al.*, 2017). Par ailleurs, parmi les protéines impliquées dans la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, 4 motifs ont été identifiés dont 1, dit motif D, conservé au sein des TMD4 et -12 des MmpL10 et -12 de *M. tuberculosis* suggérant que ces deux MmpL pourraient aussi contribuer à l'efflux d'antibiotiques (Paulsen *et al.*, 1996).

Chez *M. abscessus*, la résistance aux dérivés de la thiacéthazone a été récemment associée à la sur-expression des gènes *mmpS5-mmpL5* suite à des mutations dans un répresseur TetR (Halloum *et al.*, 2017). De plus, chez la souche sauvage, le répresseur TetR se lie à ces dérivés et ne remplit plus sa fonction de répresseur, ce qui favorise la résistance de *M. abscessus* à ces composés (Richard *et al.*, 2018).

### 4.2 La protéine MmpL3, une cible attractive pour le design d'anti-mycobactériens

Étant donné le rôle majeur des pompes d'efflux dans les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques, diverses études ont été menées ces dernières années visant à inhiber l'activité de ces pompes (Askoura *et al.*, 2011; Opperman and Nguyen, 2015). Le rôle de la protéine MmpL3 dans la physiologie des mycobactéries, et notamment son essentialité, font d'elle une cible privilégiée de traitements anti-mycobactériens (Viljoen *et al.*, 2017). Actuellement, la protéine MmpL3 représente l'une des cibles pharmacologiques antimycobactériennes les plus prometteuses. Il a récemment été



**Figure 28 | Inhibiteurs de la protéine MmpL3 chez *M. tuberculosis* (Mtb) et *M. abscessus* (Mabs).**

Sont représentés divers inhibiteurs efficaces de la protéine MmpL3 de *M. tuberculosis* et de *M. abscessus* en ciblant le flux de protons alimentant le transporteur (\*).

(Adapté de Sandhu and Akhter, 2018)

démontré que de nombreuses entités chimiques inhibent l'activité de cette protéine, non seulement chez *M. tuberculosis* mais aussi chez les MNT (La Rosa *et al.*, 2012; Tahlan *et al.*, 2012; Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2013; Lun *et al.*, 2013; Bailo, *et al.*, 2015; Dupont *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018) (**Figure 28**). Chez *M. tuberculosis*, les composés inhibant l'activité de la protéine MmpL3 sont :

- SQ109, un dérivé de l'éthambutol (Tahlan *et al.*, 2012) ;
- l'adamantyl, inhibiteur de l'urée AU1235 (Grzegorzewicz *et al.*, 2012) ;
- les indoléamides ou leurs dérivés tel que l'indolcarboxamide BM212 (Lun *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2013; Stec *et al.*, 2016) ;
- le benzamidazole (Stanley *et al.*, 2012) ;
- le N-benzyl-60,70-dihydrospiro[piperidine-4,40-thieno[3,2-c]pyran] (spiro) (Remuiñán *et al.*, 2013).

Les inhibiteurs de la protéine MmpL3 agissent de façon synergique avec d'autres anti-tuberculeux, ce qui peut présenter un intérêt pour la réduction de la durée du traitement de la tuberculose (Li *et al.*, 2017).

Chez *M. abscessus*, PIPD1, un dérivé du pipéridinol, inhibe l'activité d'efflux de la protéine MmpL3, potentiellement par inhibition de la FPM, et est actif vis-à-vis de 32 souches cliniques comprenant des isolats des 3 sous-espèces du complexe *M. abscessus* soulignant l'intérêt thérapeutique de cet inhibiteur (Dupont *et al.*, 2016). De plus, des souches résistantes de *M. abscessus* à ce composé présentent des mutations dans le gène *MAB\_4508* codant la protéine MmpL3, confirmant d'une part que PIPD1 cible la MmpL3 et permettant d'autre part l'identification d'une potentielle poche de fixation de l'inhibiteur (Dupont *et al.*, 2016). L'efficacité de PIPD1 envers d'autres MNT opportunistes reste à être testée ; celui-ci pouvant offrir des perspectives prometteuses dans le traitement des mycobactérioses. Par ailleurs, certains inhibiteurs de la protéine MmpL3 de *M. tuberculosis*, comme BM212 et SQ109, entraînent une rupture du gradient de protons alimentant la protéine et pourraient être effi-

caces vis-à-vis d'autres protéines MmpL (Bailo *et al.*, 2015).

Une meilleure connaissance du rôle des MmpL dans la physiologie et la virulence des mycobactéries est requise pour mieux évaluer leur potentiel en tant que cible thérapeutique. A ce jour, chez *M. tuberculosis*, la fonction des protéines MmpL1, -2 et -6 demeure inconnue. L'étude d'autres MmpL impliquées dans des processus cellulaires clefs, comme les protéines MmpL5 et -11 de *M. tuberculosis* pourrait mener à la découverte de nouveaux traitements anti-mycobactériens. Chez *M. abscessus*, l'abondance des MmpL pourrait contribuer à la résistance de la bactérie à de multiples antibiotiques. Enfin, cibler les partenaires des protéines MmpL peut également constituer une piste thérapeutique d'intérêt. En effet, Gannoun-Zaki *et coll.* ont montré que la surexpression du gène codant le peptide mycobactérien KdpF, interagissant avec les TMD2 à 6 des MmpL7 et -10, restreint la survie intra-macrophagique et la capacité des mycobactéries à former des cordes, phénotype associé à la virulence de mycobactéries pathogènes (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013).

### 4.3 MmpL et vaccins

Bien qu'efficace pour réduire le risque de propagation de la tuberculose chez les jeunes enfants, le taux de protection du BCG contre la maladie chez les adultes est très variable et ce vaccin confère peu de protection contre la tuberculose latente. Récemment l'efficacité de trois MmpL a été évaluée en tant que vaccins potentiels contre la tuberculose (Strong and West, 2018). Des antigènes synthétiques comprenant les boucles extracellulaires N-terminale et C-terminale des MmpL1 (SERoM-1), -8 (SERoM-8) et -10 (SERoM-10) ont été produits et testés comme candidats vaccins. SERoM-1 et SERoM-8 se sont révélés hautement immunogènes par des tests de production d'IFN- $\gamma$  mesurée par ELISPOT. Un vaccin combiné SERoM-1, -8 et -10 a démontré une protection significative contre *M. tuberculosis* dans un modèle murin de tuberculose, entraînant une réduction du nombre de bactéries d'environ 10 fois après infection des poumons et de la rate par rapport à



l'adjuvant seul (Strong and West, 2018). Les effets protecteurs obtenus sont comparables à ceux obtenus avec le BCG et offrent de nouvelles perspectives dans la prévention et le traitement des infections à mycobactéries.

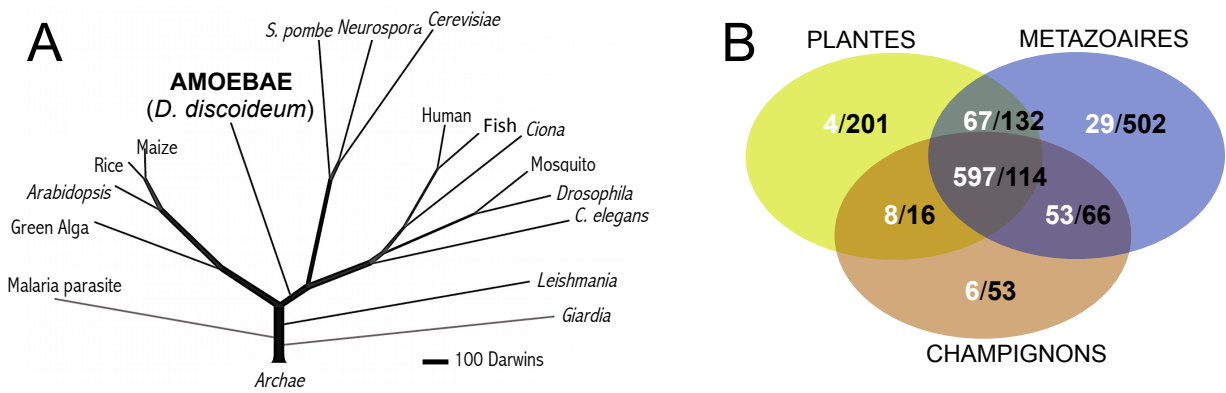
## V. Perspectives évolutives

Si l'avènement des antibiotiques a permis de lutter contre de nombreux agents infectieux, il s'est aussi accompagné de l'évolution de souches infectieuses acquérant une résistance à ces antibiotiques. Cela a finalement conduit à l'échec de certains traitements antibactériens et à l'impossibilité de traiter certaines infections bactériennes (Nikaido, 2009). Comme nous l'avons évoqué, chez les mycobactéries l'apparition de mutations dans les pompes d'efflux peut impacter la résistance aux antibiotiques parmi les mécanismes évolutifs contribuant à la résistance à de multiples antibiotiques (Al-Saeedi and Al-Hajoj, 2017). Chez les MmpL, d'autres événements géniques peuvent modifier la fonction des protéines telles que la duplication génique, la fusion et la scission de gènes.

Dès 1999, des analyses menées par Tekaia et coll. montrent que les transporteurs MmpL présentent des duplications internes au niveau de leurs TMD, ce qui a été confirmé par la suite pour les TMD-3, -4, -5 et -6 (Tekaia et al., 1999; Sandhu and Akhter, 2015). Il s'ensuit des événements de fusion et de scission des gènes qui modifient leur fonction. Ainsi, au sein de la souche ancestrale de *M. tuberculosis* comprenant RD1, deux gènes indépendants codent pour les protéines MmpS6 et MmpL6 alors que dans la souche moderne de *M. tuberculosis*, les deux gènes ont fusionné en un seul (Boritsch et al., 2014). Le gène *mmpL13* est au contraire scindé en deux dans les souches modernes H37Rv et CDC1551 et chez *M. africanum*, contrairement à d'autres espèces du MTBC telles que *M. canettii* et *M. bovis* (Deshayes et al., 2008). Des variations sont en fait observables au sein de différentes souches de *M. tuberculosis* suggérant que la scission du gène *mmpL13*

est un exemple d'adaptation de souches plutôt que d'espèces (Sandhu and Akhter, 2015). Cette scission du gène est le résultat de l'insertion d'une autre séquence conduisant à la formation de deux portions de gènes. Chez *M. leprae*, cette scission correspond à de la pseudogénéisation car les deux portions de gènes ne sont pas fonctionnelles. Par ailleurs, bien que cette scission donne naissance à deux séquences codantes fonctionnelles chez les souches H37Rv et CDC1551 de *M. tuberculosis*, il est probable que celles-ci ne remplissent plus leur fonction de transporteur RND, ayant perdu leur symétrie interne nécessaire au bon fonctionnement de ces pompes (Eda et al., 2003; Sandhu and Akhter, 2015). Chez les transporteurs membranaires, les événements de duplication génique assurent la formation des unités fonctionnelles de la machinerie de transport, la stabilité des protéines, leur repliement et changements conformationnels (Choi et al., 2008; Keller et al., 2014). De tels événements d'interruption de séquences codantes ont aussi été observés chez *M. bovis* concernant le gène *mmpL9* (Deshayes et al., 2008). L'ensemble de ces événements montre que les gènes *mmpL* figurent parmi des gènes importants pour les mécanismes d'adaptation des mycobactéries à leurs hôtes ou leurs environnements, connaissant leur contribution à la physiologie, la virulence et la résistance aux antibiotiques des mycobactéries.

Par ailleurs, la topologie inhabituelle des protéines MmpL3 et -11, due à la perte partielle des « pore domains » et des « docking domains » ainsi qu'à la présence d'un domaine cytosolique, pourrait être une indication de l'évolution de ces protéines dans des contextes particuliers. En effet, la réduction de la taille des boucles extracytoplasmiques pourrait augmenter la stabilité thermodynamique de ces protéines en réduisant l'énergie requise pour leur repliement, rendant ces protéines plus stables à des températures plus élevées (Sandhu and Akhter, 2015). Ce type d'adaptations serait davantage bénéfique à des bactéries intracellulaires d'hôtes au sang chaud comme *M. tuberculosis*.

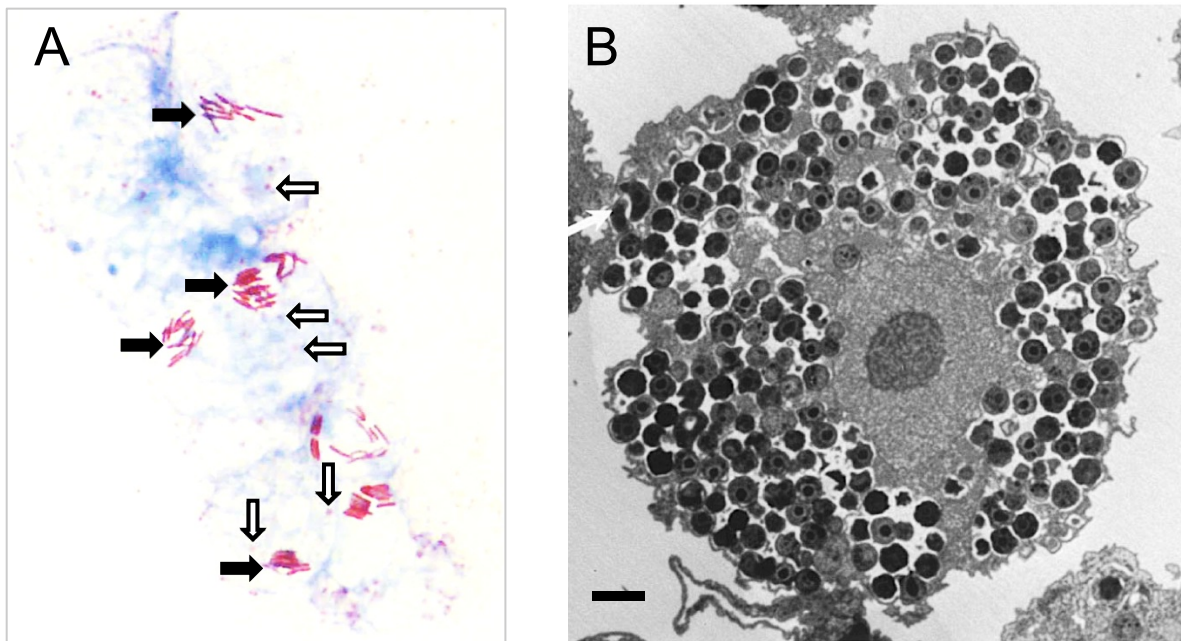


**Figure 29 | Place des amibes au sein des eucaryotes (A) et protéines conservées (B).**

A : Les amibes telle que *Dictyostelium discoideum* sont des protozoaires qui ont divergé de la lignée animale/champignon après la séparation des plantes et des animaux.

B : De façon remarquable, de nombreux domaines fonctionnels (Pfam) sont conservés entre amibes, plantes et animaux. Sur ce diagramme de Venn figurent en blanc les Pfam identifiées chez l'amibe *D. discoideum*, en noir ceux absents.

(Adapté de Eichinger *et al.*, 2005)



**Figure 30 | Les amibes sont un réservoir de micro-organismes résistant à la phagocytose amibienne.**

A : Cliché de microscopie photonique de la bactérie intracellulaire *Legionella spp.* (flèches noires) et du virus géant *Lausannevirus* (flèches blanches) à l'intérieur de l'amibe *Acanthamoeba castellanii*.

Grossissement : X 1000.

B : Cliché de microscopie électronique montrant l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* remplie de la bactérie *Parachlamydia acanthamoebae* (flèche blanche). Grossissement : X 2,625. Bar : 1  $\mu$ m.

(Adapté de Greub and Raoult, 2004a (A) et Bertelli and Greub, 2012 (B))

Ces dix dernières années, le modèle amibien d'étude des mycobactéries pathogènes a été particulièrement employé afin de comprendre la physiopathologie des infections à mycobactéries tuberculeuses et non-tuberculeuses et les mécanismes sous-jacents. Dans ce chapitre, nous décrirons la pertinence de ce modèle dans l'étude de la virulence et des adaptations des pathogènes intracellulaires mycobactériens et non-mycobactériens à leurs hôtes et notamment le rôle écologique des amibes dans l'émergence de pathogènes. La co-occurrence d'amibes et de mycobactéries dans l'environnement pose des questions épidémiologiques et écologiques et notamment dans le cadre des infections à *M. avium* et à *M. abscessus* pour lesquelles la vie intra-amibienne augmente la virulence. Il apparaît que le modèle amibien d'infection pourrait en particulier contribuer à une meilleure compréhension de la physiopathologie des infections à *M. abscessus*, des facteurs de virulence contribuant à sa survie intracellulaire et finalement de l'évolution de *M. abscessus* en tant que pathogène.

### I. L'incubateur amibien

#### 1.1 Les amibes libres sont des phagocytes environnementaux

Les amibes sont des cellules eucaryotes appartenant au royaume des amoebozoaires parmi les protozoaires (Hampl *et al.*, 2009). Elles ont divergé de la lignée animale/champignon après la séparation des plantes et des animaux mais possèdent de nombreux domaines fonctionnels conservés chez les plantes et les animaux (Eichinger *et al.*, 2005) (**Figure 29**).

On distingue les amibes parasitaires, pathogènes et non pathogènes, dont le cycle de vie dépend d'un hôte (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*), des amibes libres, évoluant de façon autonome dans l'environnement. Celles-ci se nourrissent par phagocytose de nombreux micro-organismes libres ou au sein de biofilms, incluant des algues, des bactéries, des levures et des virus. De la sorte, elles contrôlent l'écologie de communautés microbiennes (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Elles forment un groupe de plus de 15 000 espèces largement répandues dans l'environnement au sein de biofilms et aux interfaces eau/sol, eau/air et eau/plantes où les micro-organismes proies sont abondants et où les conditions de lumière, de température, d'oxygénation et de pH sont compatibles avec la vie amibienne (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Adl *et al.*, 2007). De nombreuses amibes des genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria* sont

aussi retrouvées dans divers systèmes aquatiques construits par l'homme tels que les sources d'eau potable, les piscines, les bains d'hydrothérapie, les douches et les tours aéroréfrigérantes des hôpitaux par exemple (Thomas *et al.*, 2006; Corsaro and Greub, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Thomas and Ashbolt, 2011). La plupart des amibes vivent sous une forme dite trophozoïte, se multipliant par division binaire. Cependant, dans des conditions défavorables (manque de nutriments, hautes/basses températures, dessiccation, concentrations élevées en composés chimiques), les amibes se différencient en une forme dormante, le kyste, constitué de trois couches successives, de l'intérieur vers l'extérieur : l'endocyste, comprenant le noyau baignant dans le cytoplasme, la région claire, et l'exocyste en surface. Cette structure rend les amibes particulièrement résistante à de multiples stress et aux processus de désinfection (Thomas *et al.*, 2004). Par ailleurs, un désenkystement et un retour à une forme trophozoïte sont observés lorsque des conditions de vie favorables sont à nouveau réunies.

Les micro-organismes phagocytés par les amibes suivent la voie endocytique et sont dégradés dans des phagolysosomes acides (ou vacuoles digestives) par de nombreuses hydrolases (Greub and Raoult, 2004a). Cependant, plusieurs virus géants et certaines bactéries ont développé des stratégies d'échappement à la phagocytose amibienne et forment un groupe de



**Tableau 5 | Mycobactéries isolées naturellement au sein d'amibes libres.** « - » : non-identifié.

Mycobactéries	Amibes	Source	Références
<i>M. intracellulare</i>	<i>Acanthamoeba lugdunensis</i> KA/LC6	Solution d'entretien de lentilles de contact	Yu <i>et al.</i> , 2007
<i>M. gordonae</i>	-	Marais	Eddyani <i>et al.</i> , 2008
<i>M. malmoense</i>	-	Réservoir d'eau de pluie	Collingro <i>et al.</i> , 2005
<i>M. mucogenicum</i>	<i>Echinamoeba exundans</i>	Eau ozonée	Thomas <i>et al.</i> , 2008
<i>M. paratuberculosis</i>	-	Champs	White <i>et al.</i> , 2010
	Genre <i>Rosculus</i>	Eau d'une ferme	Samba-Louaka <i>et al.</i> , 2018

**Tableau 6 | Mycobactéries identifiées par la co-culture ambiante.** « - » : non-identifié.

Echantillons	Mycobactéries	Méthode d'identification	Lignée amibienne	Références	
Tissu intestinal humain	<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	IS900	<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18	Mura <i>et al.</i> , 2006	
Réseau d'eau hospitalier	<i>M. xenopi</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. kansasii</i>	ADNr 16S	<i>A. castellani</i> ATCC 30010	Thomas <i>et al.</i> , 2006	
Crachat	<i>M. massiliense</i>	ADNr 16S, <i>rpoB</i>	<i>A. polyphaga</i> Linc-API	Adékambi <i>et al.</i> , 2004	
Eau de rivière	<i>M. frederiksbergense</i> / <i>M. fluoanthenvivorans</i> , <i>M. frederiksbergense</i> , <i>M. gastrii</i> ou <i>M. kansasii</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. insubricum</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. vaccae</i> , <i>M. vanbaalenii</i>	ADNr 16S	<i>A. castellanii</i> ATCC30010	Thomas <i>et al.</i> , 2008	
Biofilm de sable	<i>M. gordonae</i> , <i>M. insubricum</i> , <i>M. poriferae</i>	ADNr 16S	-		
Sable filtré	<i>M. septicum</i> / <i>M. peregrinum</i>	ADNr 16S	-		
Eau ozonée	<i>M. gordonae</i> , <i>M. fluoanthenvivorans</i>	ADNr 16S	-		
Biofilm de charbon actif granulaire	<i>M. fluoanthenvivorans</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. neglectum</i>	ADNr 16S	-		
Eau filtrée au charbon	<i>M. frederiksbergense</i> / <i>M. fluoanthenvivorans</i>	ADNr 16s	-		
Points distants du réseau de distribution d'eau	<i>M. anthracenicum</i> , <i>M. frederiksbergense</i> / <i>M. fluoanthenvivorans</i> , <i>M. gadium</i> , <i>M. neglectum</i> , <i>M. vanbaalenii</i>	ADNr 16S	-		
Fontaine	<i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. moncense</i>	ADNr 16S	<i>A. polyphaga</i> Linc-API		Pagnier <i>et al.</i> , 2008
Lac	<i>M. neoaurum</i>	ADNr 16S	-		
Sol (sites de déversement illégaux, champs)	<i>M. vanbaalenii</i> , <i>M. rhodesiae</i> , <i>M. frederiksbergense</i> , <i>M. neoaurum</i>	<i>hsp65</i>	<i>A. culberstoni</i>		Wang <i>et al.</i> , 2006
TAR	<i>M. chelonae</i> , <i>M. phocaicum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. conceptionense</i> , <i>M. chimaera</i>	<i>rpoB</i>	<i>A. polyphaga</i> Linc-API	Pagnier <i>et al.</i> , 2009	

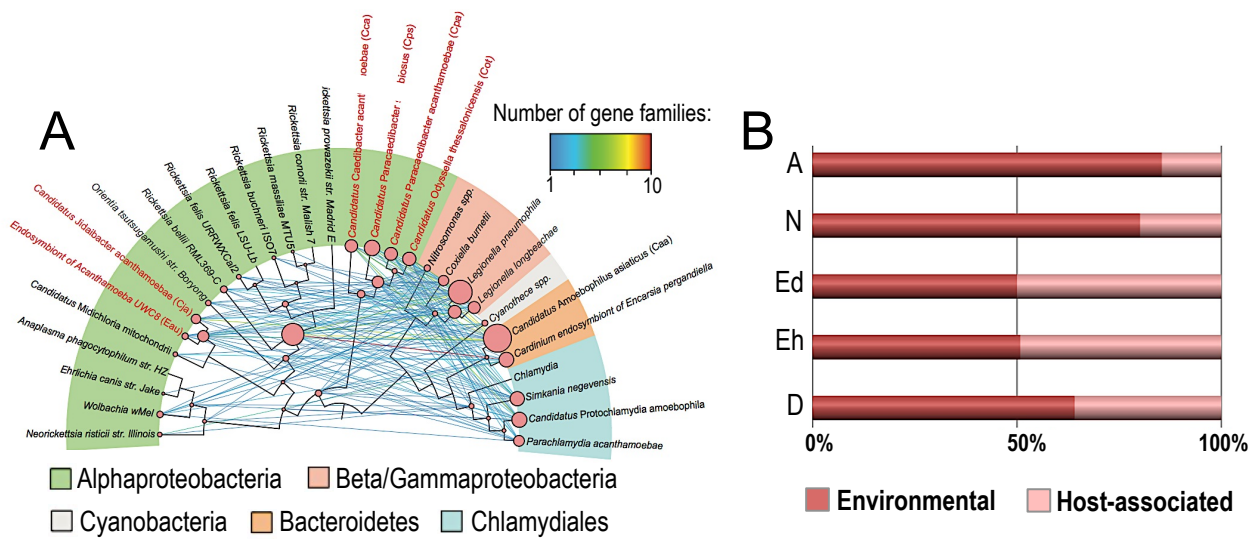
TAR : tours aéroréfrigérantes.

micro-organismes résistant aux amibes ou ARM (amoeba-resistant micro-organisms) (**Figure 30**). Ces micro-organismes vivent de façon commensale au sein de l'amibe ou bien se multiplient dans l'amibe avant de la lyser, d'où le concept de réservoir ou incubateur amibien. Certains ARM résistent également à l'enkystement amibien. Les kystes métaboliquement inactifs, peuvent rester viables jusqu'à 24 ans à 4°C dans l'eau et pourraient donc être des réservoirs pour ces micro-organismes dans les réseaux d'eau (Mazur *et al.*, 1995).

## 1.2 Les amibes libres : un « melting pot » bactérien ?

Les premiers endosymbiotes d'amibes observés furent des bactéries (Proca-Ciobanu *et al.*, 1975). Parmi les bactéries endosymbiotes naturels des amibes figurent les genres *Chlamydiae* et *Legionellae* (Rowbotham, 1980; Fritsche *et al.*, 1993). Les amibes du genre *Acanthamoeba* contiennent souvent des endosymbiotes bactériens, et environ 5% des symbiotes isolés par Fritsche et coll. sont de nouvelles bactéries de la famille des *Chlamydiae* (Fritsche *et al.*, 1993; Fritsche *et al.*, 2000). Une grande variété d'ARM, dont des bactéries résistantes aux amibes (ARB, amoeba-resistant bacteria), ont par la suite été isolées de co-cultures amibiennes ou identifiées chez l'hôte infecté par une étape d'amplification en amibes (enrichissement amibien) (Horn and Wagner, 2004; Greub and Raoult, 2004a; Jacquier *et al.*, 2013). De plus, de nombreuses bactéries survivent dans les amibes *in vitro* (Greub and Raoult, 2004a; Wagner *et al.*, 2006). Ces bactéries représentent de nombreux embranchements incluant les *Actinobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Chlamydiales*, les *Firmicutes* et différentes subdivisions des *Proteobacteria* (alpha, bêta, gamma, epsilon). Finalement, parmi 539 espèces bactériennes listées comme étant pathogènes pour l'homme et l'animal, 102 sont décrites dans la littérature comme étant capables de résister à la phagocytose amibienne et de proliférer potentiellement dans l'amibe (Thomas and McDonnell, 2007).

Concernant les mycobactéries, des études expérimentales ont tout d'abord prouvé la réalité des interactions amibes-mycobactéries. Ces études ont été menées avec l'amibe *A. castellanii*. La quantification des bactéries intracellulaires est réalisée par différentes méthodes : comptage microscopique des mycobactéries après coloration au Ziehl, marquage fluorescent, comptage en microscopie électronique), ou bien par comptage des unités formant colonies (UFC), et enfin par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative (Cirillo *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 1998a ; Strahl *et al.*, 2001 ; Whan *et al.*, 2006). Tout particulièrement, ces deux dernières méthodes nécessitent une élimination des bactéries extracellulaires par l'emploi d'antibiotiques ou d'acide chlorhydrique 3% (Cirillo *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 1998b). Une cinquantaine d'espèces mycobactériennes phagocytées sont résistantes à la phagocytose amibienne (Ben Salah *et al.*, 2009b). Toutes ces espèces sont capables de survivre dans les trophozoïtes amibiens, exceptées les souches *M. bovis* BCG Pasteur et Tokyo, contrairement à la souche parentale *M. bovis* (Taylor *et al.*, 2003). Plusieurs associations naturelles entre amibes et mycobactéries ont été prouvées : *M. intracellulare*, *M. gordonae* et *M. malmoense*, *M. mucogenicum* et *M. paratuberculosis* ont été retrouvées associées aux amibes dans l'environnement (Yu *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008 ; Eddyani *et al.*, 2008 ; White *et al.*, 2010; Samba-Louaka *et al.*, 2018) (**Tableau 5**). Une étude en faveur de l'hypothèse d'un réservoir amibien montre que des protozoaires tels que *Dictyostellium discoideum* peuvent être une source et une niche pour l'échange horizontal de gènes des mycobactéries comme *M. avium* avec d'autres ARB telles que *L. pneumophila* (Lamrabet *et al.*, 2012a). De plus, *M. avium* et *L. pneumophila* peuvent coexister au sein de l'amibe sans entrer en compétition, suggérant une possible vie des mycobactéries dans les amibes parmi la communauté d'ARB symbiotiques (Lamrabet *et al.*, 2012a). Par ailleurs, la culture de mycobactéries sur lysat d'amibes permet une croissance des mycobactéries similaire à celle observée en milieu riche, confirmant que l'amibe peut favoriser la répli-

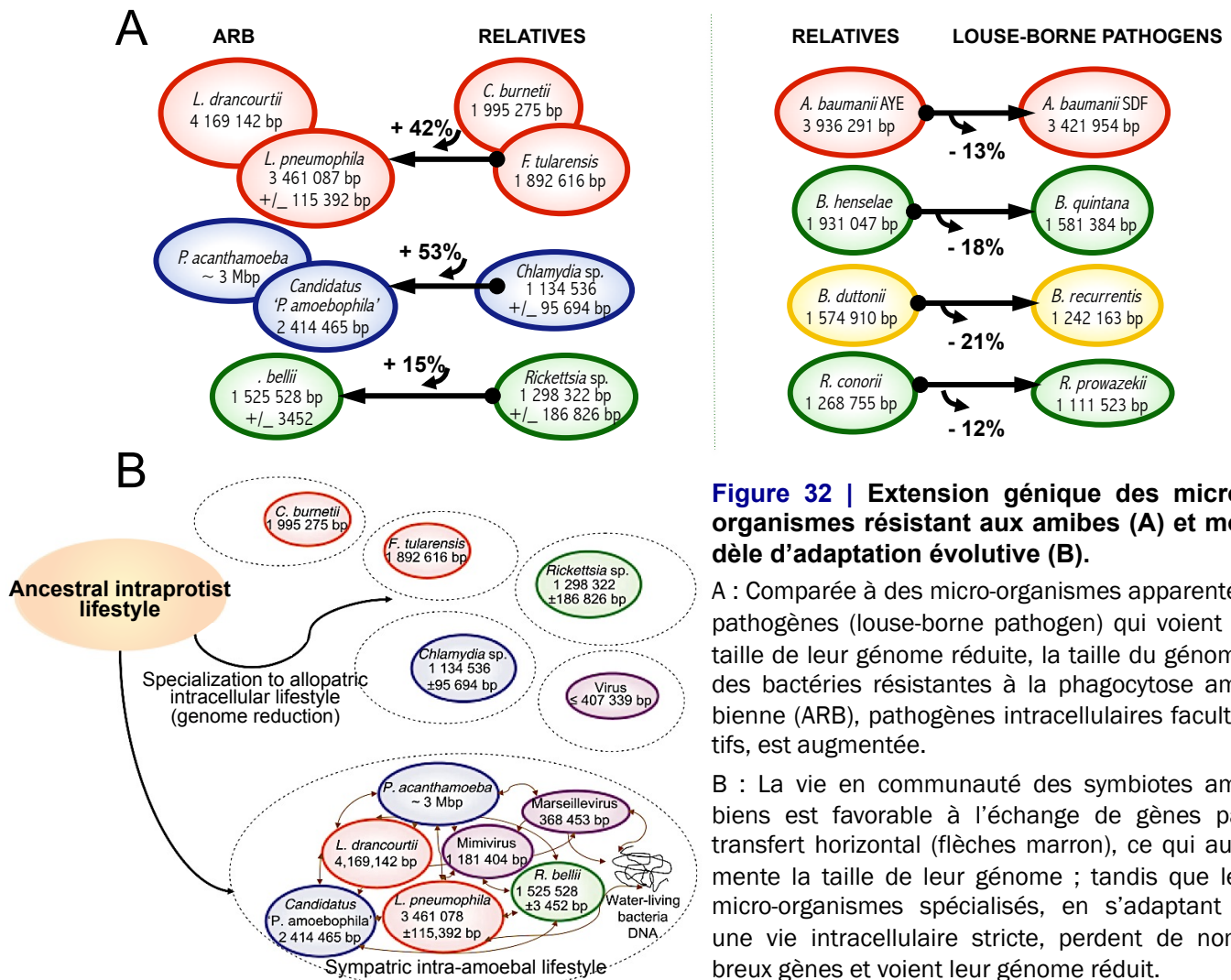


**Figure 31 | Echanges génétiques entre bactéries résistantes aux amibes et amibes.**

A : Exemple de transferts horizontaux de gènes entre bactéries résistantes aux amibes (ARB) (les *Rickettsiales* et autres ARB éloignées).

B : Transfert horizontal de gènes entre amibes et ARB environnementales. A : *Acanthamoeba*. N : *Naegleria*. Ed : *Entamoeba Dispar*. Eh : *Entamoeba histolytica*. D : *Dictyostelium*.

(Adapté de Wang *et al.*, 2017 (A) et Clarke *et al.*, 2013 (B))



**Figure 32 | Extension génique des micro-organismes résistant aux amibes (A) et modèle d'adaptation évolutive (B).**

A : Comparée à des micro-organismes apparentés pathogènes (louse-borne pathogen) qui voient la taille de leur génome réduite, la taille du génome des bactéries résistantes à la phagocytose amibienne (ARB), pathogènes intracellulaires facultatifs, est augmentée.

B : La vie en communauté des symbiotes amibiens est favorable à l'échange de gènes par transfert horizontal (flèches marron), ce qui augmente la taille de leur génome ; tandis que les micro-organismes spécialisés, en s'adaptant à une vie intracellulaire stricte, perdent de nombreux gènes et voient leur génome réduit.

(Adapté de Moliner *et al.*, 2010)

cation des mycobactéries en leur fournissant les facteurs nécessaires à cette croissance selon leur propension à vivre de façon saprophytique dans les amibes (Lamrabet *et al.*, 2012b).

Enfin, si certaines mycobactéries peuvent être détectées en grande quantité dans des biofilms et des aérosols, une grande proportion de mycobactéries ne peut être cultivée par des moyens conventionnels. En contrepartie, la co-culture amibienne a permis l'isolement de diverses mycobactéries résistantes à la phagocytose amibienne, dans des fontaines d'eau, dans des réseaux d'eau hospitaliers ou encore au sein de tours aéroréfrigérantes, et chez des individus infectés (**Tableau 6**). C'est par exemple ainsi que *M. massiliense* a été isolée par Adékambi et coll. du crachat d'un patient présentant une pneumopathie hémoptique alors que la mycobactérie n'était pas détectée par des analyses microbiologiques classiques (Adékambi *et al.*, 2004). De plus, la présence de certaines amibes telle que *A. polyphaga* dans un réseau d'eau hospitalier a été corrélée significativement à la présence de mycobactéries (Thomas *et al.*, 2008). Au Bénin, une dizaine d'espèces mycobactériennes ont été identifiées dans des sources d'eau où différentes espèces d'amibes furent également détectées (Eddyani *et al.*, 2008). De plus, les mycobactéries d'origine terrestre ou aquatique ont souvent été isolées par co-culture avec l'amibe *A. polyphaga* (Thomas and McDonnell, 2007; Pagnier *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2008). Finalement, Delafont et coll. ont décrit la présence de MNT dans plus de 87% des amibes collectées de réseaux d'eau potable (Delafont *et al.*, 2014). Le tout suggère que les mycobactéries environnementales sont des proies potentielles d'amibes dans des environnements où elles cohabitent et soutient l'hypothèse de l'existence d'un réservoir amibien des mycobactéries.

### 1.3 Évolution des ARB au sein des amibes libres

La vie intra-amibienne des ARB est le résultat d'adaptations liées à des modifications de leur génome par duplication de gènes non essentiels et par acquisition horizontale de gènes (Ochman *et al.*, 2000; Hughes, 2002). En effet,

au sein de l'amibe, des échanges de gènes par transferts horizontaux peuvent avoir lieu entre ARB d'un même phylum et ARB de phyla différents (Wang *et al.*, 2017) (**Figure 31A**). Parmi les gènes acquis par transfert horizontal chez les *Rickettsiae* figurent une ATP/ADP (adénosine di/triphosphate) translocase d'un ancêtre de *Chlamydiae* permettant le parasitisme par import de l'ATP de l'hôte en échange d'ADP (Greub and Raoult, 2003a). Le système de sécrétion de type IV (T4SS), codant tous les gènes requis pour le transfert de gènes par conjugaison bactérienne et également impliqué dans la sécrétion de facteurs de virulence, est aussi présent chez ces deux ARB, ainsi que chez *L. pneumophila* (Segal *et al.*, 1998). L'analyse du génome des amibes montre également des échanges génétiques entre les endosymbiotes et leur hôte, avec une prépondérance de gènes bactériens retrouvés dans les génomes amibiens, provenant en majorité de bactéries environnementales chez les genres *Acanthamoeba* et *Dictyostelium*, et provenant de bactéries environnementales ou associées à des hôtes de façon équivalente chez le genre *Entamoeba* (Clarke *et al.*, 2013) (**Figure 31B**).

En comparant les génomes de bactéries intracellulaires facultatives endosymbiotes d'amibes et de bactéries intracellulaires strictes à d'autres bactéries proches portées par des poux, Moliner et coll. ont mis en évidence une expansion génomique chez les endosymbiotes amibiens comparés aux bactéries spécialisées, subissant une réduction génomique (Moliner *et al.*, 2009) (**Figure 32A**). Les échanges de gènes entre ARB expliquent cette expansion génomique (**Figure 32B**). Cette théorie est en faveur de l'hypothèse d'une émergence de nouveaux pathogènes au sein du réservoir amibien. Ainsi, parmi les ARB, la découverte de pathogènes respiratoires émergents comme *Parachlamydia acanthamoebae* et *Simkania negevensis* suggère que la vie intra-amibienne pourrait induire des adaptations et modifications génomiques favorables à la naissance de nouveaux pathogènes (Le Faou *et al.*, 2001; Corsaro *et al.*, 2002). Ces modifications génomiques, étendues sur plusieurs millions d'années, ont pu remodeler la



machinerie microbicide des amibes libres et conduire au développement de stratégies de résistance des proies à la phagocytose amibienne.

Chez les mycobactéries, des analyses de génomique comparative ont montré l'existence d'un ancêtre commun dans l'environnement qui aurait évolué vers une forme de mycobactéries née du sol et de l'eau comme *M. avium* et *M. intracellulare*, vers les espèces associées à des hôtes humains ou animaux comme *M. avium subsp. paratuberculosis* et *M. avium subsp. avium*, les espèces du MTBC et *M. leprae* (Ahmed *et al.*, 2007; Stinear *et al.*, 2008; Turenne *et al.*, 2008). Cela supporte l'hypothèse que l'évolution des mycobactéries a pu être influencée par le contact avec les amibes. La pathogénicité de cet ancêtre commun aurait été modulée par des échanges de gènes avec d'autres ARB et entre mycobactéries. Certaines mycobactéries auraient par la suite subi une réduction génomique importante, comme les espèces du MTBC et *M. leprae*, les accommodant à un style de vie intracellulaire strict chez leurs hôtes humains et animaux ; tandis que d'autres auraient gardé une capacité à vivre dans l'environnement, comme *M. marinum*, *M. avium* ou encore *M. abscessus*. En effet, en comparant la taille du génome de mycobactéries saprophytes (*M. smegmatis* :  $\approx$  7,0 Mb), de pathogènes opportunistes (*M. avium* :  $\approx$  5,5 Mb, *M. abscessus* :  $\approx$  5,0 Mb) et de pathogènes stricts (*M. tuberculosis* :  $\approx$  4,5 Mb, *M. leprae* :  $\approx$  3,0 Mb), une décroissance est notable parmi les espèces associées à des hôtes humains ou animaux. Toutefois, l'évolution des mycobactéries n'est pas seulement le résultat de réductions génomiques. En effet, des transferts horizontaux de gènes ont été démontrés chez des espèces pathogènes du MTBC et chez *M. abscessus* (Gutierrez *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2009; Fitzpatrick, 2009). Une étude récente montre que *M. marinum* et *M. avium* ont acquis des éléments génétiques mobiles de différentes sources incluant des micro-organismes phylogénétiquement distants. *M. marinum* pourrait ainsi échanger activement des gènes avec d'autres mycobactéries environnementales et pathogènes opportunistes. Le transfert de la séquence

d'insertion *IS6110* entre *M. smegmatis* et les espèces du MTBC, et sa découverte dans une autre espèce environnementale, *Mycobacterium sp.* souche JLS, suggère que ces espèces ont probablement occupé la même niche (Coros *et al.*, 2008). De la même façon, un pool de gènes mobiles est partagé entre *M. smegmatis*, *M. abscessus* ainsi que *Mycobacterium sp.* souche JDM601, suggérant une niche commune à ces trois espèces (Reva *et al.*, 2015). La majorité des mycobactéries étant résistantes à la phagocytose amibienne, l'amibe constitue probablement une niche commune à ces bactéries, favorisant les échanges de gènes inter- et intra-espèces comme cela a pu être démontré chez des endosymbiotes amibiens non-mycobactériens.

#### 1.4 Amibes et émergence de maladies chez l'homme

Les amibes constituent un intermédiaire vraisemblable entre certaines bactéries endosymbiotiques et l'homme (Rowbotham, 1980). En effet, des associations entre amibes et *L. pneumophila* au sein du réseau d'eau hospitalier ont été démontrées, suggérant que les amibes constituent un réservoir intermédiaire (Thomas *et al.*, 2006). Des associations similaires ont été également rapportées pour les mycobactéries. Les aérosols seraient le moyen de transmission prédominant des ARB à l'homme, comme cela a été démontré pour *L. pneumophila* (Hart and Makin, 1991). Les ARB peuvent être transmises sous forme libre ou bien associées à des amibes ou encore empaquetées dans des vésicules larguées par les amibes et qui peuvent contenir des milliers de bactéries (Rowbotham, 1986; Greub and Raoult, 2004a). Ce dernier processus, permettant aux amibes de retarder leur lyse suite à la réplication des ARB lytiques, a été décrit chez les genres *Legionella*, *Parachlamydia* et *Burkholderia* (Berk *et al.*, 1998; Inglis *et al.*, 2000; Greub and Raoult, 2002). *P. acanthamoebae*, endosymbiote de l'amibe *A. polyphaga* entre 25 et 30 °C, induit la lyse de celle-ci entre 32 et 37 °C (Greub and Raoult, 2003c), une caractéristique qui pourrait permettre à la bactérie d'être internalisée chez l'hôte ou l'animal « sans être vue »



lorsque l'amibe colonise les muqueuses nasales où la température avoisine les 30°C. Puis, lorsque l'amibe atteint le tractus respiratoire où la température est davantage élevée (~37°C), elle serait lysée par la bactérie, ce qui déclencherait l'infection.

La transmission de certaines mycobactéries à un nouvel hôte amibien ou leur libération dans l'environnement pourrait être également médiée par la lyse de l'hôte premièrement infecté : en effet des mycobactéries comme *M. avium* et *M. abscessus* sont partiellement lytiques tandis que d'autres, comme *M. chelonae*, sont totalement lytiques après une co-culture prolongée (au-delà de 5 jours) (Cirillo *et al.*, 1997; Pagnier *et al.*, 2008).

D'autre part, l'amibe constitue une armure protectrice pour les ARB résistantes à l'enkystement amibien. *In vitro*, 26 espèces de mycobactéries survivent à l'enkystement amibien (Adékambi *et al.*, 2006). Parmi ces espèces, 20 sont présentes dans des systèmes de distribution des eaux (Vaerewijck *et al.*, 2005). Dans les eaux, le kyste pourrait protéger les mycobactéries de divers stress et notamment des biocides comme la chlorure, ce qui pourrait contribuer au passage des bactéries des eaux de sources aux eaux potables traitées (Le Dantec *et al.*, 2002; Whan *et al.*, 2006). De façon générale, les ARB sont protégées des biocides au sein des kystes (Steinert *et al.*, 1998b; Kahane *et al.*, 2001; Coulon *et al.*, 2010). Par conséquent, les kystes jouent un rôle important dans la persistance de ces micro-organismes dans l'environnement, expliquant la faible efficacité de biocides et de procédures de stérilisation ainsi que l'occurrence de pseudo-épidémies en leur présence (Greub and Raoult, 2003b; Storey *et al.*, 2004; Dupuy *et al.*, 2014). De plus, au sein des kystes amibiens, les mycobactéries doivent faire face à des conditions de vie anaérobie. Les kystes pouvant perdurer dans l'environnement des dizaines d'années, des mécanismes d'adaptation à de telles conditions de vie ont pu apparaître chez certaines mycobactéries, qui seraient favorables à une vie intracellulaire où les apports en oxygène sont limités; par analogie aux adaptations développées par *M. tuber-*

*culosis*, une bactérie aérobie qui peut survivre de longues périodes d'anaérobiose par induction du régulon de la dormance, également activé durant les infections latentes à *M. tuberculosis* chez l'homme (Martin I. Voskuil *et al.*, 2009). Alors que les ARB non-mycobactériennes résistantes à l'enkystement sont retrouvées dans l'endocyste, les mycobactéries sont retrouvées dans l'exocyste, la partie la plus externe du kyste ; ce qui pourrait faciliter leur libération rapide des kystes au cours du processus de déenkystement (Ben Salah and Drancourt, 2010).

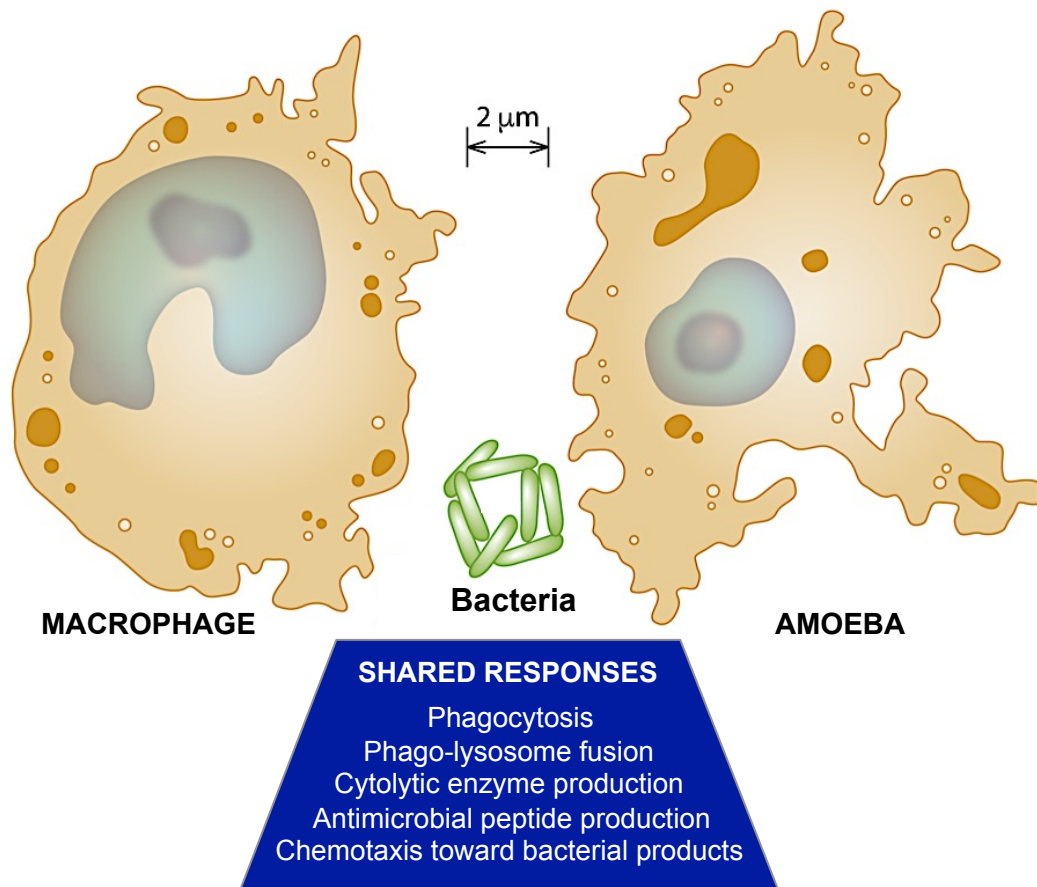
Enfin, les ARB pourraient développer une résistance à certains antibiotiques au sein de l'hôte amibien, ce qui expliquerait indirectement, leur succès infectieux (Barker *et al.*, 1995). La vie intra-kystique protégerait davantage les mycobactéries de certains antibiotiques en comparaison à la vie intra-macrophagique (Miltner and Bermudez, 2000). Par ailleurs, des co-infections avec mycobactéries et des amibes du genre *Acanthamoeba* ont été rapportées chez des individus immunodéprimés et chez des individus immunocompétents (Sison *et al.*, 1995; Walochnik *et al.*, 2008). Les amibes constituant une niche favorable à la réplication de mycobactéries pathogènes stricts ou pathogènes opportunistes et favorisant leur résistance aux antibiotiques, de telles infections deviennent particulièrement difficiles à traiter. Parmi les questions épidémiologiques liées à l'écologie des ARB, la connaissance des interactions amibes-mycobactéries est d'un intérêt particulier pour **(1)** mesurer la contribution, encore peu connue, des amibes au succès infectieux des mycobactéries ; **(2)** mieux comprendre les facteurs et les mécanismes sous-jacents à la virulence des mycobactéries et leur transmission.

## II. Les amibes, des modèles d'étude de la virulence des ARB ?

### 2.1 L'amibe, un ancêtre du macrophage ?

De nombreuses ressemblances entre amibes et macrophages font que l'amibe est aujourd'hui perçue comme un ancêtre évolutif des macrophages (Siddiqui and Khan, 2012) (**Figure 33**). L'amibe se nourrit par phagocytose





**Figure 33 | Réponses communes du macrophage et de l'amibe au contact de bactéries.**

Amibes et macrophages sont capables de détecter (par chimiotactisme) et d'ingérer des bactéries par un mécanisme de phagocytose. Le phagosome contenant les bactéries fusionne avec le lysosome contenant des enzymes cytolitiques. Les bactéries ingérées sont digérées dans le phagolysosome via l'action de ces enzymes et de peptides antimicrobiens.

(Adapté de Claeys and Robinson, 2018)

et digère ses proies au sein de vacuoles acides, autant de caractéristiques partagées avec les macrophages de mammifères (Barker and Brown, 1994; Stuart and Ezekowitz, 2005; Greub and Raoult, 2004a; Clarke *et al.*, 2013). Par exemple, l'analyse du génome de *A. castellanii* montre la présence de plusieurs types de PRRs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes tels que les récepteurs lectine de type C ou liant le mannose, le LPS et le peptidoglycane (Clarke *et al.*, 2013). La voie MAPK, participant à l'immunité innée, est présente chez l'amibe et serait activée suite à la reconnaissance des proies par les PRRs (Arthur and Ley, 2013). Plusieurs protéines de l'immunité innée induites par l'interféron sont présentes dans le génome d'*A. castellanii* dont deux protéines guanosine triphosphatases (GTPase) qui activent l'immunité cellulaire autonome chez les vertébrés contre les bactéries intracellulaires, dont les espèces appartenant aux genres *Mycobacterium* et *Legionella* (MacMicking, 2012). De plus, *A. castellanii* contient un homologue de la protéine NRAMP du macrophage, impliquée dans la protection contre *L. pneumophila* et *M. avium* et un homologue de la protéine NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles produisant des dérivés oxygénés pendant la phagocytose qui contribuent à l'élimination des bactéries internalisées (Davies and Edwards, 1991; Peracino *et al.*, 2006). Chez l'amibe sociale (pluricellulaire) *D. discoideum*, des cellules dites sentinelles possèdent la capacité de phagocyter *L. pneumophila* et d'éliminer la bactérie. Cette propriété est dépendante d'une protéine comportant un domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor), parmi les protéines jouant le rôle d'adaptateur ou d'effecteur des voies activées par les TLR et initiant les programmes transcriptionnels modulant des réponses de défense spécifiques (Chen *et al.*, 2007). Chez cette même amibe, la protéine NRAMP-1 participe à l'élimination de *L. pneumophila* et *M. avium* une fois phagocytées (Peracino *et al.*, 2006). Ainsi, du fait des homologies entre la machinerie microbicide des amibes et des macrophages, certaines stratégies développées par les ARB pour résister aux amibes pourraient également per-

mettre aux ARB de survivre à la phagocytose des macrophages quand elles rencontrent un animal ou l'homme.

## 2.2 Apprêtement amibien à la vie intramacrophagique : l'exemple de *L. pneumophila*

Des modèles pour tester la virulence des ARB ont été développés chez *D. discoideum* (Hägele *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2000; Solomon and Isberg, 2000; Pukatzki *et al.*, 2002; Cosson *et al.*, 2002). La virulence de certaines bactéries pathogènes mutées a été testée par évaluation des plages de lyse formées par des ARB virulentes induisant la lyse des amibes, ce qui a permis, par exemple, la mise en évidence du rôle du quorum-sensing et du T2SS dans la virulence de *P. aeruginosa* (Pukatzki *et al.*, 2002). Par ailleurs, des mutants de *D. discoideum* ont permis d'identifier différentes voies amibiennes participant aux interactions avec les ARB phagocytées (Tosetti *et al.*, 2014). La cornine et de nombreuses protéines associées au cytosquelette ou encore des protéines se liant au calcium contrôlent l'internalisation et la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* (Fajardo *et al.*, 2004). Les protéines Phg1 (protéine de la famille 9TM) et Kil1 (sulfotransférase) contribuent à l'élimination du pathogène *Klebsiella pneumoniae* (Benghezal *et al.*, 2006).

Les interactions de *L. pneumophila* avec différentes amibes (*D. discoideum*, *A. castellanii* et *Hartmannella vermiformis*) constituent l'exemple le mieux décrit de stratégies communes à la survie intracellulaire en amibes et en macrophages d'un pathogène intracellulaire :

- (1) les bactéries sont phagocytées par « coiling » (Horwitz, 1983; Bozue and Johnson, 1996) ;
- (2) la fusion phago-lysosomale est empêchée (Horwitz, 1983; Bozue and Johnson, 1996) ;
- (3) les bactéries internalisées se trouvent au sein de vésicules attachées à la membrane plasmique et associées au réticulum endoplasmique rugueux (Swanson and Isberg, 1995; Abu Kwaik, 1996) ;



- (4) une multiplication bactérienne intracellulaire est observée (Horwitz and Silverstein, 1980; Rowbotham, 1980) ;
- (5) les cellules-hôtes sont lysées et libèrent les bactéries (Horwitz and Silverstein, 1980; Rowbotham, 1980).

Au niveau moléculaire, la première preuve montrant que des gènes similaires sont requis pour la survie intracellulaire de *L. pneumophila* en amibes et en macrophages a été apportée par Cianciotto et Fields, qui ont montré que le gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*), impliqué dans la survie intra-macrophagique de *L. pneumophila*, est requis pour la survie ainsi que la multiplication de la bactérie en amibes (Cianciotto and Fields, 1992). Puis, le criblage en amibes et en macrophages d'une banque de mutants de transposition de *L. pneumophila* a permis d'identifier 89 gènes impliqués dans l'adhérence aux amibes et aux macrophages, dans la survie et la réplication de la bactérie dans ces cellules ou bien contribuant à la cytotoxicité de la bactérie envers ces cellules (Gao *et al.*, 1997).

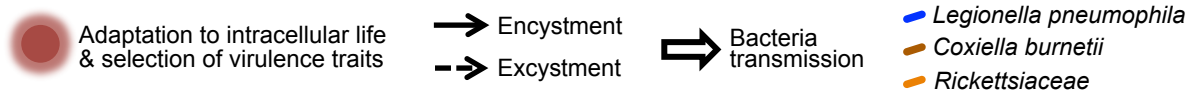
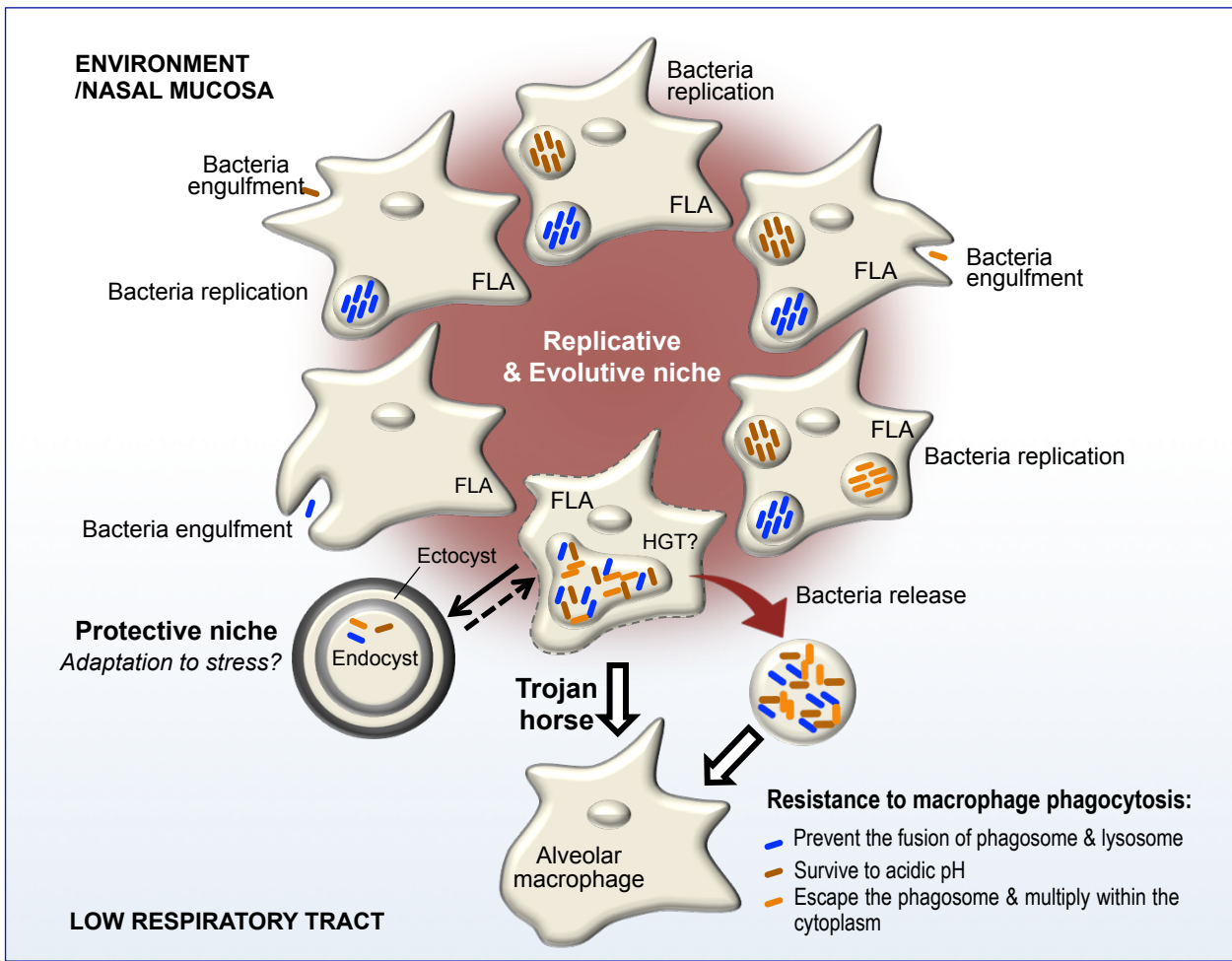
La survie de la bactérie dans les monocytes est favorisée par la vie intra-amibienne (Cirillo *et al.*, 1999). Ce concept d'apprêtement amibien a été suggéré tôt dans l'histoire de l'étude des interactions entre *L. pneumophila* et les amibes, la vie intra-amibienne favorisant la résistance de la bactérie à des conditions de haute température, d'osmolarité et d'acidité en comparaison à la vie *in vitro*, des conditions rencontrées dans le macrophage (Barker and Brown, 1994). Puis, l'apprêtement amibien a été pleinement décrit par l'étude du transcriptome de plusieurs souches de *L. pneumophila* infectant l'amibe *A. castellanii* (Bruggemann *et al.*, 2006). Comme prédit pour des micro-organismes transitant de phagocytes à l'eau, le cycle de vie de *L. pneumophila* consiste en au moins deux phases : la phase répliative, pendant laquelle la bactérie est avirulente et non-motile, et la phase de transmission où la bactérie devient virulente et motile. Le passage d'une phase répliative à une phase de transmission est déclenché lorsque les nutriments nécessaires à la multiplication de la bactérie viennent à man-

quer. Ce mode de vie diphasique de la bactérie est observé en amibes (Bruggemann *et al.*, 2006). Chaque phase est caractérisée par un profil transcriptomique particulier, prouvant que la vie intra-amibienne induit des adaptations de la bactérie lui permettant d'effectuer son cycle infectieux : survie et réplication dans l'amibe avant de la lyser pour finalement se propager (Bruggemann *et al.*, 2006). L'identification de gènes bactériens induits spécifiquement dans l'amibe expliquerait une virulence augmentée de la bactérie cultivée *in vivo*. L'induction du système de sécrétion de type IV pendant les phases de réplication et de transmission permet le transfert de macromolécules dans la cellule-hôte empêchant la fusion phagolysosomale, et donc l'élimination de la bactérie. Pendant la phase de transmission, l'induction de gènes induisant la transmission de la légionnelle, comme les gènes impliqués dans la biogenèse du flagelle, la survie intracellulaire (incluant des gènes de réponse aux stress oxydatifs rencontrés dans l'amibe), et la manipulation d'un futur hôte par l'expression de gènes eucaryotes-like, participent au pouvoir pathogène de cette bactérie.

En conclusion, l'hôte amibien est une niche protectrice et évolutive des ARB, favorisant l'évolution de mécanismes d'adaptation à la survie intracellulaire (apprêtement) comme l'inhibition de la maturation phagosomale (chez *L. pneumophila*), la survie à des pH acides (chez les *Rickettsiae*) ou encore la capacité à s'échapper du phagosome et à se multiplier dans le cytoplasme (chez *Coxiella burnettii*) (**Figure 34**).

### III. Les modèles amibiens appliqués à l'étude des interactions macrophages-mycobactéries

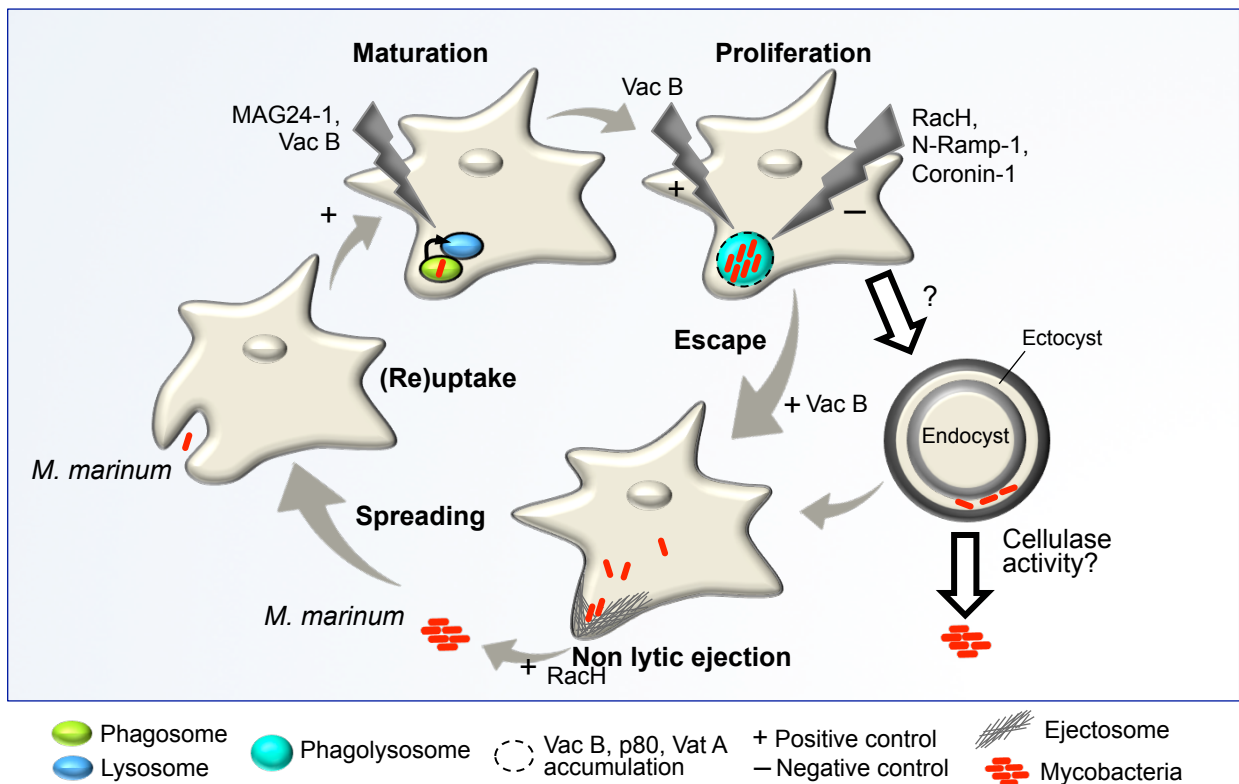
Plusieurs déterminants moléculaires impliqués dans les interactions amibes-mycobactéries ont été découverts grâce au modèle *D. discoideum*. Ces déterminants sont aussi impliqués dans les interactions macrophages-mycobactéries et prouvent la pertinence du modèle amibien dans l'étude de telles interactions. Par exemple :



**Figure 34 | Rôle des amibes libres dans l'écologie et la pathogénicité des bactéries résistantes à la phagocytose amibienne.**

Les amibes libres (FLA) constituent à la fois une niche favorable à la réplication (niche réplivative) des bactéries résistantes à la phagocytose amibiennes (ARB) et une niche où ces bactéries acquièrent potentiellement de nouveaux gènes (niche évolutive) favorables à leur vie endosymbiotique ou à leur virulence par échange horizontal de gènes avec d'autres ARB, ou avec l'hôte amibien (cas de bactéries se multipliant dans le noyau des amibes, non-représenté ici). Les FLA enkystées sont aussi une niche protectrice pour les ARB, formant un bouclier contre différents biocides ; et pourraient également être le lieu d'adaptations des bactéries à des stress environnementaux (hypoxie) par la suite favorables à la colonisation d'autres phagocytes. Les FLA pourraient servir de cheval de Troie à la colonisation d'hôtes humains ou animaux. Le pouvoir pathogène augmenté des ARB favoriserait la résistance à la phagocytose de cellules immunitaires de l'hôte comme les macrophages ; par différents mécanismes : **(1)** empêchement de la fusion phagolysosomale (*Legionella pneumophila*), **(2)** survie au pH acide des lysosomes (*Coxiella burnetii*), **(3)** échappement du phagosome et multiplication intracytoplasmique (*Rickettsiaceae*).

(Adapté de Greub and Raoult, 2004a)



**Figure 35 | Mécanismes d'interaction entre *M. marinum* et l'amibe *D. discoideum*.**

Après la phagocytose de *M. marinum* par l'amibe *D. discoideum*, un phagosome se forme qui acquiert de façon transitoire les marqueurs vacuolaires d'endosome précoce, puis la vacuoline Vac B s'accumule tandis que *M. marinum* synthétise la protéine MAG24-1. La présence de VacB à la surface du phagosome et de MAG24-1 est essentielle à l'établissement d'une niche favorable à la réplication bactérienne, les protéines RacH, N-Ramp-1 et Coronine-1 vont contribuer à l'élimination de la bactérie par la voie endocytique classique menant à la formation d'un phagolysosome alors que la protéine Vac B est associée à une survie intracellulaire augmentée de la bactérie. La protéine Vac B contribuerait à l'échappement de *M. marinum* du phagosome tandis que RacH contribue à la transmission de la bactérie via la formation de l'éjectosome contribuant à l'éjection non-lytique de *M. marinum*.

(Adapté de Salah *et al.*, 2009)



- un îlot de pathogénicité identifié chez *M. avium*, est requis pour l'invasion des amibes et des macrophages (Danelishvili *et al.*, 2007), probablement acquis par transfert horizontal étant donné son %G+C et le fait qu'il soit absent chez *M. tuberculosis* et *M. paratuberculosis* ;
- l'étude de la survie de *M. smegmatis* mutée dans les gènes *mspA* et *mspC*, codant des porines, confirme également l'importance de la perméabilité de l'OM pour la survie intracellulaire des mycobactéries en amibes et en macrophages (Sharbati-Tehrani *et al.*, 2005).

Chez *A. castellanii*, des mécanismes similaires d'échappement de *M. avium* à la phagocytose sont observés comparativement à une lignée de macrophages murins (Cirillo *et al.*, 1997). En effet, *M. avium* évite la dégradation par les lysosomes des hôtes amibiens et macrophages (Cirillo *et al.*, 1997).

Le tout suggère que les modèles amibiens sont pertinents pour étudier les interactions entre les mycobactéries et les macrophages.

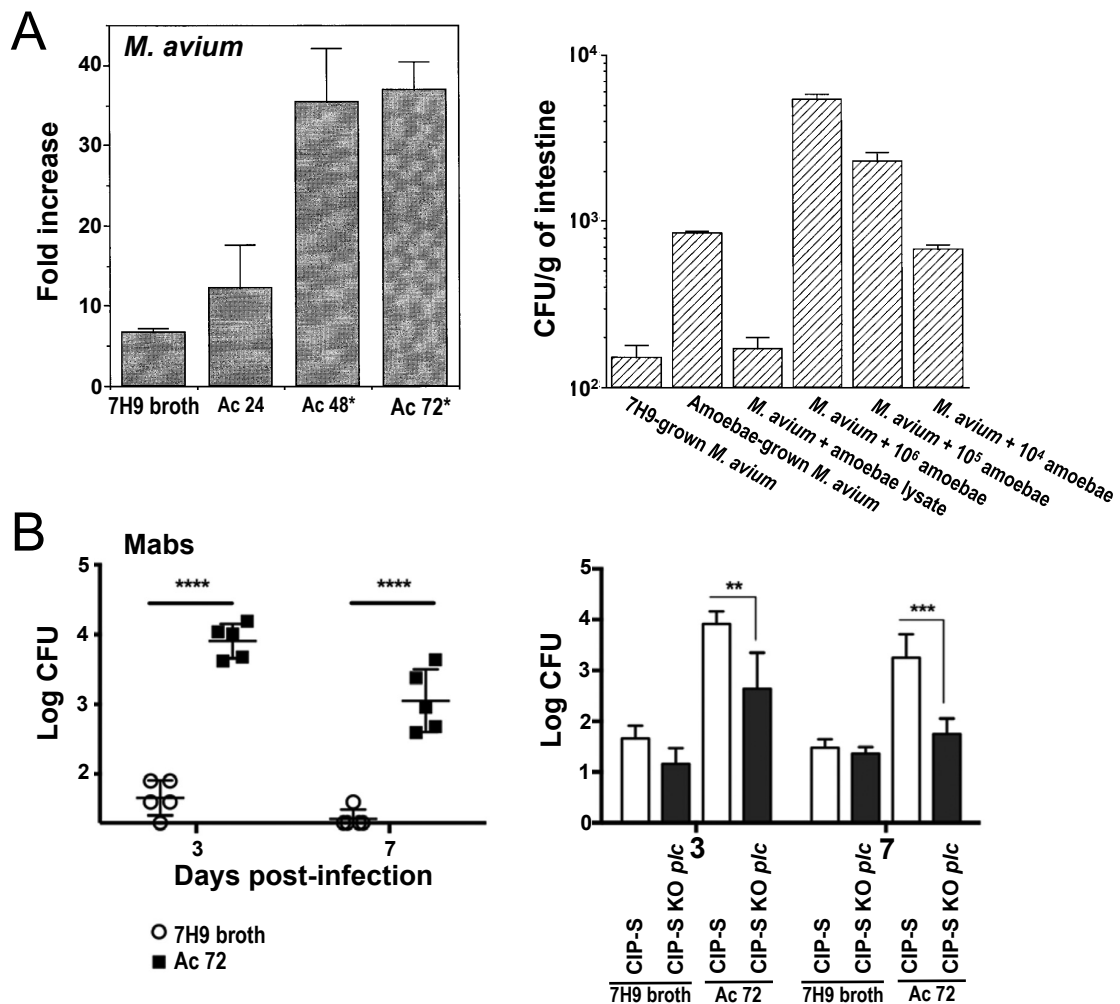
### 3.1 Interactions de *M. marinum* et *M. tuberculosis* avec l'amibe *D. discoideum*

La mise en place de l'infection, la formation et la structure des granulomes ainsi que les lésions causées par *M. marinum* sont identiques à celles engendrées par *M. tuberculosis* chez son hôte et sa prolifération intracellulaire est très similaire (Barker *et al.*, 1997; Swaim *et al.*, 2006). Plusieurs mutants de virulence de *M. marinum* ont des phénotypes similaires à ceux de mutants de *M. tuberculosis* et peuvent être complétés par des gènes de *M. tuberculosis*, faisant de *M. marinum* un modèle utile pour étudier la pathogenèse de la tuberculose dans des organismes génétiquement modifiables (Gao *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004; Volkman *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2006; Cosma *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2006). Chez *Dictyostelium* spp., un modèle d'infection à *M. marinum* a été proposé (Figure 35).

Au cours de la phagocytose de particules inertes et de bactéries non-infectieuses, la pro-

téine V-ATPase est délivrée à la membrane des phagosomes, provoquant un début d'acidification du phagosome. Des glycoprotéines lysosomales, telles que Lamp-1, sont livrées aux phagosomes s'acidifiant, accumulant également la protéine membranaire flotilline-1 et des lipides (Aniento *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1998; Nelson and Harvey, 1999; Dermine *et al.*, 2001). Les mycobactéries pathogènes peuvent changer le cours de la maturation des phagosomes en limitant l'acidification du compartiment phagosomal : ce défaut d'acidification est corrélé avec une exclusion de la protéine V-ATPase de la membrane phagosomale (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Les mycobactéries limitent également l'accumulation d'hydrolases lysosomales (Vergne *et al.*, 2004). Un recrutement actif de coronine à la vacuole de réplication de *M. tuberculosis* a été rapporté qui favoriserait la prolifération intravacuolaire de la mycobactérie dans une lignée cellulaire de macrophages murins (Ferrari *et al.*, 1999). Cependant, ce compartiment dans lequel les mycobactéries peuvent proliférer reste fusogène, dynamique et partiellement connecté à la voie endocytaire de l'hôte (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996). Une partie des bactéries phagocytées subit la voie de dégradation classique, tandis que l'autre résiste à la phagocytose amibienne et se multiplie dans l'amibe. Dans ce modèle, la protéine MAG24-1 de *M. marinum* est requise pour établir une véritable niche de réplication lors de la phase de prolifération de la bactérie (12-37 h post-ingestion) (Hagedorn and Soldati, 2007). La maturation de la vacuole d'endocytose s'accompagne également de l'accumulation de flotilline-1 (Vac B), suivi de sa rupture à la fin de la phase de prolifération de la bactérie (21-37 h), comme cela peut être observé chez des cellules mononucléaires périphériques sanguines (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) (Hagedorn and Soldati, 2007; Hagedorn *et al.*, 2009). Cette rupture, comme chez *M. tuberculosis*, est dépendante du locus ESX-1 du T7SS. Les bactéries libérées dans le cytosol continuent de se multiplier jusqu'à leur libération de l'amibe. Par ailleurs, des études montrent que la transmission de cellule à cellule de *M. marinum* en modèles amibiens et macrophagiques est as-





**Figure 36 | Apprêtement amibien de *M. avium* (A) et *M. abscessus* (Mabs) (B).**

A : Apprêtement amibien de *M. avium*. Le panneau de gauche montre la croissance intracellulaire de *M. avium* dans des macrophages après croissance dans un milieu de culture mycobactérien traditionnel (7H9) ou après croissance intracellulaire dans l'amibe *A. castellanii* pendant 24 (Ac 24), 48 (Ac 48) ou 72 (Ac 72) heures. La croissance intracellulaire de la mycobactérie est exprimée par un taux de croissance après 3 jours d'infection des macrophages. Le panneau de droite montre l'infection de la muqueuse intestinale par *M. avium* chez des souris infectées par voie orale selon différentes conditions d'amplification de la mycobactérie (en milieu 7H9 ou en amibes) et d'ingestion (mycobactéries seules, mycobactéries + lysat amibien, mycobactéries + amibes).

B : Apprêtement amibien de *M. abscessus*. Le panneau de gauche montre la charge bactérienne dans les poumons de souris infectées par aérosolisation après amplification en milieu 7H9 ou en amibes. Le panneau de droite montre les charges bactériennes de la souche sauvage et d'un mutant du gène *MAB\_0555 (plc)* dans les poumons de souris infectées par aérosolisation après amplification des souches en milieu 7H9 ou en amibes (Ac 72).

(Adapté de Cirillo *et al.*, 1997 (A) et Bakala N'Goma *et al.*, 2015 (B))

surée par un mécanisme conservé, non-lytique, dépendant d'ESX-1 et d'une structure à base d'actine, l'éjectosome, formé en présence de la protéine RacH ; offrant ainsi de nouvelles perspectives dans l'étude de la transmission des infections à mycobactéries tuberculeuses tout particulièrement, ce processus n'étant pas décrit chez la MNT *M. avium* (Stamm *et al.*, 2003; Hagedorn *et al.*, 2009).

Enfin, en utilisant *D. discoideum* comme modèle de macrophages spumeux, il a été récemment montré que les gouttelettes lipidiques de l'hôte se déplacent vers la vacuole contenant *M. marinum* dans les minutes qui suivent la phagocytose et pourraient être capturées et transférées à l'intérieur du phagosome (Barisch *et al.*, 2015). Dans les stades plus tardifs de l'infection (19 h), des lipides neutres et des stéroïdes s'accumulent dans le phagosome. Non seulement les acides gras libérés par les TAG de l'hôte, mais aussi ceux des phospholipides, sont utilisés par *M. marinum* pour la formation d'ILL. Et, de façon similaire à ce qui est décrit chez *M. tuberculosis*, *M. avium* ou encore *M. abscessus* en macrophages, *M. marinum* exploite les lipides de l'amibe au cours de l'infection (Neyrolles *et al.*, 2006; Peyron *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2011; Caire-Brändli *et al.*, 2014; Viljoen *et al.*, 2016). Comme décrit en macrophages, les ILL pourraient être source de nutriments et pourraient aussi jouer le rôle d'antioxydants.

### 3.2 Apprêtement amibien des MNT *M. abscessus* et *M. avium* chez *A. castellanii*

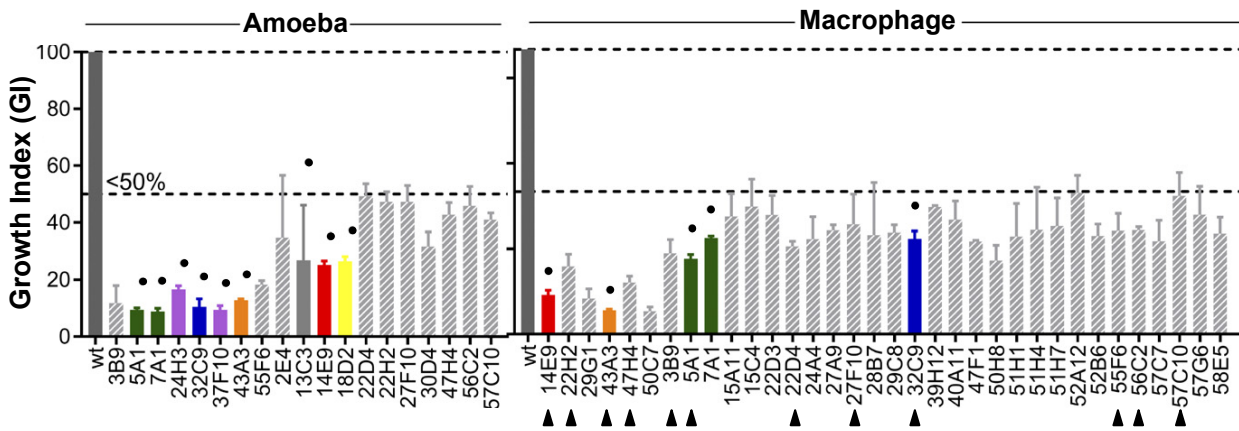
Le concept d'apprêtement amibien a été démontré chez les MNT *M. avium* et *M. abscessus*. En effet, il a été montré que la croissance intra-amibienne de *M. avium* augmente son entrée et sa réplication dans la lignée cellulaire épithéliale HT-29 et dans des macrophages dérivés de monocytes humains, ainsi que la virulence de ce pathogène intestinal dans un modèle murin d'infection (Cirillo *et al.*, 1997) (Figure 36A). Notre laboratoire a également montré une virulence augmentée de *M. abscessus* dans un modèle murin d'infection suite à

une culture en amibes (Bakala N'Goma *et al.*, 2015) (Figure 36B, panneau de gauche).

Des études suggèrent que cet apprêtement amibien est lié à l'induction de gènes favorisant la survie intra-macrophagique. Ainsi, par clonage d'une banque de promoteurs fluorescent GFP (Green Fluorescent Protein) de *M. avium* chez *M. smegmatis* et mesure de fluorescence suite à l'infection de l'amibe *A. castellanii*, Tenant et Bermudez ont montré l'induction de 20 gènes durant la co-culture amibienne dont 8 communément régulés en macrophages, et qui pourraient contribuer à la survie intracellulaire (Tenant and Bermudez, 2006). Chez *M. abscessus*, nous avons montré la contribution du gène *MAB\_0555 (plc)*, spécifiquement induit en amibes, à la survie et à la multiplication de *M. abscessus* dans les poumons de souris infectées (Bakala N'Goma *et al.*, 2015) (Figure 36B, panneau de droite). Ainsi, des adaptations à un mode de vie intracellulaire se font au sein de l'amibe, augmentant la virulence de certaines mycobactéries, et mesurables par l'étude des modifications transcriptomiques de ces mycobactéries.

### 3.3 Etude de la virulence de *M. abscessus* dans le modèle amibien *A. castellanii*

L'étude de la physiopathologie des infections à *M. abscessus* a montré une association entre virulence et transition d'un variant S à un variant R. Récemment, Da Silva *et coll.* ont étudié les interactions entre l'amibe *A. castellanii* et les variants S et R d'isolats cliniques de *M. massiliense*, isolés à un stade précoce et à un stade tardif chez deux patients, un individu atteint de la mucoviscidose et un individu présentant une bronchiectasie (da Silva *et al.*, 2018). Cette étude montra que l'adhésion des 4 isolats (S/R, CF; S/R, bronchiectasie) à l'amibe *A. castellanii* est similaire. Toutefois, les isolats S se multipliaient plus rapidement dans l'amibe comparé aux isolats R. Ceux-ci présentaient en effet une vitesse de croissance lente dans l'amibe et l'isolat R de l'individu CF formait des agrégats, une caractéristique corrélée à une pathogénicité augmentée en macrophages et dans le modèle



**Figure 37 | Mise en évidence de gènes requis pour la survie intracellulaire de *M. abscessus* en amibes et en macrophages.**

Six-milles mutants d'une banque de mutants obtenus par transposition chez une souche lisse de *M. massiliense* ont été criblés pour un défaut de croissance intracellulaire dans l'amibe *A. castellanii* puis testés en macrophages par détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) 2 et 3 jours post-infection respectivement. Les UFC des mutants sont rapportées à celles du sauvage (wt, wild type), ce qui donne l'indice de croissance des mutants ou GI (Growth Index). Parmi les mutants fortement atténués en amibes (GI < 0,5), 12 mutants sont également fortement atténués en macrophages (flèches noires). Les mutants du locus ESX-4 sont indiqués en couleur (vert : *eccD<sub>4</sub>*, violet : *eccC<sub>4</sub>*, bleu : *eccB<sub>4</sub>*, orange : *espl*, rouge : *eccE<sub>4</sub>*, jaune : *mycP<sub>4</sub>*).

(Adapté de Laencina *et al.*, 2018)

du poisson zèbre (Bernut *et al.*, 2014; Brambilla *et al.*, 2016). De plus, les isolats R s'avèrent davantage cytotoxiques, ce qui n'est pas sans rappeler le comportement particulièrement virulent du variant R en macrophages, induisant jusqu'à 80% d'apoptose chez des monocytes dérivés d'une lignée humaine (Roux *et al.*, 2016). Enfin cette étude montra également la capacité des 4 isolats, R et S, à survivre et à se multiplier dans les trophozoïtes et à survivre dans les kystes 5 jours après enkystement. Comme suggéré plus haut, cette aptitude pourrait contribuer à la transmission de *M. abscessus* à l'homme (Ben Salah and Drancourt, 2010). Bien que le modèle amibien ne soit probablement pas convenable pour étudier l'ensemble des traits de virulence de *M. abscessus* lors des infections de l'homme, il fournit néanmoins des indications sur les voies contribuant à la pathogénicité des souches isolées à différents stades de l'infection.

Enfin, comme évoqué précédemment, le modèle amibien permet d'identifier des gènes requis pour la survie intracellulaire des ARB. Certaines études suggèrent un lien entre multiplication intra-amibienne et virulence des mycobactéries, les mycobactéries les plus virulentes se multipliant davantage : ainsi le taux de répli-

cation intracellulaire de *M. kansasii* dans l'amibe *A. castellanii* est corrélé avec la virulence de différentes souches, indépendamment du sous-type génétique (Goy *et al.*, 2007). Chez *M. abscessus* qui se multiplie particulièrement vite en amibe (temps de doublement de 1,5 h environ entre le premier et le 4<sup>ème</sup> jour post-infection), l'identification de mutants impactés dans leur virulence est facilitée, les atténuations les plus faibles étant de ce fait particulièrement identifiables. Parmi les mutants de *M. abscessus* atténués en macrophages, les mutants des gènes *MAB\_0555 (plc)* et *MAB\_4780* (mutant de synthèse des acides mycoliques) sont également atténués en amibes (Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Halloum *et al.*, 2016). De plus, le rôle du système ESX-4 dans la survie intra-macrophagique de *M. abscessus* a été initialement découvert grâce à un crible de 6 000 mutants de transposition d'une souche *M. massiliense* lisse avec l'amibe *A. castellanii* (Laencina *et al.*, 2018). Au total 47 gènes ont été identifiés par le crible amibien comme étant requis pour la survie intracellulaire de *M. abscessus* en amibes tandis que 12 gènes jouent un rôle prédominant à la fois dans la survie intra-amibienne et intra-macrophagique (index de croissance ou Growth index (GI) inférieur à 0,5) (**Figure 37**).



Le genre *Mycobacterium* englobe aujourd'hui plus de 180 espèces dont une poignée d'agents pathogènes d'importance épidémiologique majeure telles que les espèces du complexe *M. tuberculosis*, agents étiologiques de la tuberculose chez l'homme et l'animal et *M. leprae* et *M. lepromatosis*, agents étiologiques de la lèpre. Probablement sous-estimées pendant de nombreuses années, la prévalence des infections à MNT et leur signification épidémiologique ne sont toutefois pas négligeables. Ainsi ces dernières années ont été marquées par l'émergence ou la réémergence de MNT comme agents pathogènes, grâce notamment à l'amélioration d'outils diagnostiques, et en particulier l'émergence de *M. abscessus*, une MNT à croissance rapide responsable d'infections pulmonaires, notamment chez les sujets atteints de la mucoviscidose (De Groote and Huitt, 2006; Qvist et al., 2016).

*M. abscessus* est capable de persister silencieusement dans l'hôte pendant des années (Moore and Frerichs, 1953; Cullen et al., 2000). *M. abscessus* peut se multiplier et persister au sein des macrophages (Oberley-Deegan et al., 2009; Sousa et al., 2015; Roux et al., 2016). Au cours de l'infection, l'aptitude de *M. abscessus* à transiter d'un morphotype S à un morphotype R a été associée à une virulence accrue de la bactérie et à sa persistance, ainsi qu'à des pathologies sévères (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot et al., 2007; Bernut et al., 2014).

L'analyse du génome de *M. abscessus* a montré un capital génétique compatible avec une vie à l'interface eau/plantes, suggérant l'existence d'un possible réservoir environnemental de *M. abscessus* (Ripoll et al., 2009). Plusieurs études ayant rapporté des associations entre mycobactéries et protozoaires environnementaux ubiquistes comme les amibes libres ont soulevé l'hypothèse d'un réservoir amibien des mycobactéries et notamment des MNT environnementales (Delafont et al., 2014). Le rôle de ces phagocytes environnementaux dans l'évolution de certaines bactéries pathogènes et dans l'épidémiologie des infections

bactériennes a été particulièrement étudié chez *L. pneumophila* (Thomas et al., 2006; Moliner et al., 2010). Le concept d'apprêtement à la vie intra-macrophagique au contact des amibes, initialement décrit chez *L. pneumophila*, a également été montré chez *M. avium*, suggérant que l'amibe, au-delà de son rôle de vecteur de transmission, pourrait également moduler la virulence de certaines mycobactéries (Cirillo et al., 1997; Bruggemann et al., 2006). Cette hypothèse a été également vérifiée au laboratoire concernant les interactions entre *M. abscessus* et une souche axénique de l'amibe libre *A. castellanii*, le passage amibien augmentant la virulence de *M. abscessus* dans un modèle murin d'infection par aérosolisation (Bakala N'Goma et al., 2015). Le gène *MAB\_0555*, codant une PLC, participe à la virulence de *M. abscessus* et son induction en amibes montre que l'environnement amibien peut induire l'expression de gènes de virulence, pas ou peu exprimés en macrophages (Bakala N'Goma et al., 2015).

**L'objectif général de ce travail est d'identifier des gènes de virulence de *M. abscessus* par des approches globales.**

**Objectif 1 :** Description des adaptations de *M. abscessus* à la vie intra-amibienne et intra-macrophagique et identification de facteurs de virulence par une approche de transcriptomique comparée.

Dans ce contexte, le principal objectif de mon projet doctoral a consisté en la caractérisation des adaptations intracellulaires de *M. abscessus* – et tout particulièrement des adaptations à la vie intra-amibienne – afin de mieux comprendre la pathogénicité de cette MNT, pouvant à terme offrir des perspectives thérapeutiques.

**Objectif 2 :** Caractérisation fonctionnelle d'un gène *mmpL* requis pour la survie en amibes et en macrophages de *M. abscessus*.

Une autre approche globale permettant l'identification de facteurs de virulence de *M. abscessus* consiste à évaluer la contribution

de tel ou tel gène à la survie intracellulaire de la bactérie par criblage d'une banque de mutants obtenus par mutagenèse aléatoire chez *M. marseillense*. Cette approche en cours de validation à mon arrivée au laboratoire a permis d'identifier une dizaine de gènes requis pour la survie intracellulaire de *M. abscessus* en amibes et en macrophages dont les gènes du locus ESX-4 et un gène de la famille *mmpL*. Le gène *mmpL*, présent dans le génome de *M. abscessus*, a fait l'objet d'une étude fonctionnelle chez la souche type de *M. abscessus*.

L'intérêt de la communauté scientifique pour les familles de gènes *mmpL* et *mmpS*, largement décrites chez *M. tuberculosis*, a récemment évolué chez les MNT, et notamment *M. abscessus* chez qui ces deux familles semblent avoir connues une expansion considérable. Une étude phylogénétique a été menée afin d'élucider l'origine de cette diversité et de mieux caractériser ces familles de gènes parmi les mycobactéries.

# ***RÉSULTATS***





**L'objectif de cette première partie est de décrire les adaptations de *M. abscessus* à la vie intra-amibienne et intra-macrophagique et d'identifier des facteurs de virulence par une approche de transcriptomique comparée.**

Trois hypothèses d'étude ont été posées :

- (1) Est-ce que l'amibe prépare *M. abscessus* à la vie intra-macrophagique (apprêtement amibien) ?
- (2) Pouvons-nous identifier des gènes cibles de l'apprêtement amibien par comparaison des adaptations de *M. abscessus* et de *M. chelonae* en amibes ?
- (3) *M. abscessus* présente-t-il des adaptations spécifiques en macrophages comparées à la vie intra-amibienne ?

## APPROCHES METHODOLOGIQUES

L'analyse du transcriptome de *M. abscessus* au sein d'amibes et de macrophages a été obtenue par séquençage complet des acides ribonucléiques (ARN) bactériens intracellulaires (RNAseq, RNA sequencing). Des extraits d'ARN messagers (ARNm) issus de plusieurs réplicats biologiques, furent obtenus, en quantité suffisante (au moins 10 µg) pour procéder à leur séquençage. La méthodologie est décrite de manière exhaustive dans un article vidéo du journal *J Vis Exp.* (**Matériel et méthodes, Article 5**, Dubois *et al.* 2018a). La préparation des extraits au séquençage, la construction des librairies d'ADN complémentaire (ADNc) et leur séquençage, ainsi que les analyses qualitatives et statistiques associées ont été réalisés en collaboration avec l'unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée (PMI) et la plateforme Transcriptome et Epigénome de l'Institut Pasteur (P2F) de Paris (France).

Plusieurs conditions expérimentales ont été établies afin d'atteindre les objectifs fixés :

- (1) co-culture courte (4 h) de *M. abscessus* avec l'amibe *A. castellanii* ;
- (2) co-culture prolongée (16 h) de *M. abscessus* avec l'amibe *A. castellanii* ;
- (3) infection prolongée (16 h) d'une lignée murine de macrophages (J774.2) par *M. abscessus* ;

- (4) co-culture prolongée (16 h) de *M. chelonae* avec l'amibe *A. castellanii*.

Le témoin de chaque condition d'infection (bactéries intracellulaires) correspond à une culture de la bactérie dans le milieu employé pour la co-culture et à la même température (bactéries planctoniques). A savoir, une culture en milieu minimum à 30 °C dans les conditions 1-2 et 4 et une culture à 37 °C en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé dans la condition 3. Des analyses statistiques réalisées avec le package DESeq2 de R ont permis de comparer les différentes conditions par normalisation (Love *et al.*, 2014). De plus, un dendrogramme réalisé sur les données normalisées a montré une structure claire des données : un regroupement des réplicats biologiques et une séparation des conditions biologiques (bactéries planctoniques ou intracellulaires, temps de culture ou co-culture).

La comparaison des transcriptomes obtenus pour les conditions expérimentales 1-4 par rapport aux témoins définissent 4 jeux de données (datasets 1-4) correspondant à un ensemble de gènes différentiellement exprimés (DEGs, Differentially Expressed Genes). Le nombre de gènes réprimés (down DEGs), induits (up DEGs) ainsi que la couverture des séquences codantes (CDS, Coding DNA sequence) des génomes de *M. abscessus* et *M. chelonae* sont donnés dans le **Tableau 7**. Les transcriptomes issus des

conditions (1) et (2) reflètent au mieux les conditions de vie au sein de l'amibe, dans l'environnement, la co-culture étant effectuée à 30°C et en présence d'un milieu minimum sans source de carbone ni d'azote. La comparaison des DEGs issus de ces conditions pourrait permettre de discriminer les facteurs microbiens nécessaires à l'échappement à la phagocytose de ceux impli-

qués dans la persistance de *M. abscessus*. La comparaison des conditions expérimentales (2) et (3)/(4) pourrait contribuer à l'identification des cibles de l'apprêtement de *M. abscessus* par l'amibe, en supposant que le passage amibien est à l'origine de la virulence particulière de *M. abscessus* en macrophages comparée à *M. chelonae*.

**Tableau 7 | Description des jeux de données.**

Datasets	Down DEGs	Up DEGs	Tot.	CDS cover
1	1218	1355	2573	56%
2	1095	1122	2217	49%
3	1646	1671	3317	73%
4	1186	1949	3835	80%

Tot. : nombre total de DEGs identifiés. CDS : coding DNA sequence.

## RESULTATS

Nous montrons par cette étude un continuum de la réponse de *M. abscessus* à la phagocytose amibienne, certaines voies cellulaires étant particulièrement sollicitées dans les premières heures de co-culture (4 hpi) et plus tardivement (16 hpi). Il s'agit de modifications post-traductionnelles, des voies du turnover protéique et de biosynthèse de chaperonnes moléculaires. La sollicitation de ces voies, assurant des adaptations rapides à des conditions de vie changeantes, pourrait contribuer à la survie et à la persistance de *M. abscessus* dans les amibes. Une spécificité de la réponse à une co-culture courte (4 h) est la sollicitation de la voie du transport et du métabolisme des lipides, suggérant un rôle important des lipides comme première adaptation à la phagocytose amibienne. Cette observation est confirmée par l'induction de gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras et du cholestérol, alimentant le cycle des acides tricarboxyliques et permettant à la bactérie de s'adapter aux stress oxydatifs et hypoxiques rencontrés dans les cellules. En amibes, des voies impliquées dans le métabolisme du soufre sont enrichies parmi les gènes induits. Ces voies, particulièrement sollicitées par *M. tuberculosis* en macrophages, contribuent à la dé-

toxification. D'autres voies sollicitées en amibes 16 hpi comme la voie de biosynthèse du cofacteur molybdène et la voie de transport des polyamines pourraient contribuer à la résistance de *M. abscessus* à divers stress intracellulaires (stress osmotique, ionique, thermique, oxydatif, alcalin et acide). Par ailleurs, une voie est enrichie parmi les gènes induits (l'entrée dans les cellules), suggérant que la vie en amibes pourrait contribuer à l'invasion de futures cellules phagocytaires par *M. abscessus* comme cela a été rapporté chez *L. pneumophila* (Hart and Makin, 1991; Thomas *et al.*, 2006 ; Bruggemann *et al.*, 2006).

Contrairement à ce qui est observé en amibes, la vie intra-macrophagique est moins propice à des variations d'expression amples et modérées. Davantage de gènes fortement réprimés sont identifiés. Parmi les gènes les plus réprimés, la transcription ainsi que le transport et le métabolisme des métabolites secondaires sont enrichis, suggérant une activité métabolique ralentie de la bactérie en macrophages. Cette observation a été confirmée par une analyse d'enrichissement ontologique appliquée au transcriptome, de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la réplication du bacille et des voies

centrales du métabolisme étant enrichies parmi les gènes réprimés. Par ailleurs, parmi ces gènes, les voies cellulaires de modifications post-traductionnelles, du turnover protéique et de biosynthèse de chaperonnes moléculaires tendent à être sur-représentées. Ces observations montrent que la vie intra-amibienne et intra-macrophagique engendrent une réponse différente de *M. abscessus*. Toutefois, nous avons montré par l'analyse de la régulation du métabolisme central du carbone que *M. abscessus* dépend du catabolisme des lipides (acides gras et cholestérol) à la fois en amibes et en macrophages et que les environnements intra-amibiens et intra-macrophagiques sont perçus comme des environnements stressants par la bactérie qui induit fortement des gènes impliqués dans des adaptations à divers stress (hypoxiques, oxydatifs, alcalins) et des gènes codant des chaperonnes, permettant des adaptations rapides aux stress rencontrés. Parmi ces gènes, des gènes permettant la détection des stress rencontrés sont particulièrement induits par *M. abscessus* en amibes et en macrophages en comparaison avec ce qui est décrit chez *M. tuberculosis*. Il s'agit de gène codant des protéines Fe-S et en particulier des protéines d'assemblage des centres Fe-S dont la biosynthèse est significativement enrichies en amibes et en macrophages (**Annexe 1**). Des gènes permettant des adaptations rapides aux stress détectés sont particulièrement induits en amibes au temps précoce d'infection comme des gènes codant des NAP (**Annexe 2**). Par ailleurs, des gènes impliqués dans la réponse à de faibles concentrations en O<sub>2</sub> ou NO et en fer sont induits en amibes et non en macrophages, induction possiblement favorable à la survie intracellulaire. Enfin, la régulation positive des triacylglycéril synthase (Tgs) 2 et -5 et des précurseurs des antigènes 85 dans les amibes suggère que *M. abscessus* stockerait les acides gras sous forme de TAG dans l'amibe *A. castellanii* comme cela est décrit chez *M. marinum* dans le modèle *D. discoideum*, évitant ainsi l'accumulation toxique d'acides gras libres dans le cytosol (Goldberg and St. John, 1976; Neckers and Tatu, 2008; Barisch *et al.*, 2015; Barisch and Soldati, 2017) (**Annexe 3**). Le TAG

peut être également transporté à la paroi. Toutefois, la répression 4 hpi du gène *lprG* codant un transporteur du TAG suggère que le TAG serait davantage stocké dans les premières heures de l'infection plutôt que recyclé à la paroi.

Nous avons précédemment démontré une virulence augmentée de *M. abscessus* suite à la co-culture amibienne, fait probablement médié par l'induction de gènes de virulence comme le gène *plc* (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). En macrophages, *M. abscessus* se multiplie davantage que *M. chelonae*. Des expériences préliminaires suggèrent que le passage amibien augmente la virulence de *M. abscessus* et non de *M. chelonae* (**Annexes 4**). L'analyse comparée des transcriptomes de *M. abscessus* et *M. chelonae* en amibes montre que les deux bactéries répondent différemment à l'environnement intra-amibien et cette différence pourrait expliquer un apprêtement de *M. abscessus* et non de *M. chelonae* par l'amibe (**Annexes 4**). Des voies biologiques possiblement impliquées dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* et enrichies suite à la co-culture amibienne parmi les gènes induits ne sont pas enrichies par *M. chelonae*. Dans ce contexte, afin d'identifier des gènes contribuant à la virulence de *M. abscessus*, nous nous sommes focalisés sur les gènes fortement induits en amibes aux temps précoce et tardif d'infection, peu induits par *M. abscessus* en macrophages et par *M. chelonae* en amibes, supposant que cette forte induction chez *M. abscessus* en amibes contribuerait à augmenter sa virulence. Cela représente 45 gènes. Parmi ces gènes, 6 opérons ont été délétés par double recombinaison génique ( $\Delta$ OP1-6), représentant 10 gènes. En macrophages, des gènes induits par *M. abscessus* particulièrement enrichis sont impliqués dans des voies biologiques pouvant contribuer à la survie intracellulaire de *M. abscessus* comme la voie MEP parmi les plus représentées. Nous avons également entrepris, de la même façon, la délétion de 5 opérons parmi les gènes de *M. abscessus* les plus induits en macrophages ( $\Delta$ OP7-11). L'ensemble des mutants obtenus était atténué en amibes et tous sauf 1 en macrophages ( $\Delta$ OP6).

Parmi la première série de mutants ( $\Delta$ OP1-6), 4 mutants ont été complémentés parmi les plus atténués en macrophages. Les gènes complétant le phénotype de la souche sauvage ont par la suite été sur-exprimés chez *M. chelonae*. La multiplication des souches de *M. chelonae* ainsi modifiées en macrophages a été comparée à la souche sauvage de *M. chelonae* et de *M. abscessus*. La sur-expression de 2 gènes (*MAB\_1517c* et *MAB\_2649*) de *M. abscessus* parmi 9 gènes conféra un avantage à la multiplication de *M. chelonae* en macrophages et tout particulièrement, la sur-expression du gène *MAB\_2649* codant une protéine MmpS parmi une famille de protéines connues pour contribuer à la survie intracellulaire des mycobactéries en assurant le transport de lipides à la membrane externe ou bien en contribuant à la captation de fer par l'export de sidérophore dans le milieu extérieur.

Parmi, la seconde série de mutants (OP7-OP11), un mutant a fait l'objet d'une attention particulière ( $\Delta$ OP11), ce mutant étant éliminé par les macrophages au fil du temps. Le gène délété, *MAB\_4532c*, récemment dénommé *eis2*, code une N-acétyltransférase (Rominski *et al.*, 2017). De façon notable, l'activité N-acétyltransférase est enrichie en macrophages 16 hpi (**Annexe 5**). L'autre gène *eis* de *M. abscessus*, *eis1*, contribue à la survie intracellulaire de la bactérie en macrophages, toutefois le mutant  $\Delta$ *eis1* survie et la charge bactérienne reste constante les premiers jours de l'infection. Bien qu'il n'existe pas d'orthologue de l'*eis* de *M. tuberculosis* chez *M. abscessus*, le mutant  $\Delta$ *eis2* est complémenté par l'*eis* de *M. tuberculosis* dans les temps précoces de l'infection (1 dpi). Néanmoins, comparé à l'*eis* de *M. tuberculosis*, l'*eis2* de *M. abscessus* n'est pas impliqué dans le contrôle de l'apoptose et de l'autophagie des macrophages mais semble, comme *M. tuberculosis*, contrôler la production de ROS par ces

cellules mais aussi la sensibilité de *M. abscessus* à ces radicaux oxygénés (Shin *et al.*, 2010). Une spécificité de l'*eis2* de *M. abscessus* est son rôle dans l'induction de dommages à la membrane phagosomale. Des analyses de génomique comparative ont montré des portions de gènes conservés entre le locus *eis2* de *M. abscessus* et un locus de *M. tuberculosis* comprenant le gène *mmpL11*, transporteur des EM et des TAG. D'autres gènes sont conservés, possiblement impliqués dans la synthèse de lipides pariétaux, suggérant un rôle possible de l'Eis2 dans la modification de ces lipides.

L'étude du transcriptome de *M. abscessus* en amibes et en macrophages que nous avons menée a donc permis de caractériser les adaptations de *M. abscessus* à ces deux phagocytes. Bien que différente selon l'hôte, la réponse de *M. abscessus* à la phagocytose amibienne et macrophagique met en évidence un capital génique permettant une adaptation rapide aux stress communément rencontrés en amibes et en macrophages. L'environnement amibien est propice à des variations d'expression de grande amplitude parmi les gènes induits. L'enrichissement de voies contribuant potentiellement à la survie intracellulaire de la bactérie parmi les gènes induits suggère que l'induction forte et modérée de gènes en amibes serait favorable à la survie intracellulaire de la bactérie et notamment l'induction d'un gène *mmpS*. La vie intra-amibienne pourrait également contribué à la transmission de *M. abscessus* à de nouveaux hôtes. Nous sommes parvenus à identifier 11 gènes de virulence à l'issue de ces études. Confirmant d'une part que le modèle amibien est pertinent dans l'objectif d'identifier de nouveaux gènes de virulence et d'autre part, l'adaptation particulière de *M. abscessus* aux cellules phagocytaires immunes (pathoadaptation) et en particulier l'essentialité du gène *eis2* de *M. abscessus*.

Article 1 (manuscrit en préparation)

***Mycobacterium abscessus* transcriptomic responses towards amoeba and macrophage intracellular environment : identification of key virulence advantages**

Violaine Dubois, Alexandre Pawlik, Anouchka Bories, Vincent Le Moigne, Odile Sismeiro, Rachel Legendre, Hugo Varet, Pilar Rodriguez, Jean-Louis Gaillard, Jean-Yves Coppée, Roland Brosch, Jean-Louis Herrmann and Fabienne Girard-Misguich



***Mycobacterium abscessus* virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in  
amoebae and macrophages**

Violaine Dubois<sup>1</sup>, Alexandre Pawlik<sup>2</sup>, Anouchka Bories<sup>1</sup>, Vincent Le Moigne<sup>1</sup>, Odile Sismeiro<sup>3</sup>,  
Rachel Legendre<sup>3</sup>, Hugo Varet<sup>3</sup>, Pilar Rodriguez<sup>6</sup>, Jean-Louis Gaillard<sup>1,4</sup>, Jean-Yves Coppée<sup>3</sup>,  
Roland Brosch<sup>2</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>1,5\*</sup> and Fabienne Girard-Misguich<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 2I, UVSQ, INSERM, Université Paris-Saclay, Versailles, France.

<sup>2</sup> Unité de Pathogénomique Mycobactérienne intégrée, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>3</sup> Plateforme Génomique PF4, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>4</sup> APHP, GHU PIFO, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne Billancourt, France.

<sup>5</sup> APHP, GHU PIFO, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France.

<sup>6</sup> Laboratoire d'Écologie, Systématique et Évolution, Université Paris-Saclay, Orsay, France

**Key words:** Amoeba, Macrophage, *Mycobacterium abscessus*, virulence, replication

**Short title:** *Mycobacterium abscessus* virulence modeled by environmental amoebae

\* Correspondence: Fabienne Girard-Misguich: [fabienne.misguich@uvsq.fr](mailto:fabienne.misguich@uvsq.fr); Jean-Louis

Herrmann: [jean-louis.herrmann@aphp.fr](mailto:jean-louis.herrmann@aphp.fr)





## ABSTRACT

Free-living amoebae might represent an evolutionary niche preparing amoeba resistant bacteria towards pathogenicity. In order to get more insights into the so-called amoebal training ground for *M. abscessus*, we characterized the full transcriptome of *M. abscessus* in *Acanthamoeba castellanii* (Ac) and macrophages (M $\phi$ ), as well as *M. chelonae* intra-amoebal transcriptome for comparison and characterization of *M. abscessus* virulence advantages for intracellular life. Major results indicate the differences between gene regulation occurring in Ac and M $\phi$ . Up-regulated genes in Ac are implicated in defense mechanisms and allowed *M. abscessus* resisting environmental stress. *M. abscessus* switches from carbon sources to fatty acid metabolism when inside Ac. Forty-five and 38 genes were highly induced in Ac and in M $\phi$  respectively. Eleven most induced genes or genes putatively implicated in the adaptation to intracellular stress, as examples, were deleted and all but one were confirmed to be involved in *M. abscessus* survival in M $\phi$ . By cloning and overexpressing two of these genes in *M. chelonae* we show that high induction of those genes enhances survival in M $\phi$ . In addition, *M. abscessus eis2* mutant ( $\Delta eis2_{MAB}$ ) was particularly attenuated in M $\phi$ . Infection of M $\phi$  with  $\Delta eis2_{MAB}$  strain was associated with higher production of ROS and absence of phagosomal membrane damage and phagosome-cytosol contacts, as compared to the wild-type and complemented *M. abscessus* strains. Altogether, *M. abscessus* intra-Ac and intra-M $\phi$  transcriptomes demonstrated of the potential of *M. abscessus* to adapt to an intracellular lifestyle, with Ac largely contributing to the enhancement of *M. abscessus* survival in M $\phi$ .

## INTRODUCTION

To date, most mycobacterial species are environmental organisms found in soil (Lavania *et al.*, 2008), air (Angenent *et al.*, 2005) and water (Guidotti *et al.*, 2008; Gomila *et al.*, 2008; Ben Salah *et al.*, 2009), and belongs to the Rapid Growing Mycobacteria (RGM). In contrast, most of the host-associated mycobacteria are Slow Growing mycobacteria (SGM). However, some exceptions exist: *Mycobacterium abscessus* and members of the *Mycobacterium chelonae* complex, in addition to *Mycobacterium fortuitum*, represent the main opportunistic pathogens among RGM (Griffith *et al.*, 2007).

Identification of the last common ancestor of the genus *Mycobacterium* is still a matter of debate, although recent studies suggest it could be an environmental species that evolved either as a soil-borne mycobacterium, as a waterborne mycobacterium such as *Mycobacterium avium-intracellulare* and *Mycobacterium marinum*, or as a host-associated mycobacterium such as *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* and *M. avium subsp avium*, *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) species and *Mycobacterium leprae* (Stinear *et al.*, 2008).

Compared to other non-tuberculous mycobacteria (NTM), recovery of *M. abscessus* from the environment is rare (Thomson *et al.*, 2013). Information from its genome suggest that *M. abscessus* may live at the interface of soil, vegetable and water, where free-living amoebae (FLA) are commonly found (Ripoll *et al.*, 2009). FLA have been isolated from habitats in common with mycobacteria (Thomas and McDonnell, 2007; Falkinham, III, 2009) including cold-drinking water systems (Thomas *et al.*, 2006; Eddyani *et al.*, 2008), hot water systems in hospitals and cooling towers (Pagnier *et al.*, 2008). FLA are ubiquitous organisms that feed on bacteria, and these bacteria have likely developed adaptations to an intracellular lifestyle to become amoeba-resistant bacteria (ARB) (Adékambi *et al.*, 2006;

Lamrabet *et al.*, 2012). Mycobacteria have been isolated from such habitats by amoebal enrichment (Thomas *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010), allowing potential evolution toward pathogenicity by the acquisition of virulence genes by horizontal gene transfer (Gutierrez *et al.*, 2005; Ripoll *et al.*, 2009).

Finally, amoebae are often considered as an ancestral form of macrophages (M $\phi$ ) sharing similar cellular structures and biological features (Barker and Brown, 1994; Greub and Raoult, 2004; Siddiqui and Khan, 2012).

*M. abscessus* has been shown to be resistant to amoeba phagocytosis and encystment, a property shared with all mycobacteria with the exception of the attenuated *M. bovis* BCG strain (Adékambi *et al.*, 2006; Salah *et al.*, 2009; Bakala N’Goma *et al.*, 2015). In addition, co-culture of *M. abscessus* with *Acanthamoeba castellanii* (Ac) increases its virulence when aerosolized in mice (Bakala N’Goma *et al.*, 2015) suggesting the existence of an amoebal ‘training ground’ for opportunistic pathogenic mycobacteria. Similarly, co-culture of amoebae with *M. avium* was found to trigger *M. avium* virulence by enhancing both entry and intracellular multiplication of the bacterium (Cirillo *et al.*, 1997). The essential role of *M. abscessus* type VII secretion system (T7SS) ESX-4 was also demonstrated based on an intra-amoebal viability screen of a transposon mutant library, unraveling for the first time the role of the ESX-4 system in *M. abscessus* intracellular survival (Laencina *et al.*, 2018).

In order to get more insights into the so-called amoebal training ground for *M. abscessus*, we characterized the full transcriptome of *M. abscessus* in Ac and M $\phi$ , as well as *M. chelonae* intra-amoebal transcriptome for comparison and characterization of *M. abscessus* virulence advantages for intracellular life. Although amoebae and M $\phi$  share common features, it has been shown that an intra-amoebal life requires specific adaptations (Laencina *et al.*, 2018). The full description and analysis of *M. abscessus* transcriptomes might allow the

identification of key virulence genes and might provide a full picture of *M. abscessus* adaptations to survive and replicate either in an amoebal host (encountered in the environment) or in M $\phi$  (encountered in mammals) and its ability to resist host defense.

## RESULTS

### *Overall description of M. abscessus intracellular transcriptomes*

RNAseq data from *M. abscessus* planktonic or intracellular cultures (3 to 4 replicates per condition) were analyzed and compared to identify *M. abscessus* genes that were up- or down-regulated after Ac and M $\phi$  infections. *M. abscessus* transcriptomes in Ac 4 and 16 hours post-infection (hpi), in M $\phi$  16 hpi and transcriptomes of *M. chelonae* in Ac 16 hpi were obtained. Invariant genes were excluded from the analyses. Normalization and hierarchical clustering of normalized raw data showed a clear structuration of the data according to the conditions tested (**Sup. Figure 1**). Differentially expressed genes (DEGs) were identified using the *DESeq2* package (Love *et al.*, 2014) (**Sup. Table 1**) and the Log<sub>2</sub> fold change (FC) values from *M. abscessus* transcriptomes were compared (**Sup. Figure 2**). In Ac, most up-regulated or down-regulated DEGs 4 hpi were still up- or down-regulated 16 hpi (**Figure 1A**). In order to detail the biological changes associated with *M. abscessus* intracellular regulation, we first grouped the DEGs in cluster of orthologues (Cluster of Orthologous Groups or COGs) (Tatusov *et al.*, 2000). Highly induced genes in Ac (over 16 times) were more frequently found in COG O (Post-translational modification, protein turnover, chaperones), COG K (Transcription) and COG I (Lipid transport and metabolism) compared to the genome; although this last category tended to be under-represented at 16 hpi (**Figure 1B**). Comparatively, highly repressed genes (over 16 times) were assigned to COG E and COG F (amino-acid and nucleotide transport and metabolism respectively) (**Figure 1B**).

When comparing *M. abscessus* Ac-16hpi vs. M $\phi$ -16hpi transcriptomes, DEGs were more dispersed, 20% of DEGs were regulated in the opposite direction (increased versus decreased and vice versa) (**Figure 1C**). The representation of DEG according to their FC highlight that in Ac and M $\phi$  most DEGs were low ( $FC < |2|$ ) 16 hpi (**Sup. Figure 2A**). In Ac, UP

regulated DEGs predominated in comparison with their behavior in a macrophagic environment (**Sup. Figure 2B**).

COG assignments allowed highlighting differences between *M. abscessus* high DEGs in M $\phi$  and Ac (**Figure 1D**). The COG O that was over-represented in *M. abscessus* highly induced genes in Ac, was more frequently associated with highly repressed genes in M $\phi$  (**Figure 1B-D**). By comparison, induced genes belonging to the COG P (Inorganic ion transport and metabolism) were over-represented in M $\phi$  only, potentially illustrating different adaptations to amoebal and macrophagic environments (**Figure 1D**).

#### *Main biological pathway changes in Ac and M $\phi$*

We performed a gene ontology enrichment (GOE) analysis to further characterize *M. abscessus* adaptations in Ac and M $\phi$ . Enriched GO are characterized by an enrichment factor (EF) (from 1 to 4) and a number of significantly enriched genes (from small (<10) to large (>100)) (**Figure 2**).

In Ac, the most enriched induced genes fall into polyamine transport (GO:0015846) up to adenine salvage (GO:0006168), including small groups of genes involved in sulfur metabolism (sulfate assimilation pathway (SAP)) (GO:0000103), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) biosynthetic pathway (GO:0070814) and detoxification (iron-sulfur cluster assembly (GO:0016226)) (**Figure 2A**).

In M $\phi$ , *M. abscessus* induced enriched genes fall into different GO as compared to those induced in Ac. L-proline biosynthetic process (GO:0055129); methylerythritol 4-phosphate MEP pathway (GO:0019288) and Glycerol ether metabolic process (GO:0006662) were the most enriched GO, followed by the type II secretion system and notably the Tat (twin-arginine translocation) pathway (**Figure 2B**).

In Ac, the most enriched repressed genes fall into the nitrate assimilation GO (GO:0042128), up to glycogen biosynthetic process GO (GO:0005978) (**Figure 2C**). In particular, GO related to glucose transport and metabolism were enriched (GO:0005977, GO:00015749, GO:0009250, GO:0005978) (**Figure 2C**).

In M $\phi$ , *M. abscessus* repressed genes are related to growth and parietal activities. From GO:0040007 corresponding to growth, up to GO:0030259 corresponding to lipid glycosylation, in addition to GO:0071941 (nitrogen cycle metabolism process), GO:0009259 (peptidoglycan synthesis) and GO:0022604 (regulation of cell morphogenesis), GOE indicates that *M. abscessus* slows down its energy cost metabolism and its growth rate (**Figure 2D**).

Taken together, these observations suggest that *M. abscessus* enters a slow-replicative state in M $\phi$  and dedicates its energy to detoxification and protein secretion into the host.

#### *Regulation of central carbon metabolism in Ac and M $\phi$*

To further describe *M. abscessus* metabolic adaptations in Ac and M $\phi$ , we investigated the regulation of genes implicated in central carbon metabolism. The major finding was that *M. abscessus* switches from a glucose-like carbon source to fatty acids inside Ac and M $\phi$  (**Figure 3**). The glycolysis/neoglucogenesis and pentose phosphate pathways were mostly down-regulated or unchanged inside the cells whereas the  $\beta$ -oxidation of fatty acids was induced in Ac and M $\phi$ . This switch was observed since the early time of Ac infection. Fifteen genes predicted to encode enzymes necessary for the biochemical activation and  $\beta$ -oxidation of fatty acids like the fatty acid-coenzyme A (CoA) synthase (*fadD3*, 9, 10, 19), acyl-CoA dehydrogenase (*fadE5*, 14, 23-24, 27-29, 31), enoyl-CoA hydratase (*echA19*), hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (*fadB2*) and acetyl-CoA transferase (*fadA5*, 6), were up-regulated in Ac and M $\phi$ . Genes implicated in the synthesis of enzymes involved in the



breakdown of cholesterol A and B rings were highly induced in Ac and M $\phi$ .  $\beta$ -oxidation of fatty acids and cholesterol breakdown result in the accumulation of propionyl-CoA that is detoxified by the methylmalonyl pathway. By-products of these 3 pathways and the GABA shunt feed the TCA cycle while succinate generated by the TCA cycle enables the bacterium to deal with anaerobic respiration (Hartman *et al.*, 2014). In addition, *M. abscessus* may detoxify from glyoxylate by its conversion into malate through the glyoxylate shunt (**Figure 3**).

Furthermore, down-regulation of the mycolate operon (*MAB\_2027-MAB\_2039*) (**Table 1**), encompassing the  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthases (KasA & KasB) and  $\beta$ -ketoacyl synthases (*MAB\_2031* & *MAB\_2029*), as well as the malonyl-CoA acyl carrier protein transacylase (MCAT) homolog (*MAB\_2034*) suggests that *M. abscessus* undergoes starvation inside the cells as previously described (Jamet *et al.*, 2015).

#### *Regulation of conserved virulence genes in Ac and M $\phi$*

We assessed the regulation of conserved virulence genes from *M. tuberculosis*, known to be induced and to contribute to the cellular microbicidal defenses of the tubercle bacillus in M $\phi$  (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). The picture looked similar between Ac and M $\phi$  with a few exceptions in response to low O<sub>2</sub>/NO and to low iron (**Figure 4**). Transcriptional regulators like *dosR*, *phoP* and *mtrA* were regulated in the opposite direction in Ac and M $\phi$ , with *phoP* and *mtrA* only induced in Ac, and *dosR* exclusively induced in M $\phi$ . Other genes known to contribute to the survival of the bacterium in response to oxidative stress (Sherman *et al.*, 1999), comprising *ahpD*, *bcp*, *trxB1* and *2*, *trxC* genes (Schnappinger *et al.*, 2003), in addition to *ahpC*, were up-regulated in Ac and M $\phi$ .

Altogether, these analyses suggest that the induced sets of genes in Ac reflect main

adaptations to resistance to intracellular stress. Part of those genes were also shown to be induced in M $\phi$  and might thus constitute a repertoire of genes participating in *M. abscessus* virulence.

#### *M. abscessus highly induced genes in amoeba*

The highest FC values of *M. abscessus* regulated genes in Ac 4 and 16 hpi were individualized and compared to the FC values obtained from *M. abscessus* transcriptome in M $\phi$  and *M. chelonae* transcriptome in Ac (**Sup. Figure 3**). This comparison allowed individualizing 45 genes highly induced by *M. abscessus* in Ac (**Sup. Table 2**). We also listed the most induced genes in M $\phi$  (38 genes) (**Sup. Table 3**). From the comparison with the Ac transcriptomes, we constructed deletion mutants in 6 loci ( $\Delta$ OP1 to  $\Delta$ OP6) (**Table 3**). From *M. abscessus* transcriptome in M $\phi$  we constructed deletion mutants in 5 loci ( $\Delta$ OP 7 to  $\Delta$ OP11) among the most induced genes or in genes putatively implicated in the adaptation to intracellular stress (**Table 3**).

$\Delta$ OP1 to  $\Delta$ OP6 strains were evaluated for their intracellular multiplication in Ac and in M $\phi$  (**Figure 5A**). All mutants were attenuated in Ac and M $\phi$ , except one ( $\Delta$ OP5) (**Figure 5A**). All mutated strains had similar growth *in vitro* to the wild type strain (**Sup. Figure 4A**).  $\Delta$ OP2, 3, 4 and 6 were complemented and all strains recovered the wt phenotype except for the OP4 gene (*MAB\_2650*) potentially encoding an MmpL (**Sup. Figure 4B**).

These experiments confirmed the importance of these highly induced genes in Ac, in the intra-M $\phi$  survival of *M. abscessus*. Several genes (OP2, and 6) are absent from *M. chelonae*, or present in *M. chelonae* genome but at least four times less induced (OP3 and OP4) in Ac. We have analyzed their contribution towards intracellular survival by overexpressing *M. abscessus* OP2, 3, 6 and *MAB\_2649* genes in *M. chelonae* (**Figure 5B, left panel**), which is

unable to survive in M $\phi$  (Sousa *et al.*, 2015). Only the overexpression of *M. abscessus* OP3 and *MAB\_2649* increased *M. chelonae* survival in M $\phi$  (**Figure 5B, right panel**). By comparison, no increase in *M. chelonae* intracellular survival was observed when overexpressing *M. abscessus* OP2 and OP6 (**Figure 5B, right panel**).

#### *M. abscessus highly-induced genes in M $\phi$*

Defect in intracellular survival was noticed for all mutants from  $\Delta$ OP7 to  $\Delta$ OP11 strains (**Figure 5A**), the  $\Delta$ OP11 mutant was particularly attenuated (GI<0.1). OP11 (*MAB\_4532c*) KO strain tended to be eliminated by M $\phi$  while its growth was similar to the wt strain *in vitro* (**Sup. Figure 4**). When complementing  $\Delta$ OP11 strain with *MAB\_4532c*, we restored the wt phenotype (**Figure 6A**). *MAB\_4532c* encodes for an Eis N-acetyl transferase protein, according to a motif analysis (InterProScan 5). Of interest, *M. abscessus* contains two *eis* genes, named *eis1<sub>MAB</sub>* (*MAB\_4124*) and *eis2<sub>MAB</sub>* (*MAB\_4532c*) while *M. tuberculosis* possesses a single *eis<sub>MTB</sub>* gene (*Rv2416c*) for which *eis1<sub>MAB</sub>* (*MAB\_4124*) is the closest homolog. No conservation of synteny was observed between the respective genomic regions in *M. abscessus* and *M. tuberculosis* though (**Sup. Figure 5A**). In contrast, the *eis2<sub>MAB</sub>* locus depicts some similarity and conservation with the *M. tuberculosis eis* locus, with inverted and syntenic conservation of groups of genes (**Sup. Figure 5B**). *M. tuberculosis eis* locus was well-conserved in *M. abscessus* and corresponds to *MAB\_1619-MAB\_1627* and *MAB\_1633-MAB\_1637* regions (**Sup. Figure 5C**). Both *eis1<sub>MAB</sub>* and *eis2<sub>MAB</sub>* were found closed to *mmpL* (brown arrows) and/or *mmpS* (orange arrow) genes (**Sup. Figure 5**). In *M. abscessus eis2* locus, an *mmpL* gene (*MAB\_4529*) was conserved in *M. tuberculosis* corresponding to *mmpL11* (**Sup. Figure 5B**). To assess the function of *M. abscessus eis* genes we performed transcomplementation of KO strains ( $\Delta$ *eis1<sub>MAB</sub>* and  $\Delta$ *eis2<sub>MAB</sub>*) with *M. tuberculosis eis*

(*eis<sub>MTB</sub>*). Of interest, and unlike *eis<sub>2MAB</sub>*, *eis<sub>1MAB</sub>* was repressed inside Mφ (**Sup. Figure 6**) and *eis<sub>1MAB</sub>* KO strain survived to Mφ phagocytosis (**Figures 6A-B**). Complementation of  $\Delta$ *eis<sub>1MAB</sub>* and  $\Delta$ *eis<sub>2MAB</sub>* with *eis<sub>1MAB</sub>* or *eis<sub>2MAB</sub>* respectively allowed the recovery of both mutants intracellular survival (**Figures 6A-B**). However, complementation with *eis<sub>MTB</sub>* gene allowed only partial restoration of the intracellular replicative phenotype for the  $\Delta$ *eis<sub>2MAB</sub>* mutant, but no restoration was observed for the  $\Delta$ *eis<sub>1MAB</sub>* mutant (**Figure 6A-B**). Similar behaviors regarding apoptosis, necrosis, autophagy and phagosomal acidification were observed when comparing the wt *M. abscessus* strain with the  $\Delta$ *eis<sub>2MAB</sub>* mutant (**Sup. Figure 7**). However, two major differences were observed. Firstly, infection of Mφ with the  $\Delta$ *eis<sub>2MAB</sub>* strain (at a MOI of 50) was associated with higher production of ROS by the cells and loss of *eis<sub>2MAB</sub>* also sensitized *M. abscessus* to ROS and notably to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figures 6C-D**). Secondly, the  $\Delta$ *eis<sub>2MAB</sub>* mutant was unable to damage phagosomal membrane and to provoke phagosome-cytosol contacts as compared to the wt and complemented *M. abscessus* strains (**Figure 6E**).

## DISCUSSION

The main objective of this work was to understand the genomic benefits of *M. abscessus* to withstand and survive in eukaryotic cells. Some genes strongly induced after infection of Ac were required for survival in M $\phi$ . Also, some genes strongly induced after infection of M $\phi$  were required for survival in Ac. These results confirmed that *M. abscessus* life in Ac or M $\phi$  triggers genes allowing to survive phagocytosis by both Ac and M $\phi$ . They are complementary to the *Tn M. abscessus* library viability screen in Ac, allowing the identification of two additional virulence factors, the type VII secretion system ESX4 and the lipid transport protein MmpL8<sub>MAB</sub> (Laencina *et al.*, 2018; Dubois, Viljoen, *et al.*, 2018). The attenuation of KO strains in M $\phi$  depleted for genes highly induced by *M. abscessus* in Ac but not in M $\phi$  also suggests that the intra-amoebal environment might enhance *M. abscessus* virulence through the triggering of genes required for intracellular survival. In *M. chelonae*, orthologous genes weren't induced that high, some of them were repressed or not regulated, further suggesting that this peculiar induction of *M. abscessus* genes after Ac infection was favorable for its survival in M $\phi$ . Notably, the over-induction of *MAB\_2649* and *MAB\_1517c* genes in *M. chelonae* favors its replication in M $\phi$ , suggesting that the high induction of these two genes in amoebae may trigger *M. abscessus* virulence. In addition, we previously showed that co-culturing *M. abscessus* with amoebae enhances its virulence even *in vivo* through the induction of the *plc* virulence gene (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

Most of the 6 loci (OP1 to OP6) studied encode for hypothetical proteins, with the exception of the *MAB\_1517c* gene encoding a probable methyl transferase, and the *MAB\_2649* and *MAB\_2650* genes encoding an MmpS and an MmpL respectively (**Table 2**) (Viljoen *et al.*, 2017). Inside *M. abscessus* OP2, mainly comprising genes of unknown function, we identified an ABC transporter, FecCD/TroCD-like in *MAB\_1243c* protein and an alkaline shock protein

Asp23 in MAB\_1247c protein by performing a motif analysis. *M. abscessus* OP3 encompasses MAB\_1517c encoding a Tetracenomycin polyketide synthesis O-methyltransferase TcmP. This protein was found to confer resistance to Tetracenomycin in *M. avium* and to be potentially implicated in lipid synthesis. A motif analysis performed on *M. abscessus* OP6 gene shows that MAB\_4791c encodes a protein implicated in the twin-arginine translocation pathway (see below).

A striking result of our work is the essential role of the *eis2<sub>Mab</sub>* gene in early resistance to the microbicidal defense of M $\phi$ , in the phagosomal membrane damage and cytosol contact, allowing the intracellular survival of *M. abscessus*. Although *M. abscessus* possesses 2 *eis* genes, there is no redundancy in their respective functions, the *eis1<sub>Mab</sub>* mutant presenting a similar behavior to the wt strain in M $\phi$ , with only the loss of a log<sub>10</sub> CFU 5 dpi, compared to the *eis2<sub>Mab</sub>* mutant almost cleared by M $\phi$  5 dpi. Despite higher genomic identity between *eis1<sub>MAB</sub>* and *eis<sub>MTB</sub>*, overexpression of *M. tuberculosis eis* genes in  $\Delta$ *eis2<sub>MAB</sub>* strain allow the bacterium surviving within the first 24 hours post-infection, demonstrating similar function of *eis<sub>MTB</sub>* and *eis2<sub>MAB</sub>* in the bacteria resistance to M $\phi$  phagocytosis. However the deletion of *eis2<sub>MAB</sub>* is more deleterious for the bacterium survival in M $\phi$  compared to the deletion of *eis<sub>MTB</sub>*, (Wei *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009). *Eis<sub>MTB</sub>* contributes to *M. tuberculosis* survival inside M $\phi$  by controlling host cell apoptosis, autophagy, ROS production and innate immune defenses (Shin *et al.*, 2010). As observed in *M. tuberculosis* (Shin *et al.*, 2010) increasing the MOI (to 50) raised differences between *eis2<sub>MAB</sub>* KO and wt strains with regard to resistance to oxidized derivatives. This effect of the bacterial load on the cell response was not yet observed regarding cell death mechanisms.

One of the peculiarities of the *eis2<sub>MAB</sub>* locus is to possess similarities with a genomic region of *M. tuberculosis*, within which is found the *mmpL11* gene. The potential counterpart in

*M. abscessus* is MAB\_4529 (**Sup. Figure 5**). Most MmpL are lipid transporters implicated in cell physiology and virulence (Chalut, 2016; Viljoen *et al.*, 2017). *M. abscessus* encodes 27 MmpLs, twice as much as *M. tuberculosis* (Viljoen *et al.*, 2017). In *M. tuberculosis*, MmpL11 is implicated in heme iron acquisition (Owens *et al.*, 2013) and the transport of mycolic acid wax ester and long-chain triacylglycerols (Wright *et al.*, 2017). Three genes conserved in *M. abscessus* *eis2* locus encode for proteins belonging to the lipid transport and metabolism pathways (COG I), which suggests, together with conservation of *M. tuberculosis* *mmpL11* locus, that *M. abscessus* *eis2* locus might participate in cell wall biogenesis (Yamaryo-Botte *et al.*, 2015).

Transcriptomic analysis revealed that nine *M. abscessus* genes, which orthologues in *M. tuberculosis* contribute to virulence, were highly induced during infection of M $\phi$  (**Sup. Table 2**). Among them, WhiB7 and DevR-DevS encoding genes are implicated in stress sensing (Kumar *et al.*, 2011). WhiB7, a Fe-S cluster protein, was shown to be induced in response to perturbation in amino-acid metabolism, under reducing intracellular state, iron depletion and increased temperatures (Geiman *et al.*, 2006). The 20-fold increase of *M. abscessus* *whiB7* gene in M $\phi$  suggests that *M. abscessus* may undergo similar stresses in M $\phi$ . The DevR response regulator of the histidine kinase DevS was also highly up-regulated. In *M. tuberculosis*, the *devR-devS* two-component system (also known as the DosR system) is activated in response to hypoxia (Sherman *et al.*, 2001). Likewise, *M. abscessus* MAB\_2562c the orthologue of *Rv0081* was induced by 10-fold in M $\phi$ . A putative orthologue (MAB\_1409c) of the dormancy response gene *Rv1258c* was also strongly induced in M $\phi$ . The conserved Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB-encoding gene is thought to be involved in fatty acid metabolism, unless it confers protection against DNA methylation. The *aspC* gene was induced by 8-fold. AspC mediates nitrogen transfer from aspartate to glutamate, which

in turn, together with glutamine, provides nitrogen to most of the biosynthesis pathways. This is thought to be essential in *M. tuberculosis* (Sassetti *et al.*, 2003), while aspartate is required for mycobacterial virulence (Gouzy *et al.*, 2013). *M. abscessus katA* gene, which is conserved in *M. avium* and *Listeria monocytogenes*, is a catalase that degrades H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and oxygen in a single reaction. Such a reaction, enabling resistance to oxidative metabolites, may be an important mechanism for surviving in phagocytic cells (Manca *et al.*, 1999). *M. abscessus eamA* gene (*MAB\_0677c*), which is thought to encode a drug/metabolite transporter, was induced in Mφ. Two additional genes (*MAB\_3762* and *MAB\_3180*) encoding proteins with an EamA domain are also highly induced. Finally, at the molecular function level, it appears that six of *M. abscessus* top induced genes in Mφ encode for acyl or N-acetyl transferase proteins playing a role in post-translational modifications.

*M. abscessus* transcriptomes' comparison in Ac or Mφ highlights metabolic responses specific to each cell. In Mφ, *M. abscessus* enters a slow replicative stage, and activates detoxification processes and protein secretion pathways. By comparison, in amoebae *M. abscessus* switches on protein synthesis, lipid transport and metabolism, transcription post-translational modifications (PTM), protein turn over and chaperones (COG O), reflecting a more active and replicative behavior as compared to a more persistent state in Mφ. Actually, cell wall biogenesis including peptidoglycan and glycosaminoglycan biosynthetic processes were down-regulated in Mφ. Similarly, *mtrA*, *phoP* and *devR* were differently expressed, with only *devR* up-regulated in Mφ, confirming the switch towards a slow growth stage for *M. abscessus* in Mφ.

Over-representation of the COG O (post-translational modification, protein turnover, molecular chaperone) category in *M. abscessus* infecting Ac indicates that *M. abscessus* may alter cellular processes during its interactions with amoebae via PTM as described in various



pathogens (Ribet and Cossart, 2010; Müller *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2017). Protein turnover does not only help to clear old proteins but also aids a fast adaptation to nutrient poor environments (Goldberg and St. John, 1976). Molecular chaperones help pathogens override unfavorable conditions encounters in the host like heat shock, oxidative and acid stresses (Neckers and Tatu, 2008). They also contribute to the inhibition of lysosomal fusion and favor bacterial growth (Neckers and Tatu, 2008). They may therefore form a first line of defense against bactericidal stresses and help consolidate pathogen virulence. Thus, over-representation of the COG O inside amoebae might reflect specific intracellular cues the mycobacterium faced since the early time of infection.

In Ac, the most enriched GO is adenine salvage (GO:0006168) (**Figure 2**). This GO represents any process that generates adenine from derivatives without any *de novo* synthesis. Mycobacteria are able to limit their high energy demanding nucleotide synthesis (Ducati *et al.*, 2011). Mycobacteria are also capable of scavenging free nitrogenous bases from the medium (Ducati *et al.*, 2011). Under conditions of low energy availability or rapid multiplication, the salvage pathway may then be the main source of maintaining the nucleotide pool (Ducati *et al.*, 2011).

Sulfur metabolism (GO:0000103), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) biosynthetic pathway (GO:0070814) and detoxification via Fe-S cluster assembly proteins (GO:0016226) in addition to polyamine transport (GO:0015846), were also enriched in Ac. In its reduced form, sulfur is used in the biosynthesis of the amino acid cysteine that is one of the prime targets for reactive nitrogen intermediates (Rhee *et al.*, 2005). Those pathways might play a key role in *M. abscessus* survival in phagocytic cells, since genes involved in the metabolism of sulfur have consistently been identified as up-regulated in conditions that mimic the intra-macrophagic environment and during Mφ infection by *M. tuberculosis* (Schnappinger *et al.*,

2003). As for polyamines (cadaverine, putrescine and spermidine) that have pleiotropic effects on cells via their interaction with nucleic acids, a role in bacterial virulence by allowing the escape of mycobacteria from the phagolysosome, toxin activity or protection from oxidative and acid stress has been demonstrated (Shah and Swiatlo, 2008).

In M $\phi$ , glycerol ether metabolic process; MEP pathway and L-proline biosynthetic process were most enriched. Glycerol ether metabolic process corresponds to glycerophospholipids-seminalipids-plasmecholine metabolism and cellular amide biosynthetic processes. The MEP pathway is required for isoprenoid precursor biosynthesis (Rohmer *et al.*, 1993). A wide variety of monoterpenes and diterpenes belong to isoprenoid classes which function as toxins, growth inhibitors, or other secondary metabolites (Gershenzon and Dudareva, 2007). Finally, proline has been reported as an important factor in the adaptation of mycobacteria to slow growth rate and hypoxia (Berney *et al.*, 2012). It has been believed that the proline-utilization pathway protects mycobacterial cells by detoxifying methylglyoxal, a by-product of endogenous glycerol metabolism (Berney *et al.*, 2012) that can damage DNA and proteins within cells. Up-regulation of base-excision repair suggests that the mycobacterium presently undergoes DNA damaging. Protein folding was also enriched, as well as the type II secretion system, which was enriched by more than two-fold. This secretion system promotes specific transport of folded periplasmic proteins across a dedicated channel in the outer membrane. It necessitates both Sec and Tat pathways to secrete proteins into the periplasm. Potential roles for SecA1 and SecA2 in *M. tuberculosis* dormancy has been reported while the Tat pathway was shown to contribute to virulence in *Legionella pneumophila* for instance, by facilitating secretion of Phospholipase C (Rossier and Cianciotto, 2005), a virulence factor conserved in *M. abscessus* (Ripoll *et al.*, 2009).

Both Ac and M $\phi$  were sensed as a stressful environment by *M. abscessus* by the up-

regulation of genes known to be involved in multiple stress responses. Induction of low O<sub>2</sub> and low NO response genes confirm hypoxic environments encountered by *M. abscessus* either in Ac or Mφ.

In conclusion, the elements found in this work confirm that induced genes in amoebae play an essential role in the future survival of *M. abscessus* in Mφ. Both environments have commonalities, in terms of metabolic switches, especially to withstand the host response, but provoke very different responses indicating the active side of intra-amoebic life compared to a more deleterious side of life within the Mφ. its intra-amoebic life possibly allows *M. abscessus* to withstand this noxious environment, especially thanks to several genes which role in virulence has been confirmed in this work. Many tracks opened during this work must now be followed to complete this picture and provide a full understanding of *M. abscessus* interactions with host cells.

## REFERENCES

- Adékambi, T., Salah, S. Ben, Khlif, M., Raoult, D., and Drancourt, M. (2006a) Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5974–81.
- Adékambi, T., Salah, S. Ben, Khlif, M., Raoult, D., and Drancourt, M. (2006b) Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5974–81.
- Ahmed, N., Saini, V., Raghuvanshi, S., Khurana, J.P., Tyagi, A.K., Tyagi, A.K., and Hasnain, S.E. (2007) Molecular Analysis of a Leprosy Immunotherapeutic Bacillus Provides Insights into Mycobacterium Evolution. *PLoS One* **2**: e968.
- Angenent, L.T., Kelley, S.T., St Amand, A., Pace, N.R., and Hernandez, M.T. (2005) Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4860–5.
- Bakala N’Goma, J.C., Moigne, V. Le, Soismier, N., Laencina, L., Chevalier, F. Le, Roux, A.-L., *et al.* (2015a) Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. *Infect Immun* **83**: 780–91.
- Bakala N’Goma, J.C., Moigne, V. Le, Soismier, N., Laencina, L., Chevalier, F. Le, Roux, A.-L., *et al.* (2015b) Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. *Infect Immun* **83**: 780–91.
- Barker, J., and Brown, M.R.W. (1994) Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**: 1253–1259.
- Berney, M., Weimar, M.R., Heikal, A., and Cook, G.M. (2012) Regulation of proline metabolism

in mycobacteria and its role in carbon metabolism under hypoxia. *Mol Microbiol* **84**: 664–81.

Berney, M., Weimar, M.R., Heikal, A., and Cook, G.M. (2012) Regulation of proline metabolism in mycobacteria and its role in carbon metabolism under hypoxia. *Mol Microbiol* **84**: 664–681.

Chalut, C. (2016) MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* **100**: 32–45.

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**: 3759–67.

Dubois, V., Laencina, L., Bories, A., Moigne, V. Le, Pawlik, A., Herrmann, J.-L., and Girard-Misguich, F. (2018) Identification of Virulence Markers of *Mycobacterium abscessus* for Intracellular Replication in Phagocytes. *J Vis Exp* .

Dubois, V., Viljoen, A., Laencina, L., Moigne, V. Le, Bernut, A., Dubar, F., *et al.* (2018) MmpL8MAB controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 201812984.

Ducati, R.G., Breda, A., Basso, L.A., and Santos, D.S. (2011) Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem* **18**: 1258–75.

Eddyani, M., Jonckheere, J.F. De, Durnez, L., Suykerbuyk, P., Leirs, H., and Portaels, F. (2008) Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6547–53.

Falkinham, III, J.O. (2009) Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* **107**: 356–367.

Geiman, D.E., Raghunand, T.R., Agarwal, N., and Bishai, W.R. (2006) Differential Gene Expression in Response to Exposure to Antimycobacterial Agents and Other Stress

Conditions among Seven Mycobacterium tuberculosis whiB-Like Genes. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2836–2841.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., *et al.* (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80.

Gershenzon, J., and Dudareva, N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* **3**: 408–414.

Goldberg, A.L., and John, A.C. St. (1976) Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells: Part 2. *Annu Rev Biochem* **45**: 747–804.

Gomila, M., Ramirez, A., Gasco, J., and Lalucat, J. (2008) Mycobacterium llatzerense sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2769–2773.

Gouzy, A., Poquet, Y., and Neyrolles, O. (2013) A central role for aspartate in Mycobacterium tuberculosis physiology and virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 68.

Greub, G., and Raoult, D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413–33.

Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., *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.

Guidotti, T.L., Ragain, L., Haas, P. de, and Soolingen, D. van (2008) Communicating with healthcare providers. *J Water Health* **6**: s53.

Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., *et al.* (2005) Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* **1**: e5.

- Hartman, T., Weinrick, B., Vilchèze, C., Berney, M., Tufariello, J., Cook, G.M., *et al.* (2014) Succinate dehydrogenase is the regulator of respiration in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **10**: e1004510.
- Jamet, S., Quentin, Y., Coudray, C., Texier, P., Laval, F., Daffé, M., *et al.* (2015) Evolution of Mycolic Acid Biosynthesis Genes and Their Regulation during Starvation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **197**: 3797–811.
- Kumar, A., Farhana, A., Guidry, L., Saini, V., Hondalus, M., and Steyn, A.J.C. (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev Mol Med* **13**: e39.
- Laencina, L., Dubois, V., Moigne, V. Le, Viljoen, A., Majlessi, L., Pritchard, J., *et al.* (2018) Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci* **115**: E1002–E1011.
- Lamrabet, O., Mba Medie, F., and Drancourt, M. (2012) *Acanthamoeba polyphaga*-enhanced growth of *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* **7**: e29833.
- Lavana, M., Katoch, K., Katoch, V.M., Gupta, A.K., Chauhan, D.S., Sharma, R., *et al.* (2008) Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol* **8**: 627–631.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C.E., Freedman, V.H., Kaplan, G., and Kaplan, G. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* **67**: 74–9.
- Medjahed, H., and Singh, A.K. (2010) Genetic manipulation of *Mycobacterium abscessus*. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 10**: Unit 10D.2.

- Moigne, V. Le, Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., *et al.* (2016) MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection. *Infect Immun* **84**: 2895–2903.
- Mukhopadhyay, S., Nair, S., and Ghosh, S. (2012) Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 463–485.
- Müller, M.P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S., and Itzen, A. (2010) The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**: 946–9.
- Neckers, L., and Tatu, U. (2008) Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe* **4**: 519–27.
- Owens, C.P., Chim, N., Graves, A.B., Harmston, C.A., Iniguez, A., Contreras, H., *et al.* (2013) The *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein Rv0203 transfers heme to membrane proteins MmpL3 and MmpL11. *J Biol Chem* **288**: 21714–28.
- Pagnier, I., Raoult, D., and Scola, B. La (2008) Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ Microbiol* **10**: 1135–1144.
- Parra, J., Marcoux, J., Poncin, I., Canaan, S., Herrmann, J.L., Nigou, J., *et al.* (2017) Scrutiny of *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa antigen proteoforms provides new insights in the lipoglycoprotein biogenesis paradigm. *Sci Rep* **7**: 43682.
- Rhee, K.Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C.F. (2005) S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 467–472.
- Ribet, D., and Cossart, P. (2010) Pathogen-Mediated Posttranslational Modifications: A Re-



emerging Field. *Cell* **143**: 694–702.

Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., *et al.* (2009) Non Mycobacterial Virulence Genes in the Genome of the Emerging Pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **4**: e5660.

Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295 ( Pt 2)**: 517–24.

Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2005) The *Legionella pneumophila* *tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect Immun* **73**: 2020–32.

Roux, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., *et al.* (2016) The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* **6**: 160185.

Salah, I. Ben, Adékambi, T., and Drancourt, M. (2009) *Mycobacterium phocaicum* in therapy pool water. *Int J Hyg Environ Health* **212**: 439–444.

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.

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.

Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., *et al.* (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages. *J Exp Med* **198**: 693–704.

Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J. a, Monahan, I.M., *et al.* (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages:

Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* **198**: 693–704.

Shah, P., and Swiatlo, E. (2008) MicroReview A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. .

Sherman, D.R., Mdluli, K., Hickey, M.J., Barry, C.E., and Stover, C.K. (1999) AhpC, oxidative stress and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biofactors* **10**: 211–7.

Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., and Schoolnik, G.K. (2001) Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7534–9.

Shin, D.-M., Jeon, B.-Y., Lee, H.-M., Jin, H.S., Yuk, J.-M., Song, C.-H., *et al.* (2010) *Mycobacterium tuberculosis* Eis Regulates Autophagy, Inflammation, and Cell Death through Redox-dependent Signaling. *PLoS Pathog* **6**: e1001230.

Siddiqui, R., and Khan, N.A. (2012) *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Exp Parasitol* **130**: 95–97.

Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015) Cytosolic Access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. *PLOS Pathog* **11**: e1004650.

Sousa, S., Bandeira, M., Carvalho, P.A., Duarte, A., and Jordao, L. (2015) Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *Int J Mycobacteriology* **4**: 36–43.

Stinear, T.P., Seemann, T., Harrison, P.F., Jenkin, G.A., Davies, J.K., Johnson, P.D.R., *et al.* (2008) Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* **18**: 729–741.

Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., and Koonin, E. V (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**: 33–6.

- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., and Greub, G. (2006) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2428–38.
- Thomas, V., and McDonnell, G. (2007) Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett Appl Microbiol* **45**: 349–357.
- 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.
- Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., *et al.* (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database (Oxford)* **2009**: bap021.
- 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**.
- 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.
- Wright, C.C., Hsu, F.F., Arnett, E., Dunaj, J.L., Davidson, P.M., Pacheco, S.A., *et al.* (2017) The Mycobacterium tuberculosis MmpL11 Cell Wall Lipid Transporter Is Important for Biofilm Formation, Intracellular Growth, and Nonreplicating Persistence. *Infect Immun* **85**: e00131-17.
- Wu, S., Barnes, P.F., Samten, B., Pang, X., Rodrigue, S., Ghanny, S., *et al.* (2009) Activation of the eis gene in a W-Beijing strain of Mycobacterium tuberculosis correlates with increased SigA levels and enhanced intracellular growth. *Microbiology* **155**: 1272–81.

Yamaryo-Botte, Y., Rainczuk, A.K., Lea-Smith, D.J., Brammananth, R., Peet, P.L. van der, Meikle, P., *et al.* (2015) Acetylation of Trehalose Mycolates Is Required for Efficient MmpL-Mediated Membrane Transport in Corynebacterineae. *ACS Chem Biol* **10**: 734–746.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains, plasmids and growth conditions**

A clinical isolate of *M. abscessus* subspecies *massiliense* smooth variant (43S) and *M. chelonae* type strain CCUG 47445 were used for the RNAseq experiments. Gene deletions were performed in *M. abscessus* subspecies *abscessus* CIP 104536T smooth strain. Both *M. abscessus* CIP strain and *M. chelonae* type strain were used to perform *in vitro* survival and complementation tests while gene deletions were performed with *M. abscessus* CIP strain. *M. abscessus* strains and *M. chelonae* strains were routinely grown aerobically at 37 °C and 32°C respectively, in Middlebrook 7H9 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose, and 250 mg/L kanamycin (Thermo Fisher Scientific) when necessary, with 25 mg/L zeocin (Thermo Fisher Scientific) for the knockout strains, and with 25 mg/L zeocin plus 250 mg/L hygromycin (Thermo Fisher Scientific) for complemented strains. *A. castellanii* (ATCC 30010) was grown at room temperature without CO<sub>2</sub> in peptone yeast extract glucose (PYG) broth for the amplification of the strain. J774.2 cell line was grown and used as described (Le Moigne *et al.*, 2016; Roux *et al.*, 2016).

### **Gene deletion and complementation**

Deletion of genes was performed using the recombineering system as described previously (Medjahed and Singh, 2010; Bakala N’Goma *et al.*, 2015). Growth of the KO strains was checked by measuring the optical density of bacterial cultures in 7H9 medium supplemented with glycerol 0.1%. Complementation was performed after amplifying and cloning genes into the integrative plasmid pMVH361 as described (Bakala N’Goma *et al.*, 2015).

## RNA isolation and RNA sequencing

Approximately  $10^7$  cells were infected in 50 mL tubes, with low agitation, without CO<sub>2</sub>. Amoebae were infected at 100 MOI at 32°C. Mφ were infected at 50 MOI at 37°C. Cells were washed 3 times after 1 hour of infection and resuspended in medium supplemented with amikacin 250 µg/mL and incubated for 1 hour to eliminate extracellular bacteria. Three additional washes were performed and cells were resuspended in medium supplemented with amikacin 50 µg/mL for the rest of the infection. Amoebal cells were harvested 4 h and 16 hpi for intracellular *M. abscessus* RNA isolation and 16 hpi for intracellular *M. chelonae* RNA isolation. Mφ were harvested 16 hpi for intracellular *M. abscessus* RNA isolation. RNA isolation was performed as described (Dubois, Laencina, *et al.*, 2018). Briefly, cells were lysed with a cold solution of Guanidium thiocyanate (GTC), N-Lauryl-sarcosine, Sodium citrate +/- Tween 80 plus β-mercaptoethanol. The lysates containing intracellular bacteria were collected, centrifuged and RNA was isolated from the bacterial pellets with TRIzol. The lysates were then transferred into 2 mL screw tubes containing zirconium beads and were conserved at -80°C for at least 1 day to allow inactivation of RNAses and cells dissolution. Bacteria cells were disrupted with a bead beater by performing to round at 6.500 rpm for 25 seconds, followed by one round at 6.500 rpm for 20 seconds. Two hundred µL of chloroform isoamyl was added and tubes were immediately mixed for 10 seconds. The mixture was centrifuged at 13.000 rpm for 15 minutes at 4°C. The RNA present in the upper phase was transferred to a fresh tube, and precipitated by adding 0.8 volume of isopropanol. Tubes were inverted twice to allow precipitation and kept at -20°C for at least 2 hours. The precipitated RNA was then pelleted by centrifugation at 13.000 rpm for 30 min at 4°C. The pellet was washed with ethanol (70%) and centrifuged at 13.000 rpm for 10 min at 4°C. The washed pellet was air-dried, resuspended in RNase-free water and stored at -80°C until

cDNA library construction.

Control RNA was isolated from bacteria cells grown in amoeba or M $\phi$  infection medium (mowat and DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum respectively).

Biological replicates were prepared to allow statistical comparisons of infected and non-infected samples.

### **RNA treatments prior to library preparation and library preparation**

RNA samples were treated with DNases (AMBION) to remove DNA contaminants, purified with the RNA MEGAclean kit (ThermoFisher), and depleted of ribosomal RNA with the riboZero kit (Illumina). RNA (total, depleted, purified) is checked on the Bioanalyser system (Agilent) for its quality and integrity. cDNA libraries were prepared with samples displaying a RIN above 7. RNA concentrations were measured using the nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and the Qubit fluorometer (Invitrogen). Libraries were prepared with the TruSeq Stranded RNA LT prep kit cDNA synthesis, set A (Illumina) which consists in: (1) RNA fragmentation, (2) 1st strand cDNA synthesis (Reverse transcriptase and random primers), (3) 2d strand cDNA synthesis (removal of the RNA template and synthesis of a new strand with dUTP), (4) no end repair step, (5) adenylation of 3' ends, (6) ligation of adapters and (7) enrichment of DNA fragments. Libraries are checked for concentration and quality on DNA chips with Agilent Bioanalyzer. More precise and accurate quantification is performed with sensitive fluorescent-based quantitation assays ("Quant-It" assays kit and Qubit fluorometer, Invitrogen).

### **NGS sequencing and data analysis**

Sequencing and statistical analysis were performed in the Transcriptome and Epigenome

platform (PF2) of Pasteur Institute, Paris, France. The cDNA libraries were sequenced with Illumina HiSeq 2500 system by performing an SRM run (SR: Single Read, PE: Paired-end Reads, M: multiplexed samples) of 51 cycles with 7 index bases read. The quality of the sequencing was assessed with the external FastQC program (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). After the trimming of adapter sequences, reads were aligned with RefSeq assemblies, either *M. abscessus* subsp. *massiliense* strain GO 06 assembly (GCF\_000277775.2) or *M. chelonae* CCUG 47445 assembly (GCF\_001632805.1), using the Bowtie software (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). Differential analysis of gene expression was performed using the R software, Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) packages including *DESeq2* (Love *et al.*, 2014) and the PF2tools package (version 1.2.12) developed at PF2. Normalization and differential analysis were carried out according to the *DESeq2* model and package (version 1.10.0). Genes with expression changes depicting a p-value over 0.05 were removed from the analysis. Putative conserved genes of *M. abscessus* 43S genes and *M. chelonae* in *M. abscessus* subsp. *abscessus* CIP strain were determined by Birectionnal Best Hit search using the OpSCAN software (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/opscan/>). (Differentially expressed) genes assignment to COGs was performed using the COG automatic Classification from the MicroScope database (Vallenet *et al.*, 2009). Percentage assignments between groups were compared by performing Fisher's exact tests. GOE analyses were performed with the topGO R package (Bioconductor) (Alexa *et al.* 2018).

### **Quantitative real-time PCR**

qRT-PCR were performed with a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad). Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out DNA contamination. The *sigA* gene



was used as an internal control (Bakala N’Goma *et al.*, 2015). Each qRT-PCR was performed with three biological replicates.

### ***In vitro survival assays***

Survival of strains in amoebae and M $\phi$  were performed as previously described (Dubois, Viljoen, *et al.*, 2018). Survival tests of KO strains were performed in duplicates three times. Confirmation of attenuated phenotypes and complementation tests were performed in triplicates three times.

### ***Phagosome acidification and phagosomal escape FRET assays***

***Phagosome acidification***  
Phagosome acidification and phagosomal escape FRET assays and phagosomal escape FRET assays were conducted in THP-1 cells as previously described (Simeone *et al.*, 2015; Roux *et al.*, 2016).

### ***Cell death, autophagy and ROS production assays***

Macrophage death following infection with *M. abscessus* was assessed with the Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI for flow cytometry (ThermoFischer). Autophagy was assessed with the Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit (ThermoFisher). ROS production by macrophages was measured with the MitoSOX Red kit (ThermoFisher).

Infections were performed as previously described (Dubois, Viljoen, *et al.*, 2018), at 50 MOI. In the ROS production assay, cells were infected 15 min only.

### ***Bacterial sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed by culturing the bacteria in 7H9 medium supplemented with

glycerol 0,1% and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Laboratoires Gillbert) (20 µM). CFU tests were performed at different times post-treatment (2 h, 4 h, 8 h) to determine the number of viable bacteria compared to the wt strain (Growth Index).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Description of *M. abscessus* transcriptomes in Ac (A) and M $\phi$  (C).** Differentially expressed genes (DEGs) fold change (FC) in *A. castellanii* (Ac) 4 hpi are plotted against DEGs FC 16 hpi (A). DEGs FC in Ac 16 hpi are also plotted against DEGs FC in macrophages (M $\phi$ ) 16 hpi (C). DEGs from quadrants 2 (Q2) and 4 (Q4) are genes regulated in the same direction whereas DEGs from Q1 and Q3 are genes regulated in opposite directions. Dots on the plot axes are genes regulated in one condition only. Proportions of DEGs in each case are quantified. ***M. abscessus* adaptations to Ac (B) and M $\phi$  (D) unraveled by COG categorization.** Highly regulated genes were assigned to COGs. The genome assignment (framed in black) serves as a reference for COG enrichment tests. Fisher's exact tests were performed to compare the transcriptome sets and the genome set of genes assignments to COG. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Figure 2: Gene ontology enrichment analyses applied on *M. abscessus* intracellular transcriptomes.**

**A. Up-regulated genes in Ac 16 hpi. B. Up-regulated genes in M $\phi$ . C. Down-regulated genes in Ac 16 hpi. D. Down-regulated genes in M $\phi$  16 hpi.** Gene ontology (GO) enrichment analysis was performed with the topGO R package. Enriched GOs are sorted according to their enrichment factor (EF), corresponding to the ratio of significant DEGs assigned to the GO over expected assigned DEGs to the GO. Enriched GOs are represented by circles which size is proportional to the amount of significant DEGs assigned. Positive statistical tests are given that face each GO. Method giving the smallest  $p$ -value is underlined.

**Figure 3: Intracellular *M. abscessus* relies on fatty acid and cholesterol catabolism.**

DEGs FC of genes implicated in Central Carbon Metabolism (CCM) is represented on a Heat Map ranging from blue (down DEGs) to red (up DEGs). On this Heat Map both *M. abscessus* intra-amoebal (Ac) and intra-macrophagic (M $\phi$ ) DEGs are depicted.

**Figure 4: Regulation of genes required for pathogenic mycobacteria survival *in vitro*.**

Regulation of *M. abscessus* genes conserved in *M. tuberculosis*, known to be induced and to contribute to cellular microbicidal defenses of the tubercle bacillus in M $\phi$  (Mukhopadhyay *et al.*, 2012) is represented on a Heat Map in a blue (repressed genes) to red (induced genes) color scale. On this Heat Map both *M. abscessus* intra-amoebal (Ac) and intra-macrophagic (M $\phi$ ) DEGs are depicted and divided in categories: « broad transcription regulators » and genes implicated in the response to various intracellular stress (« Multiple stress response », « Heat Shock response », « Molecular chaperones », « DNA damage repair enzymes », « Response to low O<sub>2</sub> / NO », « Low iron response », « Response to oxidative stress »).

**Figure 5: Comparative transcriptomic analyses allow identifying genes required for *M. abscessus* survival in amoebae and macrophages.**

**A. Intracellular survival of selected KO ( $\Delta$ OP) in *A. castellanii* (Ac) and macrophages (M $\phi$ ).**

**B. Over-expression of 4 *M. abscessus* virulence genes (left panel) in *M. chelonae* and impacts on *M. chelonae* replication in macrophages (right panel).** FC values from *M. chelonae* transcriptome in Ac 16 hpi are compared to FC values mid-log phase cultures of *M. chelonae* strains overexpressing *M. abscessus* genes (left panel). Cells were infected at 10 MOI and colony forming units (CFU) tests were performed 0 and 3 dpi. The relative growth of each strain as compared to *M. abscessus* wt (Growth Index, GI) is given. All experiments

were repeated twice or more, in duplicates (A.) or triplicates (B). Statistical analyses were performed with GraphPad PRISM6. Histograms with error bars represent means  $\pm$  SD. Differences between means were analyzed by ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed. ns = non-significant. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Figure 6: *M. abscessus eis2* gene is essential for survival in macrophages and shares functions with *M. tuberculosis eis* conversely to *M. abscessus eis1*.**

**A. Intracellular survival of *M. abscessus eis2* KO strain ( $\Delta eis2_{MAB}$ ) and complementation in macrophages (M $\phi$ ). B. Intracellular survival of *M. abscessus eis1* KO strain ( $\Delta eis1_{MAB}$ ) and complementation in M $\phi$ .** Macrophages were infected at 10 MOI and colony forming unit (CFU) tests were performed at several times post-infection (0, 1, 3 and 5 dpi). **C. Control of ROS production by *M. abscessus* Eis2.** ROS production by M $\phi$  was assessed by flow cytometry with the MitoSox Red kit, 15 min post-infection at 50 MOI. **D. Sensitivity of *M. abscessus eis2* KO strain to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was assessed by incubated bacterial cultures with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20  $\mu$ M during 8 h. The amount of survival cells was determined by performing CFU tests at several hours post-infection (2, 4, 8 hpi). **E. Control of phagosomal rupture by *M. abscessus* Eis2.** Phagosomal rupture was assessed by performing a Fluorescence energy transfer (FRET) analysis as previously described (Simeone *et al.*, 2015). Results are depicted as signal overlays per group with 1,000,000 events per condition acquired in not infected cells (NI cells), Heat killed *M. abscessus* (HK), wild-type *M. abscessus* (Mabs wt), KO strains ( $\Delta eis2_{MAB}$ ), KO strains complemented with *eis2\_{MAB}* (C.*eis2\_{MAB}*). All experiments were repeated twice or more in triplicates. Statistical analyses were performed with GraphPad PRISM6. Histograms with error bars represent means  $\pm$  SD.

Differences between means were analyzed by ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed. ns = non-significant. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## SUPP. FIGURE LEGENDS

**Sup. Figure 1: DESeq2 statistical analyses.**

**A. *M. abscessus* transcriptomes in *A. castellanii* 4 and 16 hpi. B. *M. abscessus* transcriptome in macrophages 16 hpi. C. *M. chelonae* transcriptome in *A. castellanii* 16 hpi.** Hierarchical clustering of raw data (left panel) and transcriptome heatmaps (right panel) are depicted.

**Sup. Figure 2: Comparison of *M. abscessus* transcriptomes in *A. castellanii* and in macrophages according to differentially expressed genes fold change.**

**A. Differentially expressed genes (DEGs) were categorized according to their fold change (FC) expressed in  $\text{Log}_2$ .** Low DEGs depict a FC under  $|2|$ , Med DEGs depict a FC between  $|2|$  and  $|4|$  and High DEGs depict a FC higher than  $|4|$ . **B. Ratio of UP DEGs to DOWN DEGs were represented during co-cultures with *A. castellanii* (Ac) and macrophages ( $\text{M}\phi$ ).**

**Sup. Figure 3: Selection of *M. abscessus* genes highly induced in amoebae.**

*M. abscessus* highly induced genes in *A. castellanii* (Ac) were considered (n=77). Genes poorly induced in macrophages ( $\text{M}\phi$ ) (filter 1) and during *M. chelonae* co-culture with amoeba (filter 2) were conserved (n=45). FC: fold change ( $\text{Log}_2$  value).

**Sup. Figure 4: Verification of knockout strains growth in culture medium and contribution to virulence in macrophages.**

**A. KO strains growth in culture medium.** The strains were cultured in 7H9 medium supplemented with glycerol 0.1% for seven days. Growth curves were obtained by measuring the cultures optical density each day. **B. Complementation of *M. abscessus***

**ΔOP2,-3,-4 and -6 strains in macrophages.** Macrophages were infected at 10 MOI. Experiments were repeated three times in triplicates. Statistical analyses were performed with GraphPad PRISM6. Histograms with error bars represent means  $\pm$  SD. Differences between means were analyzed by ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed. ns = non-significant. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Sup. Figure 5: Conservation of *M. abscessus eis* loci in *Mycobacterium tuberculosis* and vice versa.**

**A. Conservation of *M. abscessus eis1* locus in *M. tuberculosis*. B. Conservation of *M. abscessus eis2* locus in *M. tuberculosis*. C. Conservation of *M. tuberculosis eis* locus in *M. abscessus*.** Bidirectional Best Hit (BBH) search was performed between *M. abscessus* and *M. tuberculosis* genomes with the OpSCAN software. BBHs are depicted by arrows filled with red, brown or orange. Brown arrows correspond to MmpL-encoding genes. Orange arrows correspond to MmpS-encoding genes. Grey bands link genes or groups of genes conserved in the two species.

**Sup. Figure 6: Expression of *M. abscessus eis* genes in macrophages 4 and 16 hpi.** *Eis1<sub>MAB</sub>* (left panel) and *eis2<sub>MAB</sub>* (right panel) expression in macrophages was measured twice in triplicates by quantitative-real time PCR by normalization with the *sigA* housekeeping gene.

**Sup. Figure 7: Intracellular phenotypes uncontrolled by *M. abscessus eis2* genes.**

**A. Cell death.** Macrophage death following infection with *M. abscessus* was assessed with the Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI for flow cytometry. **B. Cell**



**autophagy.** Cell autophagy was measured with the Premo Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit. At least 40 cells per condition were analyzed by confocal microscopy. The number of autophagic particules per cell (left panel) and acidification of autophagosomes (right panel) was determined with the Fiji software. **C. Phagosomal acidification.** Phagosomal acidification was assessed as previously described (Roux *et al.*, 2016). Macrophages were infected at 10 (C) or 50 MOI (A and B). Histograms with error bars represent means  $\pm$  SD. Differences between means were analyzed by ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed. ns = non-significant. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Table 1: Regulation of *M. abscessus* mycolate synthesis operon in Ac and M $\phi$ .**

<b>Mma gene</b>	<b>Encoded protein</b>	<b>Mabs gene</b>	<b>FC Ac 4 hpi</b>	<b>FC Ac 16 hpi</b>	<b>FC M<math>\phi</math> 16 hpi</b>
<i>MYCMA_RS13950</i>	Acyl carrier protein	<i>MAB_2027</i>	-3.28	-2.91	0.00
<i>MYCMA_RS13945</i>	3-oxoacyl-ACP synthase (Kas B)	<i>MAB_2028</i>	-2.68	-2.24	0.00
<i>MYCMA_RS13940</i>	Beta-ketoacyl synthase	<i>MAB_2029</i>	-2.95	-4.48	0.00
<i>MYCMA_RS13935</i>	3-oxoacyl-ACP synthase (Kas A)	<i>MAB_2030</i>	-3.80	-3.15	0.00
<i>MYCMA_RS13930</i>	Beta-ketoacyl synthase	<i>MAB_2031</i>	-2.92	0	-1.60
<i>MYCMA_RS13925</i>	3-oxoacyl-ACP reductase	<i>MAB_2032</i>	-2.16	0	-1.85
<i>MYCMA_RS13920</i>	Thioesterase	<i>MAB_2033</i>	-2.09	0	0.00
<i>MYCMA_RS13915</i>	Malonyl CoA-ACP transacylase	<i>MAB_2034</i>	-2.09	0	0.00
<i>MYCMA_RS13910</i>	Acyltransferase	<i>MAB_2035</i>	0	0	0.00
<i>MYCMA_RS13905</i>	Membrane protein (MmpS)	<i>MAB_2036</i>	-1.16	0	-1.06
<i>MYCMA_RS13900</i>	Hypothetical protein (MmpL)	<i>MAB_2037</i>	-0.68	-0.86	0.00
<i>MYCMA_RS13895</i>	Transporter	<i>MAB_2038</i>	0	0	0.00
<i>MYCMA_RS13890</i>	Lipase (LipH)	<i>MAB_2039</i>	0	0.86	-0.72

**Table 2: Deleted operons in *M. abscessus* CIP 104536T.**

<b>Operon ID</b>	<b>Mabs gene</b>	<b>Protein encoded</b>	<b>IP5 motif analysis on hypothetical proteins</b>
OP1 (2231455)	<i>MAB_4664</i>	Hypothetical protein	No IPR
	<i>MAB_1242c</i>	Hypothetical protein	No IPR
	<i>MAB_1243c</i>	Hypothetical protein	IPR035568: ABC transporter. FecCD/TroCD-like
OP2 (395711)	<i>MAB_1244c</i>	Hypothetical protein	No IPR
	<i>MAB_1245c</i>	Hypothetical protein	No IPR
	<i>MAB_1246c</i>	Hypothetical protein	No IPR
	<i>MAB_1247c</i>	Hypothetical protein	IPR005531: Alkaline shock protein Asp23
OP3 (2230454)	<i>MAB_1517c</i>	Probable O-methyltransferase Omt	
OP4 (396003)	<i>MAB_2649</i>	Putative membrane protein. MmpS family	
	<i>MAB_2650</i>	Putative membrane protein. MmpL family	
OP5 (2231454)	<i>MAB_4663</i>	Hypothetical protein	No IPR
OP6 (2231514)	<i>MAB_4791c</i>	Hypothetical protein	Twin-arginine translocation pathway. Signal sequence
OP7 (2229980)	<i>MAB_0086</i>	Taurine catabolism dioxygenase	
OP8 (395598)	<i>MAB_0734</i>	Hypothetical protein	Leukocidin/porin MspA superfamily (036435)
	<i>MAB_3132c</i>	Membrane protein	No IPR
OP9 (396109)	<i>MAB_3133c</i>	Hemin transporter	
	<i>MAB_3134c</i>	Transcriptional regulator	
OP10 (2231416)	<i>MAB_4509c</i>	Hypothetical protein	No IPR
OP11 (22311420)	<i>MAB_4532c</i>	Hypothetical protein	N-acetyltransferase Eis (016181)

**Supp. Table 1: Differentially expressed genes identified with the *DEseq2* package.**

<b>Transcriptomes</b>	<b>Down DEGs</b>	<b>Up DEGs</b>	<b>Tot</b>	<b>CDS cover</b>
Mabs, Ac 4 hpi	1218	1355	2573	56%
Mabs, Ac 16 hpi	1095	1122	2217	49%
Mabs, M $\phi$ hpi	1646	1671	3317	73%
Mchel, Ac 16 hpi	1186	1949	3835	80%

**Supp. Table 2: List of *M. abscessus* genes highly induced in Ac only.**

Mma gene	Encoded protein	IP5 analysis (IPR)	Mabs BBH	MTB BBH	MAV BBH	FC Ac, 4 hpi	FC Ac, 16 hpi
<i>Highly induced genes 4 hpi</i>							
MYCMA_RS01100	Hypothetical protein	No IPR	MAB_4664			5.71	0.00
MYCMA_RS08980	Glyoxalase		MAB_3056c			5.32	1.81
MYCMA_RS10865	Hypothetical protein	Magnesium transporter MgtE (006669)	MAB_2717c		MAV_2122	5.26	1.44
MYCMA_RS14505	MULTISPECIES: 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase		MAB_1916c	panB	panB	5.22	1.89
MYCMA_RS17210	Copper oxidase		MAB_1271c			4.99	2.71
MYCMA_RS10860	Hypothetical protein	No IPR	-			4.99	1.26
MYCMA_RS11360	Monoxygenase		MAB_2607			4.93	0.00
MYCMA_RS10755	Hypothetical protein	No IPR	MAB_2738c			4.84	2.22
MYCMA_RS17970	Hypothetical protein	No IPR	MAB_1117c			4.49	2.33
MYCMA_RS07655	MULTISPECIES: alkylhydroperoxidase		MAB_3311c			4.48	3.25
MYCMA_RS02005	Short-chain dehydrogenase		MAB_4478c		MAV_1797	4.45	1.84
MYCMA_RS06830	Nitroreductase		MAB_3461c			4.38	2.11
MYCMA_RS20755	Membrane protein	Transport accessory protein MmpS (008693)	MAB_0477			4.31	2.77
MYCMA_RS09135	Hypothetical protein	Virulence factor BrkB (017039)	MAB_3025	Rv2707	MAV_3600	4.29	1.90
MYCMA_RS11655	Hypothetical protein	No IPR	-			4.23	1.87
MYCMA_RS08985	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase		MAB_3055c			4.16	0.00
MYCMA_RS11985	Sulfite reductase subunit alpha		MAB_2492			4.13	2.55
MYCMA_RS12840	Hypothetical protein	No IPR	MAB_2313			4.07	3.46
MYCMA_RS03450	Acyl-CoA dehydrogenase		MAB_4158	fadE26	MAV_0652	4.05	2.31
<i>Highly induced genes 4 &amp; 16 hpi</i>							
MYCMA_RS18820	Sugar translocase		-			6.52	6.22
MYCMA_RS11145	MULTISPECIES: MmpS family protein		MAB_2649			4.73	6.82
MYCMA_RS19885	Short-chain dehydrogenase		MAB_0646c	Rv0068	MAV_4710	5.67	5.27

MYCMA_RS01105	Hypothetical protein	No IPR	MAB_4663	6.16	4.18
MYCMA_RS00455	Hypothetical protein	Twin-arginine translocation pathway, signal sequence (006311)	MAB_4791c	5.17	4.96
MYCMA_RS21900	TQXA domain-containing protein		MAB_0219	5.33	4.73
MYCMA_RS07540	MULTISPECIES: ATP-binding protein		MAB_3325c	5.03	4.75
<b>Highly induced genes 16 hpi</b>					
MYCMA_RS13965	(Fe-S)-cluster assembly protein		MAB_2020c	2.77	4.93
MYCMA_RS17325	Hypothetical protein	No IPR	MAB_1244c*	3.11	5.03
MYCMA_RS06800	MerR family transcriptional regulator		-	2.71	4.00
MYCMA_RS15995	TetR family transcriptional regulator		MAB_1518	1.52	4.01
MYCMA_RS18825	MarR family transcriptional regulator		MAB_0925c	3.20	5.04
MYCMA_RS17330	Hypothetical protein	ABC transporter, FecCD/TroCD-like	MAB_1243c	2.86	4.97
MYCMA_RS17315	Hypothetical protein	Alkaline shock protein Asp23 (05531)	MAB_1247c	3.43	5.10
MYCMA_RS02820	MULTISPECIES: molecular chaperone DnaK		MAB_4273c	2.63	4.87
MYCMA_RS12505	Activator of HSP90 ATPase		MAB_2387	3.12	4.99
MYCMA_RS20640	Carboxymuconolactone decarboxylase		-	0.00	7.63
MYCMA_RS10645	YrbE family protein		-	0.00	4.71
MYCMA_RS16000	GlcNAc transferase		MAB_1517c*	0.00	4.31
MYCMA_RS17320	Hypothetical protein	No IPR	MAB_1246c*	2.07	4.27
MYCMA_RS09170	GntR family transcriptional regulator		MAB_3018	0.00	5.71
MYCMA_RS10650	Membrane protein	No IPR	-	0.00	4.17
MYCMA_RS01300	TetR family transcriptional regulator		MAB_4625	2.55	4.30
MYCMA_RS10655	Membrane protein	No IPR	-	0.00	4.05
MYCMA_RS02345	MULTISPECIES: alkyl hydroperoxide reductase		MAB_4408c	3.46	4.04
MYCMA_RS14940	Transposase		-	3.22	4.03

**Supp. Table 3: List of *M. abscessus* genes highly induced in M $\phi$  or Ac 16 hpi.**

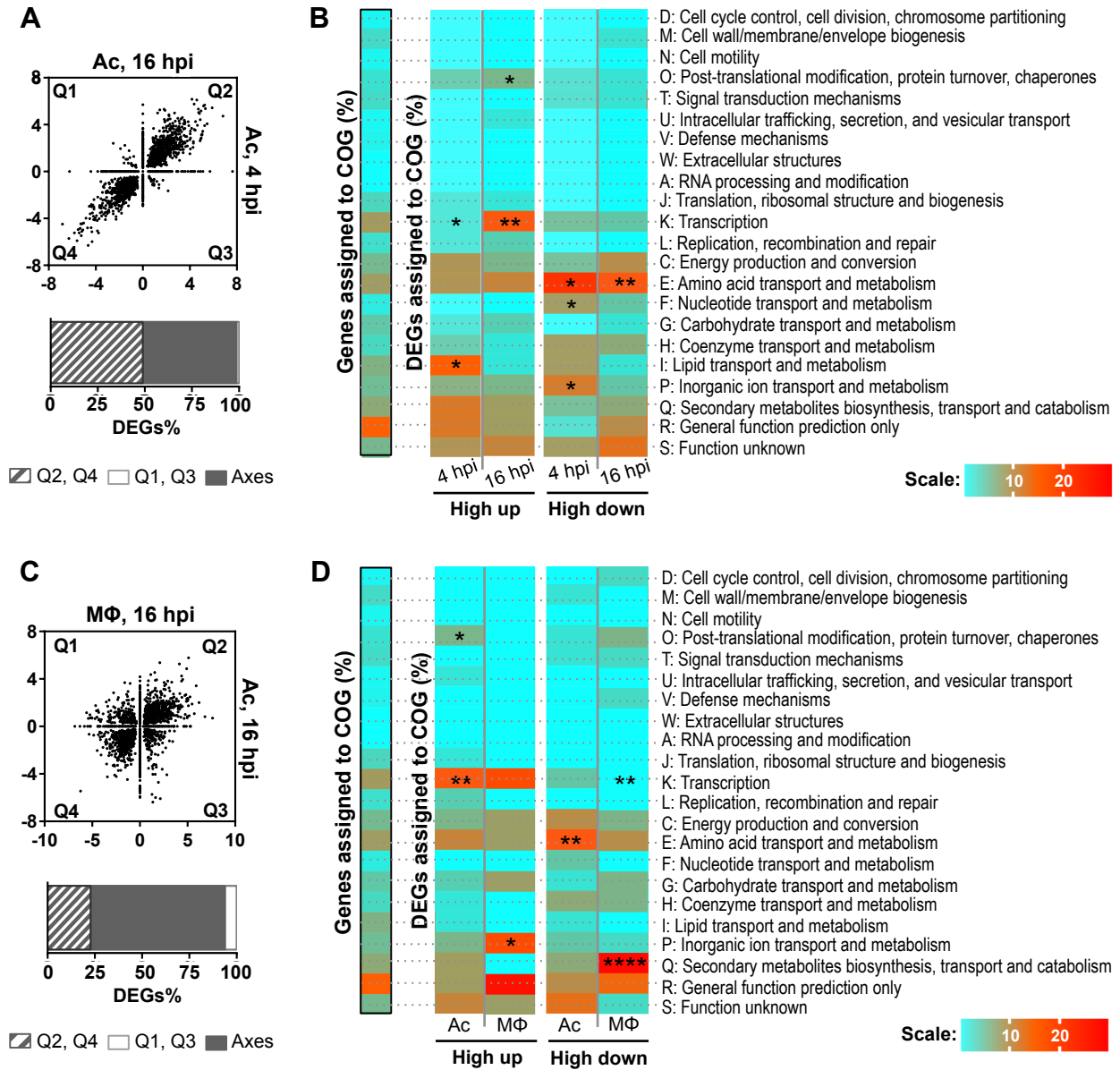
Mma gene	Encoded protein	IP5 analysis (IPR)	Mabs gene	MTB BBH	MAV BBH	FC M $\phi$	FC Ac
MYCMA_RS01880	Hypothetical protein	No IPR	MAB_4509c	-	-	5.78	5.11
MYCMA_RS01765	Hypothetical protein	N-acetyltransferase Eis (016181)	MAB_4532c	-	-	5.37	2.09
MYCMA_RS13035	MFS transporter		MAB_2273	-	-	5.26	4.15
MYCMA_RS17085	Acyltransferase		MAB_1297c	-	MAV_4113	4.86	4.91
MYCMA_RS08590	Transcriptional regulator		MAB_3134c	-	-	4.54	1.55
MYCMA_RS08595	Hemin transporter		MAB_3133c	-	-	4.36	1.14
MYCMA_RS06600	MULTISPECIES: transcriptional regulator		MAB_3508c	whiB7	MAV_4142	4.24	4.37
MYCMA_RS02565	Acetyltransferase		MAB_4324c	-	-	4.18	0.00
MYCMA_RS05440	Membrane protein	EamA domain (000620)	MAB_3762	-	-	3.96	4.49
MYCMA_RS12630	ABC transporter		MAB_2355c	-	-	3.92	1.76
MYCMA_RS17930	GNAT family acetyltransferase		MAB_1125c	-	-	3.89	1.62
MYCMA_RS05315	Hypothetical protein	No IPR	MAB_3786c	-	-	3.85	0.90
MYCMA_RS08600	Membrane protein	No IPR	MAB_3132c	Rv2620c	MAV_3498	3.83	0.00
MYCMA_RS19730	Membrane protein	EamA domain (000620)	MAB_0677c	-	-	3.83	0.00
MYCMA_RS22615	Esterase		MAB_0078	-	MAV_3025	3.82	2.92
MYCMA_RS13590	DEAD/DEAH box helicase		MAB_2158c	-	MAV_2956	3.81	4.38
MYCMA_RS11580	Universal stress protein UspA		-	-	-	3.78	0.00
MYCMA_RS06595	Hypothetical protein	No IPR	MAB_3509c	-	-	3.72	3.35
MYCMA_RS22620	IcIR family transcriptional regulator		MAB_0077	-	MAV_3024	3.69	2.54
MYCMA_RS08355	Membrane protein	EamA domain (000620)	MAB_3180	-	MAV_0095	3.68	-1.60
MYCMA_RS04790	DNA-binding response regulator		MAB_3891c	devR	MAV_4109	3.62	-1.02
MYCMA_RS19020	Hypothetical protein	FAD//NAD(P)-binding domain superfamily (1036188)	MAB_0857	-	-	3.55	2.73
MYCMA_RS10510	Transporter		MAB_2780c	-	-	3.47	0.83
MYCMA_RS13570	Hypothetical protein	No IPR	-	-	-	3.45	0.00
MYCMA_RS16570	MFS transporter		MAB_1409c	Rv1258c	MAV_1406	3.44	2.59
MYCMA_RS22575	Taurine catabolism dioxygenase		MAB_0086	Rv3406	-	3.41	5.90
MYCMA_RS19295	Membrane protein		MAB_0766	-	-	3.36	0.00
MYCMA_RS11690	Transcriptional regulator		MAB_2562c	Rv0081	MAV_5108	3.32	0.00
MYCMA_RS21395	Catalase		MAB_0351	-	katA	3.27	0.00
MYCMA_RS00530	SAM-dependent methyltransferase		-	-	-	3.26	0.00
MYCMA_RS07025	Hypothetical protein	2 isopropylmate synthase LeuA, allosteric (dimerization) domain superfamily (036230)	MAB_3424c	-	MAV_3928	3.25	3.06
MYCMA_RS19455	Hypothetical protein	No IPR	MAB_0733	-	-	3.22	1.62
MYCMA_RS06265	Alkane 1-monoxygenase		MAB_3598c	alkB	MAV_4215	3.14	2.51
MYCMA_RS15610	Guanylate cyclase	Papain-like cysteine peptidase superfamily (IPR038765)	MAB_1591	Rv1118c	MAV_1249	3.14	0.00
MYCMA_RS14880	ABC transporter		MAB_1846	-	-	3.09	2.68

MYCMA_RS14875	Peptidase	MAB_1847	-	-	3.04	0.87
MYCMA_RS02705	MULTISPECIES: aminotransferase AlaT	MAB_4294	aspC	MAV_4818	3.04	1.54
MYCMA_RS19450	Hypothetical protein	MAB_0734	-	-	3.00	3.15
Leukocidin/porin MspA superfamily (036435)						

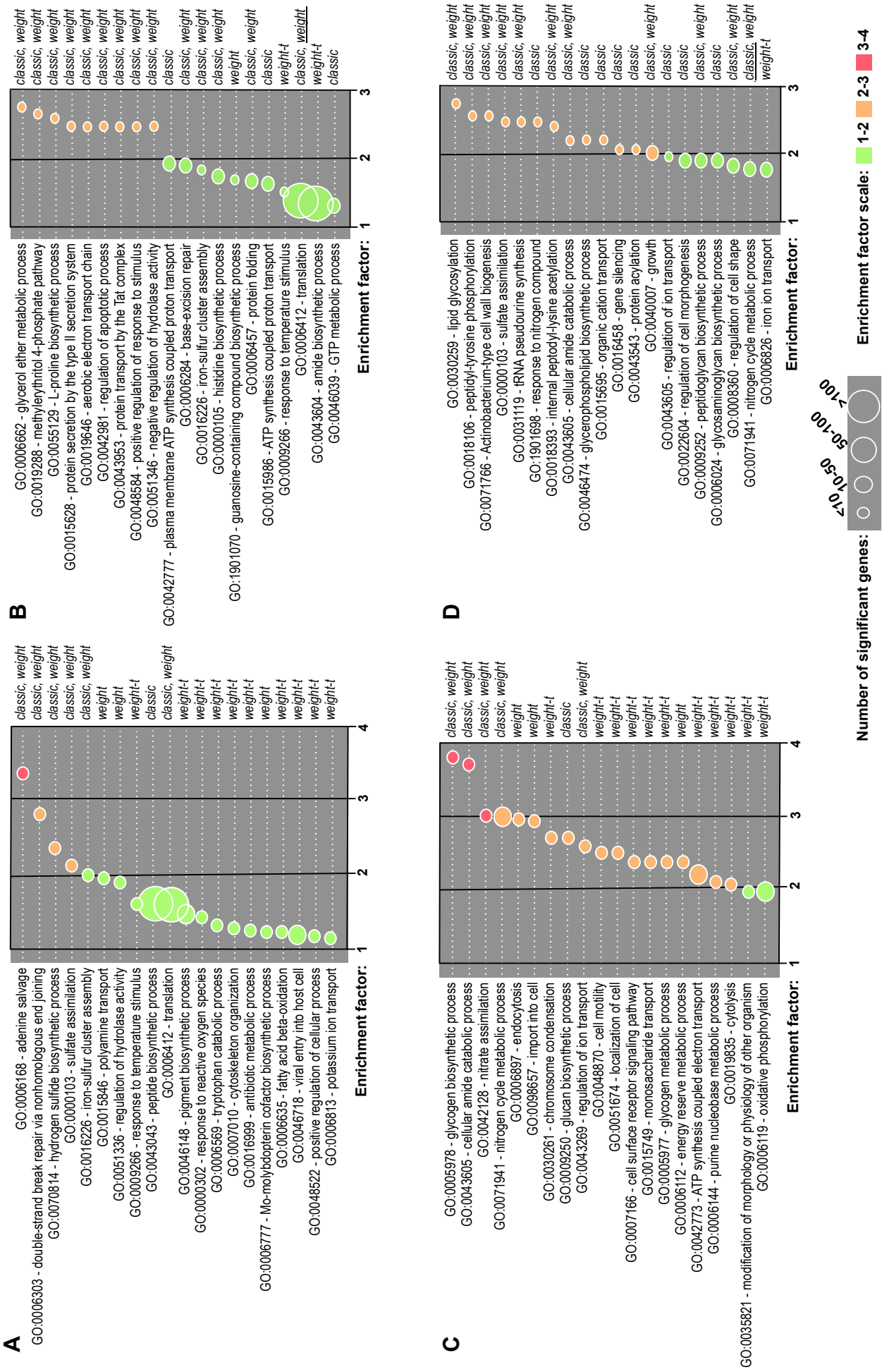




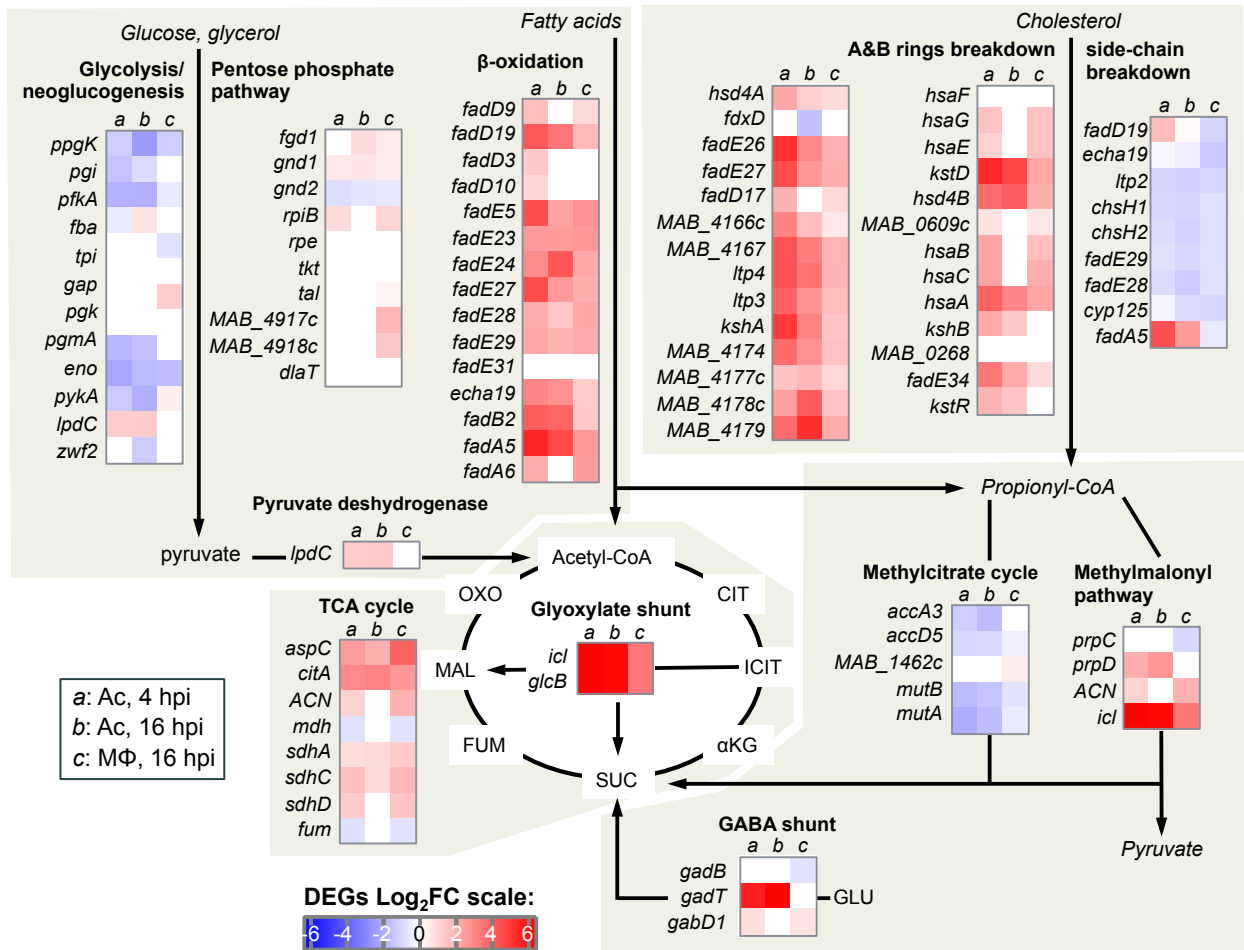
**Figure 1**



**Figure 2**

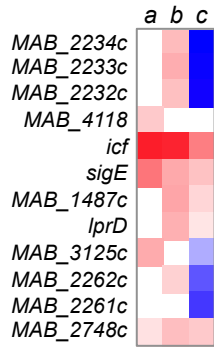


**Figure 3**

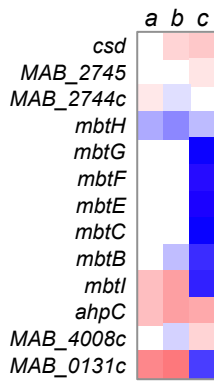


**Figure 4**

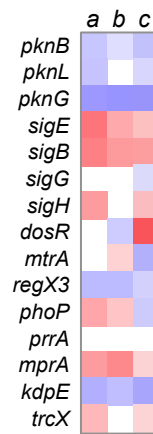
**Low O<sub>2</sub>/NO response**



**Low iron response**



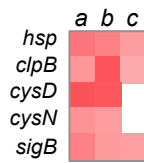
**Transcription regulators**



**Molecular chaperones**



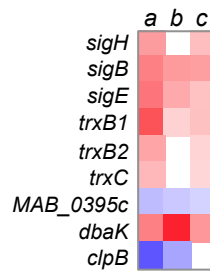
**Multiple stress response**



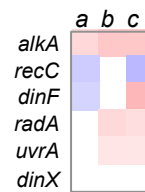
**Heat shock response**



**Response to oxidative stress**



**DNA damage repair enzymes**



a: Ac, 4 hpi  
b: Ac, 16 hpi  
c: MΦ, 16 hpi

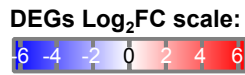
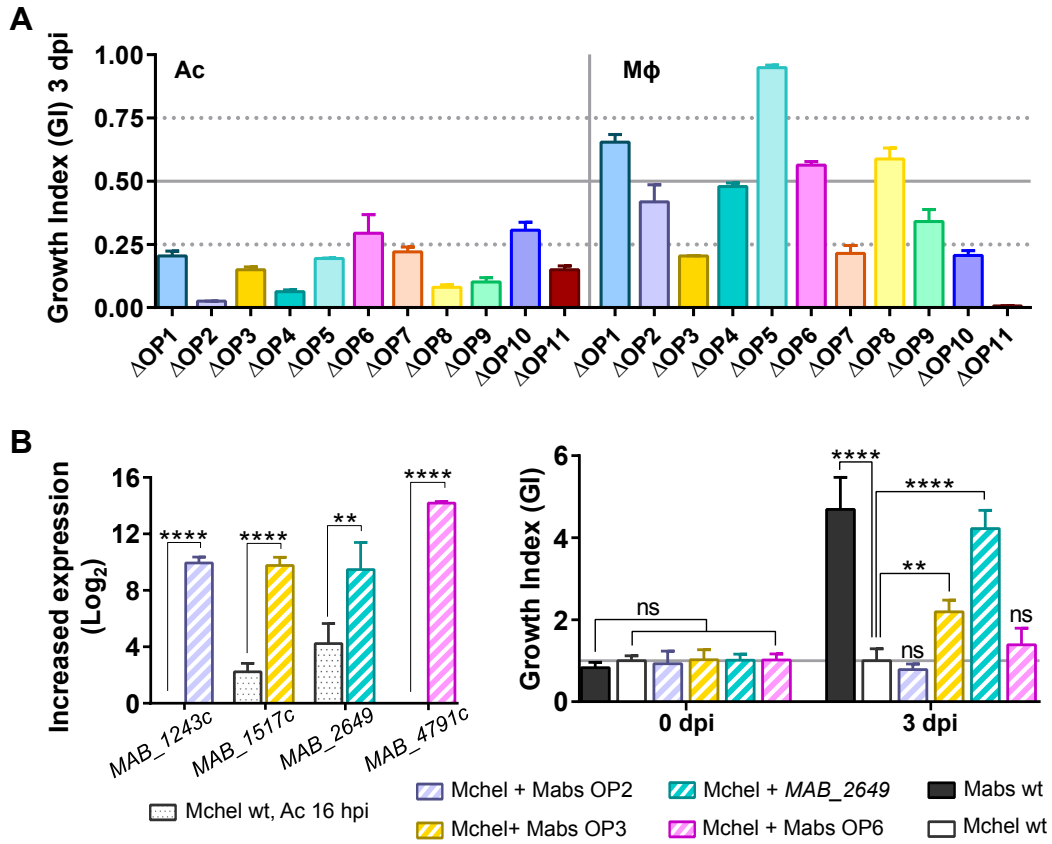
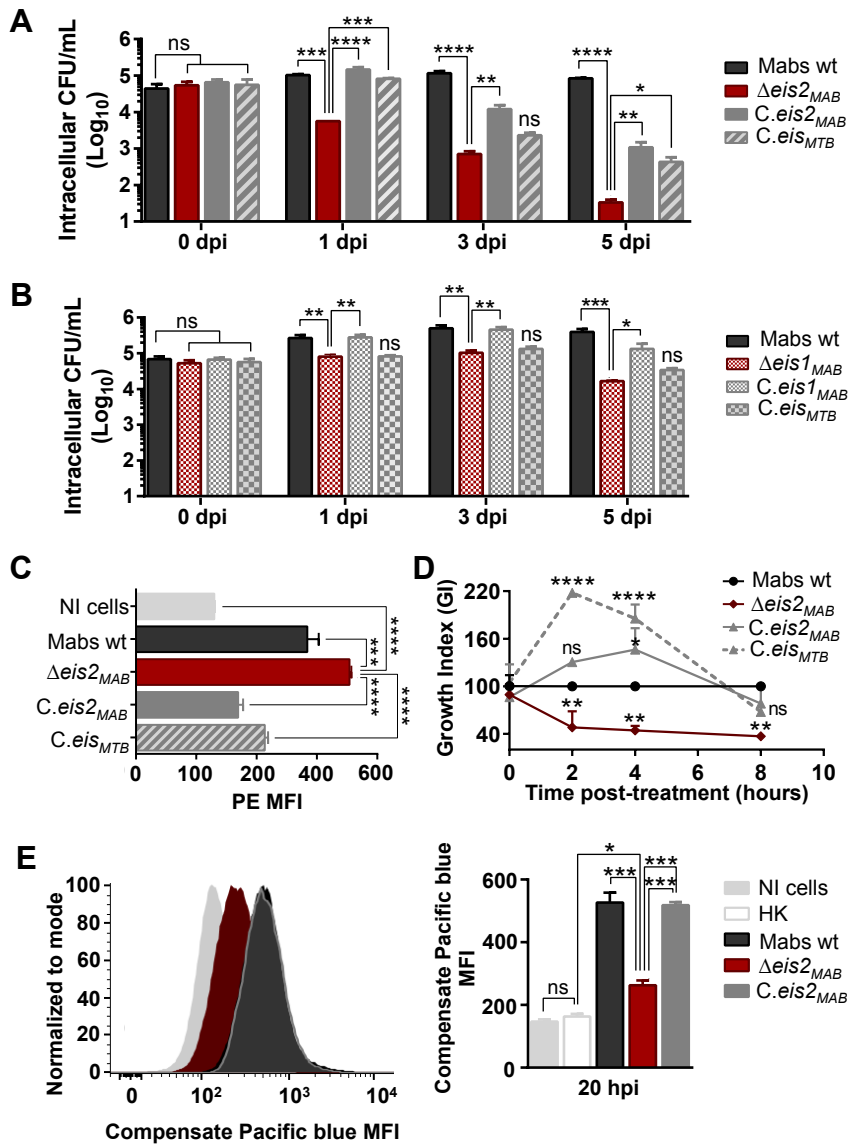


Figure 5

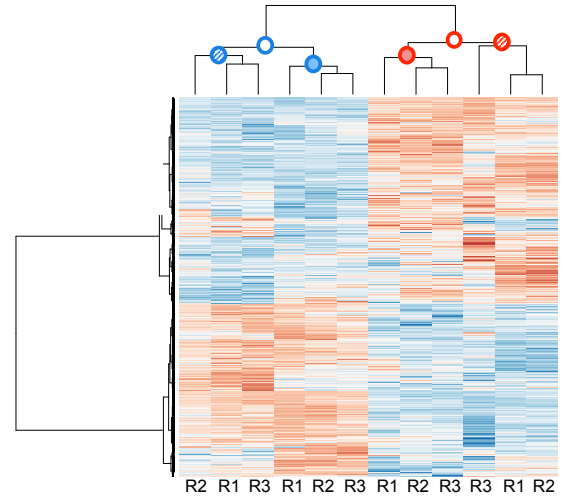
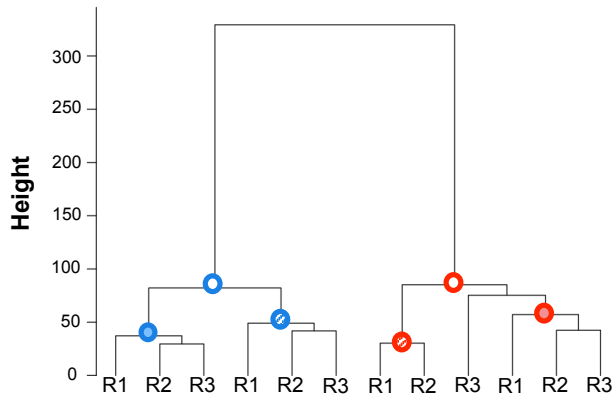


**Figure 6**

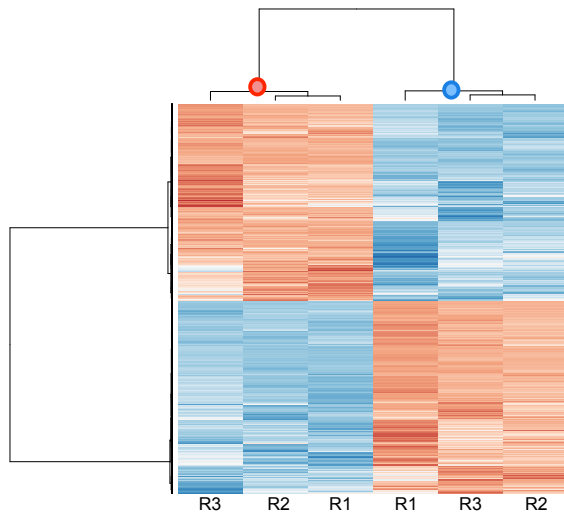
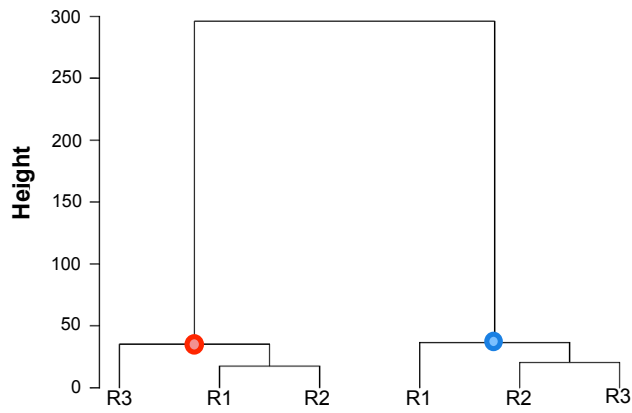


# Supp. Figure 1

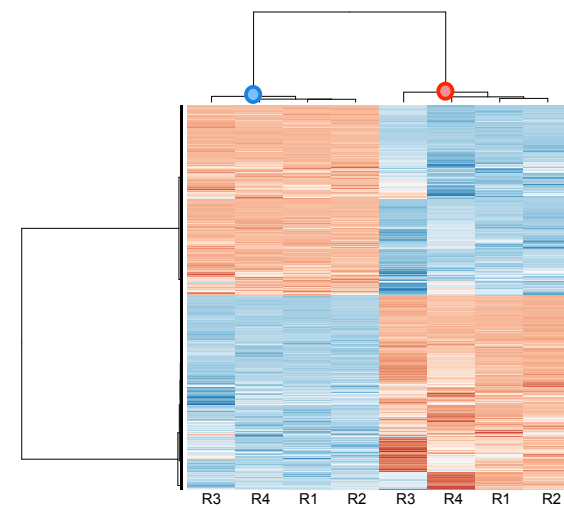
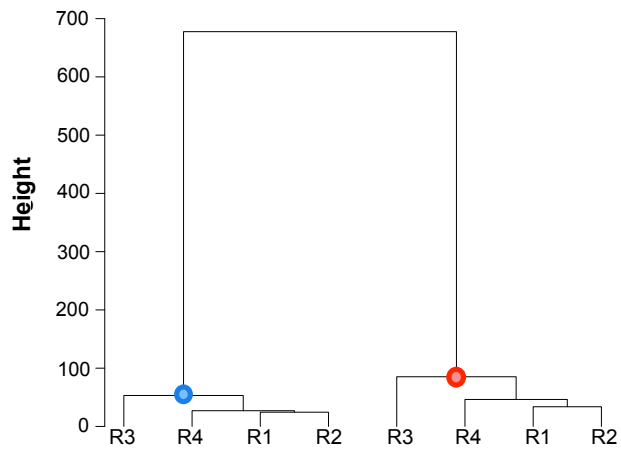
**A**



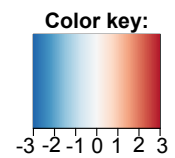
**B**



**C**

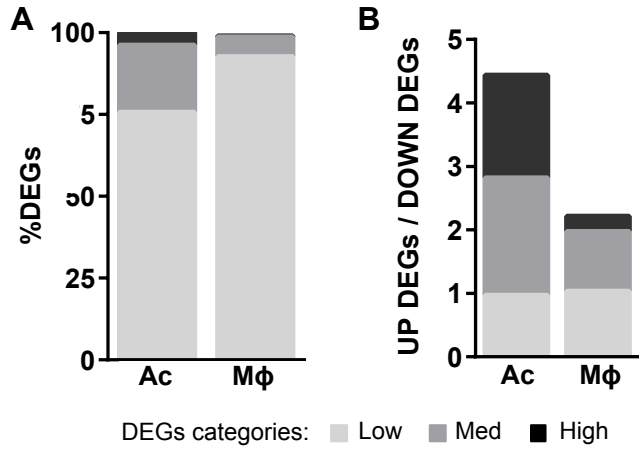


- Intracellular bacteria: 4 hpi 16 hpi
- Panctonic bacteria: 4 h 16 h

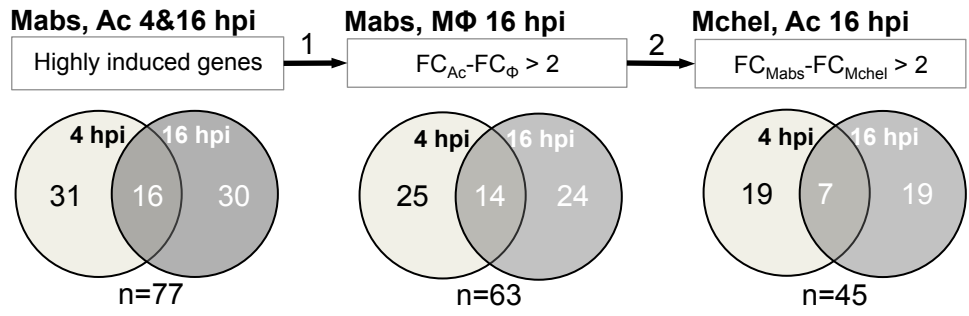




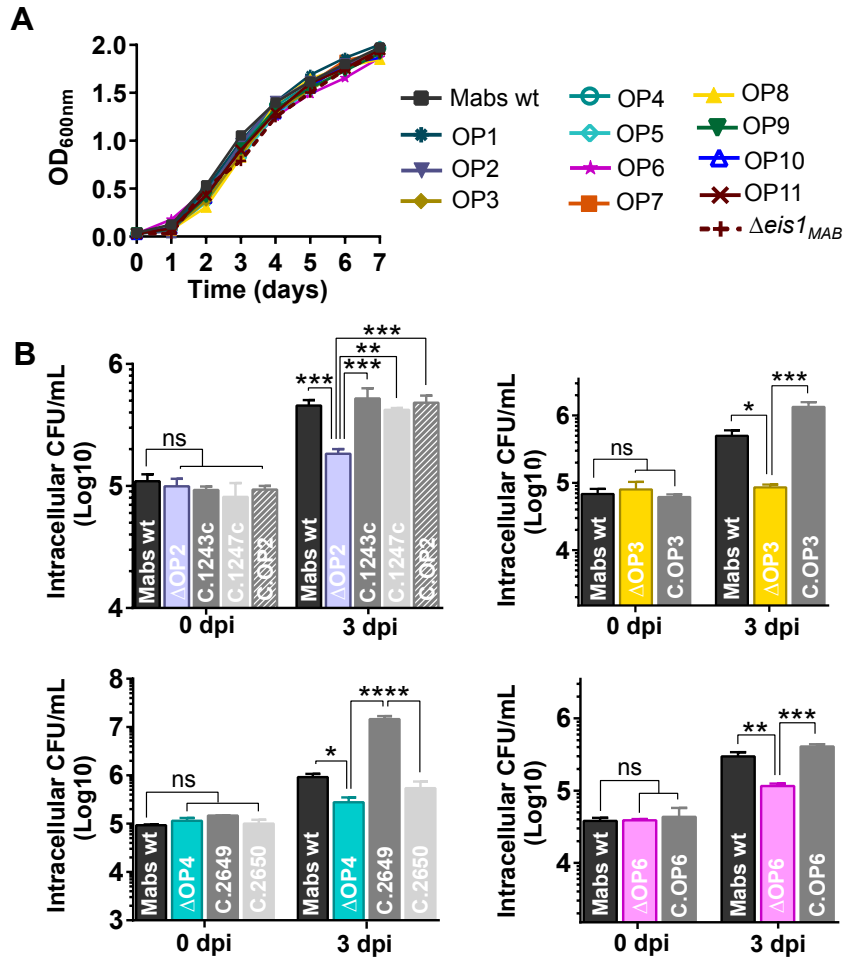
Supp. Figure 2



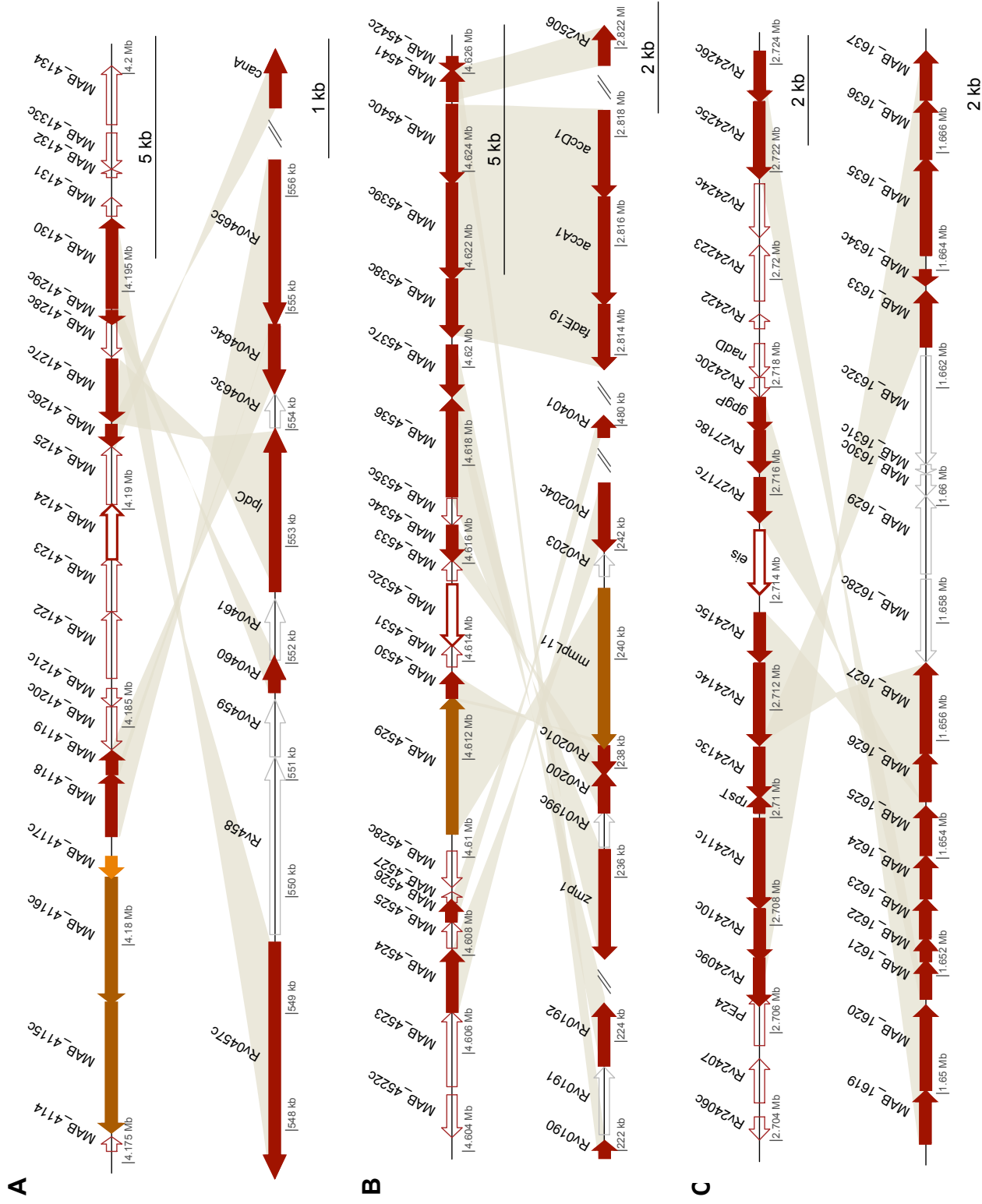
### Supp. Figure 3



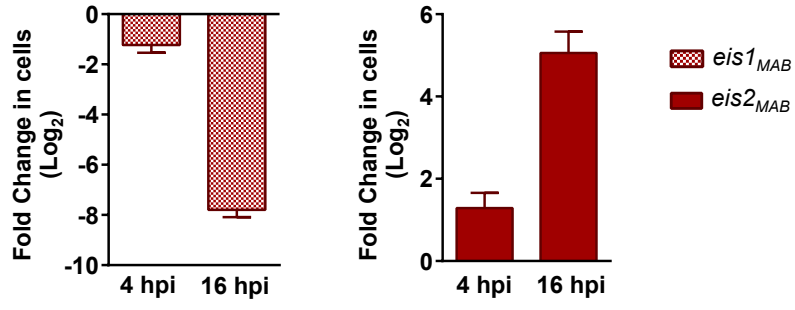
Supp. Figure 4



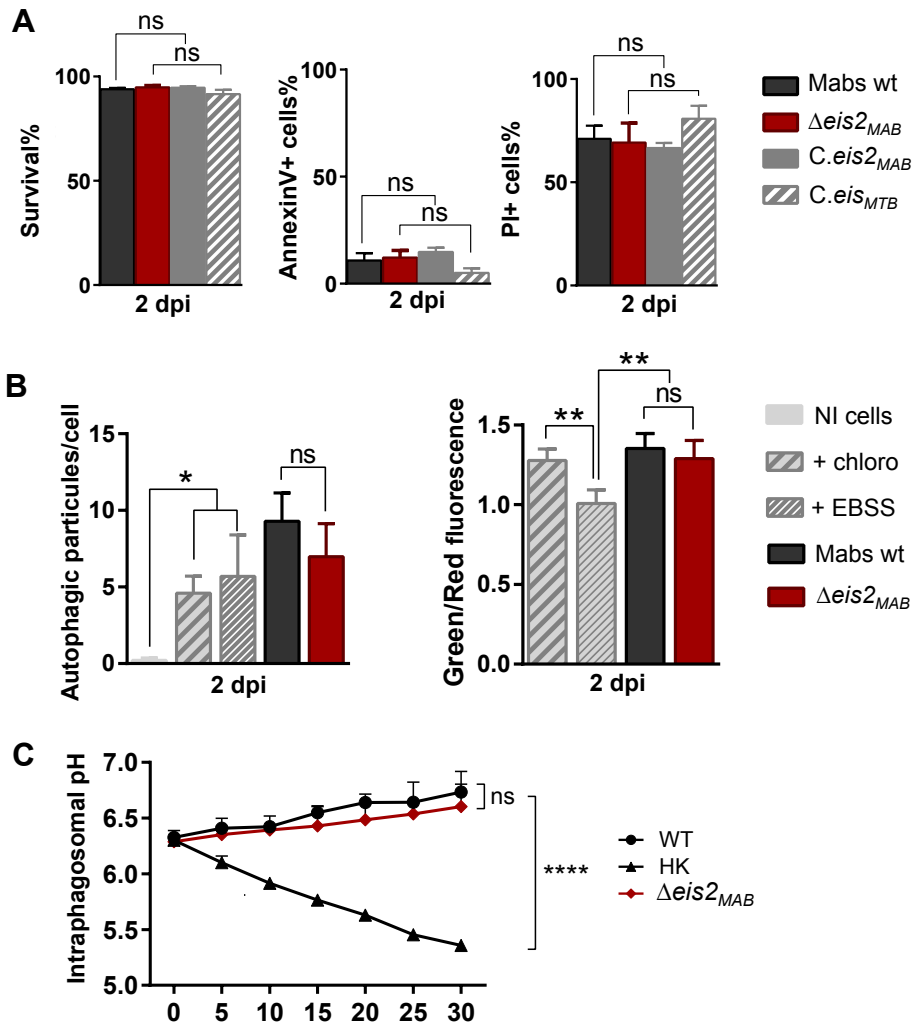
Sup. Figure 5



Supp. Figure 6



Supp. Figure 7





A l'issue de cette première partie, où nous avons montré par une analyse transcriptomique, l'influence d'une vie intra-amibienne sur le répertoire génomique de *M. abscessus*, il nous est apparu essentiel de confronter cette analyse à celle du crible d'une banque de mutants par transposition réalisée dans la souche clinique *M. massiliense* 43S.

**L'objectif de cette deuxième partie est d'identifier des gènes impliqués dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* par le un crible d'une banque de mutants réalisé sur amibes.**

### APPROCHES METHODOLOGIQUES

Le criblage d'une banque de mutants de transposition de *M. massiliense* souche 43S (souche clinique d'origine Coréenne) a été réalisé au laboratoire. Chaque mutant présente une insertion unique d'un transposon entre un dinucléotide TA et cette insertion est aléatoire (Zhang *et al.*, 2012). La distribution en dinucléotides TA étant homogène le long du génome, il n'y pas de régions génomiques a priori « favorables » à l'insertion du transposon. Cette approche est donc non-biaisée.

En comparaison au modèle d'infection cellulaire de macrophages, *M. abscessus* se multiplie fortement en amibes (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). Il a par ailleurs été suggéré que la virulence des mycobactéries résistantes à la phagocytose amibienne peut être corrélée à leur croissance intra-amibienne (Goy *et al.*, 2007). Des défauts de multiplication liés à une perte de virulence sont évaluables en amibes. Ainsi, après avoir ordonné la banque, la survie intracellulaire de 6 000 mutants (soit une couverture potentielle de 1,5 fois le génome), a été évaluée par co-culture avec l'amibe *A. castellanii* pendant 2 jours comme premier crible. A l'issue de ce crible, 136 mutants ont été sélectionnés (soit 2,3%). Une seconde évaluation en amibes (2 dpi) et en macrophages (3 dpi) de ces 136 mutants a permis d'en retenir 47 (**Annexes 6 & 7, Article 6** : Laencina *et al.*, 2018 ; **Article 7** : Girard-Misguich *et al.*, 2018).

### RESULTATS

#### I. Résultats principaux et comparaison aux données de transcriptomique

Le site d'insertion du transposon a été identifié chez les 47 mutants atténués en amibes et en macrophages (V. Dubois). Treize de ces 47 gènes mutés joueraient un rôle prédominant à la fois dans la survie intra-amibienne et intra-macrophagique (GI < 0,5) (**Tableau 8**). Cinq de ces gènes appartiennent au locus ESX-4 (**Tableau 8**, en gras) pour lequel une fréquence particulièrement élevée de mutants a été mise en évidence lors du crible en amibes (12 mutants) comparée à la fréquence moyenne de mutations pour 100 000 pb (1,5 mutants). Cinq mutants possédaient une insertion du transposon dans le gène *eccB<sub>4</sub>* qui a fait l'objet d'une étude fonctionnelle au sein de la souche type de *M. abscessus* (Laencina *et al.*, 2018). Cette étude a mis en évidence le rôle de ce gène dans deux phénotypes majeurs contribuant à la survie intracellulaire de la bactérie : l'arrêt de la maturation du phagosome (blocage de l'acidification) et la rupture de la membrane phagosomale entraînant des contacts phagosome-cytosol (Laencina *et al.*, 2018).

Parmi les gènes identifiés par la crible amibien, seuls 3 gènes (*MYCMA\_RS02170*, *MYCMA\_RS00095* et *MYCMA\_RS05470*) ne semblent pas ou peu impliqués dans la survie intra-macrophagique de *M. abscessus* (GI > 0,75) (**Tableau 8**); ce qui souligne à nouveau l'intérêt du modèle amibien dans l'étude de la virulence de *M. abscessus*. Toutefois, 16 gènes



**Tableau 8 | Gènes impliqués dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* identifiés par le criblage d'une banque de mutants de transposition avec l'amibe *A. castellanii* et expression de ces gènes après une co-culture courte (4 h) et prolongée (16 h) avec l'amibe.** Les orthologues putatifs (BBH) des gènes de *M. massiliense* (Mmas) sont donnés chez *M. abscessus* (Mabs). Les gènes du locus ESX-4 sont indiqués en gras.

Mutant	Mmas gene	Encoded protein	Mabs BBH	GI Ac	GI MΦ	FC Ac, 4 hpi	FC Ac, 16 hpi
29G1	MYCMA_RS20990	Hypothetical protein	MAB_0431c	>0,75	0,13	-1,80	-1,58
50C7	MYCMA_RS19185	4-aminobutyrate aminotransferase	MAB_0821	>0,75	0,08	2,53	3,18
15C4	MYCMA_RS09300	23S rRNA methyltransferase	MAB_2992c	>0,75	0,45	-1,60	-0,84
51H4	MYCMA_RS10635*	Mammalian cell entry protein	-	>0,75	0,37	0,00	3,43
51H1	MYCMA_RS05245	Glutamate dehydrogenase	MAB_3800c	>0,75	0,34	0,00	0,74
52B6	MYCMA_RS14510*	Nitrate ABC transporter substrate-binding protein	MAB_1915	>0,75	0,34	0,00	0,00
57C7	MYCMA_RS01295*	Acyl-CoA synthetase	MAB_4626c	>0,75	0,33	2,20	2,32
52A12	MYCMA_RS03375	3-ketosteroid-9-alpha-hydroxylase oxygenase subunit	MAB_4173	>0,75	0,50	3,83	2,41
57G6	MYCMA_RS04920	Alanine glycine permease	MAB_3866c	>0,75	0,42	-2,40	-2,03
51H7	MYCMA_RS00965	Non-ribosomal peptide synthetase	MAB_4691c	>0,75	0,38	0,00	1,91
40A11	MYCMA_RS05930	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	MAB_3658c	>0,75	0,40	-1,23	-0,95
58E5 <sup>a</sup>	MYCMA_RS22555**	Oxidoreductase	MAB_0090c	>0,75	0,35	0,00	0,00
28B7	MYCMA_RS10415	MULTISPECIES: hypothetical protein	MAB_2799	0,73	0,35	-2,00	-1,88
15A11	MYCMA_RS07535	Hypothetical protein	MAB_3326c	0,72	0,41	5,60	5,17
22D3	MYCMA_RS12315	Urease accessory protein UreF	MAB_2426	0,72	0,42	-2,94	-1,97
47F1	MYCMA_RS10685	Spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	MAB_2752	0,71	0,33	0,00	0,75
44A6	MYCMA_RS02170**	Beta-oxoacyl-ACP reductase	MAB_4443	0,62	>0,75	2,43	2,04
50H8	MYCMA_RS05310	SAM-dependent methyltransferase	MAB_3787	0,53	0,26	1,19	0,74
24A4	MYCMA_RS02665	Hypothetical protein	MAB_4302	0,53	0,33	0,00	-1,41
39H12	MYCMA_RS01460	Hypothetical protein	MAB_4593c	0,53	0,45	-1,00	-0,98
29C8	MYCMA_RS14550	Hypothetical protein	MAB_1911c	0,50	0,36	-1,76	-1,34
22D4	MYCMA_RS14995	Hypothetical protein	-	0,49	0,31	0,00	-1,61
22H2	MYCMA_RS16510	Hypothetical protein	MAB_1421	0,47	0,24	0,00	0,00
27F10	MYCMA_RS01635	Hypothetical protein	MAB_4558c	0,47	0,38	1,09	0,00
56C2	MYCMA_RS17005	Hypothetical protein	MAB_1314	0,46	0,37	0,00	0,00
47H4	MYCMA_RS12265**	Hypothetical protein	MAB_2436	0,43	0,18	1,08	0,00
57C10	MYCMA_RS01385	3-oxoacyl-ACP synthase	MAB_4608	0,41	0,49	0,63	0,67
2E4	MYCMA_RS17965	MULTISPECIES: hypothetical protein	MAB_1118c	0,35	0,54	2,73	1,22
30D4	MYCMA_RS18315	Hypothetical protein	MAB_1027	0,32	0,74	-1,18	-1,02
13C3	MYCMA_RS00095	RNA polymerase sigma factor SigM	MAB_4938	0,27	>0,75	0,00	-1,03
<b>18D2</b>	<b>MYCMA_RS05460</b>	<b>Type VII secretion-associated serine protease</b>	<b>MAB_3758</b>	<b>0,26</b>	<b>0,58</b>	<b>-0,95</b>	<b>-1,39</b>
<b>14E9<sup>b</sup></b>	<b>MYCMA_RS05450</b>	<b>Type VII secretion protein EccE</b>	<b>MAB_3760</b>	<b>0,25</b>	<b>0,14</b>	<b>-0,65</b>	<b>-1,35</b>
55F6	MYCMA_RS19030*	Membrane protein	MAB_0855	0,18	0,36	-3,08	-3,68
43A3 <sup>c</sup>	MYCMA_RS19985	Hypothetical protein	MAB_0628	0,13	0,08	-0,88	-1,18
<b>24H3</b>	<b>MYCMA_RS05470</b>	<b>MULTISPECIES: type VII secretion protein EccC</b>	<b>MAB_3756c</b>	<b>0,13</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
3B9	MYCMA_RS21330	ATPase	MAB_0364c	0,12	0,28	-2,03	-1,32
<b>32C9<sup>d</sup></b>	<b>MYCMA_RS05455</b>	<b>Type VII secretion protein EccB</b>	<b>MAB_3759c</b>	<b>0,11</b>	<b>0,34</b>	<b>-0,94</b>	<b>-1,80</b>
<b>5A1</b>	<b>MYCMA_RS05465</b>	<b>MULTISPECIES: type VII secretion integral membrane protein EccD</b>	<b>MAB_3757</b>	<b>0,09</b>	<b>0,30</b>	<b>-0,99</b>	<b>-2,05</b>

Gènes mutés par l'insertion du transposon dans différents clones, a : 1 insertion supplémentaire (clone 58C5). b : 1 insertion supplémentaire (clone 15G8). c : 2 insertions supplémentaires (clones 13F7 et 2D10). d : 4 insertions supplémentaires (clones 14B9, 19D4, 32C7 et 25E4).

\* Gènes impliqués dans la biogenèse de l'enveloppe. \*\* Gènes impliqués dans le métabolisme et le transport de lipides.

GI (Growth Index) : index de croissance (UFC/mL rapportées au témoin). Ac : *A. castellanii*, MΦ : macrophages. FC (Fold Change) : variation d'expression d'un gène donné en Log base 2.

« - » : absence de BHH.

s'avèrent importants en macrophages, et qui n'auraient pu être identifiés si la sélection initiale des mutants d'intérêt par le crible amibien avait été trop stringente (GI <0,75) (**Tableau 8**). Un seul des gènes identifiés par ce crible est fortement induit en amibes (*MYCMA\_RS07535*, correspondant à *MAB\_3326c*), légèrement atténué 2 jours post-infection mais particulièrement atténué en macrophages 3 jours post-infection (GI <0,50) (**Tableau 8**). L'approche de transcriptomique comparative ne permet donc pas l'identification de tels gènes comme des gènes potentiels de virulence. D'ailleurs, 4 gènes parmi les 47 gènes identifiés par le crible ne sont pas régulés en amibes tandis que 19 sont réprimés, et notamment les gènes les plus importants à la survie intra-amibienne et intra-macrophagique, comme les gènes du locus ESX-4 (**Tableau 8**). Le criblage amibien de la banque de mutants est donc particulièrement complémentaire de l'analyse transcriptomique.

Par ailleurs, 7 gènes requis pour la survie intracellulaire de *M. abscessus* sont impliqués dans la biogénèse de l'enveloppe (**Tableau 8**, \*) ou dans le métabolisme et le transport de lipides (**Tableau 8**, \*\*). Quatre de ces gènes sont particulièrement requis pour la survie en macrophages. Un gène spécifique à la sous-espèce *massiliense*, et codant une protéine Mce, est particulièrement requis pour la survie en amibes. Enfin, les gènes *MYCMA\_RS12265* et *MYCMA\_RS19030* sont cruciaux à la fois pour la survie en amibes et celle en macrophages. Ces gènes codent des protéines hypothétiques. Toutefois une analyse de motif protéique montre que *MYCMA\_RS12265* code une protéine FAP (Fibronectin Attachment Protein) et que *MYCMA\_RS19030* code une protéine de la famille MmpL.

### La protéine FAP *MYCMA\_RS12265*

La fibronectine est connue pour permettre l'attachement de différents micro-organismes aux cellules-hôtes. Des études ont montré que les FAP mycobactériennes sont impliquées dans l'attachement des mycobactéries aux cellules épithéliales ou encore aux macrophages alvéolaires murins (Pasula *et al.*, 2002). Parmi les FAP

synthétisées par *M. tuberculosis* figurent le complexe antigénique Ag85ABC impliqué dans la biogénèse du TDM par sa fonction mycolyltransférase (Belisle *et al.*, 1997; Senaratne *et al.*, 1998; Stahl *et al.*, 2001). Un mutant de ce complexe est atténué en macrophages, prouvant que les FAP peuvent jouer des rôles clefs à la fois dans la physiologie et la pathogénicité des mycobactéries. Le gène *MYCMA\_RS12265* possède un orthologue putatif chez *M. tuberculosis*, nommé *apa*, dont le produit est un ligand probable de la protéine A du surfactant pulmonaire qui, parmi les lectines de type C, sont connues pour leur rôle dans la reconnaissance des pathogènes et la mise en place de la réponse immune (Ragas *et al.*, 2007). *In vivo*, l'expression d'*apa* pourrait contribuer à la persistance des mycobactéries pathogènes et à l'établissement d'une infection chronique. *Apa* est par ailleurs capable de susciter une réponse immune protectrice (Kumar *et al.*, 2003). Le tout fait de cette protéine un candidat vaccin chez *M. tuberculosis*. Toutefois, chez *M. abscessus* la fonction du gène *MYCMA\_RS12265* est inconnue. Même s'il est probable que le mutant de ce gène présente un défaut d'adhésion aux cellules, cela doit être analysé afin d'estimer la contribution de ce gène à la survie et la multiplication intracellulaire de *M. abscessus*.

### La protéine MmpL *MYCMA\_RS19030* (*MYCMA\_0439*)

Chez les mycobactéries typiques portées par l'espèce *M. tuberculosis*, les MmpL ont fait l'objet de nombreuses études du fait de leur contribution majeure à la virulence du bacille (Camacho *et al.*, 1999; Lamichhane *et al.*, 2005; Domenech *et al.*, 2005). En fait, certaines sont dédiées au transport de glycolipides participant à l'intégrité de l'enveloppe mycobactérienne, régulant sa perméabilité et jouant des rôles physiologiques importants. Ils contribuent à la protection mécanique et osmotique offerte par l'enveloppe et peuvent moduler les réponses de l'hôte et jouent de ce fait un rôle clef dans la pathogénicité (Jackson, 2014). En participant à la capture du fer, les sidérophores libérés par les couples MmpS4-MmpL4 et MmpS5-MmpL5 con-

tribuent également à la survie du bacille dans l'hôte (Wells *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014). Un autre intérêt majeur pour cette famille de protéines est leur implication dans l'efflux d'antibiotiques (MmpL5) tandis que certaines (et notamment MmpL3) constituent des cibles thérapeutiques prometteuses (La Rosa *et al.*, 2012; Tahlan *et al.*, 2012; Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2013; Lun *et al.*, 2013; Bailo *et al.*, 2015; Dupont *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018).

Récemment, nous avons choisi de décrire ce double visage des MmpL et nous avons mis en évidence l'abondance toute particulière de ces protéines au sein des mycobactéries atypiques et pathogènes opportunistes (Viljoen *et al.*, 2017). En effet, par la construction d'un profil HMM (Hidden Markov Model) spécifique aux pro-

téines MmpL des mycobactéries nous avons pu détecter avec exactitude les MmpL parmi 76 espèces mycobactériennes. Parmi les MCL, davantage de MmpL sont identifiées chez les MNT du MAC et chez *M. marinum* qu'au sein des espèces du MTBC. Parmi les MCR, l'abondance toute particulière des MmpL est portée par le groupe *Cheloniae-Abscessus-Immunogenum*. En effet, cette abondance suffit à expliquer la différence d'abondance observée entre MCL et MCR, les MCR présentant un nombre de MmpL moyen par espèce supérieur (19 versus 15). Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecular Microbiology* (Viljoen *et al.*, 2017). Il s'agit d'une des premières revues à souligner un intérêt pour cette famille de transporteurs au sein des MNT.


## Article 2

### **The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments**

Albertus Viljoen, Violaine Dubois, Fabienne Girard-Misguich, Mickaël Blaise, Jean-Louis Herrmann and Laurent Kremer

## MicroReview

## The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments

Albertus Viljoen,<sup>1</sup> Violaine Dubois,<sup>2</sup>  
Fabienne Girard-Misguich,<sup>2</sup> Mickaël Blaise,<sup>1</sup>  
Jean-Louis Herrmann<sup>2</sup> and Laurent Kremer <sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS, UMR 9004, Université de Montpellier, France.

<sup>2</sup>INSERM, UMR1173, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Montigny-le-Bretonneux, 78180, France.

<sup>3</sup>IRIM, INSERM, 34293, Montpellier, France.

## Summary

**Mycobacterial genomes contain large sets of loci encoding membrane proteins that belong to a family of multidrug resistance pumps designated Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) permeases. Mycobacterial membrane protein Large (MmpL) transporters represent a subclass of RND transporters known to participate in the export of lipid components across the cell envelope. These surface-exposed lipids with unusual structures play key roles in the physiology of mycobacteria and/or can act as virulence factors and immunomodulators. Defining the substrate specificity of MmpLs and their mechanisms of regulation helps understanding how mycobacteria elaborate their complex cell wall. This review describes the diversity of MmpL proteins in mycobacteria, emphasising their high abundance in a few opportunistic rapid-growing mycobacteria. It reports the conservation of *mmpL* loci between *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria, useful in predicting the role of MmpLs with unknown functions. Paradoxically, whereas MmpLs participate in drug resistance mechanisms, they represent also attractive pharmacological targets, opening the way for exciting translational applications. The most recent advances regarding structural/**

**functional information are also provided to explain the molecular basis underlying the proton-motive force driven lipid transport. Overall, this review emphasises the Janus-face nature of MmpLs at the crossroads between antibiotic resistance mechanisms and exquisite vulnerability to drugs.**

## Introduction

Efflux pumps are membrane proteins that actively transport a wide array of compounds across the bacterial envelope and are classified into distinct superfamilies (Li *et al.*, 2015): the ATP-binding cassette (ABC), major facilitator superfamily (MFS), small multidrug resistance (SMR), multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) and resistance nodulation cell division (RND) families. MFS, SMR, MATE and RND proteins are typically energised by the proton motive force (PMF). Among the RND superfamily of transporters (Tseng *et al.*, 1999), the mycobacterial membrane protein Large proteins (MmpL) have emerged during the last few years as key actors in the elaboration of the cell envelope of mycobacteria and the closely related corynebacteria. The genome of *Mycobacterium tuberculosis* encodes 14 annotated MmpL proteins (Cole *et al.*, 1998) whereas the genome of *Corynebacterium glutamicum* encodes only four MmpL-like transporters, designated CmpL (Yang *et al.*, 2014). Consistent with other RND proteins, such as the well-characterised multidrug efflux pump AcrB, the active component of the major efflux system AcrAB-TolC of *Escherichia coli* (Nikaido and Takatsuka, 2009; Eicher *et al.*, 2014), the MmpL/CmpL transporters require the inner membrane electrochemical proton gradient for activity as well as predicted topological features (Tseng *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Chim *et al.*, 2015; Bernut *et al.*, 2016). However, unlike the AcrAB-TolC system that mediates the efflux of exogenous compounds, the MmpL/CmpL proteins essentially appear to export endogenous lipophilic molecules with a relatively narrow substrate specificity (Székely and Cole, 2016; Chalut, 2016).

Accepted 20 March, 2017. \*For correspondence. E-mail laurent.kremer@cpbs.cnrs.fr; Tel. (+33) 4 34 35 94 47; Fax (+33) 4 34 35 94 11.

Among the MmpL members of *M. tuberculosis*, MmpL3, involved in the transport of trehalose-monomycolate (TMM), is encoded by the only essential *mmpL* gene (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Degiacomi *et al.*, 2017). MmpL11 coordinates the transport of monomeromycolyl diacylglycerol (MMDAG) and mycolate ester wax (Pacheco *et al.*, 2013). Both MmpL3 and MmpL11 have also been reported to participate in heme import (Tullius *et al.*, 2011; Owens *et al.*, 2013). MmpL4 and MmpL5 share redundant functions in siderophore export and are essential for siderophore-mediated iron acquisition (Wells *et al.*, 2013). MmpL7 mediates the transport of phthiocerol dimycocerosate (PDIM) (Jain and Cox, 2005) whereas MmpL8 transfers the sulfolipid SL-1 to the cell envelope (Converse *et al.*, 2003; Seeliger *et al.*, 2012). More recently, MmpL10 was reported to participate in the translocation of acylated trehaloses (Belardinelli *et al.*, 2014). In comparison with *M. tuberculosis*, MmpLs in non-tuberculous mycobacteria (NTM) have been given little attention, except for MmpL4a and MmpL4b reported to transport glycopeptidolipids (GPL) to the bacterial surface in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* (Medjahed and Reyrat, 2009; Bernut *et al.*, 2016). All these unique (glyco)lipids, interspersed in the mycomembrane, contribute to the integrity of the cell envelope, regulate membrane permeability and play important physiological functions, such as defining the shape of the bacilli. By providing mechanical and osmotic protection, these lipids participate in mycobacterial pathogenesis (Jackson, 2014). Therefore, due to the proper localisation of these lipids in the membrane, their transport by MmpLs is crucial for full expression of virulence in pathogenic mycobacteria. Consequently, the MmpL-driven transport can be viewed as a crucial process, outlining the MmpL transporters as potential important virulence factors. Indeed, disruption of several *mmpL* genes in *M. tuberculosis* (*mmpL4*, *mmpL5*, *mmpL7*, *mmpL8*, *mmpL10* and *mmpL11*) led to significant growth attenuation in mice (Converse *et al.*, 2003; Lamichhane *et al.*, 2005; Domenech *et al.*, 2005).

Besides being involved in the elaboration of the complex cell envelope, a few MmpL proteins, such as MmpL5, have been shown to participate in the active efflux of antitubercular drugs, including the recently approved drug bedaquiline (Hartkoorn *et al.*, 2014). As orthologs of *mmpL* genes were recently identified and characterised in NTM, especially in *M. abscessus*, notorious for being extremely resistant to most antibiotics and antitubercular drugs (Medjahed *et al.*, 2010; Nessar *et al.*, 2012), the idea that MmpL efflux pumps may contribute to the multi-drug resistance phenotype in these species has recently emerged. Paradoxically, whereas some MmpL members participate in drug resistance

mechanisms, others like MmpL3, are particularly vulnerable to the action of several antitubercular agents identified in whole cell-based screens (Bailo *et al.*, 2015). MmpL3 is currently considered as a valid pharmacological target leading to intense research dedicated to provide mechanistic and structural information to understand the ability of MmpL proteins to transduce the PMF into transport activity (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Chim *et al.*, 2015; Bernut *et al.*, 2016). Recently, structural studies using MmpL3, MmpL11 or MmpL4a as prototypes led to important insights into functional aspects of MmpL transporters, unravelling the structural foundations required for the rational design of novel or improved antimycobacterial agents targeting these MmpLs.

The functional role of the MmpLs with respect to their lipid substrates in building the complex cell wall has been the focus of several excellent recent reviews (Székely and Cole, 2016; Chalut, 2016) and will thus not be presented in this article. As being mainly studied in *M. tuberculosis*, MmpL transporters in NTM have only recently started to receive attention, in spite of their overrepresentation, particularly in rapid-growing mycobacteria (RGM). Therefore, this review focuses on a comparative analysis of the MmpL proteins between slow-growing mycobacteria (SGM) and RGM. Special attention is also given to the recent advances made in understanding their regulation as well as their contribution in drug resistance phenotypes. Data shedding new light on MmpL structure and mechanism of transport described in *M. tuberculosis* and *M. abscessus* are also discussed. Finally, a description of the potential of MmpL proteins as attractive drug targets for future drug developments against mycobacterial infections will be presented.

#### *Abundance of MmpL proteins in slow- and rapid-growing mycobacteria*

MmpLs belong to the RND permeases superfamily on the basis of topological features, amino acid sequences and functional domains. *M. tuberculosis* MmpLs are classified into the subgroups of hydrophobic/amphiphilic efflux (HAE) family 2 (corresponding to RND family 5) and HAE family 3 (corresponding to RND family 7) (Sandhu and Akhter, 2015). All MmpL proteins contain an MmpL domain as defined by the Hidden Markov Model (HMM) profile from the Pfam database (Finn *et al.*, 2014). However, the mycobacterial MmpL architecture domains are complex, with more than 10 additional domains found in association with the MmpL domain according to the InterProScan database (Mitchell *et al.*, 2015). The variation in length and position of

the MmpL domain results in a high level of architecture diversity among these proteins. The current HMM profile provided by the Pfam database is built on thousands of sequences from different genera. Consequently, it does not reflect the specific diversity in mycobacteria. Therefore, to compare the MmpL abundance among different mycobacterial species, an HMM representative of mycobacterial MmpL proteins was built, allowing the identification of MmpL proteins in 108 mycobacterial strains. The mean number of MmpL per species is depicted on a maximum-likelihood phylogenetic tree constructed with 61 out of the 76 species used in the current study (Fig. 1). The MmpL mean number per strain ranged from 5 to 29. A striking observation was that a higher number of MmpLs were found in the RGM group when compared with the SGM group ( $19 \pm 5$  and  $14 \pm 5$ , respectively). Notably, *Mycobacterium leprae* presented less MmpLs than the SGM group with five MmpLs on average, probably linked to the phenomenon of gene reduction that occurred in the genome of this mycobacterium due to its obligate intracellular lifestyle (Cole *et al.*, 2001). Inside the RGM, *M. abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* monophyletic groups (or clades) form a superclade corresponding to a 'hot spot' of MmpL abundance (Fig. 1). Indeed, the *M. abscessus* clade presented the highest number of MmpLs per RGM strain ( $27 \pm 2$ ). The *M. fortuitum* clade also had more MmpLs than most RGM ( $23 \pm 2$ ). In addition, when removing the *M. abscessus* clade from the RGM group, the RGM MmpL numbers decreased from  $19 \pm 5$  to  $17 \pm 4$ . However, only the removal of both *M. abscessus* and *M. fortuitum* clades from the RGM group brought the RGM MmpL number to that of the SGM group ( $16 \pm 3$ ), proving that these two clades are the source of MmpL diversity in RGM. Deciphering the function of these MmpLs might unravel unique aspects of the *M. abscessus* and *M. fortuitum* physiology and/or lifestyle.

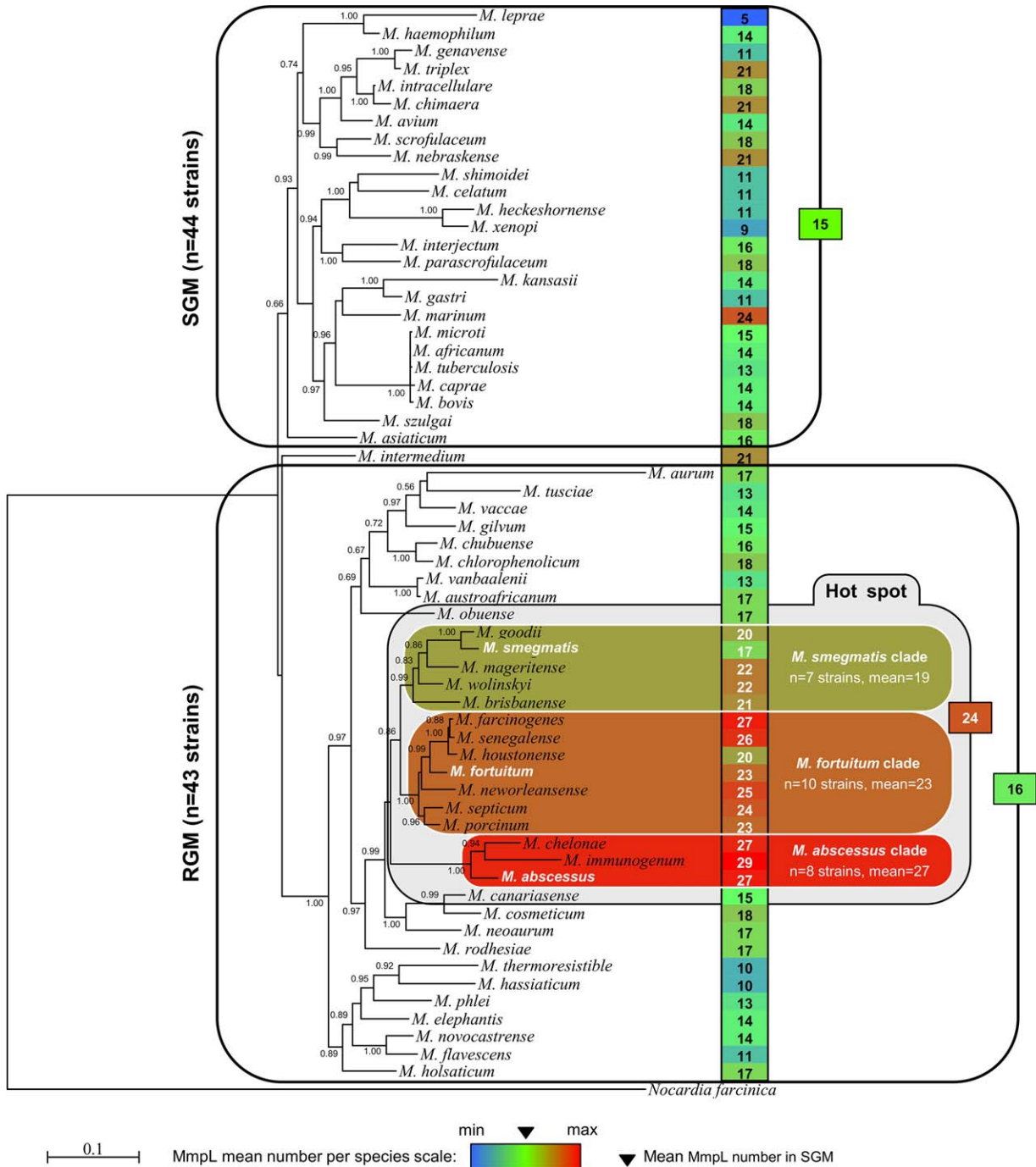
In fact, the role of MmpLs in virulence has recently been emphasised for some *M. abscessus* strains (Bernut *et al.*, 2014, 2016). From a functional perspective, the particularly high abundance of MmpLs in *M. abscessus* might provide the bacterium with some physiological advantage through increased gene dosage of MmpLs performing similar functions. Alternatively, this advantage might be related to diversity in function: aside from their well-known potential role in lipid transport, MmpLs might mediate the uptake of deprived nutrients or extrude toxic compounds in a hostile environment like the macrophage phagosome. A focus on MmpL genomic loci in *M. abscessus* (10 genes upstream/downstream MmpL protein-coding genes) sheds some light. Polyketide synthase (PKS) encoding genes, known to play a key role in cell-wall lipid biogenesis (Quadri,

2014), were found within 4 *mmpL* loci. Fifteen loci contained more than 2 proteins belonging to Cluster of Orthologous Groups (COG) (Tatusov *et al.*, 2000) M (Cell wall/membrane/envelope biogenesis) and I (Lipid transport and metabolism), 7 contained less than 2 proteins belonging to COG M or I, and 5 did not contain any proteins implicated in cell wall biogenesis or lipid metabolism in general. In *M. tuberculosis*, all MmpLs proven to be implicated in lipid transport and/or biosynthesis are near to a PKS (Chalut, 2016). In *M. abscessus*, MmpL loci do not contain more PKS than *M. tuberculosis* MmpLs loci, suggesting that *M. abscessus* MmpLs may also perform other functions than lipid transport.

It is believed that MmpL transporters are likely to work in tight association with accessory partners that modulate lipid export and/or couple export to biosynthesis. However, it remains to be explored whether mycobacteria possess periplasmic membrane fusion-like proteins (MFP) and channel-forming outer-membrane factors (OMF) that, together with MmpL transporters, constitute tripartite transport systems that allow extrusion of substrates through the inner and outer membranes similar to Gram-negative bacteria (Nikaido and Takatsuka, 2009). In the case of MmpL3, the export of TMM is dependent on the action of the essential TmaT mycolyl acetyltransferase (Yamaryo-Botte *et al.*, 2015) (Fig. 2A). MmpS proteins display no similarity to membrane fusion proteins of Gram-negative bacteria. However, the close association of *mmpS* and *mmpL* genes suggests that MmpS proteins may fulfil the role of MFPs (Deshayes *et al.*, 2010; Wells *et al.*, 2013). GPL export, for instance, involves two MmpL proteins (MmpL4a and MmpL4b) whose activities are regulated by MmpS4 and by an integral membrane protein (Gap) (Sondén *et al.*, 2005), a transport system that shares similarities with the siderophore export system of *M. tuberculosis* (Fig. 2B). Interestingly, MmpL multiplication goes along with that of MmpS. Of note, 24 MmpS-coding genes, identified using a custom HMM MmpS profile built in a similar fashion to our HMM MmpL profile, are found in *M. abscessus* among which 20 genes are near to *mmpL* genes. Thus, whatever the nature of the substrate (lipids, metals, toxic compounds), the genomic context suggests that MmpL-mediated transports might be seconded by MmpS proteins.

#### Localisation of MmpL clusters and functional conservation

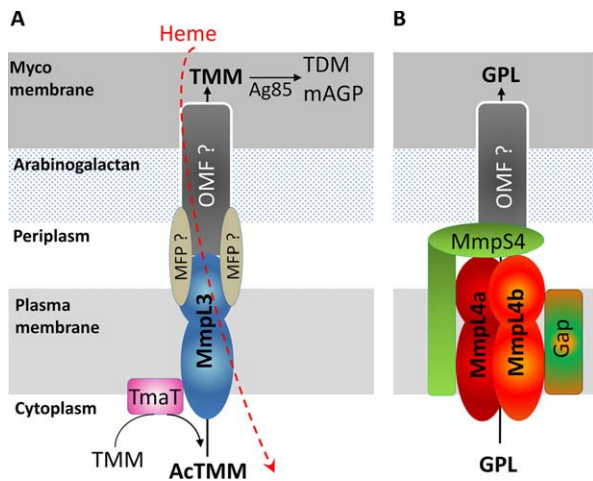
An interesting genetic aspect of MmpLs is that the genes encoding the enzymes and the MmpLs involved respectively in the biosynthesis and export of a lipid are



**Fig. 1.** MmpL abundance among mycobacteria. Based on a multigene approach (Mignard and Flandrois, 2008), the phylogeny of 61 mycobacterial species was inferred by PHYML and aLRT (Guindon and Gascuel, 2003). The tree was rooted with *Nocardia farcinica*. The aLRT statistic values over 0.5 are indicated at each node. Bar, 0.1 estimated nucleotide substitutions per site. RGM: rapid-growing mycobacteria. SGM: slow-growing mycobacteria. MmpL proteins were identified using an HMM profile built with a seed of 35 mycobacterial sequences representative of mycobacterial MmpL proteins. The mean number of MmpL is displayed next to each corresponding species. A scale of MmpL abundance is depicted, which points out a 'hot spot' in the *M. abscessus*-*M. fortuitum*-*M. smegmatis* superclade.

frequently found in dense clusters. These clusters are often conserved in synteny among the mycobacterial species. Here we show this synteny between a phylogenetically disparate set of model mycobacteria (*M.*

*tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. marinum*, *M. abscessus* and *M. smegmatis*) for which well curated and fully annotated whole genome sequences are available and for which experimental data with regards to



**Fig. 2.** Model of the transmembrane translocation of TMM and GPL.

A. TMM is first acetylated by the integral membrane protein TmaT to generate AcTMM which is exported to the periplasmic space by MmpL3, probably deacylated in the periplasm by an unknown enzyme to form TMM. The latter is then routed to the Ag85 complex that is associated with the mycomembrane by a yet unknown transport system consisting of proteins sharing similar functions with the membrane fusion-like proteins (MFP) and a channel-forming outer-membrane factor (OMF), to reconstitute a tripartite transport system. The Ag85ABC complex metabolises TMM into biologically active TDM and catalyses the mycolylation of arabinogalactan of the mAGP complex, thereby contributing to the elaboration of the mycomembrane. MmpL3 has also been implicated in heme import.

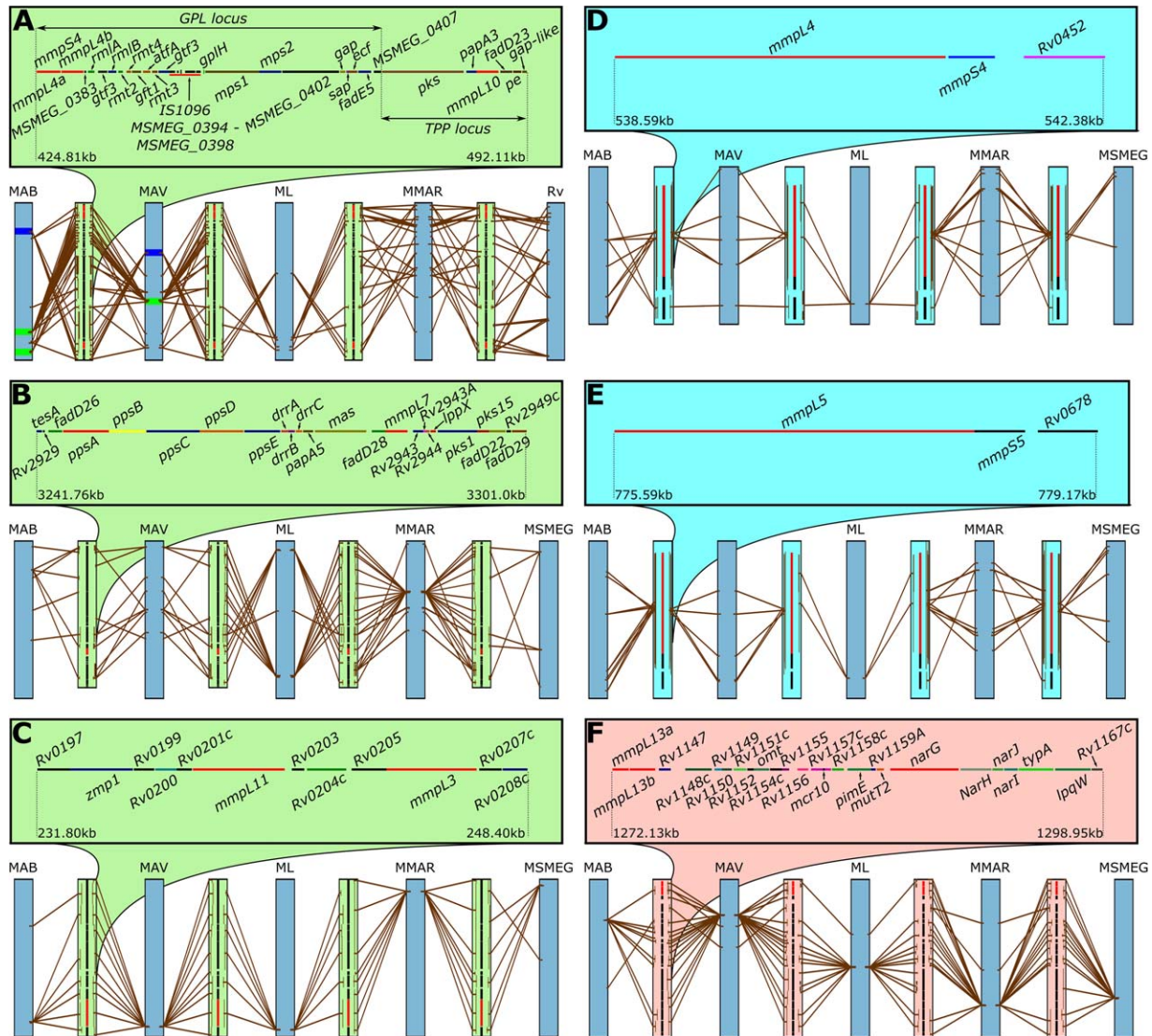
B. In *M. smegmatis* or *M. abscessus*, GPL are transported by MmpL4a and MmpL4b which require also MmpS4, acting as a scaffold with MmpL4 proteins for the assembly of the GPL biosynthesis megacomplex. This complex involves also a small integral membrane protein named Gap (GPL addressing protein) that is specifically required for the transport of the GPLs to the mycobacterial surface. The presence of an OMF remains speculative.

their lipid profiles have been generated (Fig. 3). The well characterised GPL and trehalose polyphosphate (TPP) biosynthesis and transport gene clusters are found next to each other in *M. smegmatis* (Burbaud *et al.*, 2016). Orthologs of many of the genes within these clusters, including genes involved in the biosynthesis of GPL (*rmlA*, *gft1* and *mps*) (Billman-Jacobe *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2006; Ripoll *et al.*, 2007) or of TPP (*pks* and *fadD23*) (Burbaud *et al.*, 2016) can be found in *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae* and *M. marinum* that do not produce either GPL or TPP. However, these genes are spread throughout the genomes of these mycobacteria (Fig. 3A). On the contrary, in *M. abscessus* and *M. avium*, both known to elaborate GPL and TPP (Burbaud *et al.*, 2016), the corresponding *gpl* and *tpg* gene clusters are conserved colinearly. Interestingly, the *M. abscessus* chromosome contains an additional GPL-like cluster, which contains two non-ribosomal peptide

synthase-encoding genes, *MAB\_4690c* and *MAB\_4691c* (cognate to *mps1* and *mps2*), the MbtH-like protein-encoding *gplH* gene, which is essential for GPL synthesis (Tatham *et al.*, 2012), the D-allo-threonine 6-deoxytalosyltransferase-encoding gene *gft1*, *mmpS4* and two *mmpL4* homologues (Ripoll *et al.*, 2009). While most of the elements of the *M. abscessus* GPL-related gene cluster have been validated for their role in GPL synthesis or export (Pang *et al.*, 2013), the contribution of the second and reduced GPL cluster in lipid biosynthesis in this organism remains undetermined. Similar to the GPL cluster, the large cluster of genes responsible for phthiocerol dimycoserolate (PDIM) and phenolic glycolipid (PGL) synthesis in *M. tuberculosis* is syntenic to the corresponding loci in *M. leprae* and *M. marinum*, which also elaborate PDIM and PGL. Orthologs of the genes *tesA* that encodes a type II thioesterase, *fadD26* encoding a fatty acid AMP-ligase and *mas* encoding a mycocerosic acid synthase, all proven to be necessary for PDIM synthesis (Alibaud *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012), are spread throughout the chromosomes of *M. abscessus*, *M. avium* and *M. smegmatis* (Fig. 3B). The splitting of this specific cluster might explain the absence of PDIM and PGL in these species. Interestingly, a cluster of at least 7 genes including the essential *mmpL3* gene and *mmpL11* gene are conserved in synteny among all mycobacteria investigated (Fig. 3C). The strict conservation of *mmpL3* in all species was anticipated as this gene has been shown to be essential in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, also due to its role in the transport of mycolic acids, which are crucial components of the mycomembrane (Domenech *et al.*, 2005; Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2012). In the heme import system, of which both MmpL3 and MmpL11 are thought to be constituents (Owens *et al.*, 2013), the secreted protein encoded by *Rv0203*, a gene found just downstream of *mmpL11*, transports heme across the periplasm to the periplasmic domains of MmpL3 and MmpL11. Another gene located in the highly conserved *mmpL3-mmpL11* synteny block and encoding a putative acetyltransferase (*Rv0228*) has been shown to acetylate TMM as a prerequisite to TMM transport (Yamaryo-Botte *et al.*, 2015; Belardinelli *et al.*, 2016). However, genes encoding the Pks13 involved in the biosynthesis of TMM (Gavalda *et al.*, 2014) and/or involved in the synthesis of MMDAG are not found in the *mmpL3/11* cluster.

While all of the MmpLs that have been discussed in this section so far are implicated in the biosynthesis and/or export of cell wall lipids, no lipid substrates have been identified for MmpL4 and MmpL5, which, along with their MmpS partners, transport the siderophores, mycobactin and carboxymycobactin (Chavadi *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2013). It is noteworthy that *mbt1* and





**Fig. 3.** Syntenic conservation of the *mmpL*-containing gene clusters in mycobacteria. The SyMAP 4.2 software, a synteny mapping and analysis program, was used to visualise filtered anchors (corresponding elements) between a particular *mmpL*-containing gene cluster in a reference genome and the full length subject genome (Soderlund *et al.*, 2011).

A. Synteny of the GPL and TPP clusters of *M. smegmatis* (MSMEG) with the corresponding clusters in *M. abscessus* (MAB) and *M. avium* (MAV). No co-linear conservation of the genes in these clusters of *M. smegmatis* is seen in the *M. leprae* (ML), *M. marinum* (MMAR) or *M. tuberculosis* H37Rv (Rv) chromosomes. The GPL and TPP clusters within the MAB and MAV chromosomes are indicated with a small, green and blue box respectively.

B. Synteny of the PDIM and PGL cluster of *M. tuberculosis* H37Rv with the corresponding clusters in ML and MMAR. No syntenic conservation of the genes in this cluster of H37Rv is seen in the MAB, MAV or MSMEG chromosomes.

C. Synteny of the *mmpL3-mmpL11* cluster of H37Rv with the corresponding clusters in all other mycobacterial chromosomes interrogated.

D. *mmpS4* and a transcriptional regulator-encoding gene, *Rv0452* near to *M. tuberculosis mmpL4* are co-linearly conserved in other mycobacteria.

E. *mmpS5* is co-linearly conserved with *M. tuberculosis mmpL5* in all investigated mycobacteria, except *M. leprae* in which the *mmpL4* gene exhibits some low-level homology to the *mmpL5* of *M. tuberculosis*.

F. Syntenic conservation in mycobacteria of the *mmpL13* gene cluster. The lines in red within gene clusters represent *mmpL* genes in A-F. Panels in green highlight gene clusters involved in the biosynthesis and export of lipids, those in blue gene clusters involved in siderophore export and the panel in light red represents a gene cluster containing a *mmpL* for which the function is unsolved.

*mbt2*, which encode the enzymes that synthesise mycobactin and carboxymycobactin, are located distantly on the chromosome from both *mmpL4* and *mmpL5*. In addition, *mmpL4* and *mmpL5* themselves are separated

by about 200 kilobases. A syntenic conservation of the two MmpLs involved in siderophore transport along with the siderophore biosynthetic genes is thus not likely between different mycobacteria. However, the *mmpS*

that precedes the *mmpL4* as well as a gene encoding a transcriptional regulator preceding *mmpS4* appears to be conserved in synteny between all mycobacteria (Fig. 3D). Similarly, *mmpS5* is highly conserved in synteny along with *mmpL5* (Fig. 3E), but the gene that precedes *mmpS5*, *Rv0678* encoding a MarR transcriptional regulator was only detected to be conserved co-linearly in *M. marinum*. However, genes encoding transcriptional regulators of the TetR family and bearing low protein identity (< 25%) to MarR can be found upstream of *mmpS5* in *M. abscessus*, *M. smegmatis* and *M. avium*.

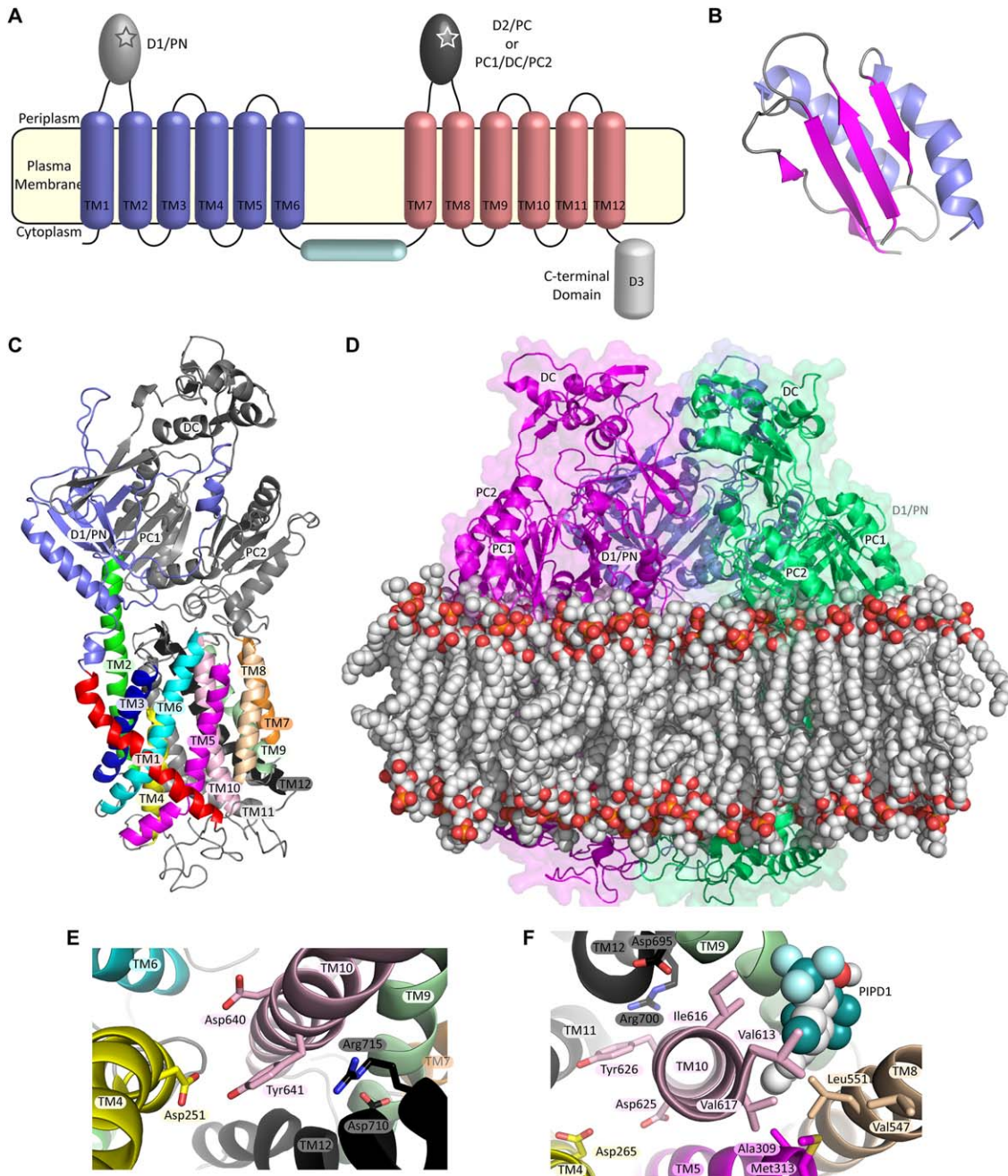
The fact that several MmpL-coding genes appear to localise in gene clusters dedicated to the same biological function might suggest that applying this type of synteny analysis may help us sift the MmpL with likely functions in lipid transport out from the large number of MmpL with unknown functions. This would especially be helpful in genetic studies of virulent species like *M. avium*, *M. ulcerans* or *M. abscessus* containing at least 14, 16 and 27 *mmpL* genes each, most of which have no known function. Although they are probably neither important for survival nor for virulence in *M. tuberculosis*, the functions of MmpL1, 2, 6, 9, 12 and 13 have not yet been determined. Interestingly, the *mmpL13* gene is truncated in *M. tuberculosis* H37Rv resulting in two open reading frames, *mmpL13a* and *mmpL13b*, in an operon configuration (Fig. 3F). Because of this truncation, it is generally considered that the two products would be non-functional. In a *mexB* mutant of *Pseudomonas aeruginosa*, it was demonstrated that the presence of both amino- and carboxyl-halves of MexB in a complex is essential for transport activity (Eda *et al.*, 2003). Strikingly, the *mmpL13a/mmpL13b* operon is conserved as a single open reading frame encoding a protein with 12 transmembrane domains in *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. marinum* and in *M. avium*. In addition, a large number of genes in the close proximity to *mmpL13* in *M. tuberculosis* are conserved in synteny between the six mycobacterial genomes investigated, except for *M. leprae* in which no functional *mmpL13* gene is present (Fig. 3F). The relatively close vicinity of *mmpL13a/mmpL13b* to *pimE* and *lpqW*, elements involved in the synthesis of the more decorated forms of phosphatidylinositol mannoside (PIM) (Crellin *et al.*, 2008; Morita *et al.*, 2006) might suggest a role for this MmpL as the yet unidentified flipase involved in PIM transport across the plasma membrane.

While there may be several possible reasons why some *mmpL* genes are conserved in syntenic blocks, one appealing explanation is that the close proximity of the *mmpL* genes to other genes involved in related functions provides a physical advantage to efficiently synthesise and export the lipid substrates, for example their co-localisation may facilitate coordination of expression

or complex formation. This has been proposed for the GPL biosynthetic and transport machinery that form a megacomplex, which produces and exports GPL in *M. smegmatis* (Deshayes *et al.*, 2010). In agreement with these observations, several studies demonstrated that biosynthesis and MmpL-dependent lipid transport are coupled in mycobacteria (Converse *et al.*, 2003; Jain and Cox, 2005).

#### *Proton motive force-driven transport enacted by MmpL proteins*

Recent bioinformatic analyses along with electron microscopy studies have led to new knowledge with respect to the potential secondary, three-dimensional and quaternary structures of MmpL proteins. All MmpL members are predicted to possess eleven or twelve transmembrane (TM) helices (with the exception of MmpL6 and MmpL13 in *M. tuberculosis*) where the first five/six transmembrane helices form the first N-terminal domain and the last six helices constitute the C-terminus (Sandhu and Akhter, 2015) (Fig. 4A). These two domains are separated by a single cytoplasmic helix between TM6 and TM7 that is orientated in parallel to the plasma membrane, in agreement with other RND protein structures. Additionally, two periplasmic domains, designated the porter domains, are located between TM1 and TM2 and between TM7 and TM8 respectively (Chim *et al.*, 2015). Chim *et al.* proposed the subdivision of *M. tuberculosis* MmpLs into two clusters: (i) Cluster I grouping the vast majority of MmpL members, comprising only D1/PN (PN stands for N-terminal porter domain) and PC1/DC/PC2 (PC stands for C-terminal porter domain) and (ii) cluster II consisting of MmpL3/11/13 possessing an extra cytoplasmic D3 domain (Chim *et al.*, 2015) (Fig. 4A). The crystal structure of the periplasmic D2 domain of MmpL11 has recently been solved at very high resolution (Fig. 4B), emphasising the structural resemblance with other RND porter domains (Chim *et al.*, 2015), and leading the authors to propose the involvement of D1 and D2 in substrate binding (Tullius *et al.*, 2011). Domain D3 is predicted to be mainly unstructured in MmpL3 but to adopt a more folded and helical structure in MmpL11. While the role of domain D3 has not yet been uncovered, its cytoplasmic localisation was supported by recent studies on MmpL3 localisation (Carel *et al.*, 2014). Moreover, deletion of D3 failed to alter TMM translocation activity, suggesting that it is dispensable for the transport activity of MmpL3 (Belardinelli *et al.*, 2016). That this extra domain is absent in MmpL3 of corynebacteria also questions its functional relevance and contribution in TMM transport.



**Fig. 4.** MmpL topology and homology modelling.

**A.** Predicted topology of MmpL proteins. Transmembrane helices are represented as blue and salmon cylinders. The cyan blue helix orientated in parallel to the plasma membrane separates the two MmpL domains. Domains D1/PN and D2/PC (or PC1/DC/PC2) found in the MmpL cluster I are shown in grey and black, respectively. The star represents the potential substrate binding sites. The cytoplasmic domain D3 shown in white is only present in the MmpL cluster II.

**B.** Crystal structure of the *M. tuberculosis* MmpL11 D2 domain. Strands, helices and coils are coloured in magenta, blue and grey, respectively.

**C.** Three-dimensional homology modelling of the *M. boletii* MmpL4a monomer. The D1/PN and PC1/DC/PC2 domains are coloured in blue and grey, respectively. Each transmembrane helix is coloured differently and their numbering is indicated.

**D.** Proposed homology model of the *M. boletii* MmpL4a homotrimer. The three monomers represented as cartoons and transparent surfaces are coloured magenta, green and pink. The different periplasmic domains are indicated. The putative position of the plasma membrane is shown as a lipid bilayer.

**E.** Mapping of the residues proposed to participate in the proton relay in MmpL3 from *M. tuberculosis*.

**F.** Putative PIPD1 binding pocket in MmpL3 from *M. abscessus*. The residues surrounding PIPD1 are in the near proximity to those proposed to be involved in the proton motive force.

Several independent studies reported homology modelling of MmpL proteins (Chim *et al.*, 2015; Sandhu and Akhter, 2015, 2016; Bernut *et al.*, 2016) (Fig. 4C and 4D), built despite very low sequence homology to the RND with available crystal structures. All these models propose that, as found in other RND proteins, MmpL transporters might be organised as homotrimers (Fig. 4D). Although care should be taken regarding the interpretation and use of these modelled three-dimensional structures, they have been very helpful to predict essential residues participating in the proton relay in MmpL3 and MmpL4a (Bernut *et al.*, 2016). Functional complementation studies of a *M. smegmatis mmpL3* conditional mutant (Varela *et al.*, 2012) with various *M. tuberculosis mmpL3* alleles demonstrated the essential role of ultra-conserved residues, such as the Asp251 in TM4 or the Asp640/Tyr641 pair in TM10, for the MmpL3 activity (Belardinelli *et al.*, 2016; Bernut *et al.*, 2016) (Fig. 4E). Additionally, using a similar approach Asp710 and Arg715 in TM12 have been shown to be crucial elements for TMM transport (Belardinelli *et al.*, 2016). Although the direct role of these amino acids in the PMF still awaits experimental proof, it is certainly conceivable that these residues could convey protons, supported by the analogy with the residues from TM4, TM10 and TM12 that are critical for the proton relay of *E. coli* AcrB (Su *et al.*, 2006; Eicher *et al.*, 2014). Recently, a single particle electron microscopy study unravelled the first low-resolution (18Å) three-dimensional structure of MmpL3 (CmpL1) from *C. glutamicum* (Belardinelli *et al.*, 2016). The electron density clearly attested to a trimeric symmetry shape, confirming the homotrimeric architecture of the transporter. This structure exhibits a central vestibule on the three-fold axis accessible from both the cytoplasmic and periplasmic sides and filled with hydrophobic residues, presumably enabling the channelling of host lipids such as TMM. Additionally, a crevice defined by the TM regions brought by the different subunits has also been proposed as a potential path for TMM (Belardinelli *et al.*, 2016).

The so far well-described bacterial RND proteins are those involved in the transport/efflux of small molecules such as metal ions or antibiotics. Therefore, the transport from the cytoplasm toward the outer membrane of GPL/TMM/PDIM, which are much larger and hydrophobic molecules, remains difficult to envision. All RND proteins work in complex with soluble and outer membrane embedded proteins, such as AcrAB-TolC (Anes *et al.*, 2015). It is very likely that additional partners may intervene in the transport/flipping mechanism of these very large substrates. It has been shown that TMM acetylation by the TmaT acetyltransferase is essential for its transport in *C. glutamicum* (Yamaryo-Botte *et al.*, 2015) and *M. smegmatis* (Belardinelli *et al.*, 2016). TmaT,

being a membrane protein, might synergistically contribute along with MmpL3 to the TMM transport mechanism. Strikingly, the *M. tuberculosis* MmpL7 PDIM transporter lacks the ultra-conserved Asp/Tyr pairs in TM4 and Asp in TM10 (Bernut *et al.*, 2016) and might therefore not be functional on its own, but might perform its activity along with the LppX lipoprotein and the DrrABC transporter (Cox *et al.*, 1999), believed to promote PDIM translocation through the plasma membrane. The respective contribution of these proteins in the transport remains to be clarified.

#### Regulation of MmpL expression

The survival strategies developed by pathogenic mycobacteria are strongly linked to the presence of an unusual cell envelope (Daffé and Draper, 1998) and in response to environmental changes, *M. tuberculosis* activates or represses the expression of key genes to promptly adjust to new conditions (Schnappinger *et al.*, 2003). Cell wall biosynthesis and remodelling are important functions for *M. tuberculosis* to establish and maintain infection. This implies a subtle control of expression of cell wall biosynthetic enzymes and transporters. Distinct mechanisms have been incriminated in the regulation of MmpL expression/activity, either at a transcriptional or at a post-translational level.

The MarR-like transcriptional regulator-coding gene *Rv0678* is adjacent to, and downstream of the *mmpS5-mmpL5* operon in *M. tuberculosis*. The crystal structure of *Rv0678* revealed a structure similar to members of the MarR family of proteins. Unexpectedly, the structure was solved in complex with a 2-stearoylglycerol molecule, suggesting that this lipid is a natural substrate of the regulator (Radhakrishnan *et al.*, 2014). Biochemical studies indicated a direct binding of *Rv0678* within the intergenic regions between *mmpS5* and *Rv0678*, consistent with a previous finding reporting altered *mmpS5-mmpL5* gene expression in strains carrying mutations in *Rv0678* (Milano *et al.*, 2009). Moreover, direct binding of *Rv0678* was also found within the promoter regions of *mmpS2-mmpL2*, *mmpS4-mmpL4* and *Rv0991-Rv0992*. The addition of an isomer of 2-stearoylglycerol reduced the binding of *Rv0678* to a target promoter probe, thus confirming that in the presence of this lipid, *Rv0678* is unable to bind to its DNA target (Radhakrishnan *et al.*, 2014).

Among their wide range of cellular activities, including osmotic stress, homeostasis, biosynthesis of antibiotics, virulence and pathogenicity of bacteria, TetR regulators are also known to modulate the expression level of multidrug resistance efflux pumps. The crystallographic structures of two other regulators, *Rv3249c* and

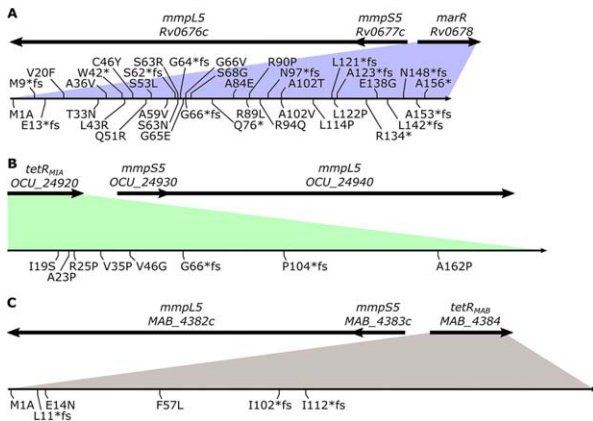
Rv1816, unravelled dimeric two-domain proteins with an architecture related to those of TetR family members (Delmar *et al.*, 2015). Both proteins were co-crystallised with saturated fatty acids, palmitic acid for Rv3249c and an isopropyl lauric acid for Rv1816, which may represent natural ligands of these regulators. Purified Rv3249c could bind directly to the promoter regions of *mmpS1* and *mmpL3* and to an intragenic region of *mmpL11* (Delmar *et al.*, 2015). Interestingly, the presence of a palmitic acid molecule buried within Rv3249c, that appears incompatible with binding of the protein to its cognate DNA ligand, was confirmed. Indeed, the addition of the fatty acid reduced the DNA binding activity of Rv3249c. Similarly, purified Rv1816 was found to directly bind to *mmpL3*, *mmpL11* and to a lesser extent *mmpL7* probes. Overall, these studies demonstrated a direct binding of several transcriptional regulators to the *mmpL* intragenic and promoter regions, providing evidence for a transcriptional control of *mmpS/mmpL* expression. They also highlight that *mmpL* genes expression is dependent on a complex interplay involving multiple transcription regulators and that ligand binding by Rv0678, Rv3249c and Rv1816 can make these regulators incompatible with their corresponding cognate DNA targets leading to derepression.

Protein phosphorylation/dephosphorylation represents a central mechanism for transduction of specific signals to various cellular processes, such as regulation of growth, differentiation, mobility and survival. Signalling through Ser/Thr phosphorylation has recently emerged as a critical regulatory mechanism in prokaryotes. This is particularly true in *M. tuberculosis*, which possesses a large family of eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases (STPKs) (Av-Gay and Everett, 2000). During the last decade, multiple mycobacterial STPK substrates, connected to cell shape/division and cell envelope biosynthesis, have been identified and the role of Ser/Thr phosphorylation by STPK in regulating important cell wall biosynthetic pathways has been delineated (Molle and Kremer, 2010). Using an *M. tuberculosis* mutant lacking the kinase domain of the PknD kinase, MmpL7 was identified as an endogenous phosphorylated substrate (Pérez *et al.*, 2006). This suggests that phosphorylation of MmpL7, and perhaps other MmpLs, could regulate the deposition of cell wall-associated glycolipids to the cell membrane.

#### *MmpL* proteins involved in drug resistance mechanisms

In their initial study, Domenech *et al.* were able to inactivate 11 out of the 12 complete *mmpL* genes in *M. tuberculosis* H37Rv and each mutant was assessed for growth kinetics and lethality in a murine model for

tuberculosis (Domenech *et al.*, 2005). While four mutants were found to be impaired in one or both measures of virulence (*mmpL4*, *mmpL7*, *mmpL8* and *mmpL11*), none of these mutants were affected in their susceptibility/resistance profile to antitubercular drugs, including the first-line drugs isoniazid (INH), ethambutol, rifampicin and pyrazinamide as well as other drugs known to be efflux substrates for RND proteins from other organisms (Domenech *et al.*, 2005). Although these results suggested that MmpL proteins do not contribute significantly to innate drug resistance in *M. tuberculosis*, *mmpL7* conferred resistance to INH when overexpressed in *M. smegmatis* (Pasca *et al.*, 2005). The INH resistance level decreased in the presence of efflux pump inhibitors like reserpine and carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). INH efflux from *M. smegmatis* expressing *mmpL7* was found to be an energy-dependent process (Pasca *et al.*, 2005). In an independent study, it was found that efflux inhibitors such as verapamil increased INH sensitivity in INH-resistant strains exhibiting up-regulation of various efflux pump genes such as *efpA* and *mmpL7* (Rodrigues *et al.*, 2012). Moreover, studies on the antileprosy drug clofazimine, of particular interest for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), has led to the generation of clofazimine-resistant *M. tuberculosis* mutants carrying mutations in the transcriptional regulator *Rv0678*, the transcriptional repressor of MmpL5, also designated MmpR5 for mycobacterial membrane protein repressor 5 (Zhang *et al.*, 2015). These mutations were associated with the concomitant up-regulation of *mmpL5* and accounted not only for the increased efflux of clofazimine but also of bedaquiline (Andries *et al.*, 2014; Hartkoorn *et al.*, 2014), the first drug to be approved in decades for the treatment of MDR-TB. Numerous mutations in *Rv0678* (Fig. 5A) were found to lead to derepression of the *mmpS5-mmpL5* operon with subsequent transcriptional gene upregulation of *mmpS5* and *mmpL5*, resulting in resistance to azoles through the active efflux of these compounds by MmpL5 (Milano *et al.*, 2009). This indicates that clofazimine and bedaquiline may also be substrates for this multi-substrate efflux pump. This hypothesis was also supported by data demonstrating that general inhibitors of efflux, verapamil and reserpine, potentiate bedaquiline activity in *M. tuberculosis*. An interesting observation is the absence of the *Rv0678-mmpS5-mmpL5* locus in *M. leprae* (Fig. 3E), which may explain why leprosy can be effectively treated with clofazimine, for which resistance was never encountered. Very recent studies also implicated MmpS5/MmpL5-mediated efflux in antibiotic resistance in NTM. Mutations in the *mmpT5* encoded TetR repressor located ahead of the *mmpS5/mmpL5* operon in *Mycobacterium intracellulare*



**Fig. 5.** Mutations in the genes *marR* or *tetR* encoding transcriptional regulators of the *mmpS5-mmpL5* operon. Non-synonymous mutations and frameshifts in (A) *marR* of *M. tuberculosis* isolates resistant to azole, bedaquiline or clofazimine; in (B) *tetR* of *M. intracellulare* isolates resistant to bedaquiline; in (C) *tetR* of *M. abscessus* resistant to thiacetazone derivatives. \* indicates a stop codon, \*fs indicates a frameshift mutation.

were associated with modest resistance levels to bedaquiline and clofazimine (Fig. 5B) (Alexander *et al.*, 2017). In addition, high resistance levels to a range of thiacetazone derivatives with potent activity against *M. abscessus* were found in spontaneous resistant mutants harbouring SNPs or indels in the TetR upstream and divergently orientated to one of three putative *mmpS5-mmpL5* operons (Fig. 5C). These mutations in TetR resulted in high induction levels of the *mmpS5* and *mmpL5* transcripts (Halloum *et al.*, 2017). Compellingly, over-expression of *mmpS5/mmpL5* in these resistant mutants did not result in cross-resistance to any other antibiotics utilised to treat *M. abscessus* infections, highlighting the specificity toward the compound exported. The presence of two other putative MmpS5/MmpL5-coding operons in *M. abscessus* (*MAB\_4311c-MAB\_4310c* and *MAB\_4705c-MAB\_4704c*) may represent resistance mechanisms through efflux of not yet known compounds with anti-*M. abscessus* activity, or conversely may contribute to the extremely high tolerance exhibited by *M. abscessus* to a very broad range of antibiotics.

#### *MmpL3* as an attractive antimycobacterial drug target

The essentiality of *mmpL3* for growth in axenic media and for establishing infection in human macrophages or in a mouse model was recently demonstrated using conditional knockdown mutants (Li *et al.*, 2016; Degiacomi *et al.*, 2017). Moreover, depletion of MmpL3 had a rapid bactericidal effect and rendered *M. tuberculosis* more susceptible to MmpL3 inhibitors (Li *et al.*, 2016). In this

context, MmpL3 was recently identified in multiple high-throughput whole-cell screens as the target of several antitubercular agents. Currently, it represents one of the most promising antimycobacterial pharmacological targets and numerous chemical entities have recently been shown to inhibit MmpL3 activity not only in *M. tuberculosis* but also in NTM, thus opening a new field in the inhibition of mycolic acid transport (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; La Rosa *et al.*, 2012; Tahlan *et al.*, 2012; Lun *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2013; Bailo *et al.*, 2015; Dupont *et al.*, 2016). Notably, SQ109, identified in a combinatorial chemistry-based search for ethambutol analogues, currently in phase III of clinical trials, was shown to inhibit MmpL3 in *M. tuberculosis* (Tahlan *et al.*, 2012). It was also demonstrated that SQ109 treatment led to inhibition of TDM synthesis and concomitant accumulation of TMM and found that spontaneous SQ109-resistant mutants contained single nucleotide polymorphisms within *mmpL3*. Shortly thereafter, the pyrrole derivative BM212 (La Rosa *et al.*, 2012) and the adamantyl urea AU1235 (Grzegorzewicz *et al.*, 2012) with antitubercular activity were found to target *mmpL3* as resistant mutants harboured mutated *mmpL3* alleles. MmpL3 inhibitors act also synergistically with other antitubercular drugs, which is of interest to efforts that aim to reduce the duration of TB treatments (Li *et al.*, 2017). The divergent scaffolds from which these different inhibitors were derived as well as their broad-spectrum activity against non-mycolate producing bacteria and fungal species, suggested that MmpL3 was probably not the direct target of these inhibitors. Li *et al.* (2014) have shown that SQ109 causes dissipation of the PMF in *M. tuberculosis*, thus disrupting MmpL3 function. This uncoupling effect has recently been addressed for several antitubercular drugs targeting MmpL3 (Feng *et al.*, 2015). In a recent study, tetrahydropyrazo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide (THPP) was reported to inhibit mycolic acid biosynthesis by targeting the enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase EchA6, instead of the previously assigned MmpL3 target (Cox *et al.*, 2016), despite the fact that multiple mutations in *mmpL3* conferred resistance to this inhibitor (Remuiñán *et al.*, 2013). THPP inhibitors compete with CoA-binding resulting in suppression of mycolic acid synthesis, demonstrating that spontaneous resistance-conferring mutations in *mmpL3* can potentially obscure the actual target identification of small inhibitors.

Recently, a new piperidinol-based compound, termed PIPD1, exhibiting potent bactericidal activity against clinical *M. abscessus* strains was identified. Treatment of *M. abscessus*-infected zebrafish with PIPD1 correlated with increased embryo survival and decreased bacterial loads (Dupont *et al.*, 2016). Whole genome analysis of *M. abscessus* strains resistant to PIPD1 identified

several mutations in *MAB\_4508*, encoding a protein homologous to MmpL3. Subsequent biochemical analyses proved that whilst *de novo* synthesis of mycolic acids remained unaffected by PIPD1 treatment, the compound was found to strongly inhibit the transport of TMM, thereby leading to the inhibition of arabinogalactan mycolylation (Dupont *et al.*, 2016). In addition, mapping a large panel of distinct mutations conferring resistance to PIPD1 on a *MAB\_4508/MmpL3* three-dimensional homology model allowed identification of a potential PIPD1-binding cavity (Dupont *et al.*, 2016). Unexpectedly, the residues Val613, Ile616 and Val617 present in TM10, that belong to the putative PIPD1-binding cavity, are also located in the spatial vicinity of the PMF-driven Asp625 and Tyr626 residues in TM10 and whose side chains face the other PMF essential Asp265 residue in TM4 (Bernut *et al.*, 2016) (Fig. 4F). Binding of PIPD1 may thus destabilise key structural elements and/or arrangements that are required for the proton relay (Bernut *et al.*, 2016). This may in turn abolish the PMF and the transport of TMM across the membrane, leading to the bactericidal effect of the compound. Overall, this underlines a unique mode of action in *M. abscessus*, resulting in the arrest of mycolic acid translocation from the cytoplasm, where they are synthesised, to the periplasmic side of the plasma membrane for subsequent use in the formation of the virulence-associated outer membrane trehalose-containing glycolipids or essential transfer onto the cell wall AG by the Ag85 complex. Of note, the N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] reported to inhibit MmpL3 in *M. tuberculosis* (Remuñán *et al.*, 2013) is inactive against *M. abscessus*, indicating that some MmpL3 inhibitors are species-specific. However, the work by Dupont *et al.* (2016) supports the view of *MAB\_4508/MmpL3* as a promising drug target to be further exploited against *M. abscessus* and presumably also against other NTM. Indeed, effective drugs with novel molecular targets are urgently needed to fight these emerging pathogens. The natural resistance of *M. abscessus* to most commonly available antibiotics seriously limits chemotherapeutic treatment options, which is particularly challenging for treating cystic fibrosis patients infected with this RGM (Nessar *et al.*, 2012).

### Conclusion and future perspectives

An important observation arising from the present analysis is that a higher number of MmpLs is found in the RGM group than in the SGM group, and particularly in the *M. abscessus* clade. This is corroborated by recent comparative genomic studies indicating that *M. abscessus* evolves rapidly and continues to acquire new

genetic material for the adaptation to divergent environmental conditions (Choo *et al.*, 2014; Sapriel *et al.*, 2016). The capacity of *M. abscessus* to transition from a smooth intra-macrophage-resistant form to a rough extracellular form is likely to facilitate its capacity to adapt and survive in the changing environments (Roux *et al.*, 2016). In this context, modulation of its cell wall composition/architecture and its ability to extrude toxic xenobiotics prevailing in its various habitats and hosts may also be greatly aided by its high number of MmpL transporters. The consequence of this large network of efflux pumps may explain, at least partly, the intrinsic resistance of *M. abscessus* to most antimicrobials (Nessar *et al.*, 2012). However, much remains to be learned regarding the multiple and perhaps untapped functions of the diverse family of proteins in NTM, particularly in apprehending their contribution to the exquisite antibiotic resistance profiles expressed by some NTM.

Important progresses have been made these last few years in functionally and structurally characterising the MmpL proteins involved in the export of surface-exposed lipids in mycobacteria and corynebacteria. Although these transporters are thought to mediate translocation of the substrates across the plasma membrane using the PMF as a source of energy, important questions remain unaddressed. The description of the proton pathway that energises these transporters is far from being complete and awaits high-resolution structures as well as the development of functional assays. Once achieved, this may also bring further insights to explain the molecular basis of substrate recognition and translocation, how the different inhibitors inhibit MmpL3, and to define whether they have access to the same or different binding cavities. The design of new and improved chemotypes targeting MmpL3 for future antimycobacterial drug developments would greatly benefit from such structural and functional studies. Access to a biochemical assay would undoubtedly be helpful as the MmpL3 inhibitors are distinct pharmacophores, raising the question whether they exert their activity through specific inhibition of the MmpL3 transporter functions or through indirect mechanisms, for example involving the dissipation of the PMF (Li *et al.*, 2014). The continuing rise of MDR tuberculosis and the emergence of difficult-to-treat NTM infections warrant the need for new drugs with new modes of action that will shorten treatment duration. In this regard, MmpL3 inhibitors may have significant potential (Li *et al.*, 2017). Since the export of TMM requires the action of the essential TmaT mycolyl acyltransferase, MmpL interactors such as TmaT may represent potential drug targets that remain to be explored. Additionally, targeting MmpL binding partners, such as peptides exhibiting anti-virulence functions, may also pave the way toward innovative approaches to

combat mycobacterial infections. This view is supported by work demonstrating that overexpression of the mycobacterial KdpF peptide, shown to interact with the transmembrane domains 2–6 of MmpL7 and MmpL10, restricts intramacrophage growth and the ability of mycobacteria to form cords (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013).

## Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the support of the French National Research Agency (DIMYVIR ANR-13-BSV3-0007-01) to LK and JLH and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) DEQ20150331719 to LK and the associations Vaincre la Mucoviscidose and Grégory Lemarchal for funding VD.

The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

- Alexander, D.C., Vasireddy, R., Vasireddy, S., Philley, J.V., Brown-Elliott, B.A., Perry, B.J., *et al.* (2017) Emergence of *mmpT5* variants during bedaquiline treatment of *Mycobacterium intracellulare* lung disease. *J Clin Microbiol* **55**: 574–584.
- Alibaud, L., Rombouts, Y., Trivelli, X., Burguière, A., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., *et al.* (2011) A *Mycobacterium marinum* TesA mutant defective for major cell wall-associated lipids is highly attenuated in *Dictyostelium discoideum* and zebrafish embryos. *Mol Microbiol* **80**: 919–934.
- Andries, K., Vilellas, C., Coeck, N., Thys, K., Gevers, T., Vranckx, L., *et al.* (2014) Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS ONE* **9**: e102135.
- Anes, J., McCusker, M.P., Fanning, S., and Martins, M. (2015) The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* **6**: 587.
- Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **8**: 238–244.
- Bailo, R., Bhatt, A., and Ainsa, J.A. (2015) Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochem Pharmacol* **96**: 159–167.
- Belardinelli, J.M., Larrouy-Maumus, G., Jones, V., Sorio de Carvalho, L.P., McNeil, M.R., and Jackson, M. (2014) Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **289**: 27952–27965.
- Belardinelli, J.M., Yazidi, A., Yang, L., Fabre, L., Li, W., Jacques, B., *et al.* (2016) Structure-function profile of MmpL3, the essential mycolic acid transporter from *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect Dis* **2**: 702–713.
- 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 USA* **111**: E943–E952.
- Bernut, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., *et al.* (2016) Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* **99**: 866–883.
- Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Haites, R.E., Kovacevic, S., and Coppel, R.L. (1999) Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **33**: 1244–1253.
- 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.
- Carel, C., Nukdee, K., Cantaloube, S., Bonne, M., Diagne, C.T., Laval, F., *et al.* (2014) *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localise dynamically to the old growing pole and septum. *Plos One* **9**: e97148.
- Chalut, C. (2016) MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* **100**: 32–45.
- Chavadi, S.S., Stirrett, K.L., Edupuganti, U.R., Vergnolle, O., Sadhanandan, G., Marchiano, E., *et al.* (2011) Mutational and phylogenetic analyses of the mycobacterial *mbt* gene cluster. *J Bacteriol* **193**: 5905–5913.
- Chim, N., Torres, R., Liu, Y., Capri, J., Batot, G., Whitelegge, J.P., and Goulding, C.W. (2015) The structure and interactions of periplasmic domains of crucial MmpL membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **22**: 1098–1107.
- Choo, S.W., Wee, W.Y., Ngeow, Y.F., Mitchell, W., Tan, J.L., Wong, G.J., *et al.* (2014) Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary potential. *Sci Rep* **4**: 4061.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–544.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., *et al.* (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**: 1007–1011.
- 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 USA* **100**: 6121–6126.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**: 79–83.
- Cox, J.A.G., Abrahams, K.A., Alemparte, C., Ghidelli-Disse, S., Rullas, J., Angulo-Barturen, I., *et al.* (2016) THPP target assignment reveals EchA6 as an essential fatty acid shuttle in mycobacteria. *Nat Microbiol* **1**: 15006.
- Crellin, P.K., Kovacevic, S., Martin, K.L., Brammananth, R., Morita, Y.S., Billman-Jacobe, H., *et al.* (2008) Mutations in *pimE* restore lipoarabinomannan synthesis and growth in a *Mycobacterium smegmatis* *lpqW* mutant. *J Bacteriol* **190**: 3690–3699.



- Daffé, M., and Draper, P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131–203.
- Degiacomì, G., Benjak, A., Madacki, J., Boldrin, F., Provvedi, R., Palù, G., et al. (2017) Essentiality of *mmpL3* and impact of its silencing on *Mycobacterium tuberculosis* gene expression. *Sci Rep* **7**: 43495.
- Delmar, J.A., Chou, T.-H., Wright, C.C., Licon, M.H., Doh, J.K., Radhakrishnan, A., et al. (2015) Structural basis for the regulation of the MmpL transporters of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **290**: 28559–28574.
- Deshayes, C., Bach, H., Euphrasie, D., Attarian, R., Coureuil, M., Sougakoff, W., et al. (2010) MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **78**: 989–1003.
- 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.
- Dupont, C., Viljoen, A., Dubar, F., Blaise, M., Bernut, A., Pawlik, A., et al. (2016) A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol* **101**: 515–529.
- Eda, S., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2003) Function of the MexB efflux-transporter divided into two halves. *Biochemistry* **42**: 7238–7244.
- Eicher, T., Seeger, M.A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., et al. (2014) Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *Elife* **3**: 3145.
- Feng, X., Zhu, W., Schurig-Briccio, L.A., Lindert, S., Shoen, C., Hitchings, R., et al. (2015) Antiinfectives targeting enzymes and the proton motive force. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: E7073–E7082.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., et al. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* **42**: D222–D230.
- Gannoun-Zaki, L., Alibaud, L., Carrère-Kremer, S., Kremer, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2013) Overexpression of the KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology. *PLoS ONE* **8**: e60379.
- Gavalda, S., Bardou, F., Laval, F., Bon, C., Malaga, W., Chalut, C., et al. (2014) The polyketide synthase Pks13 catalyzes a novel mechanism of lipid transfer in mycobacteria. *Chem Biol* **21**: 1660–1669.
- Grzegorzewicz, A.E., Pham, H., Gundi, V.A.K.B., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., et al. (2012) Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol* **8**: 334–341.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696–704.
- Halloum, I., Viljoen, A., Khanna, V., Craig, D., Bouchier, C., Brosch, R., et al. (2017) Resistance to thiacetazone derivatives active against *Mycobacterium abscessus* involves mutations in the MmpL5 transcriptional repressor MAB\_4384. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: e02509–16.
- 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.
- Jackson, M. (2014) The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**: a021105.
- Jain, M., and Cox, J.S. (2005) Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**: e2.
- La Rosa, V., Poce, G., Canseco, J.O., Buroni, S., Pasca, M.R., Biava, M., et al. (2012) MmpL3 is the cellular target of the antitubercular pyrrole derivative BM212. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 324–331.
- 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.
- Li, W., Upadhyay, A., Fontes, F.L., North, E.J., Wang, Y., Crans, D.C., et al. (2014) Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 6413–6423.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**: 337–418.
- Li, W., Obregón-Henao, A., Wallach, J.B., North, E.J., Lee, R.E., Gonzalez-Juarrero, M., et al. (2016) Therapeutic potential of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid transporter, MmpL3. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 5198–5207.
- Li, W., Sanchez-Hidalgo, A., Jones, V., Calado Nogueira de Moura, V., North, E.J., and Jackson, M. (2017) Synergistic interactions of MmpL3 inhibitors with antitubercular compounds *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: e02399–16.
- Lun, S., Guo, H., Onajole, O.K., Pieroni, M., Gunosewoyo, H., Chen, G., et al. (2013) Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **4**: 2907.
- 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., Gaillard, J.-L., and Reyrat, J.-M. (2010) *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol* **18**: 117–123.
- Mignard, S., and Flandrois, J.-P. (2008) A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1432–1441.
- Milano, A., Pasca, M.R., Provvedi, R., Lucarelli, A.P., Manina, G., Ribeiro, A.L., de, J.L., et al. (2009) Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. *Tuberculosis (Edinb)* **89**: 84–90.
- Mitchell, A., Chang, H.-Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., et al. (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* **43**: D213–D221.

- Miyamoto, Y., Mukai, T., Nakata, N., Maeda, Y., Kai, M., Naka, T., *et al.* (2006) Identification and characterisation of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipid biosynthesis. *J Bacteriol* **188**: 86–95.
- Molle, V., and Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol* **75**: 1064–1077.
- Morita, Y.S., Sena, C.B.C., Waller, R.F., Kurokawa, K., Sernee, M.F., Nakatani, F., *et al.* (2006) PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria. *J Biol Chem* **281**: 25143–25155.
- Nessar, R., Cambau, E., Reytrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2012) *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* **67**: 810–818.
- Nikaido, H., and Takatsuka, Y. (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 769–781.
- Owens, C.P., Chim, N., Graves, A.B., Harmston, C.A., Iniguez, A., Contreras, H., *et al.* (2013) The *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein Rv0203 transfers heme to membrane proteins MmpL3 and MmpL11. *J Biol Chem* **288**: 21714–21728.
- Pacheco, S.A., Hsu, F.-F., Powers, K.M., and Purdy, G.E. (2013) MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **288**: 24213–24222.
- Pang, L., Tian, X., Pan, W., and Xie, J. (2013) Structure and function of *Mycobacterium* glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. *J Cell Biochem* **114**: 1705–1713.
- Pasca, M.R., Guglielame, P., De Rossi, E., Zara, F., and Riccardi, G. (2005) *mmpL7* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4775–4777.
- Pérez, J., Garcia, R., Bach, H., Waard, J.H., de, Jacobs, W.R., Av-Gay, Y., *et al.* (2006) *Mycobacterium tuberculosis* transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 6–12.
- Quadri, L.E.N. (2014) Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**: 179–211.
- Radhakrishnan, A., Kumar, N., Wright, C.C., Chou, T.-H., Tringides, M.L., Bolla, J.R., *et al.* (2014) Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **289**: 16526–16540.
- Rao, S.P.S., Lakshminarayana, S.B., Kondreddi, R.R., Herve, M., Camacho, L.R., Bifani, P., *et al.* (2013) Indol-carboxamide is a preclinical candidate for treating multidrug-resistant tuberculosis. *Sci Transl Med* **5**: 214ra168.
- Remuiñán, M.J., Pérez-Herrán, E., Rullás, J., Alemparte, C., Martínez-Hoyos, M., Dow, D.J., *et al.* (2013) Tetrahydropyridopyrimidine-3-carboxamide and N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* targeting MmpL3. *PLoS ONE* **8**: e60933.
- Ripoll, F., Deshayes, C., Pasek, S., Laval, F., Beretti, J.-L., Biet, F., *et al.* (2007) Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genom* **8**: 114.
- Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., *et al.* (2009) Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS ONE* **4**: e5660.
- Rodrigues, L., Machado, D., Couto, I., Amaral, L., and Viveiros, M. (2012) Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol* **12**: 695–700.
- Roux, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., *et al.* (2016) The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* **6**: 185.
- Sandhu, P., and Akhter, Y. (2015) The internal gene duplication and interrupted coding sequences in the MmpL genes of *Mycobacterium tuberculosis*: toward understanding the multidrug transport in an evolutionary perspective. *Int J Med Microbiol* **305**: 413–423.
- Sandhu, P., and Akhter, Y. (2016) The drug binding sites and transport mechanism of the RND pumps from *Mycobacterium tuberculosis*: insights from molecular dynamics simulations. *Arch Biochem Biophys* **592**: 38–49.
- Sapriel, G., Konjek, J., Orgeur, M., Bourli, L., Frézal, L., Roux, A.-L., *et al.* (2016) Genome-wide mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: evolutionary and epidemiological implications. *BMC Genom* **17**: 118.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., *et al.* (2003) Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med* **198**: 693–704.
- Seeliger, J.C., Holsclaw, C.M., Schelle, M.W., Botyanszki, Z., Gilmore, S.A., Tully, S.E., *et al.* (2012) Elucidation and chemical modulation of sulfolipid-1 biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **287**: 7990–8000.
- Soderlund, C., Bomhoff, M., and Nelson, W.M. (2011) SyMAP v3.4: a turnkey synteny system with application to plant genomes. *Nucleic Acids Res* **39**: e68.
- Sondén, B., Kocíncová, D., Deshayes, C., Euphrasie, D., Rhayat, L., Laval, F., *et al.* (2005) Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Mol Microbiol* **58**: 426–440.
- Su, C.-C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H., and Yu, E.W. (2006) Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J Bacteriol* **188**: 7290–7296.
- Székely, R., and Cole, S.T. (2016) Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function. *Mol Microbiol* **99**: 831–834.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., *et al.* (2012) SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1797–1809.

- Tatham, E., Sundaram Chavadi, S., Mohandas, P., Edupuganti, U.R., Angala, S.K., Chatterjee, D., and Quadri, L.E.N. (2012) Production of mycobacterial cell wall glycopeptidolipids requires a member of the MbtH-like protein family. *BMC Microbiol* **12**: 118.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., and Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**: 33–36.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., and Saier, M.H. (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 107–125.
- Tullius, M.V., Harmston, C.A., Owens, C.P., Chim, N., Morse, R.P., McMath, L.M., et al. (2011) Discovery and characterisation of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 5051–5056.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., et al. (2012) MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem Biol* **19**: 498–506.
- Wells, R.M., Jones, C.M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K.S., et al. (2013) Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **9**: e1003120.
- Yamaryo-Botte, Y., Rainczuk, A.K., Lea-Smith, D.J., Brammananth, R., Peet, P.L., van der, Meikle, P., et al. (2015) Acetylation of trehalose mycolates is required for efficient MmpL-mediated membrane transport in Corynebacterineae. *ACS Chem Biol* **10**: 734–746.
- Yang, L., Lu, S., Belardinelli, J., Huc-Claustre, E., Jones, V., Jackson, M., and Zgurskaya, H.I. (2014) RND transporters protect *Corynebacterium glutamicum* from antibiotics by assembling the outer membrane. *Microbiologyopen* **3**: 484–496.
- Yu, J., Tran, V., Li, M., Huang, X., Niu, C., Wang, D., et al. (2012) Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun* **80**: 1381–1389.
- Zhang, S., Chen, J., Cui, P., Shi, W., Zhang, W., and Zhang, Y. (2015) Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* **70**: 2507–2510.

## II. Contrôle de la virulence de *M. abscessus* par la MmpL8

Connaissant l'abondance particulière des MmpLs chez les espèces du complexe MCC comparée aux espèces du complexe MTBC, la mise en évidence d'une MmpL contribuant à la survie intracellulaire de *M. abscessus* par le crible amibien a suscité notre attention. Comme mentionné à plusieurs reprises, l'enveloppe mycobactérienne constitue une interface entre la mycobactérie et l'hôte jouant un rôle clef dans la pathogénicité des mycobactéries en modulant les interactions hôtes-pathogènes. La contribution de la famille de transporteurs de lipides MmpL à la virulence des mycobactéries est peu décrite chez *M. abscessus*, contrairement à *M. tuberculosis*. Les protéines MmpL4a et MmpL4b de *M. abscessus*, impliquées dans le transport des GPL, sont pour l'instant les seules décrites comme jouant un rôle dans la virulence de *M. abscessus* (Roux *et al.*, 2011; Bernut *et al.*, 2016). Si le criblage de mutants *mmpL* a permis d'identifier la contribution de certains lipides complexes transportés par les MmpL à la virulence des mycobactéries tels que le PDIM et les PGL ou encore le sulfolipide de *M. tuberculosis*, jusqu'à ce jour, aucun lipide spécifique du MCC participant à la pathogénicité toute particulière de ce complexe parmi les MCR, et notamment de *M. abscessus*, n'a été identifié.

Le gène *MYCMA\_0439* codant une protéine MmpL putative a été mis en évidence par le crible en amibes. Une étude fonctionnelle a été réalisée en mutant selon le modèle de recombinaison son équivalent putatif chez la souche type de *M. abscessus*, *MAB\_0855*, pour lequel une synténie totale est observée en amont et en aval du gène *MYCMA\_0439* (non montré). Des expériences de survie intracellulaire *in vitro* montre que le mutant *MAB\_0855* est atténué en macrophages et cette atténuation est complétée par son propre gène, ainsi que le gène *MYCMA\_0439*, suggérant que ces deux gènes remplissent des fonctions similaires. Par modélisation, il apparaît que le gène *MAB\_0855* code effectivement une protéine MmpL à 12 TMD, présentant deux boucles extracytoplas-

miques caractéristiques entre les TMD1 et -2 et les TMD7 et -8. La boucle N-terminale porte un unique « pore domain » tandis que la boucle C-terminale porte deux sous-domaines « pore domains » et un « docking domain ». Cette structure est celle décrite chez les protéines MmpLs du cluster I (HAE2) de *M. tuberculosis*, regroupant 10 des 13 protéines MmpL de *M. tuberculosis*. Afin de déterminer la fonction putative de *MAB\_0855*, nous avons entrepris la comparaison phylogénétique des MmpL de *M. abscessus* et de *M. tuberculosis*. Bien qu'il n'existe pas d'orthologue supposé de *MAB\_0855* chez *M. tuberculosis*, cette étude montre que la protéine se groupe avec les MmpL8, -10 et -12 au sein du cluster HAE2, trois MmpL impliquées dans le transport de lipides de surface, à l'exception de la MmpL12 de *M. tuberculosis* qui aurait perdu cette fonction (Boritsch *et al.*, 2016).

Une comparaison avec d'autres espèces mycobactériennes montre des orthologies putatives de *MAB\_0855* pour la MmpL12 de différentes espèces chez qui cette protéine serait impliquée dans le transport des LOS alors que *MAB\_0855* se rapproche davantage des MmpL8 de *M. tuberculosis* et de son ancêtre *M. canettii* en termes d'identité. Néanmoins, étant donné l'absence de synténie entre le locus *MAB\_0855* (*MAB\_0845-MAB\_0865*) de *M. abscessus* et les loci *mmpL8* et *mmpL12* de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* respectivement, il est peu probable que *MAB\_0855* remplisse la même fonction que ces *mmpL* chez ces espèces. Le fait que *M. abscessus* ne produise ni de LOS ni de SL est en accord avec cette observation. Toutefois, une synténie est observée entre *M. tuberculosis* et *M. abscessus* en amont et en aval du locus *MAB\_0855* suggérant que ce locus pourrait être soit la marque d'une adaptation évolutive spécifique de *M. abscessus* ; soit que le locus ait été perdu chez *M. tuberculosis*, soit qu'il ait été acquis par *M. abscessus* au cours de l'évolution. Le fait que le profil phylogénétique du gène *MAB\_0937c*, orthologue du gène *mmpL10* de *M. tuberculosis*, soit particulièrement conservé chez les MNT où *MAB\_0937c* est impliqué dans le transport de lipides abondants, les TPP, souligne d'une part le caractère atypique du profil

phylogénétique de *MAB\_0855* en comparaison, et suggère d'autre part que ces deux MmpL remplissent des fonctions différentes. Les TPP ressemblent structurellement aux DAT/PAT et au SL de *M. tuberculosis* transportés respectivement par les MmpL10 et -8 de *M. tuberculosis*, ce qui suggère que des protéines MmpL homologues transportent des composés similaires. Enfin, au sein du groupe *Chelonae-Abscessus-Immunogenum*, le locus *MAB\_0855* est particulièrement bien conservé, en synténie chez *M. chelonae* et en synténie inversée chez *M. immunogenum*. Un gène est cependant non retrouvé chez ces deux espèces (*MAB\_0849*), tandis que quelques gènes sont spécifiques à l'une ou l'autre de ces espèces comparativement à *M. abscessus*. L'orthologue putatif de *MAB\_0855* est annoté *mmpL8* chez les deux espèces, probablement par simple identité avec la MmpL8 de *M. tuberculosis*. Par une expérience de transcomplémentation du mutant  $\Delta MAB_0855$  avec les gènes *mmpL8*, *mmpL10* et *mmpL12* de *M. tuberculosis*, il apparaît que le rôle de *MAB\_0855* dans la virulence de *M. abscessus* peut être rempli par les *mmpL8* et -12 de *M. tuberculosis*. De cette première étude ressort la particularité du gène *MAB\_0855*. La prédiction fonctionnelle dépend du contexte génomique et, selon ce contexte, certains transporteurs semblent pouvoir se substituer. Par ailleurs, devant l'impossibilité de fournir une annotation du gène *MAB\_0855* par comparaison avec *M. tuberculosis*, nous avons adopté l'annotation existante chez *M. chelonae* et *M. immunogenum* et désignons *MAB\_0855* comme la MmpL8 de *M. abscessus* (MmpL8<sub>MAB</sub>).

Pour mieux comprendre le rôle de cette MmpL8 dans la survie intracellulaire de *M. abscessus*, nous avons étudié *in vitro* les interactions du mutant lisse S- $\Delta mmpL8_{MAB}$  avec des macrophages par mesure de l'adhésion de la mycobactérie aux cellules et par caractérisation du devenir intracellulaire du mutant. Cette étude montre que la MmpL8 contribue à l'adhésion de *M. abscessus* aux cellules et à son aptitude à établir des communications cytosoliques avec l'hôte. Ce phénotype-ci largement décrit chez *M. tuberculosis* comme un déterminant clef de

la virulence du bacille est médié par les gènes *Esx* mais aussi par (au moins) une MmpL, impliquée dans le transport du PDIM et des PGL (MmpL7) (Simeone *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2017). Par ailleurs, le mutant R du gène *mmpL8<sub>MAB</sub>* (R- $\Delta mmpL8_{MAB}$ ) est également atténué en macrophages *in vitro*. *In vivo* une infection du poisson zèbre montre également une virulence atténuée de la souche R- $\Delta mmpL8_{MAB}$  tandis que les infections avec les deux variants mutés pour *mmpL8<sub>MAB</sub>* sont associées à une diminution du nombre de granulomes par embryon. Les composés de l'enveloppe mycobactérienne étant connus pour participer à la modulation de la réponse immune, et considérant les phénotypes observés en cellules (diminution de l'adhésion et des contacts cytosoliques avec l'hôte), il était raisonnable de supposer que la mutation de la *mmpL8* aurait des conséquences sur la composition de l'enveloppe de *M. abscessus*.

Nous avons donc étudié les modifications induites par la perte du transporteur MmpL8 au niveau de la couche extractible de lipides de l'enveloppe mycobactérienne. Une TLC des lipides extractibles polaires révèle un profil lipidique différent entre les souches lisses sauvage et mutées par transposition (55F6) ou par KO ( $\Delta mmpL8_{MAB}$ ) parmi un chapelet de lipides, migrant à proximité des GPL. Une restauration partielle de ce phénotype est obtenue chez la souche sauvage. Chez les souches rugueuses, dépourvues de GPL, la différence est plus marquée (du fait de l'absence de GPL) et cela a permis l'isolement chez la souche sauvage d'un composé absent chez le mutant R $\Delta mmpL8_{MAB}$ , nommé Pa3. Malgré la faible abondance de cette fraction par rapport à l'extrait total, nous sommes parvenus à prédire la structure de Pa3 par des analyses de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire en collaboration avec Y. Guérardel (Université de Lille, unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, France). Il s'agit de composés lipidiques à base de glucose où le sucre est lié à un lipide diacétylé que nous avons nommé GDND (glycosyl diacylated nonadecyl diol). Le rôle potentiel de ces composés dans la physiologie de *M. abs-*

cessus et sa virulence ouvre la porte à de nouvelles perspectives d'études.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un article publié dans le journal Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS) (Dubois *et al.*, 2018b).

### Article 3

#### **MmpL8<sub>MAB</sub> controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family**

Violaine Dubois, Albertus Viljoen, Laura Laencina, Vincent Le Moigne, Audrey Bernut, Faustine Dubar, Mickaël Blaise, Jean-Louis Gaillard, Yann Guérardel, Laurent Kremer, Jean-Louis Herrmann, Fabienne Girard-Misguich





# MmpL8<sub>MAB</sub> controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family

Violaine Dubois<sup>a</sup>, Albertus Viljoen<sup>b,1</sup>, Laura Laencina<sup>a,1</sup>, Vincent Le Moigne<sup>a</sup>, Audrey Bernut<sup>b,2</sup>, Faustine Dubar<sup>c</sup>, Mickaël Blaise<sup>b</sup>, Jean-Louis Gaillard<sup>a,d</sup>, Yann Guérardel<sup>c</sup>, Laurent Kremer<sup>b,e</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>a,d,3</sup>, and Fabienne Girard-Misguich<sup>a,3</sup>

<sup>a</sup>Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, INSERM UMR1173, 78000 Versailles, France; <sup>b</sup>CNRS UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, Université de Montpellier, 34293 Montpellier, France; <sup>c</sup>Université de Lille, CNRS UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France; <sup>d</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupement Hospitalier Universitaire Paris Ile de France Ouest, Hôpital Raymond Poincaré, Hôpital Ambroise Paré, 92380 Garches, Boulogne Billancourt, France; and <sup>e</sup>INSERM, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France

Edited by D. Branch Moody, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, and accepted by Editorial Board Member Carl F. Nathan September 7, 2018 (received for review July 31, 2018)

*Mycobacterium abscessus* is a peculiar rapid-growing *Mycobacterium* (RGM) capable of surviving within eukaryotic cells thanks to an arsenal of virulence genes also found in slow-growing mycobacteria (SGM), such as *Mycobacterium tuberculosis*. A screen based on the intracellular survival in amoebae and macrophages (MΦ) of an *M. abscessus* transposon mutant library revealed the important role of MAB\_0855, a yet uncharacterized Mycobacterial membrane protein Large (Mmpl). Large-scale comparisons with SGM and RGM genomes uncovered Mmpl12 proteins as putative orthologs of MAB\_0855 and a locus-scale synteny between the MAB\_0855 and *Mycobacterium chelonae* *mmpL8* loci. A KO mutant of the MAB\_0855 gene, designated herein as *mmpL8<sub>MAB</sub>*, had impaired adhesion to MΦ and displayed a decreased intracellular viability. Despite retaining the ability to block phagosomal acidification, like the WT strain, the *mmpL8<sub>MAB</sub>* mutant was delayed in damaging the phagosomal membrane and in making contact with the cytosol. Virulence attenuation of the mutant was confirmed *in vivo* by impaired zebrafish killing and a diminished propensity to induce granuloma formation. The previously shown role of Mmpl in lipid transport prompted us to investigate the potential lipid substrates of Mmpl8<sub>MAB</sub>. Systematic lipid analysis revealed that Mmpl8<sub>MAB</sub> was required for the proper expression of a glycolipid entity, a glycosyl diacylated nonadecyl diol (GDND) alcohol comprising different combinations of oleic and stearic acids. This study shows the importance of Mmpl8<sub>MAB</sub> in modifying interactions between the bacteria and phagocytic cells and in the production of a previously unknown glycolipid family.

MMP12 | *Mycobacterium abscessus* | glycolipid | GDND

One major feature of pathogenic mycobacteria is their ability to survive in phagocytic cells (1, 2), a property that is shared with the rapidly growing *Mycobacterium abscessus* (3, 4). The unique and lipid-rich mycobacterial cell envelope is largely responsible for the interactions with host immune cells, enabling the bacilli to resist the harsh conditions and bactericidal processes encountered within the macrophage (MΦ), such as phagosome maturation, nitrosative and oxidative stress, and nutrient deprivation (1, 2, 5–7). A large set of proteins participates in the biogenesis and transport of a wide diversity of cell wall-associated (glycol-)lipids (8–10). Impaired synthesis and/or transport of some of these lipids render pathogenic mycobacteria more susceptible to the host immune defenses (11–14). *Mycobacterium tuberculosis* mutants that fail to synthesize or transport the cell wall-associated phthiocerol dimycocerosates (PDIMs) show limited growth in the lungs of infected mice (11). The structurally related phenolic glycolipids (PGLs), which are unique to a few pathogenic species, are also required for optimal virulence in zebrafish of *Mycobacterium marinum*,

a close pathogenic relative to *M. tuberculosis* (12, 15). Immune evasion by *M. tuberculosis* and *M. marinum* also seems to be mediated by PDIM, very likely through masking the underlying pathogen-associated molecular patterns, and by PGL through the involvement of a chemokine receptor 2-mediated pathway with preferential recruitment and infection of permissive MΦ while evading microbicidal ones (13).

In nontuberculous mycobacteria (NTM) such as *Mycobacterium avium*, a slow-growing *Mycobacterium* (SGM), or *M. abscessus*, a rapid-growing *Mycobacterium* (RGM), glycopeptidolipids (GPLs) play an important role in NTM physiology and behavior toward eukaryotic hosts (4, 16). A transition from a smooth (S) to a rough (R) morphotype in NTM is associated with GPL loss (17–19) that results in an exacerbated virulence phenotype in various cellular and animal models (20–23). Isolation of the R variant is often

## Significance

One major defense mechanism of mycobacteria relies mainly on the synthesis and transport of specialized lipids, processes that reside in the cell wall. Among the transporters, Mycobacterial membrane protein Large (Mmpl) plays an essential role. We describe the role of Mmpl8 (Mmpl8<sub>MAB</sub>) in the survival of *Mycobacterium abscessus* within eukaryotic hosts. We show that its absence slows the contact between *M. abscessus* and the host cell cytosol, an essential element in its resistance to the cell bactericidal mechanisms. The absence of Mmpl8<sub>MAB</sub> leads to reduced production of a previously unknown glycolipid: a glycosyl diacylated nonadecyl diol (GDND). The glycolipid seems unique to the *Mycobacterium chelonae* complex, supporting the view that GDND might represent a typical signature of *M. abscessus* infection.

Author contributions: J.-L.G., Y.G., L.K., J.-L.H., and F.G.-M. designed research; V.D., A.V., L.L., V.L.M., A.B., F.D., and Y.G. performed research; M.B. contributed new reagents/analytic tools; V.D., A.V., A.B., F.D., Y.G., L.K., J.-L.H., and F.G.-M. analyzed data; and V.D., A.V., Y.G., L.K., J.-L.H., and F.G.-M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. D.B.M. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Published under the PNAS license.

<sup>1</sup>A.V. and L.L. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Present address: Bateson Centre, Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield, S10 2RX Sheffield, United Kingdom.

<sup>3</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: jean-louis.herrmann@aphp.fr or fabienne.misguich@uvsq.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1812984115/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1812984115/-DCSupplemental).



associated with chronic and more severe disease in patients with reduced pulmonary functions (4, 24–26). This is exemplified in the case of *M. abscessus*, where the transition to an R morphotype is sufficient to confer a highly virulent phenotype in zebrafish or mice (27, 28).

However, we recently showed, by looking at the differential intracellular behavior of both S and R *M. abscessus* variants, that GPLs confer a clear intracellular survival advantage to the S variant compared with the R variant, including resistance to several cellular antibacterial mechanisms, such as blockage of phagosomal acidification, and resistance to apoptosis and autophagy (4, 7). Complementary to our study, GPLs were shown to inhibit apoptosis in *M. abscessus*-infected M $\Phi$  by interacting with the mitochondrial cyclophilin D (29).

These results further highlight how mycobacterial lipids fine tune M $\Phi$ -*M. abscessus* interactions to modulate the host immune response. However, GPLs are common to all NTM, SGM, and RGM, and *M. abscessus* belongs to the RGM group that comprises mainly saprophytic species. However, unique lipids possibly involved in the peculiar pathogenicity of *M. abscessus* remain to be identified.

To act as critical players in mycobacterial pathogenesis, these complex lipids, usually synthesized within the cytoplasm, need to be translocated through the cell envelope and exposed to the bacterial surface, a process that can require a wide repertoire of lipid-specific transporters. Gap, a transmembrane protein participating in the transport of GPL through the plasma membrane, was originally identified in *Mycobacterium smegmatis* (18). The last decade has seen a mounting focus on the Mycobacterial membrane protein Large (MmpL) permeases, which are a subclass of the Resistance-Nodulation-cell-Division proteins containing 12 transmembrane domains (TMDs) and are known to translocate lipids through the plasma membrane (30–32). Complex lipids thought to be transported by MmpL proteins include PDIM (MmpL7), sulfolipid (MmpL8), diacyltrehaloses (DATs) and polyacyltrehaloses (MmpL10), monomeromycolyl diacylglycerol (MmpL11), and trehalose monomycolate (MmpL3), all of which have been implicated in *M. tuberculosis* virulence (31, 32). Additionally, the essential MmpL3 transporter represents a promising pharmacological target in *M. tuberculosis* and *M. abscessus* (33–35). In *M. abscessus*, we and others unraveled the specific role of MmpL4a and MmpL4b in GPL transport by analyzing the S to R transition in the three subspecies of the *M. abscessus* complex (17, 22, 36). These MmpLs represent the only MmpL actors described so far in *M. abscessus* virulence, despite the greater abundance of MmpLs in the *M. abscessus* complex (4). Another group of lipids, the trehalose-based polyphosphates, present in many NTM (37) has recently been proposed to contribute to the highly aggregative phenotype of *M. abscessus* R (38), but a direct role in *M. abscessus* virulence remains to be shown.

In continuation of our previous efforts to decipher the mechanisms of pathogenicity of *M. abscessus*, we recently performed a phenotypic screen of a transposon (*Tn*) mutant library generated in *M. abscessus* subspecies (subsp.) *massiliense* in amoebae and M $\Phi$ . This led to the discovery of the role of the ESX-4 type VII secretion system (T7SS) in intracellular survival of *M. abscessus* (39). This genetic screen also disclosed the *MAB\_0855* gene, encoding a yet uncharacterized MmpL. Herein; we aimed at characterizing this MmpL, designated MmpL8<sub>MAB</sub>, as well as its putative lipid substrate. We show the crucial role of MmpL8<sub>MAB</sub> in intracellular survival and virulence of *M. abscessus* in various cellular and animal models. We also present a structural description of a glycolipid family produced at reduced levels in the absence of MmpL8<sub>MAB</sub>, thereby opening the way to promising future translational applications.

## Results

### Identification of an *mmpL* Gene Crucial for Intracellular Survival of *M. abscessus*. A *Tn* mutant library constructed in the *M. abscessus*

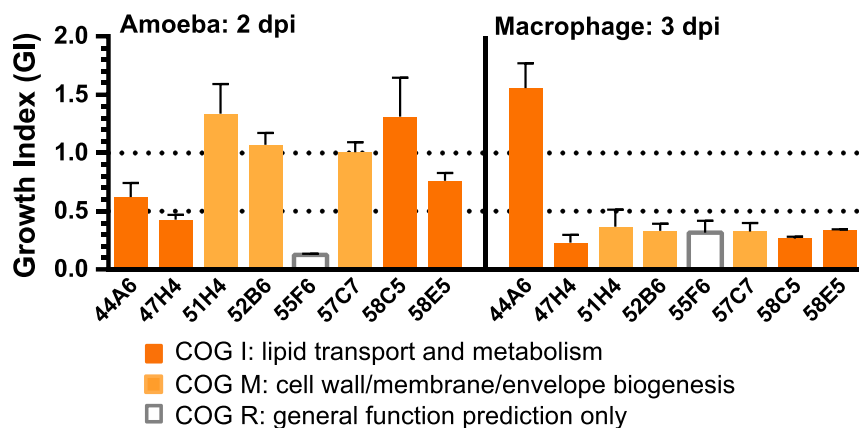
subsp. *massiliense* 43S clinical isolate was originally screened for survival in *Acanthamoeba castellanii* amoebae and in J774.2 murine M $\Phi$  (39); 7 of 47 mutants that exhibited a Growth Index (GI) below 0.5 in M $\Phi$  compared with the WT strain carried a single *Tn* insertion in genes involved in cell wall/membrane/envelope assembly and/or lipid transport and metabolism as determined by cluster of orthologous groups (COG) analysis (COG M and I, respectively) (Fig. 1 and Table 1). Interestingly, one mutant (55F6) was highly attenuated in both amoeba and M $\Phi$  (GIs of 0.13 and 0.31, respectively) and was linked to only a general function (COG R) (Fig. 1). By sequencing the *Tn* insertion site, we identified the *Tn*-disrupted gene as *MYCMA\_0439* (SI Appendix, Table S1), identical to the *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC19977 *MAB\_0855* gene, which according to systematic annotation, encodes a putative MmpL protein. The 55F6 mutant's intracellular defect was further confirmed by survival kinetics performed in amoebae and M $\Phi$  by determining the cfu and the corresponding GIs (0.18 in amoebae and 0.22 in M $\Phi$ ) (SI Appendix, Fig. S1).

**MAB\_0855 Is Unique to the *Mycobacterium chelonae* Complex.** Primary sequence analysis and 3D homology modeling indicate that MAB\_0855 presents the typical features of MmpL transporters, possessing 12 helical TMDs as well as two extracytoplasmic loops between TMD1/2 and TMD7/8, which are potentially implicated in substrate binding (SI Appendix, Fig. S2).

Phylogenetic relationships among 31 MmpLs of *M. abscessus* and 13 MmpLs of *M. tuberculosis* allowed the identification of two *M. abscessus* MmpL-specific clades (light blue and red spots in Fig. 2A), supporting the hypothesis of MmpL diversification in *M. abscessus* (31). Tandem duplications occurred as illustrated by the *mmpL4* genes (*mmpL4a* and *mmpL4b*) (blue brackets in Fig. 2A). MAB\_0855 clustered with *M. tuberculosis* MmpL8 and MmpL12 and to a lesser extent, with *M. tuberculosis* MmpL10 and *M. abscessus* MAB\_0937c (dark blue spot in Fig. 2A). MAB\_0937c is orthologous to MmpL10 in both RGM and SGM (Fig. 2B). Neither phylogenetic reconstruction nor Bidirectional Best Hit (BBH) search found putative orthologs of MAB\_0855 in *M. tuberculosis* (Fig. 2A and B). However, an extensive mycobacterial BBH search identified MmpL12 proteins in *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gastri*, *M. smegmatis*, and *Mycobacterium mucogenicum* as putative orthologs to MAB\_0855 (Fig. 2B). It is worth noting that, in these mycobacterial species, MmpL12 was suggested to transport lipooligosaccharides (LOSs) (40), which are absent in *M. abscessus*. MAB\_0855 Best Hit (BH) scores were low (under 60) except in the *M. chelonae* complex (MCC; i.e., comprising the *M. abscessus* subspecies and *M. chelonae*) and in *Mycobacterium immunogenum*, for which the BH score was up to 96 (Fig. 2B). Finally, we failed to identify any syntenic conservation in other mycobacteria of the region spanning from *MAB\_0852* to *MAB\_0859*, with the exception of the *M. chelonae* *mmpL8* locus (Fig. 2C); therefore, MAB\_0855 was designated *mmpL8*<sub>MAB</sub>. Quite notably, several genes from *M. tuberculosis* were syntenic to the *M. abscessus* genome upstream of *MAB\_0852* and downstream of *MAB\_0859*, suggesting that a deletion may have occurred between these genes in *M. tuberculosis*, perhaps as a consequence of the genomic reduction that occurred in the tubercle bacillus (Fig. 2C).

Overall, the *mmpL8*<sub>MAB</sub> genomic environment revealed a potential role in lipid biogenesis/transport, with a putative lipase/esterase encoding gene (*lipP*) as well as two *fad* genes (*fadA* and *fadB*) located upstream of *mmpL8*<sub>MAB</sub> (Fig. 2C). A polyketide synthase (*pks*)-associated gene (*papA2*) as well as a putative polyketide cyclase gene (*MAB\_0859*), possibly participating in the biogenesis and assembly of a complex cell wall lipid (41), were also found in close proximity to *mmpL8*<sub>MAB</sub>.

**MmpL8<sub>MAB</sub> Plays a Critical Role in *M. abscessus* Intracellular Survival and Virulence.** To confirm the contribution of MmpL8<sub>MAB</sub> to *M. abscessus* virulence, deletion mutants were generated in both the



**Fig. 1.** Identification of a putative MmpL required for intracellular replication in both amoebae and M $\Phi$  from a *Tn* library screen. *Tn* mutants impaired in their intracellular survival compared with the WT strain GI in amoebae and M $\Phi$ . Amoebae (*A. castellanii*) and murine M $\Phi$  were infected at an MOI of 10 and lysed at different dpi (2 and 3 dpi, respectively) before cfu determination. The *Tn* insertion site was cloned to identify the disrupted genes. Identified genes were categorized with the COG classification. Mutants for which the *Tn* insertion occurred in a gene implicated in either lipid metabolism/transport or related processes (COG M and I, respectively) and 55F6 uncharacterized (COG R) mutant putatively implicated in lipid transport and metabolism are depicted.

S and R variants of the *M. abscessus* ATCC19977-type strain by allelic exchange of the *mmpL* $\delta_{MAB}$  ORF using the recombineering strategy (42, 43) that replaces genes targeted for deletion with a zeocin resistance cassette (*SI Appendix, Fig. S3*). The proper deletion of *mmpL* $\delta_{MAB}$  was subsequently confirmed through a combination of PCR and sequencing analyses (*SI Appendix, Fig. S3*). The corresponding mutant strains generated in the S or R background, hereafter referred to as  $S\Delta mmpL\delta_{MAB}$  or  $R\Delta mmpL\delta_{MAB}$ , were complemented by transformation with an integrative plasmid containing an intact copy of *mmpL* $\delta_{MAB}$ .

$S\Delta mmpL\delta_{MAB}$  exhibited a pronounced defect in intracellular survival in murine M $\Phi$  compared with the WT or  $S\Delta mmpL\delta_{MAB}$ -complemented strains, and this alteration was already significant at 1 day postinfection (dpi) (Fig. 3A). Functional complementation of the mutant with the *mmpL* $\delta_{MAB}$  gene ( $\Delta mmpL\delta::mmpL\delta_{MAB}$ ) fully restored the WT phenotype, whereas complementation with the *Mycobacterium massiliense* homolog *MYCMA\_0439* ( $\Delta mmpL\delta::0439_{MMAS}$ ) only partially restored the effect (Fig. 3A). These results indicate that the decreased viability of  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$  was not caused by a polar effect on the expression of the downstream genes. To get more insight into the biological functions of *mmpL* $\delta$ , we addressed whether the three “closest” homologs found in *M. tuberculosis* (i.e., *mmpL8*, *mmpL10*, and *mmpL12*) (Fig. 2A) may restore the intracellular defect of  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$ . As shown in Fig. 3B, a near-complete restoration of intracellular growth was obtained with the *mmpL* $\delta_{MTB}$  and *mmpL12* $_{MTB}$  genes but not with *mmpL10* $_{MTB}$ . The intracellular growth defect of  $R\Delta mmpL\delta_{MAB}$  was also fully restored on complementation with *mmpL* $\delta_{MAB}$  (Fig. 3C).

Overall, these results show that MmpL $\delta_{MAB}$  is required for the intracellular survival of both *M. abscessus* variants.

**$\Delta mmpL\delta_{MAB}$  Presents a Reduced Adhesion to M $\Phi$  and Is Impaired in Phagosome-Membrane Rupture.** The intracellular behavior of *M. abscessus* resembles the intracellular lifestyle of a slow-growing pathogenic species (4). In particular, scrutinizing the S and R forms in M $\Phi$  highlighted the importance of the outer cell wall

layer in defining important physiological and ultrastructural features of the phagosomal compartment/membrane. Disruption of the phagosomal membrane enables the escape of the S variant to establish cytosolic communications, thereby contributing to survival inside the host cells (4). In line with these earlier findings, we investigated the possible mechanism(s) by which MmpL8 may interact with M $\Phi$ .

The question of whether MmpL8 affects the adhesion of the bacilli to the M $\Phi$  surface was determined by measuring the adhesion capacity of  $S\Delta mmpL\delta_{MAB}$  to M $\Phi$  using flow cytometry. Cells with adherent bacteria formed a population that was well separated from the nonadherent bacteria together with cellular debris (Fig. 4A). A reproducible and significant twofold decrease in  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$  cell adhesion was observed compared with WT and complemented strains (Fig. 4A).

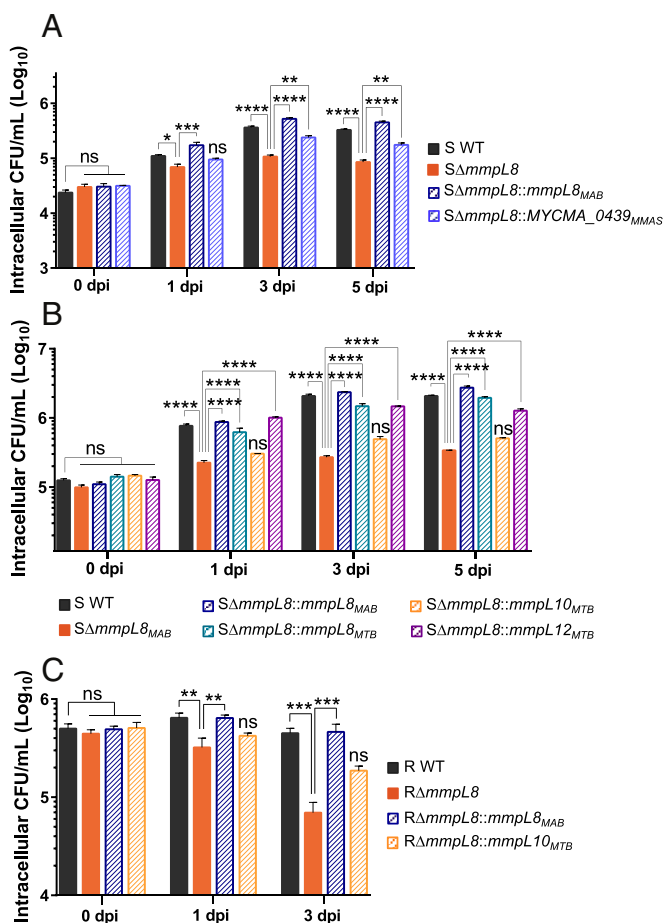
We next addressed whether a functional MmpL $\delta_{MAB}$  participates in the inhibition of phagosomal acidification, known as a crucial event for intra-M $\Phi$  survival of pathogenic mycobacteria (44). As shown in Fig. 4B, WT *M. abscessus*, but not the heat-killed strain, inhibited the intraphagosomal pH as reported previously (4).  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$  blocked phagosomal acidification in a manner similar to the WT and  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$ -complemented strains (Fig. 4B). This indicates that it is very unlikely that the reduced intracellular survival of  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$  is connected to a defect in phagosomal acidification and the subsequent maturation of the phagolysosome compartments.

To address the potential role of MmpL $\delta_{MAB}$  in phagosomal membrane damage that leads to cytosolic communications, we carried out an FRET-based assay recently adapted for *M. abscessus* that allowed us to assay phagosomal membrane disruption (4). At 20 h postinfection (hpi),  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$  was significantly reduced in its ability to damage the phagosomal membrane, and this persisted for longer time points (30 hpi) compared with the WT and  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$ -complemented strains (Fig. 4C). To further confirm the inability of  $\Delta mmpL\delta_{MAB}$  to establish contacts with the cytosol, we evaluated the production of IL-1 $\beta$  (Fig. 4D), documented as a biomarker of cytosolic *M. tuberculosis* (45–49). Consistently

**Table 1. Genes disrupted by *Tn* insertion in *M. massiliense* 43S; attenuated in M $\Phi$ ; and with a potential implication in cell wall assembly, lipid transport, and metabolism**

<i>Tn</i> mutants	<i>Tn</i> -disrupted gene and corresponding encoded protein	Corresponding gene and encoded protein in <i>M. abscessus</i>
44A6	<i>MYCMA_2469: fabG</i>	<i>MAB_4443</i> : probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase
47H4	<i>MYCMA_09125: modD</i>	<i>MAB_2436</i> : conserved hypothetical protein
51H4	<i>MYCMA_08185</i> : mammalian cell entry protein <i>mce</i>	None
52B6	<i>MYCMA_0991</i> : nitrate ABC transporter substrate-binding protein	<i>MAB_1915</i> : probable fatty acid-CoA ligase FadD
55F6	<i>MYCMA_0439</i> : membrane protein	<i>MAB_0855</i> : putative membrane protein, MmpL family
57C7	<i>MYCMA_2554</i> : acyl-CoA synthetase	<i>MAB_4626c</i> : probable fatty acid-CoA ligase FadD
58C5, 58E5	<i>MYCMA_0056</i> : oxydoreductase	<i>MAB_0090c</i> : probable oxydoreductase EphD





**Fig. 3.** Elucidation of the *mmpL8<sub>MAB</sub>* role in *M. abscessus* virulence. Intracellular growth was assessed by cfu counting throughout the infection. Murine M $\Phi$  were infected at 10 MOI with the *SΔmmpL8<sub>MAB</sub>* or with the complemented strain carrying the *MYCMA\_0439* or the *mmpL8<sub>MAB</sub>* gene (A), the *M. tuberculosis*-closest homologs to *M. abscessus mmpL8* (*mmpL8<sub>MTB</sub>*, *mmpL10<sub>MTB</sub>*, *mmpL12<sub>MTB</sub>*; B), or *mmpL10<sub>MTB</sub>* (C); cfu 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. ns, Non-significant. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001.

with the FRET data, *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>* was less potent at inducing IL-1 $\beta$  production by infected M $\Phi$  compared with WT and *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>*-complemented strains. This effect, already seen at 3 hpi, persisted for at least 30 hpi and was dependent on the caspase-1 pathway, as shown in *SI Appendix, Fig. S4A*, and based on the presence of the mature form of IL-1 $\beta$  (*SI Appendix, Fig. S4B*), it was not an artifact.

Taken collectively, these results indicate that the inactivation of *MmpL8<sub>MAB</sub>* reduces its interaction with M $\Phi$  as well as its ability to enter the cells; it also impairs the establishment of cytosolic connections. Whether these cellular phenotypes are translated into attenuation was next investigated using the recently developed zebrafish model of infection (28).

#### **MmpL8<sub>MAB</sub> Is Essential for Full Virulence of *M. abscessus* in Zebrafish.**

Since *M. abscessus* R induces a more robust and lethal infection in zebrafish compared with the S form (28, 50, 51), embryos were infected with WT, *RΔmmpL8<sub>MAB</sub>*, and complemented strains before the determination of the survival curves. While the R WT strain led to rapid larval death ( $\sim$ 80% killing at 13 dpi) as reported previously (28), *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>*, which has retained its propensity to

produce cords (*SI Appendix, Fig. S5*), was attenuated in its virulence ( $\sim$ 30% killing at 13 dpi) (Fig. 5A). Reintroduction of a functional copy of the gene into *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>* partially restored the virulent phenotype to the level of the WT strain, thus linking *MmpL8<sub>MAB</sub>* to *M. abscessus* virulence in zebrafish.

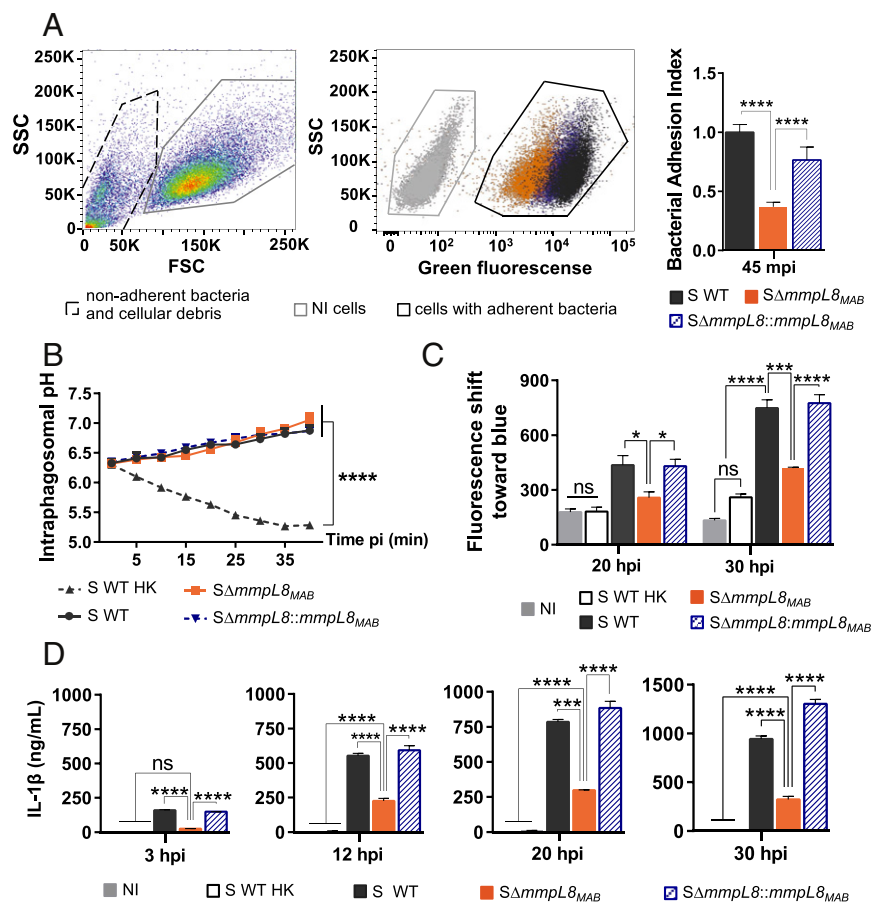
In addition to cording, a phenotypic trait conferring virulence to the R variant in zebrafish (51) is granuloma formation, which also represents a physiopathological sign of *M. abscessus* infection in embryos, although it has been reported to occur in both S and R variants (22, 28). We thus compared granuloma formation after infection with WT R and S variants and *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>* R and S mutants. A striking reduction in the number of embryos with granulomas (Fig. 5B, Left) as well as in the number of granulomas per embryo (Fig. 5B, Right) was observed in *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>*-infected embryos. Partial restoration of the WT phenotype (embryos with granulomas and number of granulomas per embryo) was observed with the *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>*-complemented strain (Fig. 5B). These diminished pathological signs were unrelated to the morphotype of the mutant. Granuloma production is usually associated with chronic rather than with acute infection. Therefore, this phenotypic characteristic is probably not incriminated in the increased survival of the embryos infected with the mutant. However, since granuloma formation is a consequence of cellular aggregation often linked to the surface properties of the mycobacterial cell wall and/or the release of granulomatogenic compounds, notably lipids (52), these results raise the question whether specific modifications on the outer layer of *M. abscessus* are connected to a specific lipid exported by *MmpL8<sub>MAB</sub>*.

#### **MmpL8<sub>MAB</sub> Is Required for Production of a Glycolipid.**

A systematic TLC-based approach for the whole range of apolar and polar lipids was implemented; 1D TLC enabled the separation of abundant glycolipids, such as GPL and trehalose dimycolate, and allowed the identification of a chaplet of lipids with amounts that seemed to be severely decreased in mutant 55F6 compared with its *M. massiliense* 43S parental strain (brackets) (Fig. 6A, lanes 1 and 2). The same chaplet of lipids, with expression level that was affected in 55F6, was also decreased in *SΔmmpL8<sub>MAB</sub>* mutants compared with their WT progenitors (Fig. 6A, lanes 3 and 4), and partial restoration of the phenotype was observed for the complemented S strain (Fig. 6A, lane 5). In particular, the abundance of one lipid assumed to be exported by *MmpL8<sub>MAB</sub>*, migrating close to the GPL, was markedly different between mutant and WT strains, which was especially apparent in the R background devoid of GPL (Fig. 6B, lanes 3 and 4). Restoration of the phenotype was also observed for the complemented strain (Fig. 6B, lane 5). Restoration of lipid production was further confirmed when *M. tuberculosis mmpL8* and -12, but not *M. marinum mmpL7*, were used to complement *ΔmmpL8<sub>MAB</sub>* (*SI Appendix, Fig. S6*).

#### **The MmpL8<sub>MAB</sub> Putative Substrate Is a Glucose-Containing Lipid.**

To get insights into the structure of the *MmpL8<sub>MAB</sub>* substrate, the lipid was first purified from the polar lipid fraction of *M. abscessus* as a homogenous lipid fraction, Pa3 (Fig. 6C and *SI Appendix, Fig. S7*). Monosaccharide and lipid composition analyses of the product showed the presence of glucose (*SI Appendix, Fig. S8*), hexadecanoic (C16), and octanoic acid (C18), which established the presence of a glucose-based glycolipid substituted by C18 and C16. MALDI-MS analysis of the Pa3 lipid fraction showed a complex pattern of signals with 28-amu increments dominated by signals at *m/z* 959, 987, and 1015 (Fig. 6D) tentatively attributed to [M + H]<sup>+</sup> ions of Glc<sub>1</sub>(C16)<sub>2</sub>, Glc<sub>1</sub>(C16)<sub>1</sub>(C18)<sub>1</sub>, and Hex<sub>1</sub>(C18)<sub>2</sub>, respectively, all substituted by a yet unknown lipid moiety. MS<sup>2</sup> fragmentation of parent ions at *m/z* 987 showed that one Glc residue, one C18, and one C16 could be independently cleaved from the parent ion. C16 and C18 could be further independently cleaved from the [M-Hex + H]<sup>+</sup> fragment ion as established by MS<sup>3</sup> fragmentation of the fragment ion at *m/z* 825. This shows that C16 and C18 do not



**Fig. 4.** MmpL8<sub>MAB</sub> plays a crucial role in *M. abscessus* interactions with cells by modulating *M. abscessus* entry and its survival inside the cells. (A) Adhesion to murine MΦ assessment by flow cytometry. MΦ were cooled down to avoid bacterial internalization and then infected with CFDA-SE-stained bacteria at an MOI of 100 for 1 h at 4 °C with gentle agitation to favor bacteria-to-cell contact. Nonadherent bacteria were well separated from intact cells (Left), and a substantial shift was observed for the cell population with adherent bacteria (Right; infected cells). The bacterial adhesion index is given that represents the mean fluorescence intensity (MFI) of each population with adherent bacteria reported to the MFI of the cells infected with the WT strain. FSC represents forward scatter and SSC represents side scatter. NI represents noninfected cells. (B) Phagosome acidification test. MΦ intraphagosomal pH after infection at an MOI of 10 was assessed by the mean FITC fluorescence measurement (485 nm) combined with mCherry fluorescence (565 nm) of double-stained bacteria. The pH along the infection is extrapolated from a pH standard curve. HK corresponds to heat killed bacteria. (C) Intracellular behavior in human THP-1. Cells were infected at an MOI of 10. The ability of bacteria to establish a contact with the cell cytosol was assessed by FRET at 20 and 30 hpi. (D) Kinetics of IL-1β production during THP-1 MΦ infection. The cellular response to infection with *M. abscessus* WT, ΔmmpL8<sub>MAB</sub>, and complemented strains was assessed by quantifying IL-1β secretion. Histograms with error bars represent means ± SD calculated using data from three independent experiments. Differences between means were analyzed by ANOVA and the Tukey posttest, allowing multiple comparisons to be performed. ns, Nonsignificant. \**P* < 0.05; \*\*\**P* < 0.001; \*\*\*\**P* < 0.0001.

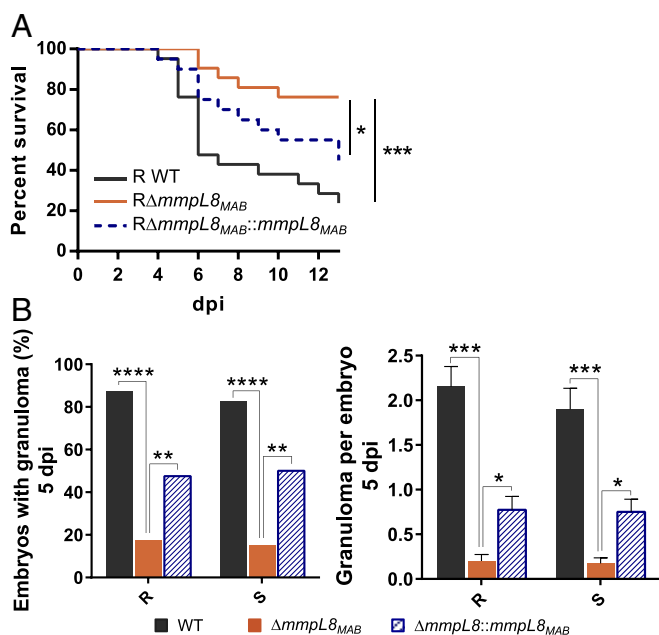
esterify the Glc residue. Finally, MS<sup>4</sup> fragmentation of the MS<sup>3</sup> fragment ion [M-Hex-C18 + H]<sup>+</sup> at *m/z* 541 generated a fragment ion at *m/z* 285 (Fig. 6D) that could be equally assigned to [M + H]<sup>+</sup> ions of octanoic acid CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>COOH or of nonadecyl alcohol CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>OH. NMR analysis of the carbohydrate moiety showed the presence of a heterogeneous H1/C1 signal at δ<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C 50.6–52.9/94.2 that correlates on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H total correlated spectroscopy (TOCSY) and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C heteronuclear single quantum coherence (HSQC)-TOCSY spectra with an H2/C2 to H6/C6 monosaccharide spin system assigned as α-Glcp in a terminal nonreducing position (Fig. 6E), which establishes that the major Glc residue is not esterified on any carbon. Accordingly, the absence of a β-anomeric signal further suggests that the C1 position of α-Glcp is involved in an *O* linkage. However, the low available quantity of compound precluded the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H nuclear overhauser effect (NOE) transfer from the anomeric proton or <sup>3</sup>J<sub>H,C</sub> connections by an <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) experiment, and thus, a final proof of the αGlcp-O-CH<sub>2</sub>-R linkage could not be provided.

As aforementioned, structural analysis by NMR data and MS<sup>n</sup> fragmentation patterns suggest that the lipid is composed of an alkyl α-glucopyranoside substituted by a C19 alkane chain diesterified by two fatty acid chains. The fragmentation pattern of the parent ion at *m/z* 987 established that it is substituted by one palmitic and one stearic acid (Fig. 6D), whereas the parent ion at *m/z* 959 is substituted by two palmitic acid chains (SI Appendix, Fig. S9). The exact position of esterification sites on the alkyl chain could not be directly established by NMR due to low quantities. Finally, the observation of three <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C signals with deshielded protons at δ 5.38/72.3, 5.18/69.4, and 5.061/68.51 (Fig. 6E) strongly suggests the presence of other forms of the lipid in which the Glc ring carbons are differentially acetylated. This would retrospectively explain the chemical shift heterogeneity of the anomeric signal of the αGlcp residue.

In summary, structural analyses established that the major lipid with production that is severely affected by MmpL8<sub>MAB</sub> deficiency consists of a heterogeneous family of Glc-containing lipids in which Glc is linked to a diacylated lipid. All of the data are consistent with the presence of a Glc alkylated with a C19 diol esterified by different combinations of palmitic and stearic acids (Fig. 6D), but they do not exclude the presence of additional related compounds with further acylation sites on the glucose residue.

## Discussion

NTM have recently emerged as important opportunistic pathogens responsible for severe lung diseases. Several studies have reported the predominance of *M. abscessus* among RGM in patients with cystic fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disease (53), underinhaled corticosteroid therapy, and bronchiectasis (21, 54–58). The deleterious impact of *M. abscessus* in the degradation of lung function in CF patients has also been well documented (26). To dissect important and specific mechanisms of pathogenesis and to identify virulence determinants, we recently screened a *Tn* mutant library in *A. castellanii* and uncovered genes essential for *M. abscessus* intracellular survival (39). This approach unraveled the crucial and unexpected role of the ESX-4 locus for intracellular survival and phagosomal escape (39). In continuation of these efforts, we present here the discovery and preliminary characterization of MYCMA\_0439 as an additional factor required for the intracellular survival of *M. abscessus* in both amoebae and MΦ. By focusing on its *M. abscessus* subsp. *abscessus* counterpart (MAB\_0855, mmpL8<sub>MAB</sub>), we confirmed the contribution of MmpL8<sub>MAB</sub> in *M. abscessus* virulence by first generating an mmpL8<sub>MAB</sub> deletion mutant (ΔmmpL8<sub>MAB</sub>) and subsequently showing for this mutant attenuation in intracellular survival, delayed cytosolic escape, and a



**Fig. 5.** The *mmpL8* gene plays a role in *M. abscessus* in vivo survival and virulence. (A) Survival curves of embryos. Embryos were injected into the bloodstream with 200 cfu of tdTomato-expressing *M. abscessus* R (parental strain), R $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> mutant, or the complemented strain R $\Delta$ mmpL8::mmpL8<sub>MAB</sub> ( $n = 20$ ). Data are representative of two independent experiments. (B) Kinetics of granuloma formation. Embryos were i.v. infected with 200 cfu of tdTomato-expressing *M. abscessus* R, *M. abscessus* S, R $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub>, S $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> mutants, S $\Delta$ mmpL8::mmpL8<sub>MAB</sub>, or R $\Delta$ mmpL8::mmpL8<sub>MAB</sub>. Granulomas were then counted at 5 dpi. Histograms represent means  $\pm$  SEM values calculated from two independent experiments. The statistical test used was the Fisher's exact test (Left), and means were analyzed by ANOVA and the Tukey posttest (Right). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

reduced capacity to provoke zebrafish killing. Direct implication of *MAB\_0855* (*mmpL8<sub>MAB</sub>*) in these impaired virulence phenotypes was confirmed by functionally complementing the mutant phenotypes.

MmpL contribution to mycobacterial virulence was first reported in *M. tuberculosis* by the screening of a *Tn* mutant library for in vivo survival deficiency (59). Genetic disruptions in *M. tuberculosis* *mmpL4*, -5, -7, -8, -10, and -11 were correlated with attenuation in mice (14). *M. tuberculosis* MmpL4 and MmpL5 were found to transport siderophores that were crucial to cope with iron starvation in a mouse model of infection (60). *M. tuberculosis* MmpL7, -8, -10, and -11 were shown to play a direct role in mycobacterial in vivo survival by shaping the cell wall (61–63).

We show here the reduced production of a previously undescribed glycolipid family, termed glycosyl diacylated nonadecyl diol (GDND), in the absence of MmpL8<sub>MAB</sub>. The cell wall composition and architecture modifications in the  $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> mutant, either due to the reduced GDND production and/or altered levels of other lipid species, may explain changes in the interactions between bacteria and M $\Phi$ , resulting in decreased intracellular survival and virulence. These cell wall alterations in the  $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> mutant might also underlie the lower number of granulomas formed in zebrafish independent of an S $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> or an R $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> infection as already observed with other deletion mutants in *M. abscessus* (33, 51).

A peculiar characteristic of *M. abscessus* is its very large number of MmpL proteins, the highest among 108 mycobacterial strains (31). This observation is particularly striking compared with the SGM MmpL number, with twice the number of MmpLs in the *M. abscessus* clade compared with *M. tuberculosis* complex

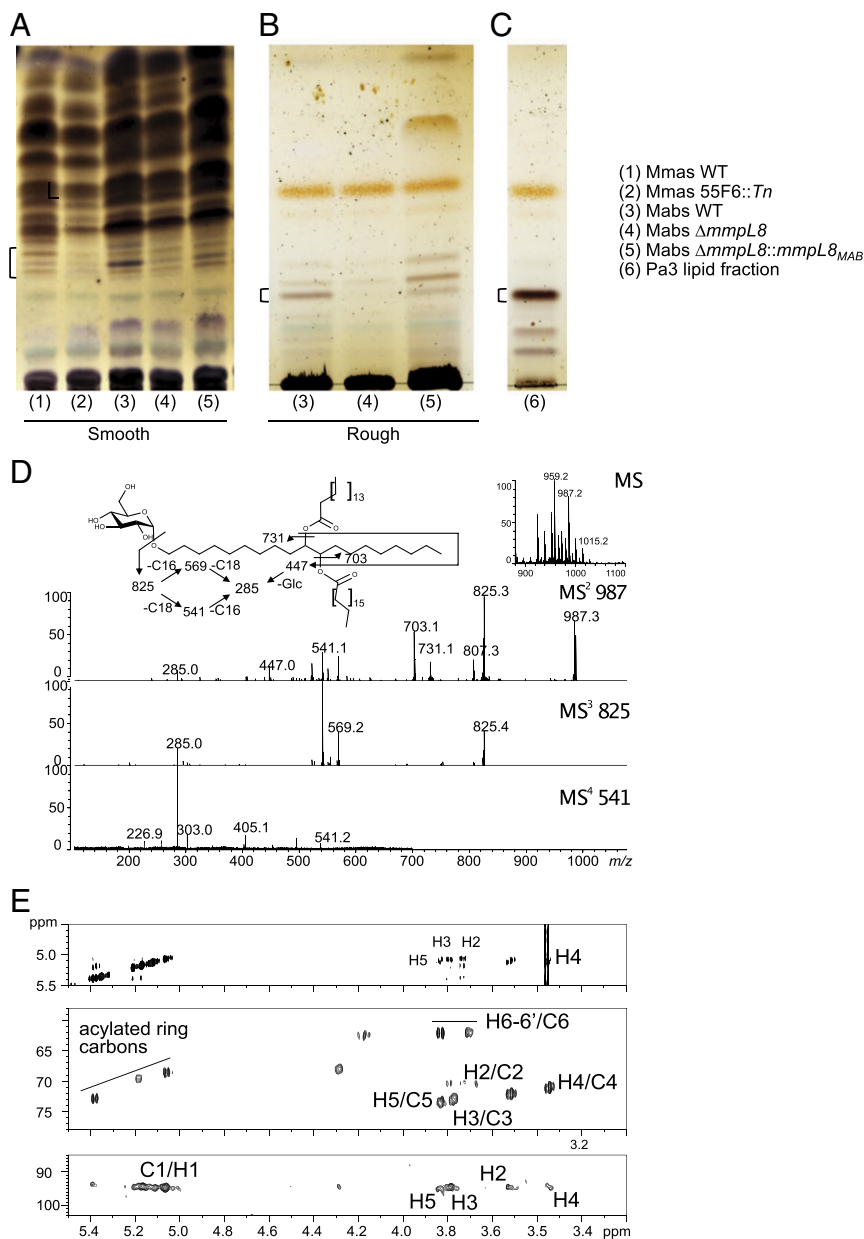
strains (31). Our phylogenetic studies corroborate these observations by individualizing two *M. abscessus* MmpL-specific clades (blue and red spots in Fig. 2A) and by highlighting tandem duplications (blue brackets in Fig. 2A).

Several MmpL members from *M. abscessus* clustered with *M. tuberculosis* MmpL proteins as exemplified for MmpL8<sub>MAB</sub> that clustered with *M. tuberculosis* MmpL8, -10, and -12, although the phylogenetic distance was the highest with MmpL10<sub>TB</sub>. *M. tuberculosis* MmpL10 is involved in the biosynthesis and transport of DATs (64). Its closest homologs in *M. smegmatis* and in *M. abscessus* (*MAB\_0937c*) were also reported to transport DATs but did not impact the intracellular persistence of *M. abscessus* (37). We confirm here that *M. tuberculosis* *mmpL10* fails to complement the intracellular phenotype of  $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub>. Only transcomplementation of  $\Delta$ mmpL8<sub>MAB</sub> with *M. tuberculosis* *mmpL8* and -12 restored the WT intracellular phenotype, and this correlated with restoration of GDND production. This complementation is intriguing with regard to the lipid substrate transported. MmpL12 of *M. smegmatis* is involved in the biosynthesis and/or transport of LOS (40), which is no longer functional in *M. tuberculosis* due to genomic reduction (65). Analysis of the syntenic conservation of the *M. abscessus* *mmpL8* locus indicated that it is not conserved in *M. smegmatis* but dispersed across its genome (Fig. 2C). In *M. smegmatis*, LOSs are presumably transported by MmpL12 (40). However, most of the LOS locus from *M. smegmatis* (*MSMEG\_4731-MSMEG\_4740*) is not conserved in *M. abscessus* that does not produce LOS. MmpL8 of *M. tuberculosis* is involved in the biosynthesis and/or transport of sulfolipid SL-1 (62), a lipid that is also not present in *M. abscessus*. The restoration of lipid export was not fully in agreement with the intracellular phenotypic behavior for all complemented strains. Considering that the M $\Phi$  or amoeba assays are stringent phenotypic assays, this difference reveals subtle substrate differences that might correlate more to the described genetic distances. This point might be solved by purifying each lipid substrate as done for GDND to unravel these differences. In addition, MmpL8<sub>MAB</sub> and functional equivalent, *M. tuberculosis* MmpL8 and -12, might fulfill another role in addition to transport; they might be involved in the maturation of the exported lipid, a function already reported for *M. tuberculosis* MmpL8 (62).

Of additional interest and to highlight scarcity of homologs of *MAB\_0855*, we could not find syntenic conservation of the *mmpL8<sub>MAB</sub>* region in any other *Mycobacterium*, with the exception of *M. chelonae*, hence providing a unique signature characteristic of the MCC complex. When considering the genes surrounding the locus, synteny was observed only in *M. tuberculosis*, suggesting that the *mmpL8<sub>MAB</sub>* locus was lost in *M. tuberculosis* as part of the genomic reduction that occurred in the tubercle bacillus.

In the *M. tuberculosis* genome, clusters harboring *pks* genes have been implicated in lipid biosynthesis and assembly (41). Most of these clusters also contain an MmpL-encoding gene that participates in the biosynthesis/export of lipids. In *M. abscessus*, the abundance of MmpL is not associated with a concomitant increase in *pks* genes, suggesting additional roles for MmpL, such as in detoxification or drug efflux mechanisms as reported for *M. tuberculosis* MmpL5 (66) rather than contributing to cell wall elaboration.

From a structural perspective, GDND differs from PDIM by the presence of standard fatty acids (a C19 diol core replacing the phthiocerol and C16/C18 replacing the polymethylated mycocerosic acids) and by the presence of a Glc residue linked to the C19 diol. PDIM represents one of the most important cell wall-associated lipids involved in *M. tuberculosis* virulence (67). Transported by MmpL7<sub>MTB</sub>, it contributes to *M. tuberculosis* escape from the phagosome independent of the pore-forming activity of the ESX-1-secreted substrate EsxA (68). Likewise, PDIM acts in concert with the ESX-1 T7SS (69) to promote phagosomal escape. Notably, our original screen identified the ESX-4 locus as a major contributor to *M. abscessus* virulence in amoebae and M $\Phi$ . A deletion mutant of *eccB<sub>4</sub>*, which encodes a



**Fig. 6.** Production of a polar lipid is altered by deletion of *mmpL8<sub>MAB</sub>*. (A and B) TLC showing a diminished amount of a set of polar lipids in strains lacking *mmpL8<sub>MAB</sub>*. Polar lipids extracted from freeze-dried bacteria (A, S strain; B, R strain) were separated by TLC using chloroform:methanol:water [90:10:1 (vol/vol/vol)] as the solvent system. TLCs were subsequently stained with orcinol [0.1% (wt/vol) in a 20% (vol/vol) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution] and charred. The presence of a particular lipid (the lipid with structure that was determined in this study; indicated with brackets) is decreased in the S *Tn MYCMA\_0439* mutant and KO  $\Delta mmpL8_{MAB}$  mutant, which is particularly evident in the *M. abscessus* R background lacking GPL. (C) TLC of lipids (named Pa3 lipid fraction) from the polar lipid fraction of the R *M. abscessus* strain. The presence of the particular lipid is again indicated with the bracket. (D) MALDI-MS and MS<sup>n</sup> analyses of purified lipids by successive fragmentations of relevant fragment ions. (Row 1) MALDI-MS spectrum of purified lipid. (Row 2) MS<sup>2</sup> fragmentation spectrum of the parent ion at *m/z* 987. (Row 3) MS<sup>3</sup> fragmentation spectrum of the fragment ion [M-Hex + H]<sup>+</sup> at *m/z* 825. (Row 4) MS<sup>4</sup> fragmentation spectrum of the fragment ion [M-Hex-C18 + H]<sup>+</sup> at *m/z* 541. On top of the MALDI-MS spectra, the structure of a major component at *m/z* 987 based on MS<sup>n</sup>, GC-MS, and NMR data is shown. (E) Multidimensional NMR spectroscopy analysis of the purified lipid. (Top) <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H TOCSY, (Middle) <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC, and (Bottom) <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC-TOCSY NMR spectra showing the spin system of the glycan moiety of the purified lipid.

core structural element of ESX-4, acidified phagosomes and showed reduced signs of phagosome-to-cytosol contacts (39). By analogy with the PDIM/ESX-1 machinery found in *M. tuberculosis*, one may hypothesize that a similar mechanism involving the GDND/ESX-4 system might be used by *M. abscessus* to escape the phagosomal compartment. However, future studies will be required to test this attractive hypothesis.

In conclusion, our study highlights the major role played by *MmpL8<sub>MAB</sub>* in controlling *M. abscessus* virulence and production of a family of glycolipids that seems unique to the MCC. As such, this could be considered as the basis of diagnostic markers for pulmonary infections caused by *M. abscessus*.

## Materials and Methods

**Strains, Cells, and Culture Conditions.** Mycobacterial strains were grown aerobically at 37 °C in Middlebrook 7H9 and on 7H11 (Sigma-Aldrich) medium supplemented with 0.2% glycerol and 1% glucose. When necessary, kanamycin, hygromycin (Thermo Fisher Scientific), and zeocin (Thermo Fisher Scientific) were added in the growth medium at 250, 1,000, and 100 μg/mL respectively.

Murine J774.2 (Sigma-Aldrich) MΦ were grown at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS (FBS; Thermo Fisher Scientific), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 IU/mL; Thermo Fisher Scientific).

The human promonocytic cell line, THP-1, was maintained in RPMI 1640 glutamax (Thermo Fisher Scientific) and 10% heat-inactivated FBS at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. For differentiation into monocytes, 10<sup>6</sup> THP-1 cells were seeded into 12-well plates and activated with 20 ng/mL of Phorbol Myristate Acetate (Sigma-Aldrich) for 72 h.

*A. castellanii* (ATCC30010) was grown in PYG Broth (70) for amplification.

**Tn Mutant Selection and Identification of the Tn Insertion.** Selection of *Tn* mutants defective for growth in amoebae and MΦ and identification of the *Tn* insertion site were performed as described previously (39). The *Tn* insertion site was identified by nucleotide BLAST comparison against the *Tn* sequence and the *M. massiliense* GO 06 genome hosted by the National Center for Biotechnology Information (NCBI). To confirm the BLAST results, the disrupted region was amplified by PCR using purified genomic DNA obtained from the mutant and a primer that hybridizes within the disrupted gene downstream of the *Tn* insertion site (SI Appendix, Table S1).

**MAB\_0855 Gene (*mmpL8<sub>MAB</sub>*) and Locus Description.** A motif analysis was performed with InterProScan (71) to confirm that *MAB\_0855* belongs to the *mmpL* family, and all proteins encoded by genes from *MAB\_0845* to *MAB\_0864* were also submitted to InterProScan (71) to check their annotation and to further predict the functions of their corresponding proteins when no functional annotation was provided. *M. abscessus* and *M. tuberculosis* *mmpL* phylogeny was inferred by Maximum Likelihood using the PHYML software and the approximate likelihood-ratio test (aLRT) statistic. *MAB\_0855* and *MAB\_0937c* phylogenetic comparison with other mycobacteria was performed by searching putative orthologs with the OpScan program with the “-H” and “-O” options, enabling the identification of a BBH ([www.abi.snv.jussieu.fr/public/opscan/](http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/opscan/)). A list of BHs was obtained by replacing the “-H” option with the “-S” option. BHs displayed a score higher than 40. Conservation of the locus spanning from *MAB\_0845* to *MAB\_0864* was assessed by a BBH search in the species closest to *M. abscessus*: *M. chelonae* and *M. immunogenum*. Comparisons with saprophytic (*M. smegmatis*), opportunistic (*M. avium*), and strictly pathogenic (*M. tuberculosis*) species were also performed. The loci were drawn with the genoPlotR package (72).

**Construction of the *mmpL8<sub>MAB</sub>* KO and Relative Complemented Mutants in the *M. abscessus* Subsp. *abscessus* Type Strain.** A KO was performed in the *M. abscessus* subsp. *abscessus* S and R ATCC19977 strains using the recombineering approach (36, 39, 42, 73, 74). Complementation was performed by electrotransforming the mutant strains with the integrative vectors pMVH361::*mmpL8<sub>MAB</sub>* and pMVH361::MYCMA\_0439. Complementation studies with the closest homologous *M. tuberculosis* genes to *M. abscessus mmpL8* [*Rv1183* (*MmpL10<sub>MTB</sub>*), *Rv1522c* (*MmpL12<sub>MTB</sub>*), and *Rv3823c* (*MmpL8<sub>MTB</sub>*)] were performed in a similar fashion. Complementation study with the *M. marinum mmpL7<sub>MAR</sub>* (*MMAR\_1764*) gene was also performed in a similar fashion but using the plasmid pMV306.

**Lipid Analyses.** For exploratory systematic lipid analysis, bacteria were cultured in 100 mL LB medium without shaking for 2 wk to obtain mature pellicles. These bacteria were collected by centrifugation, autoclaved, and washed twice with PBS before they were lyophilized. Apolar and polar lipid fractions were extracted from exactly 50 mg of freeze-dried material (R ATCC19977 WT strain) and subsequently analyzed by thin-layer liquid chromatography as previously described (75). For lipid purifications, exponentially growing bacteria (S and R ATCC19977 WT,  $\Delta$ *mmpL8*, and complemented strains) were plated on 7H10<sup>OADC</sup> agar plates (100  $\mu$ L per plate) and incubated for 1 wk at 37 °C until a dense lawn of bacterial growth was obtained. Subsequently, bacteria were collected using an inoculation loop, 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 then obtained, and polar lipids were fractionated by two rounds of liquid flash chromatography on a silica gel column (80 g, 50 mm) using a chloroform:MeOH gradient (100:0–40:60). The lipid of interest was finally purified by preparative TLC in chloroform:methanol [9:1 (vol/vol)]. Monosaccharide composition was established by GC-flame ionization detector (FID) and GC-MS analyses of trimethylsilylated methylglycosides according to Kamerling et al. (76) using mesoinositol and scylloinositol as internal standards. Fatty acids were released by methyl esterification with 0.5 M HCl in anhydrous methanol at 80 °C for 20 h, extracted with heptane, and identified by GC-MS as fatty acid methyl esters. Intact glycolipids were sequenced by MS<sup>n</sup> using an Axima Resonance MALDI quadrupole ion trap TOF instrument (Shimadzu). The sample was dissolved in chloroform:methanol [9:1 (vol/vol)] and mixed with 1 vol of a solution of 10 mg 2,5-dihydroxybenzoic acid in 1 mL chloroform:methanol [2:1 (vol/vol)] before spotting on an MALDI plate. The instrument was operated in positive ion and reflectron mode. Fragment ions were analyzed by collision-induced dissociation of the precursor ions, and argon was used as a collision gas. Before NMR spectroscopic analyses, the sample was repeatedly exchanged in CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD [2:1 (vol/vol); 99.97% purity; Eurisotop-Saclay] with intermediate drying and then dissolved in CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD [2:1 (vol/vol)].

Solution-state NMR experiments were recorded at 300 K on a Bruker Avance 900 spectrometer equipped with a 3-mm triple-resonance cryoprobe using Bruker standard pulse programs.

**Infection, Adhesion, and Phagosomal Escape Assays.** M $\Phi$  infection experiments with the WT,  $\Delta$ *mmpL8*, and complemented strains were performed as described (4, 42).

Adhesion experiments to murine M $\Phi$  were performed by flow cytometry based on the method described by Hytönen et al. (77). Before infection, log-phase bacteria were stained with CFDA-SE 50  $\mu$ M (Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific) 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 $\Phi$  were washed twice with DMEM, scraped, and resuspended in DMEM. The cells were incubated at 4 °C for 30 min with gentle agitation before the infection; 50,000 cells were infected with the bacterial strains at a high multiplicity of infection (MOI) of 100 to favor bacteria-to-cell contacts and then incubated 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 $\Phi$  and labeled bacteria. The fluorescence intensity of the cells with adherent bacteria was measured with BD Fortessa equipment (Becton Dickinson Biosciences). The data obtained from the flow cytometer were analyzed using BD FACSDIVA software and the FlowJo software.

Phagosome acidification and phagosomal escape FRET assays were conducted in THP-1 cells as previously described (78).

**Cytokine Assays.** IL-1 $\beta$  secretion was measured as previously described (79).

The FAM-FLICA caspase-1 Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies) was used to evaluate the presence of catalytically active forms of caspase-1 p10 and p12. THP-1 cells were infected at an MOI of 10 for 3 h. As a positive control of apoptosis induction, cells were incubated with 500 nM LPS for 8 h at 37 °C. The adherent cells were gently dissociated with TrypLE Express reagent (Gibco; Thermo Fisher Scientific) as recommended. Cells were washed twice and resuspended in RPMI medium with 10% FBS before staining with 30 $\times$ XFam-Vad-Fmk for 30 min at 37 °C. To gate specifically on differentiated intact cells, the cells were also stained with the CD11b antibody (78) before treatment with 5% paraformaldehyde (PFA). Fixed cells were then analyzed by flow cytometry. The results are expressed as the percentage of cells harboring the caspase-1 p10 and p12 active forms.

**Zebrafish Infections.** All zebrafish protocols adhered to the guidelines specified by the Direction Sanitaire et Vétérinaire de l'Hérault et Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale de la région Languedoc Roussillon under the reference CEEA-LR-1145. All efforts were made to minimize pain and discomfort according to European animal welfare regulations and standard protocols. Infection experiments were done using tdTomato-expressing *M. abscessus* strains and performed as described previously (28). Mortality was determined by recording the number of dead embryos daily. To evaluate granuloma formation, embryos at 5 dpi were embedded in 1% low melting point agarose and transferred to a Zeiss microscope with a Zeiss Plan NeoFluar Z 1 $\times$ 0.25 objective for monitoring.

**Culture for Cording.** In total, 4 million cfu of mycobacteria were cultured in 1 mL of 7H9 supplemented with 1% glucose in a 24-well plate at 37 °C without agitation until visualization of a bacterial film on the surface of the medium. The plates were sealed with parafilm to avoid evaporation. The formation of cords was checked by observation with an optical microscope (*SI Appendix, Fig. S5*).

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank B. Maury for cytometry settings. V.D. was supported by French Cystic Fibrosis Patients Association Vaincre la Mucoviscidose Grant RF20150501377. This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale Grant DEQ20150331719 (to L.K.) and Agence Nationale de la Recherche Grant MyCat ANR-15-CE18-0007-01 (to Y.G. and L.K.).

- Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR, Jr (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* 5:717–727.
- Makinoshima H, Glickman MS (2005) Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* 436:406–409.
- Brambilla C, et al. (2016) Mycobacteria clumping increase their capacity to damage macrophages. *Front Microbiol* 7:1562.
- Roux A-L, et al. (2016) The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* 6:160185.
- Singh P, Rameshwaram NR, Ghosh S, Mukhopadhyay S (2018) Cell envelope lipids in the pathophysiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol* 13:689–710.
- Jackson M (2014) The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:a021105.
- Gutiérrez AV, Viljoen A, Ghigo E, Herrmann J-L, Kremer L (2018) Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* complex. *Front Microbiol* 9:1145.
- Cole ST, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544.
- Kaur D, Guerin ME, Skovierová H, Brennan PJ, Jackson M (2009) Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol* 69:23–78.
- Brennan PJ (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 83:91–97.



11. Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR, Jr (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402:79–83.
12. Yu J, et al. (2012) Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun* 80:1381–1389.
13. Cambier CJ, et al. (2014) *Mycobacteria* manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505:218–222.
14. Domenech P, Reed MB, Barry CE, 3rd (2005) Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect Immun* 73:3492–3501.
15. Alibaud L, et al. (2011) A *Mycobacterium marinum* TesA mutant defective for major cell wall-associated lipids is highly attenuated in *Dictyostelium discoideum* and zebrafish embryos. *Mol Microbiol* 80:919–934.
16. Belisle JT, Pascopella L, Inamine JM, Brennan PJ, Jacobs WR, Jr (1991) Isolation and expression of a gene cluster responsible for biosynthesis of the glycopeptidolipid antigens of *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol* 173:6991–6997.
17. 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.
18. Soudén B, et al. (2005) Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Mol Microbiol* 58:426–440.
19. Billman-Jacobe H (2004) Glycopeptidolipid synthesis in mycobacteria. *Curr Sci* 86: 111–114.
20. Byrd TF, Lyons CR (1999) Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* 67:4700–4707.
21. Catherinot E, et al. (2009) Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* 47:271–274.
22. Bernut A, et al. (2016) Insights into the smooth-to-rough transition in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* 99:866–883.
23. Bernut A, Herrmann J-L, Ordway D, Kremer L (2017) The diverse cellular and animal models to decipher the pathophysiological traits of *Mycobacterium abscessus* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 7:100.
24. Kreutzfeldt KM, et al. (2013) Molecular longitudinal tracking of *Mycobacterium abscessus* spp. during chronic infection of the human lung. *PLoS One* 8:e63237.
25. Jönsson BE, et al. (2007) Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 45:1497–1504.
26. 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.
27. Catherinot E, et al. (2007) Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* 75:1055–1058.
28. Bernut A, et al. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E943–E952.
29. Whang J, et al. (2017) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis* 8:e3012.
30. Brosch R, et al. (2000) Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 290:143–152.
31. Viljoen A, et al. (2017) The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: From regulation to antimicrobial developments. *Mol Microbiol* 104:889–904.
32. Chalut C (2016) MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 100:32–45.
33. Dupont C, et al. (2016) A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol* 101:515–529.
34. Kozikowski AP, et al. (2017) Targeting mycolic acid transport by Indole-2-carboxamides for the treatment of *Mycobacterium abscessus* infections. *J Med Chem* 60:5876–5888.
35. Viljoen A, et al. (2017) Controlling extra- and intramacrophagic *Mycobacterium abscessus* by targeting mycolic acid transport. *Front Cell Infect Microbiol* 7:388.
36. Medjahed H, Reyat J-M (2009) Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: Comparison of genetic tools. *Appl Environ Microbiol* 75:1331–1338.
37. Burbaud S, et al. (2016) Trehalose polyphleates are produced by a glycolipid biosynthetic pathway conserved across phylogenetically distant mycobacteria. *Cell Chem Biol* 23:278–289.
38. Llorens-Fons M, et al. (2017) Trehalose polyphleates, external cell wall lipids in *Mycobacterium abscessus*, are associated with the formation of clumps with cording morphology, which have been associated with virulence. *Front Microbiol* 8:1402.
39. Laencina L, et al. (2018) Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E1002–E1011.
40. Etienne G, et al. (2009) Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in mycobacteria. *J Bacteriol* 191:2613–2621.
41. Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD (1997) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 24:263–270.
42. 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.
43. Medjahed H, Singh AK (2010) Genetic manipulation of *Mycobacterium abscessus*. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 10:Unit 10D.2.
44. Pethe K, et al. (2004) Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13642–13647.
45. Queval CJ, Brosch R, Simeone R (2017) The macrophage: A disputed fortress in the battle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* 8:2284.
46. Collins AC, et al. (2015) Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune DNA sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe* 17:820–828.
47. Kupz A, et al. (2016) ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives non-cognate tuberculosis control in vivo. *J Clin Invest* 126:2109–2122.
48. 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.
49. Watson RO, et al. (2015) The cytosolic sensor cGAS detects *Mycobacterium tuberculosis* DNA to induce type I interferons and activate autophagy. *Cell Host Microbe* 17: 811–819.
50. Bernut A, et al. (2015) Deciphering and imaging pathogenesis and cording of *Mycobacterium abscessus* in zebrafish embryos. *J Vis Exp* 103:e53130.
51. Halloum I, et al. (2016) Deletion of a dehydratase important for intracellular growth and cording renders rough *Mycobacterium abscessus* avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E4228–E4237.
52. Indrigo J, Hunter RL, Jr, Actor JK (2003) Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* 149:2049–2059.
53. Andréjak C, et al. (2013) Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of non-tuberculous mycobacteriosis. *Thorax* 68:256–262.
54. Chu H, et al. (2014) Prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis: A meta-analysis. *Arch Med Sci* 10:661–668.
55. Olivier KN, et al.; Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group (2003) Nontuberculous mycobacteria. I. Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:828–834.
56. Floto RA, 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.
57. Chan ED, Iseman MD (2013) Underlying host risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 34:110–123.
58. Park IK, Olivier KN (2015) Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 36:217–224.
59. Lamichhane G, Tyagi S, Bishai WR (2005) Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lungs. *Infect Immun* 73:2533–2540.
60. Wells RM, et al. (2013) Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 9:e1003120.
61. Jain M, Cox JS (2005) Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1:e2.
62. Converse SE, et al. (2003) MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6121–6126.
63. Pacheco SA, Hsu F-F, Powers KM, Purdy GE (2013) MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* 288:24213–24222.
64. Belardinelli JM, et al. (2014) Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 289:27952–27965.
65. Boritsch EC, et al. (2016) pks5-recombination-mediated surface remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* emergence. *Nat Microbiol* 1:15019.
66. Briffotiaux J, Huang W, Wang X, Gicquel B (2017) Mmp55/MmpL5 as an efflux pump in *Mycobacterium species*. *Tuberculosis (Edinb)* 107:13–19.
67. Astarie-Dequeker C, et al. (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog* 5:e1000289.
68. Quigley J, et al. (2017) The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio* 8:e00148-17.
69. Augenstein 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* 19:e12726.
70. 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.
71. Quevillon E, et al. (2005) InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33:W116–W120.
72. Guy L, Kultima JR, Andersson SGE (2010) genoPlotR: Comparative gene and genome visualization in R. *Bioinformatics* 26:2334–2335.
73. Le Moigne V, et al. (2016) MgtC as a host-induced factor and vaccine candidate against *Mycobacterium abscessus* infection. *Infect Immun* 84:2895–2903.
74. van Kessel JC, Hatfull GF (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods* 4:147–152.
75. Besra GS (1998) Preparation of cell-wall fractions from *Mycobacteria*. *Mycobacteria Protocols*, eds Parish T, Stoker NG (Humana, Totowa, NJ), Vol 101, pp 91–108.
76. Kamerling JP, Gerwig GJ, Vliegthart JF, Clamp JR (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of permethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem J* 151:491–495.
77. Hytönen J, Haataja S, 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.
78. 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:e1004650.
79. Gröschel 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* 18:2752–2765.

**Table S1: Primers used in this study.**

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')
Transposon insertion site sequencing	AATTCAACGCGGTACGTAGC
Construction of <i>mmpL8<sub>MAB</sub></i> knockout left arm	F: CCGGAATTCGGTGCCGGTCAACGAGCGCA R: GGGGTACCCCTTCAGGGCCCCACGTAG
Construction of <i>mmpL8<sub>MAB</sub></i> knockout right arm	F: AACTGCAGAACCAATGCATTGGGGAGTGTGCCCGGAATGG R: CCCAAGCTTGGGAGCCCTCTACTGGCATGTGAA
Verification of the <i>mmpL8<sub>MAB</sub></i> deletion	(1) F: TCATCAGCCGATATCACGAA R: CAGATCATGAGGCGATTTGA (2) F: TGAGCAGACCTATCGCATTCT R: CACCAGGAAGGTATCCAGCAG (3) F: TGAGCAGACCTATCGCATTCT R: GGCCATAACACCCCTTGTATT
Construction of <i>ΔmmpL8<sub>MAB</sub>::mmpL8<sub>MAB</sub></i> strain	F: GAATTCAATTGGTGGCGGAGAACACAGGTGGCA R: CTCGAGTTAACTCATCGACGGCCTGCGAGCTC
Construction of <i>ΔmmpL8<sub>MAB</sub>::0439<sub>MMAS</sub></i> strain	F: GAATTCAATTGGTGGCGGAGAACACAGGTGGCA R: CTCGAGTTAACTCATCGACGGCCTGCGAGCTC
Construction of <i>ΔmmpL8<sub>MAB</sub>::mmpL8<sub>MTB</sub></i> strain	F: CCCAAGCTTGGGATGTGCGACGTCTTGATGCAGCCTGTC R: TTTGGTTACACGACGGGCTCAGGCTTTAGCCATCGATGG
Construction of <i>ΔmmpL8<sub>MAB</sub>::mmpL10<sub>MTB</sub></i> strain	F: ATAATATTCGAAATAAT GTGGTCGGCTGTTGGGTCGCGCTC R: AGCCGTGGCAGACGGATCAAAGCGGTAGATAGTTAACATA
Construction of <i>ΔmmpL8<sub>MAB</sub>::mmpL12<sub>MTB</sub></i> strain	F: CCCAAGCTTGGGGTGGCAAGGCATGACGAGGCCAAAGCC R: GCCCGACGCGAAGCTGAGCACCTGAATAGTTAACATA
Construction of <i>ΔmmpL8<sub>MAB</sub>::mmpL7<sub>MMAR</sub></i> strain	F: TGTCAACCGACGGTACCCAT R: CGTTAAGCTTCTAGTCGGGCTGGGCGA

**Figure S1. Survival kinetics of mutant 55F6 compared to the WT progenitor inside the cells (left panels) and corresponding Growth Index (GI) over time (right panels) in amoebae (upper panel) and macrophages (lower panel).** A black horizontal line indicates the mutant GI from the original genetic screen 2 and 3 dpi in amoebae and MΦ, respectively. Histograms with error bars represent means  $\pm$  SD calculated using data from three independent experiments. Differences between means were analysed by two-way ANOVA and the Tukey post-test allowing multiple comparisons to be performed.

**Figure S2. Homology modelling of MAB\_0855. (A) Two-dimensional (2D) schematic representation of MAB\_0855. (B) Three-dimensional (3D) homology model of MAB\_0855.** The 3D homology model was performed with the *Phyre2* program<sup>71</sup> and using the 3D structure of the *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump CmeB as template (PDB id: 5LQ3)<sup>72</sup>. The 2D schematic representation was made according to the 3D model. The 2D and 3D representations share the same color code with the first transmembrane helices (TM) TM1 to TM6 colored in slate blue while TM7 to TM12 are colored in magenta. The predicted intracytoplasmic helix separating TM6 and 7 colored in grey. The two periplasmic domains D1 and D2 are in orange and blue respectively. Nt and Ct stand for N-terminus and C-terminus. The residue numbering is according to the 3D model prediction.

**Figure S3. Construction of a knockout mutant lacking the *mmpL8<sub>MAB</sub>* gene by recombineering. (A) Gene deletion strategy.** The deletion mutant was obtained by allelic exchange between the sequences flanking the *mmpL8<sub>MAB</sub>* gene 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 *mmpL8<sub>MAB</sub>* 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  $\Delta$ *mmpL8<sub>MAB</sub>* genotype by PCR and sequencing analysis.** Three pairs of primers were used 1 (in the center of *mmpL8*), 2 (in the genes flanking *mmpL8*) and 3 (in the zeocin cassette).

**Figure S4. THP-1 MΦ IL-1 $\beta$  cellular response mediated by the Caspase-1 pathway to *M. abscessus* infection corroborates the inability of  $\Delta$ *mmpL8<sub>MAB</sub>* mutant to establish cytosolic contact. (A) Measurement of the Caspase-1 activity 3 hrs post-infection. (B)**

**Assessment of IL- 1 $\beta$  maturation after 3 hrs of infection.** The FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit was used to evaluate the presence of catalytically active forms of caspase 1 p10 and p12. Mature and precursor IL-1 $\beta$  were evaluated by western blot analysis.

**Figure S5. Representative photographs of** (A) R Mabs WT, (B) R Mabs  $\Delta$  *mmpL8*<sub>MAB</sub> (C) S Mabs WT and (D) R Mabs  $\Delta$ *mmpL8::mmpL8*<sub>MAB</sub> strains after 7 days of culture in 7H9 medium.

**Figure S6. Systematic 2D TLC analysis of the *M. abscessus*  $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub> 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. TLC 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution) in the case of polar lipids and charred.

**Figure S7. Stepwise purification of lipid fraction.**

The stepwise purification of the lipid of interest was followed by TLC using chloroform/methanol (9:1 v/v) ascending solvent stained by sulfuric orcinol. The black arrow shows the target lipid whereas white arrows show other lipids of which synthesis is not affected by *mmpL8* deletion (A) **Extraction of polar and apolar lipid fractions. (B) Separation of polar lipids (P) in three fractions (Pa, Pb, Pc) by silica gel flash chromatography. (C) Resulting fractions Pa and Pb. (D) Final separation of Pa to recover the lipid of interest in Pa3 that was further analyzed.**

**Figure S8. Monosaccharide composition analysis of Pa3 fraction.**

The monosaccharide composition was established by GC-FID and GC-MS analysis of per-trimethylsilylated methylglycosides derived from the Pa3 fraction. (A) **GC-FID analysis of authentic glucose (Glc) using meso-inositol (m-Ins) as internal standard. (B) GC-FID analysis of the Pa3 fraction with m-Ins. (C) GC-FID analysis of the Pa3 fraction using scyllo-inositol (s-Ins) as internal standard.** S-Ins was used to prove that Pa3 did not contain naturally occurring m-Ins, that is present in several mycobacterial glycolipids such as phosphatidyl-inositol-mannosides (PIMs).

**Figure S9. MS<sup>n</sup> analysis of lipid at  $m/z$  959.** Fragmentation analysis of the parent ion at  $m/z$  959 with MALDI-QIT-TOF established that this compound differed from the one at  $m/z$  987 by the presence of two C16 fatty acid chains instead of one C16 and one C18. Top, MS<sub>2</sub> fragmentation spectrum of the parent ion at  $m/z$  959; bottom, MS<sub>3</sub> fragmentation spectrum of the fragment ion [M-Hex + H]<sup>+</sup> at  $m/z$  797.

Figure S1

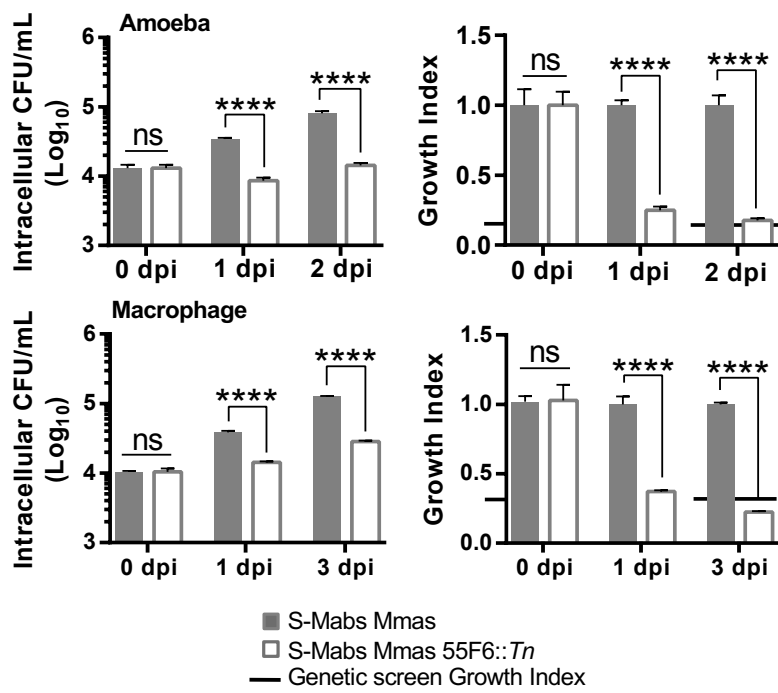
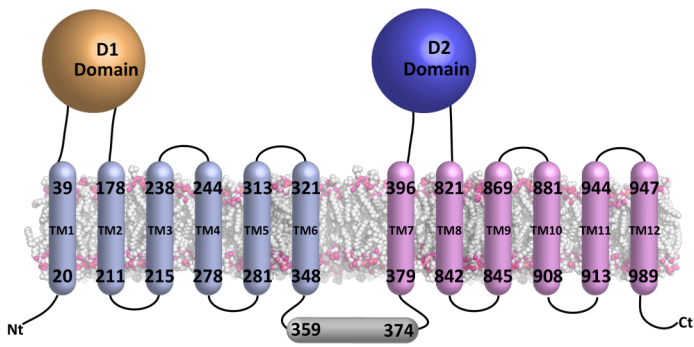


Figure S2

A



B

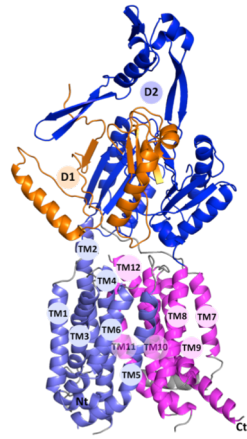


Figure S3

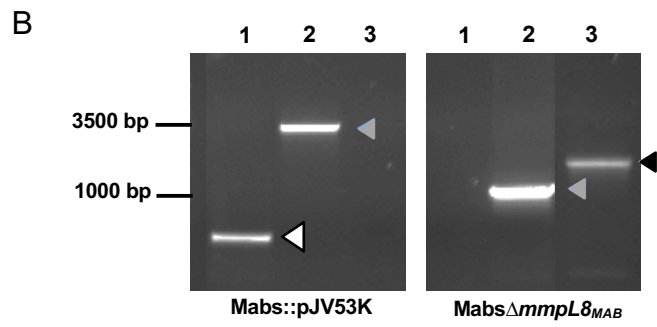
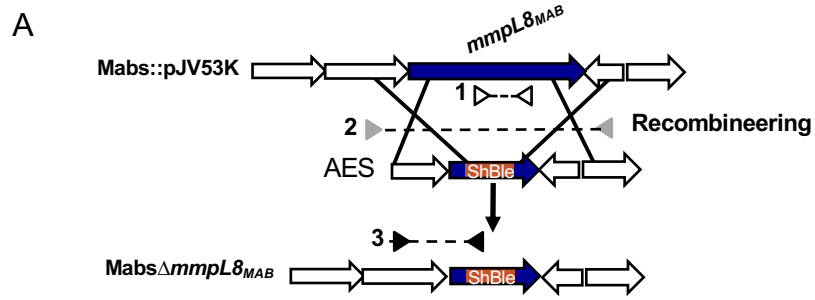
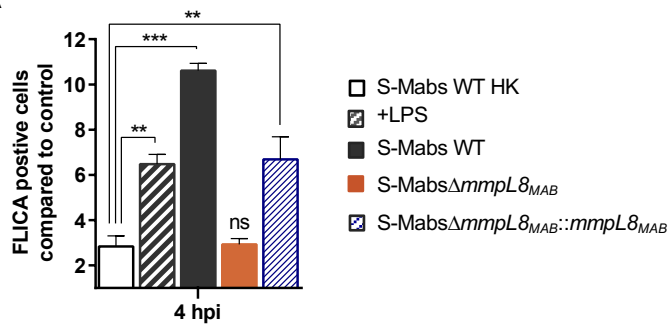




Figure S4

A



B

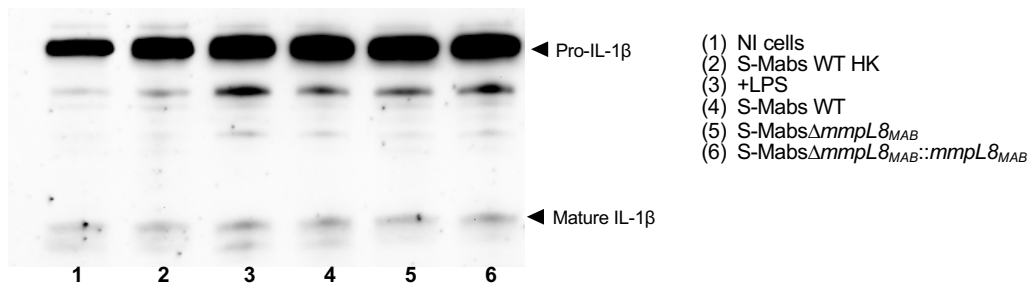
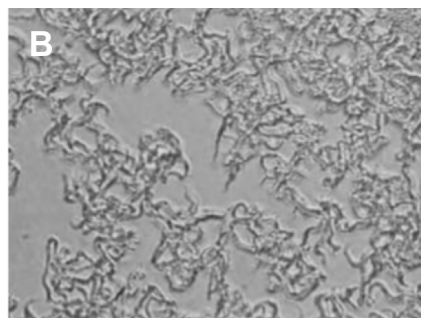
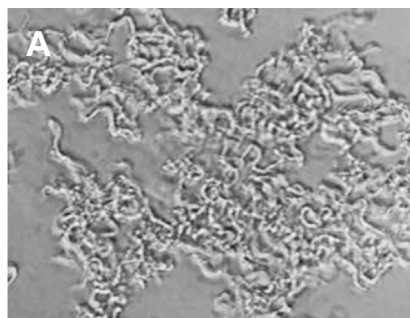


Figure S5



- (A) R Mabs WT
- (B) R Mabs  $\Delta$  *mmpL8*<sub>MAB</sub>
- (C) S Mabs WT
- (D) R Mabs  $\Delta$ *mmpL8::mmpL8*<sub>MAB</sub>

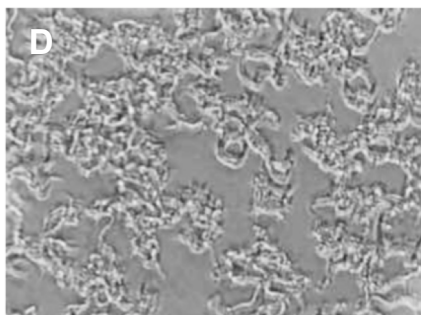
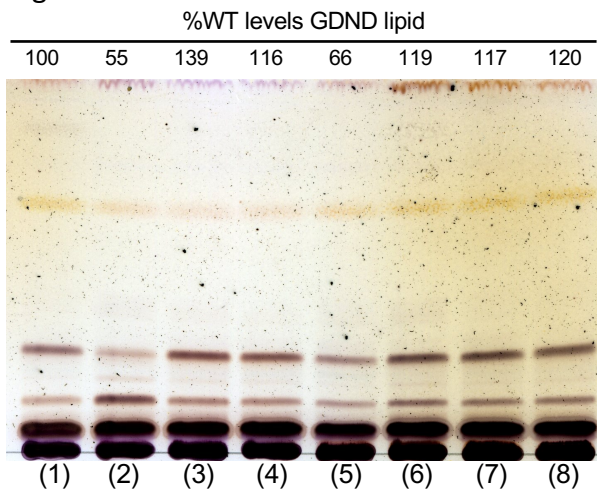


Figure S6



- (1) R-Mabs WT
- (2) R-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>
- (3) R-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>::*mmpL8*<sub>MAB</sub>
- (4) S-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>::*MYCMA\_0439*<sub>MMAS</sub>
- (5) R-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>::*mmpL7*<sub>MMAR</sub>
- (6) R-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>::*mmpL8*<sub>MTB</sub>
- (7) R-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>::*mmpL10*<sub>MTB</sub>
- (8) R-Mabs $\Delta$ *mmpL8*<sub>MAB</sub>::*mmpL12*<sub>MTB</sub>

◀ GDND lipid

Figure S7

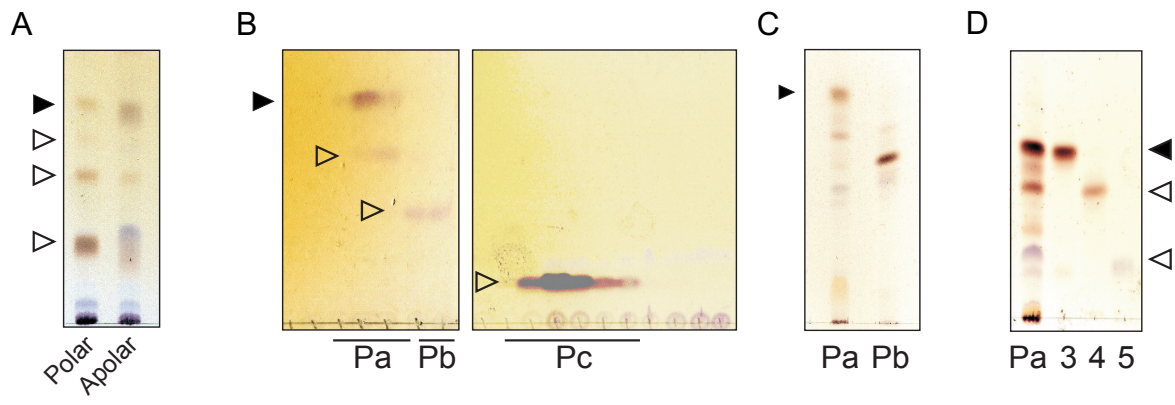


Figure S8

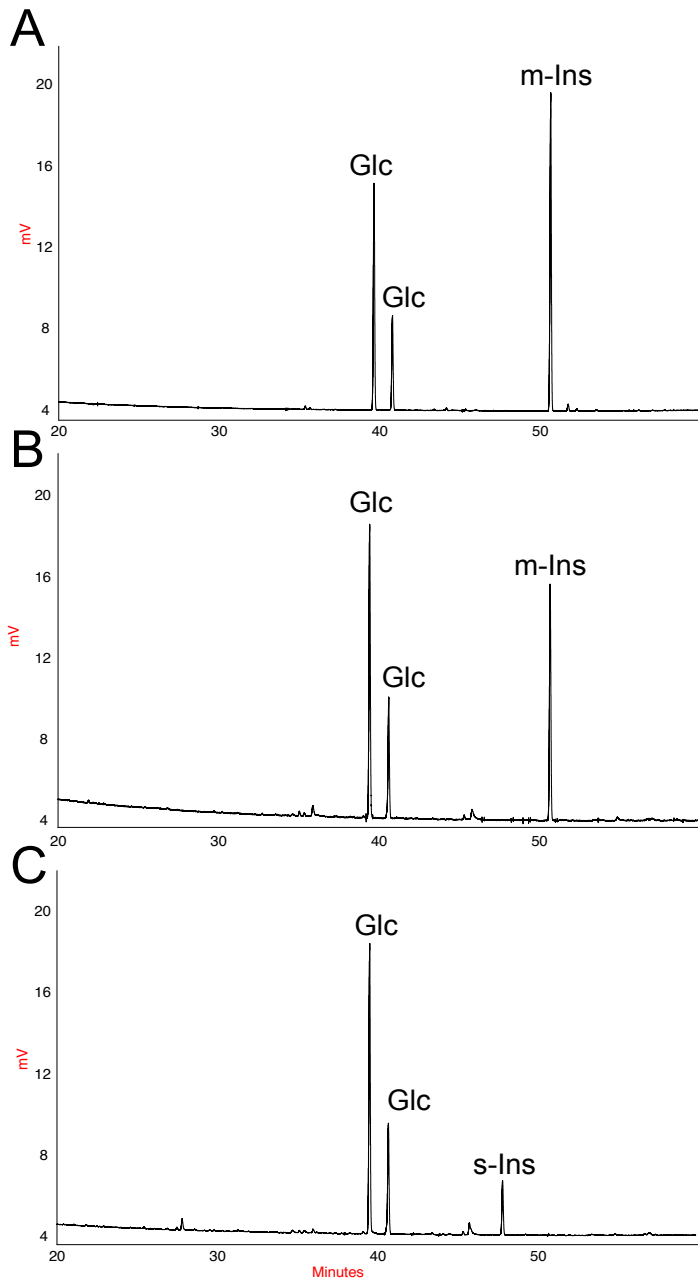
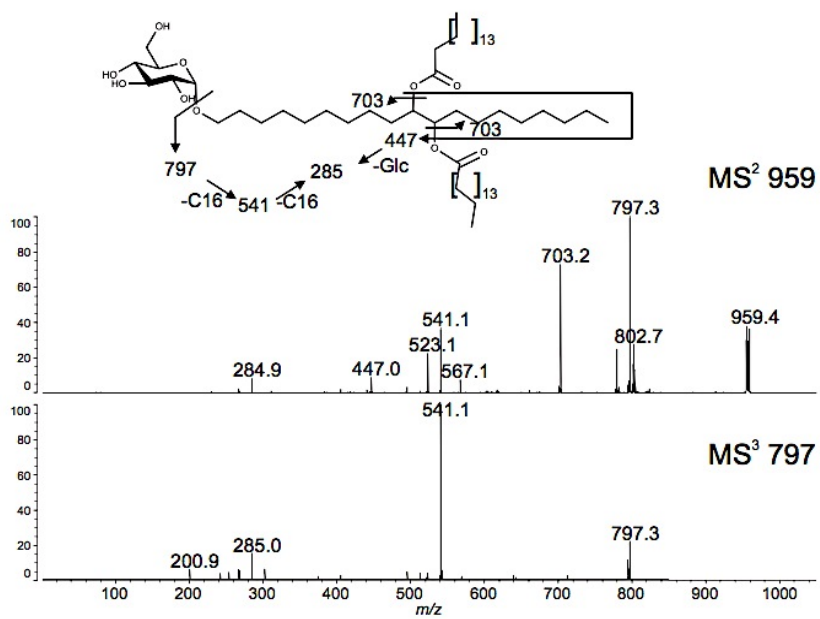
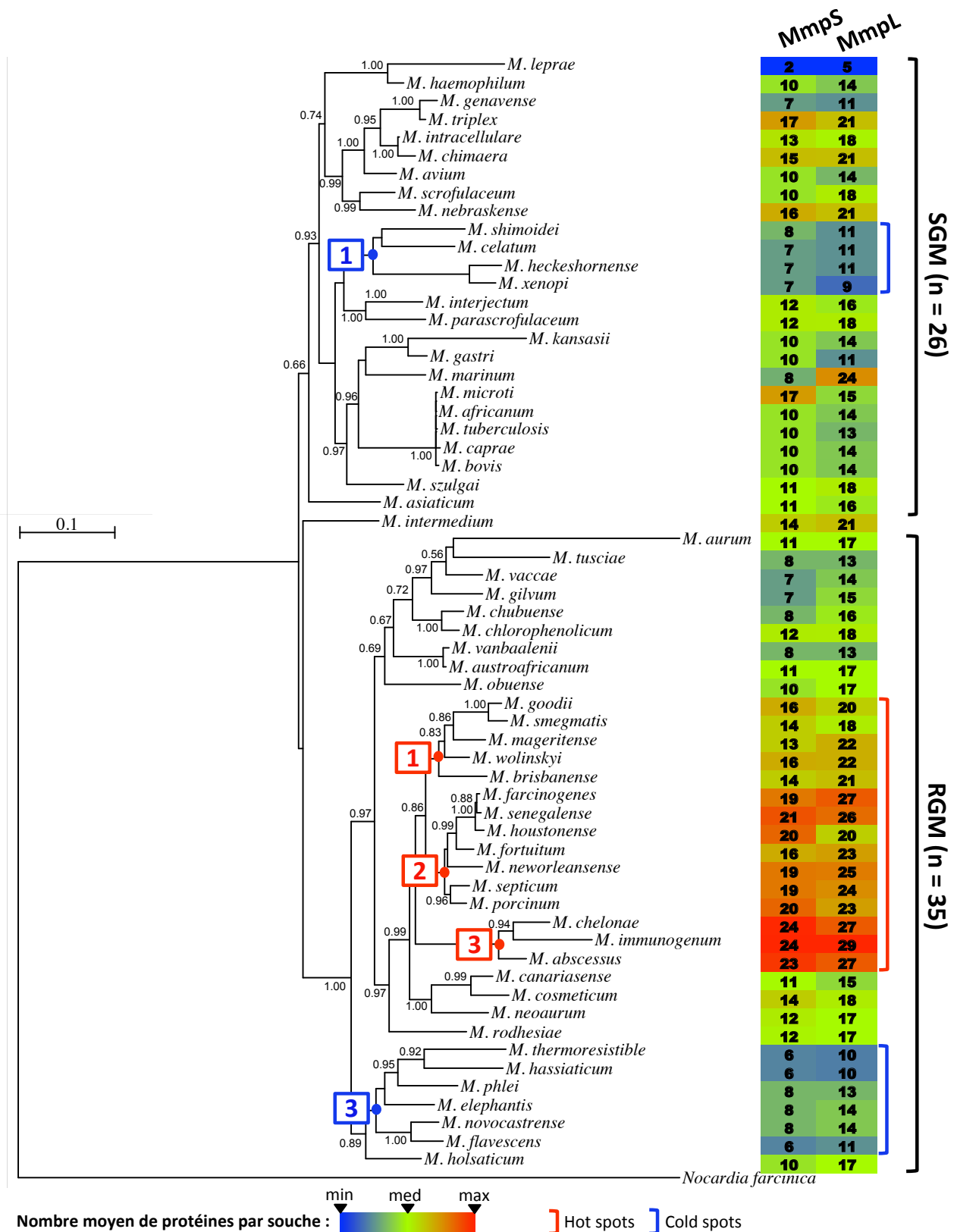


Figure S9





**Figure 38 | Distribution des MmpL et MmpS chez 61 espèces mycobactériennes.**

La phylogénie de 61 espèces mycobactériennes a été reconstruite d'après la méthode décrite par Mignard and Flandrois, 2008, par concaténation des 7 gènes *hsp65*, *rpoB*, *rrr*, *smpB*, *sodA*, *tmRNA* et *tuf*. La probabilité associée à chaque nœud est indiquée quand supérieure à 0,5. Le nombre de protéines MmpL et MmpS identifiées par espèce est donné en face de chacune d'elles et coloré selon un gradient de couleurs froides à chaudes, les couleurs chaudes étant associées aux nombres les plus élevés de protéines. RGM : mycobactéries à croissance rapide. SGM : mycobactéries à croissance lente.

### III. Perspectives évolutives

La comparaison de l'abondance des MmpL et des MmpS au sein de 76 espèces mycobactériennes suggère que l'abondance des MmpS par espèce est corrélée à celle des MmpL (**Figure 38**). La présence de « cold spots » et « hot spots » parmi ces deux familles de protéines au sein des différentes espèces soulève des questions d'un point de vue évolutif. En effet, les « cold spots » pourraient être la marque de contractions géniques (et cela est particulièrement marquant chez *M. leprae* ayant subi une réduction génique importante) tandis que les « hot spots » seraient la marque d'expansions géniques pouvant traduire des adaptations à divers environnements.

Une analyse phylogénétique a été entreprise en collaboration avec R. C Rodriguez de la Vega (Université Paris-Sud 11, Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, France), analyse à laquelle ont également contribué L. A. Galindo (UVSQ, U1173, France) et E. Dumas

(Université Paris-Sud 11, laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, France). Cette analyse a été entreprise dans le but de retracer l'histoire évolutive des MmpL et des MmpS afin d'établir *in fine* une annotation reflétant l'histoire naturelle de ces protéines. En effet, l'annotation initialement établie chez *M. tuberculosis* ne peut refléter la diversité des MmpL parmi certaines MNT comme *M. abscessus*. De plus, cette annotation est ici source de confusion, de nombreuses études ayant attribué une fonction à une MmpL ou à un couple MmpS-MmpL selon le substrat de ces protéines tandis que des protéines proches, portant la même annotation, pouvaient présenter des substrats différents. Il est apparu qu'une annotation phylogénétique de ces familles permettrait de passer outre ces ambiguïtés liées aux observations biologiques, tout en conservant du sens (le sens de l'évolution).

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction dont les premiers résultats sont présentés ci-après.

#### Article 4

##### **Phylogenomic analyses of the mycobacterial MmpL and MmpS protein families highlight gene gain in pathogenic NTM species**

Ricardo C Rodríguez de la Vega, [Violaine Dubois](#), Lee Ann Galindo, E. Dumas, Jean-Louis Herrmann, Fabienne Girard-Misguich

##### **Identification des familles de gènes *mmpL* et *mmpS* par une approche phylogénomique et définition des profils phylogénomiques des espèces**

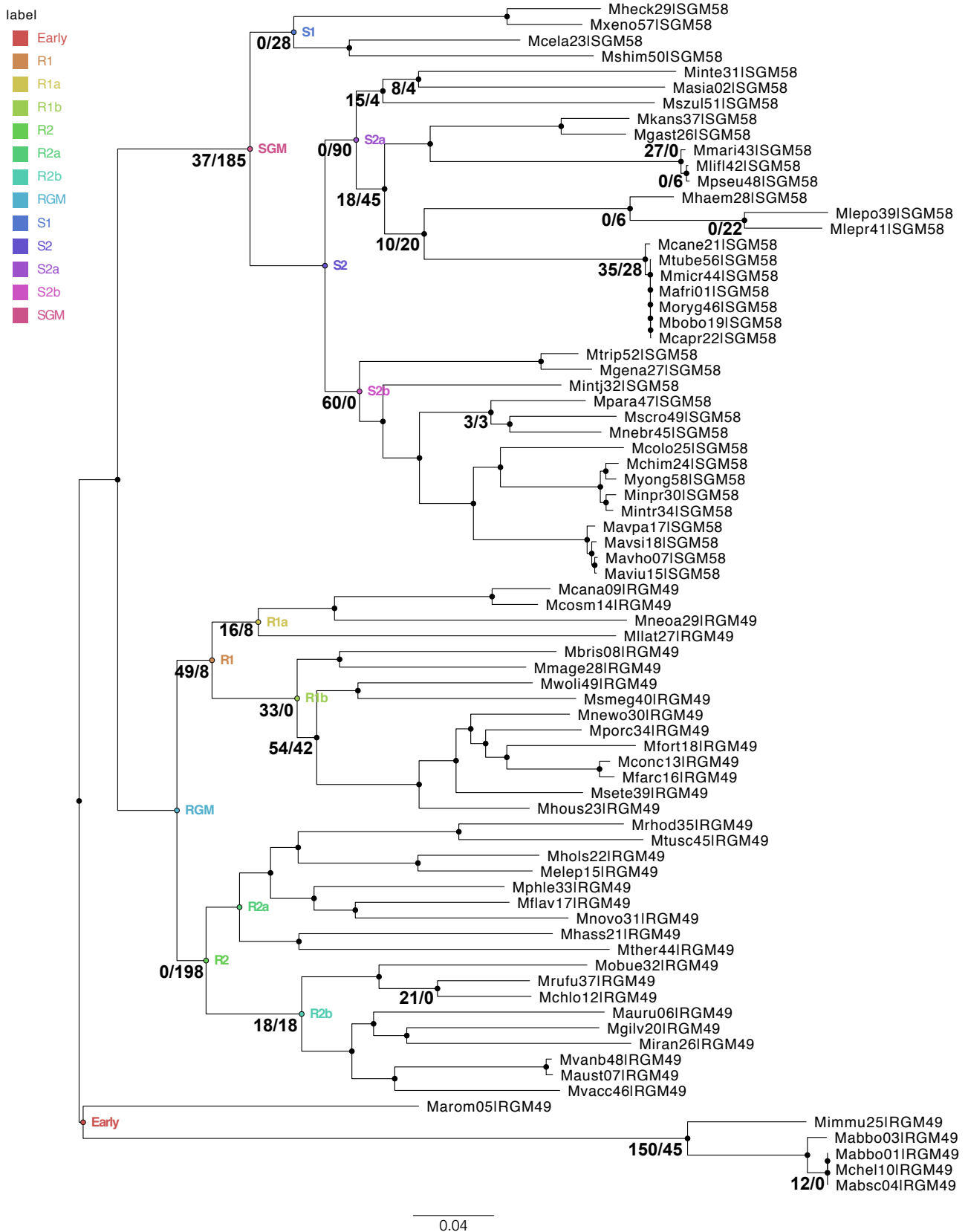
Par la méthode de blast du HMM des *mmpL* et des *mmpS* contre les 76 génomes mycobactériens sélectionnés des milliers de séquences ont été identifiés. Ces mêmes séquences ont été récupérées par une autre approche consistant à comparer par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) les 100 premiers nucléotides conservés dans ces familles de gènes (Altschul *et al.*, 1990). Les séquences de *mmpL/mmpS* de chaque espèce ont été comparées les unes contre les autres permettant de définir des orthogroupes (OG) ou groupe de gènes orthologues ou paralogues au sein des es-

pèces. Cela a permis de définir un profil phylogénomique des espèces étudiées pour les familles de gènes *mmpL* et *mmpS*.

##### **Histoire évolutive des familles de gènes *mmpL* et *mmpS* au sein des espèces (« phylotrack »)**

En parallèle, une phylogénie des espèces a été construite à partir des orthogroupes majoritairement conservés (à 75%) dans les génomes des espèces, ce qui représente 396 orthogroupes. Deux méthodes indépendantes (la méthode des maximums de ressemblance et la méthode bayésienne) ont montré une topologie similaire des arbres d'espèces, confirmant la robustesse de cette phylogénie. Cette phylogénie, bien qu'obtenue par une méthode différente, est





**Figure 39 | Phylogénie des mycobactéries selon 396 orthogroupes conservés chez 76 espèces et superposition des analyses « phylotrack » des MmpL et des MmpS.**

Soixante-seize génomes mycobactériens ont été comparés les uns contre les autres afin d'identifier des orthogroupes au sein des espèces. Les orthogroupes les plus conservés (75% de conservation et plus) ont été sélectionnés (soit 396 orthogroupes) pour construire la phylogénie des mycobactéries. Sur cet arbre phylogénétique le nombre de contractions et d'expansions géniques des MmpL/MmpS calculé par le modèle Birth Death and Innovation est indiqué au niveau des nœuds (expansions/contractions).

comparable à celle obtenue récemment par Gupta et coll. (Gupta *et al.*, 2018) (**Figure 39**). Un groupe apparaît tôt dans l'évolution (dit « Early ») comprenant les espèces du clade *Chelonae-Abscessus-Immunogenum* et *M. aromaticovorans*. De ce groupe émerge un groupe de MCR et un groupe de MCL. Le groupe de MCR se subdivise en 2 groupes majeurs R1 et R2 se subdivisant en 2 groupes, R1a/R1b et R2a/R2b respectivement. Le groupe des MCL se subdivise également en deux groupes majeurs S1 et S2, ce dernier se subdivisant en deux clades S2a et S2b.

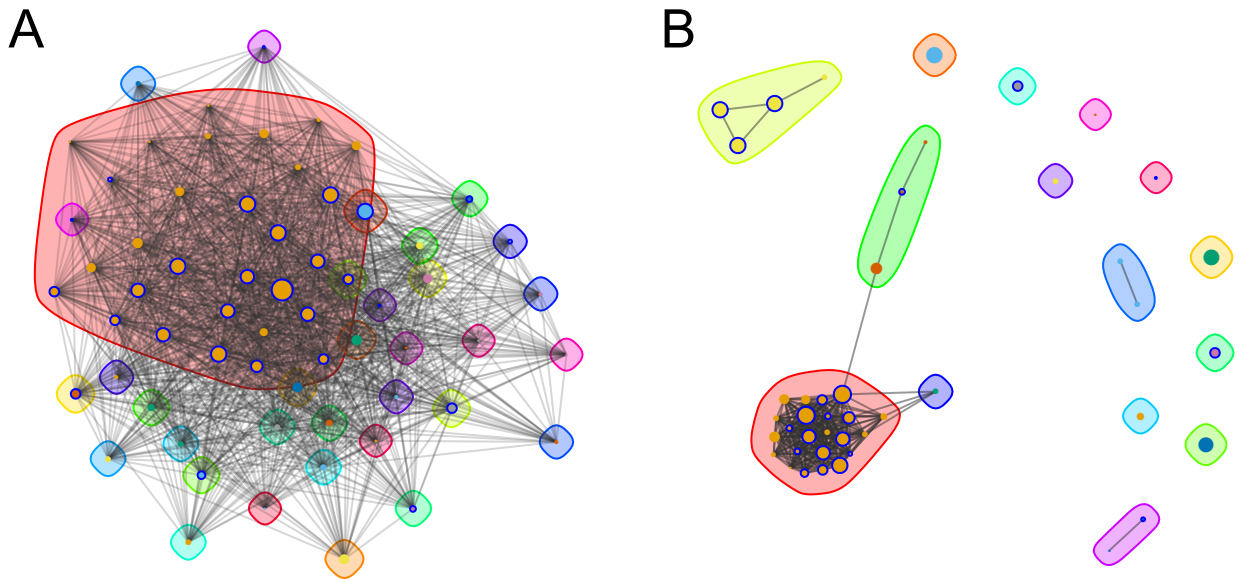
L'apparition de chaque groupe d'orthologues dans l'histoire évolutive des espèces a été modélisée à partir de cet arbre et du profil phylogénomique des espèces pour les familles de gènes des *mmpS* et des *mmpL*. Cela définit des pistes phylogénétiques (« phylotrack ») retraçant l'histoire évolutive de ces familles au sein de la phylogénie des espèces selon le modèle BDI (Birth, Death and Innovation) (Karev *et al.*, 2004). A chaque nœud de l'arbre d'espèces est indiqué la proportion d'expansions géniques (Birth ou Innovation) et de contractions géniques (Death) calculée par ce modèle (expansion/contraction, **Figure 39**). Il apparaît une tendance à la réduction génique chez l'ensemble des mycobactéries, réduction particulièrement marquée au sein des MCL où 37 expansions pour 185 réductions géniques sont observées chez l'ancêtre commun. Chez les MCR, les ancêtres communs aux groupes « Early » et au groupe R1 ont connu davantage d'expansions que de réductions géniques tandis que celui du groupe R2 a subi une forte contraction génique (198 événements). Chez les MCL, l'ancêtre commun au groupe S1 n'a connu que des contractions géniques alors que chez le groupe S2, si l'ancêtre commun du sous-groupe S2a n'a subi que des contractions géniques, celui du sous-groupe S2b (comprenant le complexe *M. avium*) n'a connu que des expansions géniques. De plus, au sein du groupe S2a, *M. marinum* est la seule espèce chez laquelle se sont accumulées uniquement des expansions après deux séries de réductions géniques. Ces événements expliquent l'abondance des *MmpL* chez le complexe *M. avium* et

chez *M. marinum* parmi les MCL. Finalement les événements d'expansion et de réduction géniques des familles de gènes *mmpL* et *mmpS* semblent refléter l'évolution des espèces et suggèrent une abondance particulière de ces protéines chez des MNT pathogènes suite à des événements d'expansion génique. De façon intéressante certaines séquences de gènes des MCL apparaissent dans des nœuds terminaux chez les MCR et réciproquement, suggérant l'existence de transferts horizontaux de gènes entre les espèces. Cela suppose que des mycobactéries phylogénétiquement distantes auraient partagé un même environnement et évolué des adaptations spécifiques au cours du temps.

De façon notable, le gène *MAB\_0855* appartient à un petit orthogroupe (OG06110) de 16 séquences conservé uniquement chez le groupe *Abscessus-Chelonae-Immunogenum* et 13 autres MCR. La plupart des MCR du groupe R2 ont perdu cet orthogroupe suite à un événement de réduction génique à la base du clade à l'exception de certaines espèces chez qui cet orthogroupe réapparaît telles que *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium flavescens* et *Mycobacterium novocastrense*. Enfin, l'orthogroupe OG06110 disparaît chez les MCL suite à un événement de contraction génique chez l'ancêtre commun aux MCL. Comparativement, le gène *MAB\_0937c* appartient à un orthogroupe (OG00225) de 83 séquences conservé chez 33 mycobactéries MCL ou MCR.

### Annotations des *MmpL* et *MmpS* (« phylonetwork »)

Afin d'annoter les orthogroupes de *MmpL* et de *MmpS*, nous avons procédé à une analyse permettant de regrouper les orthogroupes les plus proches et définissant des familles d'orthogroupes. Des graphiques ou « phylonetworks » sont générés représentant les résultats obtenus (**Figure 40**). Sur ces graphiques chaque nœud correspond à un orthogroupe et la taille du nœud est proportionnelle au nombre de gènes par orthogroupe. Selon cette analyse, il y aurait une trentaine de familles *MmpL*, avec une superfamille comprenant 29 groupes d'orthologues et plus de la moitié des *MmpL* annotées (**Figure**



**Figure 40 | Phylonetwork des orthogroupes de MmpL et MmpS .**

Le package Igraph de R a été employé pour dessiner les phylonetworks des orthogroupes de MmpL (A) et MmpS (B). Chaque nœud du phylonetwork correspond à un orthogroupe et la taille des nœuds est proportionnelle au nombre de séquences appartenant à l'orthogroupe.

**Tableau 9 | Pourcentage de séquences correspondant à un best hit contre les MmpL de *M. tuberculosis* parmi les orthogroupes de la superfamille de MmpL.** Une recherche des meilleurs hits contre les MmpL de *M. tuberculosis* pour chaque orthogroupe (OG) a été réalisée avec OpSCAN. Un hit est considéré comme un best hit quand le score de l'alignement est supérieur à 30 (donné entre parenthèses ± écart-type). Le nombre de séquences par orthogroupe est indiqué (seq.).

	MmpL1	MmpL2	MmpL4	MmpL5	MmpL6	MmpL7	MmpL8	MmpL9	MmpL10	MmpL11	MmpL12	MmpL13
<b>OG00000</b> (237 seq.)		3,4% (66±1,1)	30,0% (70,7±11,7)	65,8% (69,9±7,5)								0,4% (29,96)
<b>OG00225</b> (83 seq.)							1,2% (59,5)		94,0% (62,4±12,6)		4,8% (55,2±7,6)	
<b>OG01377</b> (74 seq.)												100% (68,5±11,0)
<b>OG01689</b> (73 seq.)										100% (73,4±10,5)		
<b>OG01755</b> (72 seq.)		70,8% (60,4±1,5)	29,1% (58,4±1,1)									
<b>OG02916</b> (54 seq.)												96,3% (31,8±4,9)
<b>OG03368</b> (44 seq.)			2,2% (60,8)									
<b>OG03521</b> (42 seq.)	28,6% (36,4±1,8)	2,3% (37,8)	4,8% (37,9±0,2)		2,4% (38,33)	2,3% (32,1)		42,9% (37,1±1,3)				
<b>OG03639</b> (40 seq.)									82,5% (41,5±0,3)		17,5% (41,4±0,4)	
<b>OG03694</b> (38 seq.)			2,6% (50,9)									
<b>OG03784</b> (38 seq.)		2,6% (65,8)	92,1% (58,5±1,8)	2,6% (56,5)								
<b>OG03910</b> (36 seq.)			100% (62,6±1,7)									
<b>OG04666</b> (27 seq.)			100 (63,4±1,5)									
<b>OG06110</b> (16 seq.)									100% (51,3±1,8)			
<b>OG06163</b> (16 seq.)			93,4% (55,6±0,9)									6,2% (29,3)
<b>OG07071</b> (12 seq.)												100% (63,8±1,4)
<b>OG07041</b> (12 seq.)											100% (80,3±20,2)	
<b>OG07179</b> (12 seq.)							83,3% (92,9±10,4)		16,7% (51,7±0,1)			
<b>OG07312</b> (12 seq.)												100% (61,1±1,2)
<b>OG07320</b> (12 seq.)												
<b>OG07436</b> (11 seq.)												
<b>OG08302</b> (9 seq.)				100% (65,7+/_0,8)								
<b>OG11189</b> (5 seq.)												20% (44,0)
<b>OG11673</b> (5 seq.)												
<b>OG13731</b> (3 seq.)												
<b>OG14178</b> (3 seq.)												100% (37,1±0,8)
<b>OG15992</b> (2 seq.)												100% (63,8±3,4)
<b>OG16861</b> (2 seq.)												100% (59,0±1,4)
<b>OG17098</b> (2 seq.)												100% (54,7±0,3)



**Tableau 11 | Annotation des MmpL selon leur histoire naturelle.** Un numéro est attribué par orthogroupe ou groupe d'orthogroupes selon leur conservation chez les 76 espèces étudiées et le nombre de séquences qu'ils comportent. Les orthogroupes annotés MmpL1 sont les plus conservés et les plus diversifiés contrairement à l'orthogroupe MmpL32.

MmpL	Orthogroupes	Espèces	Séquences
MmpL1	OG00000 OG00225 OG01377 OG01689 OG01755 OG02916 OG03368 OG03521 OG03639 OG03694 OG03784 OG03910 OG04666 OG06110 OG06163 OG07071 OG07041 OG07179 OG07312 OG07320 OG07436 OG08302 OG11189 OG11673 OG13731 OG14178 OG15992 OG16861 OG17098	2-76	992
MmpL2	OG00857	76	76
MmpL3	OG06094	16	16
MmpL4	OG06357	15 (S2a)	15
MmpL5	OG06605	11	14
MmpL6	OG06955	13	13
MmpL7	OG07095	12 (S2b)	12
MmpL8	OG06605	11	14
MmpL9	OG07346	11	11
MmpL10	OG07399	11	11
MmpL11	OG09098	7	7
MmpL12	OG09427	7	7
MmpL13	OG10116	6	6
MmpL14	OG09898	4	6
MmpL15	OG10536	5 (S2a)	5
MmpL16	OG10924	5 (Early)	5
MmpL17	OG11051	5 (Early)	5
MmpL18	OG11175	5 (Early)	5
MmpL19	OG11179	5 (Early)	5
MmpL20	OG12451	4 (S2a)	4
MmpL21	OG13279	3 (S2a)	3
MmpL22	OG13293	3	3
MmpL23	OG13558	3 (MCC)	3
MmpL24	OG14582	3 (R2b)	3
MmpL25	OG15098	2	2
MmpL26	OG15327	2	2
MmpL27	OG15444	2	2
MmpL28	OG15591	2	2
MmpL29	OG16609	2 (S2a)	2
MmpL30	OG15661	2 (S2b)	2
MmpL31	OG16943	2	2
MmpL32	OG17015	2 (S2a)	2

**Tableau 12 | Annotation des MmpS selon leur histoire naturelle.** Un numéro est attribué par orthogroupe ou groupe d'orthogroupes selon leur conservation chez les 76 espèces étudiées et le nombre de séquences qu'ils comportent. Les orthogroupes annotés MmpS1 sont les plus conservés et les plus diversifiés contrairement à l'orthogroupe MmpS15.

MmpS	Orthogroupes	Espèces	Séquences
MmpS1	OG00012 OG00064 OG02197 OG03384 OG03675 OG03756 OG04430 OG05473 OG05920 OG05945 OG06155 OG06880 OG08335 OG09365 OG09699 OG10486 OG11193 OG11214 OG11223 OG11807 OG12357 OG13089 OG16033	2-72	578
MmpS2	OG01329 OG01956 OG02613 OG11210	5-73	209
MmpS3	OG06979	12	13
MmpS4	OG08810	8	8
MmpS5	OG06399	6	6
MmpS6	OG10984 OG11123	5 (Early)	5
MmpS7	OG11095	5 (Early)	5
MmpS8	OG11177	5 (Early)	5
MmpS9	OG12484 OG14644 OG02119	3-4	10
MmpS10	OG00075	3	3
MmpS11	OG02119	3 (S2b)	3
MmpS12	OG13733 OG15591	2	2
MmpS13	OG15777	2 (S1)	2
MmpS14	OG15789	2	2
MmpS15	OG00196	1	1

**40A**). Chez les MmpS une superfamille de 23 orthogroupes est identifiée et 2 groupes comprenant 3 ou 5 orthogroupes bien peuplés (**Figure 40B**). En contraste avec les MmpL, chez les MmpS le network n'est pas fermé, c'est-à-dire que plusieurs orthogroupes ne sont pas connectés avec le groupe principal et ont probablement évolué indépendamment de ce groupe.

A titre d'exemple, par comparaison avec l'annotation de *M. tuberculosis*, la plupart des « familles » MmpL décrites chez *M. tuberculosis* ne sont pas des groupes naturels, c'est-à-dire que certaines protéines plus ou moins apparentées appartiennent à des orthogroupes bien différenciés (**Tableaux 9 & 10**). Il y a seulement trois familles naturelles comprenant les protéines MmpL3, MmpL8 et MmpL11 (et peut-être aussi MmpL9). Le fait que MAB\_0855 et

MAB\_0937c appartiennent à deux orthogroupes différents conforte l'hypothèse que ces deux protéines puissent exercer des fonctions différentes. Ainsi les OG06110 et -00225 auxquelles ces protéines appartiennent respectivement sont des exemples d'inconsistance de l'annotation existante chez *M. tuberculosis*, puisque les séquences de protéines de ces deux orthogroupes ressemblent en majorité à la MmpL10 de *M. tuberculosis*, qui par conséquent ne forme pas un groupe naturel. Cette inconsistance est également observée concernant l'annotation des MmpS chez *M. tuberculosis* (non montré). Enfin, des orthogroupes de MmpL et MmpS ne ressemblent à aucune MmpL ou MmpS décrites chez *M. tuberculosis*. Une nouvelle classification est proposée qui reflète l'histoire naturelle des MmpL (**Tableau 11**) et des MmpS (**Tableau 12**), et leur diversité.





# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces dernières années les infections à *M. abscessus* ont pris de l'ampleur et notamment dans le cadre des infections pulmonaires survenant chez les individus CF, où les infections à cette MNT (et à celle-là seule) sont associées à un net déclin de la fonction respiratoire et des pathologies sévères rappelant des infections à mycobactéries tuberculeuses (Qvist *et al.*, 2016). Le mode de contamination de telles infections demeure mal connu. Bien que les preuves d'une vie environnementale de *M. abscessus* sont minces, plusieurs études ont montré l'existence d'un réservoir hydrique de *M. abscessus*, tandis que l'analyse de son génome suggère également une vie à l'interface eau-plantes (Ripoll *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2013; Schets *et al.*, 2015; Donohue *et al.*, 2015). Dans ce contexte, *M. abscessus* pourrait être en contact avec des amibes libres, particulièrement répandues dans ces environnements.

Les amibes libres sont les premières cellules eucaryotes apparues au cours de l'évolution et douées de phagocytose. Des similarités entre l'amibe environnementale *A. castellanii* et les macrophages suggèrent que l'amibe pourrait être une forme ancestrale du macrophage (Siddiqui and Khan, 2012). De nombreux micro-organismes, et notamment des bactéries pathogènes de l'homme et de l'animal, résistent à la phagocytose amibienne et auraient ainsi développé au sein des amibes des mécanismes de résistance à la phagocytose des phagocytes professionnels rencontrés chez l'homme et l'animal, permettant de parler de pathoadaptation, comme cela a été décrit pour *L. pneumophila* (Thomas *et al.*, 2006). Le rôle des amibes en tant qu'intermédiaire de transmission des pathogènes de l'environnement, et notamment de *M. abscessus*, à des hôtes mammifères apporte de nouvelles perspectives d'études épidémiologiques. Même si peu d'études sur le terrain rapportent l'existence naturelle de mycobactéries au sein d'amibes, plusieurs analyses phylogénétiques et expérimentales soutiennent l'hypothèse d'un réservoir amibien des mycobactéries (Greub and Raoult, 2004a; Thomas *et al.*, 2008;

Lamrabet, *et al.*, 2012a; Delafont *et al.*, 2014). De nombreux arguments sont notamment en faveur d'une vie intra-amibe de *M. avium*, pouvant cohabiter avec d'autres endosymbiotes amibiens comme *L. pneumophila*. Les interactions entre amibes et mycobactéries ont été étudiées essentiellement chez *M. marinum* et *M. avium*, pour qui Cirillo *et coll.* ont montré pour la première fois l'influence de la vie intra-amibienne sur la virulence de cette mycobactérie (Cirillo *et al.*, 1997; Cirillo *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 2003; Hagedorn *et al.*, 2009; Barisch *et al.*, 2015; Barisch and Soldati, 2017). Nous avons montré que ce phénomène d'apprêtement à la vie intra-macrophagique par l'hôte amibien n'est pas restreint à *M. avium* mais s'applique également à *M. abscessus* (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). L'hypothèse d'un réservoir amibien de *M. abscessus* pourrait ainsi expliquer la virulence toute particulière de cette MCR via l'acquisition de gènes de virulence non-mycobactériens au sein de la niche amibienne et par l'induction de facteurs de virulence augmentant sa pathogénicité (Cirillo *et al.*, 1997; Greub and Raoult, 2003a; Bruggemann *et al.*, 2006). Un exemple est l'induction du gène *MAB\_0555 (plc)* chez l'amibe *A. castellanii*, un gène codant un facteur de virulence également présent chez *P. aeruginosa*, un autre pathogène majeur de la mucoviscidose, et qui favoriserait la capacité de *M. abscessus* à infecter les poumons des individus CF, contrairement à d'autres MCR telles que *M. chelonae*, dépourvue de ce gène (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

## Adaptations de *M. abscessus* à la vie phagocytaire

Pour mieux comprendre les mécanismes pouvant moduler la virulence de *M. abscessus* dans l'environnement et contribuer à sa pathoadaptation, nous avons entrepris l'étude du transcriptome d'une souche clinique lisse (43S) de *M. massiliense*, après infection de l'amibe *A. castellanii* ou après infection de macrophages murins. L'analyse comparée des gènes de *M. abscessus*, induits ou réprimés au sein de

l'amibe ou du macrophage, confirme que la survie intracellulaire de *M. abscessus* au sein du macrophage pourrait être facilitée par un passage préalable en amibes. Par ailleurs, l'analyse des gènes différentiellement exprimés en macrophages 16 hpi suggère que *M. abscessus* a développé des mécanismes spécifiques à la survie intra-macrophagique dont l'induction du gène *eis2*, essentiel à sa survie en macrophages.

Une autre approche ayant montré la pertinence du modèle amibien pour l'étude de la virulence de *M. abscessus* est le criblage à l'aveugle d'une banque de mutants en amibes. Cette approche est complémentaire des résultats obtenus par les analyses comparées de transcriptomique. Par cette approche nous avons identifié 12 mutants fortement atténués en amibes et en macrophages parmi lesquels 5 mutants étaient impactés dans le système ESX-4 du T7SS, 2 étaient impliqués dans le métabolisme des lipides ou leur transport, les autres étant mal caractérisés. L'étude du mutant 55F6, impacté dans un gène codant un transporteur membranaire de lipides mycobactériens (MmpL), a confirmé le rôle de cette famille de transporteurs dans la survie intracellulaire et la virulence de *M. abscessus*.

### Des preuves de l'apprêtement de *M. abscessus* par l'amibe ?

Précédemment, une étude menée par Tenant et Bermudez a montré l'induction d'une vingtaine de gènes de *M. avium* après 24 h et 48 h de co-culture avec l'amibe *A. castellanii*, dont 8 étaient également induits en macrophages et qui pouvaient témoigner d'adaptations à des stress communément rencontrés en amibes et en macrophages comme l'hypoxie et le stress oxydatif (Tenant and Bermudez, 2006). Toutefois, aucune preuve expérimentale n'a été apportée quant au rôle de ces gènes dans la survie intracellulaire de *M. avium* ou de l'apprêtement de *M. avium* par l'induction de ces gènes dans l'amibe.

Si *M. abscessus* et *M. chelonae* sont très proches d'un point de vue phylogénétique, *M. abscessus* se distingue de *M. chelonae* par son aptitude à engendrer des infections pulmo-

naires en addition d'infections cutanées, et à résister à la réponse immune innée. Par ailleurs, il semblerait que *M. abscessus* se réplique davantage dans l'amibe libre *A. castellanii* que *M. chelonae*, ce qui pourrait refléter sa virulence toute particulière comparée à *M. chelonae* et fait de l'amibe un modèle pertinent pour comprendre cette spécificité de *M. abscessus*. Enfin, la vie intra-amibienne de *M. chelonae* n'augmentant pas sa virulence contrairement à *M. abscessus*, nous avons obtenu le transcriptome de *M. chelonae* en amibes afin d'identifier des gènes (45) pouvant être la cible de l'apprêtement amibien (précoce et/ou tardif).

Nous avons générés 6 mutants par double recombinaison génique afin de tester la contribution de ces gènes, parmi les plus induits chez *M. abscessus* en amibes, à la survie intra-macrophagique de *M. abscessus*. L'ensemble des souches KO était atténué en amibes 3 dpi et toutes sauf une ( $\Delta$ MAB\_4663) en macrophages, montrant que le modèle amibien est bel et bien pertinent pour l'identification de gènes de virulence chez *M. abscessus*. Il s'agit de gènes potentiellement impliqués dans : **(1)** la réponse à des stress alcalins (MAB\_1247c) ou **(2)** à une carence en fer (MAB\_2649, MAB\_1243c), **(3)** des gènes impliqués dans le processus de modifications post-traductionnelles et/ou le transport de composés lipidiques (MAB\_1517c et MAB\_2649-MAB\_2650), **(4)** mais aussi des gènes de fonction inconnue (MAB\_4463, MAB\_4664, MAB\_4791c) dont un (MAB\_4791c) codant une protéine possédant une séquence signal de transport par le système Tat. La complémentation en macrophages des phénotypes des souches KO par les gènes MAB\_1243c, MAB\_1247c, MAB\_1517c, MAB\_2649 et MAB\_4664 et MAB\_4791c ont prouvé que ces gènes contribuent à la virulence de *M. abscessus*.

Enfin pour tester l'effet de la co-culture amibienne sur la virulence de *M. abscessus* nous avons sur-exprimé ces gènes chez *M. chelonae*. Parmi ces gènes, les gènes MAB\_1242c-MAB\_1247c et MAB\_4791c ne sont pas conservés chez *M. chelonae*. Seule la sur-expression chez *M. chelonae* des gènes MAB\_1517c (co-

dant une O-méthyltransférase) et *MAB\_2649* (codant une protéine MmpS) a favorisé la survie intracellulaire de la bactérie en macrophages. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que la surexpression des gènes *MAB\_4791c* et *MAB\_1242c-MAB\_1247c* ne confère pas davantage à la survie intra-macro-phagique de *M. chelonae* : **(1)** soit la fonction de ces gènes est d'ors-et-déjà remplie par d'autres gènes ; **(2)** soit le contexte génomique de *M. chelonae* ne permet pas à ces gènes de remplir leur fonction. Concernant la deuxième hypothèse, deux gènes adjacents au locus *MAB\_1242c-MAB\_1247c*, *MAB\_1248* ainsi que *MAB\_1249*, sont absents chez *M. chelonae*. Le premier code un facteur Sigma, le second une protéine hypothétique. Le gène immédiatement adjacent à *MAB\_4791c*, *MAB\_4792*, est également absent du génome de *M. chelonae* et code un régulateur transcriptionnel PAI (plasminogen activator inhibitor) de type 2. Il est possible que l'absence de ces gènes proximaux influe sur la fonction des gènes *MAB\_1242c-MAB\_1247c* et *MAB\_4791c*, même si d'autres gènes sont probablement impliqués dans le phénotype contrôlé par ces gènes. Finalement, la contribution des gènes *MAB\_1517c* et *MAB\_2649* à la survie intracellulaire de *M. chelonae* en macrophages confirme un apprêtement différentiel par l'amibe de *M. abscessus* et de *M. chelonae* et montre l'avantage conféré par l'induction forte de ces gènes en amibes. L'environnement intra-amibien serait donc favorable au développement de patho-adaptations chez *M. abscessus*. De façon notable, ces gènes pourraient contribuer au remodelage de l'enveloppe. Par ailleurs, des expériences préliminaires suggèrent que *MAB\_2649* contribue à la survie de la bactérie dans un milieu carencé en fer (non montré), un rôle clef pour la vie au sein des cellules dans lesquels le fer vient à manquer.

#### ***A la recherche de preuves d'un réservoir amibien dans l'environnement favorable à la transmission et au succès pathogène de M. abscessus***

Plusieurs études ayant souligné la co-occurrence d'amibes et de mycobactéries envi-

ronnementales ont encouragé la recherche d'interactions naturelles des mycobactéries et des amibes dans l'environnement (Greub and Raoult, 2004a; Thomas *et al.*, 2008; Lamrabet, *et al.*, 2012a; Delafont *et al.*, 2014). Des études récentes ont suggéré une possible transmission de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* à des animaux par des amibes environnementales (White *et al.*, 2010; Samba-Louaka *et al.*, 2018). La transmission de *M. abscessus* à l'homme par l'amibe pourrait expliquer l'épidémiologie particulière des infections à *M. abscessus* non transmises par des matériels contaminés comme par exemple les infections des individus CF. Pour évaluer une possible transmission de *M. abscessus* par l'environnement chez ces individus, l'échantillonnage de sites potentiellement colonisés par *M. abscessus* et des amibes environnementales peut être envisagé lors du prélèvement de différentes sources d'eau chez les patients CF. Au sein des échantillons contenant des amibes et positifs à *M. abscessus*, la présence de *M. abscessus* à l'intérieur des amibes pourrait être testée par Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). La comparaison des adaptations à la vie intra-amibienne des souches isolées dans les amibes par rapport à la souche de laboratoire type de *M. abscessus* pourrait fournir des preuves de l'apprêtement amibien dans l'environnement.

#### ***Contrôle de la virulence de M. abscessus par les lipides complexes***

Si les données de transcriptomique ont montré que le catabolisme des acides gras et du cholestérol constitue une adaptation métabolique majeure de *M. abscessus* à la vie intracellulaire, le crible de la banque de mutants a montré le rôle de lipides complexes dans le phénotype de survie intracellulaire. Des gènes particulièrement requis pour la survie intra-macro-phagique ( $GI < 0,5$ ) ont été mis en évidence qui pourraient contribuer à la biosynthèse de lipides complexes tels que *MAB\_4626c* et *MAB\_1915* codant des fatty-acid-CoA ligase FadD, et *MAB\_4691c* codant une NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) PstA (Laencina *et al.*, 2018). Un seul gène (*MAB\_0855*), codant une protéine

MmpL potentiellement requise pour le transport de lipides complexes était requis la survie en amibes et en macrophages.

Chez les espèces du complexe *M. abscessus*, les familles de protéines MmpL et MmpS sont particulièrement grandes avec en moyenne 27 MmpL et 23 MmpS détectées chez *M. abscessus* contre une quinzaine de protéines MmpL et MmpS identifiées chez les MCL, à l'exception des espèces du MAC et *M. marinum* qui en possèdent davantage. Par une approche phylogénomique nous sommes parvenus à montrer que l'abondance de ces protéines chez *M. abscessus*, *M. marinum* ou encore *M. avium* est liée à des innovations géniques. Celles-ci pourraient traduire des adaptations de ces mycobactéries environnementales à leur environnement et contribueraient également à leur virulence. Sept des 11 MmpL fonctionnelles de *M. tuberculosis* ont été caractérisées (Camacho *et al.*, 1999; Lamichhane *et al.*, 2005; Domenech *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2017). Chez *M. abscessus*, sur les 31 MmpL de la souche type, seul le rôle des MmpL4a et -4b a été étudié, des études montrant leur implication dans le transport des GPL (Nessar *et al.*, 2011; Pawlik *et al.*, 2013; Bernut *et al.*, 2016b). Le crible de la banque de mutants de transposition a révélé le rôle d'une autre MmpL (MAB\_0855 dénommée MmpL8<sub>MAB</sub>) (Laencina *et al.*, 2018; Dubois, *et al.*, 2018b).

Chez *M. tuberculosis*, le défaut de virulence associé à la délétion des gènes *mmpL7* ou *mmpL8* a été attribué, par inférence, à l'absence des PGL et du sulfolipide transportés par les protéines MmpL correspondantes. MmpL8<sub>MAB</sub> serait impliquée dans le transport d'une famille de glycolipides dénommés GDND. Les GDND, bien que différents, ressemblent davantage aux PGL de *M. tuberculosis* qu'aux DAT/PAT et au SL, ce qui souligne l'originalité de ces composés. Cette observation est d'autant plus troublante que, comme la MmpL7 de *M. tuberculosis*, MmpL8<sub>MAB</sub> joue un rôle dans le phénotype de dommages de la membrane phagosomale (Quigley *et al.*, 2017). Les protéines MmpL8 et MmpL12 de *M. tuberculosis* possèdent, comme MmpL8<sub>MAB</sub>, un domaine « sterol-sensing » (SSD, IPR000731)

dans la partie N-ter de la protéine, en position 244-370, 223-352 et 233-347 respectivement (Annexe 8). Le domaine SSD pourrait interagir avec des stérols ou autres lipides. Ce domaine est essentiel à la transduction de signaux. Il correspond à 5 domaines transmembranaires d'environ 180 résidus. C'est un domaine conservé à travers différents phyla qui ferait le lien entre le trafic vésiculaire et la localisation protéique (Kuwabara and Labouesse, 2002).

Enfin, une comparaison avec 133 espèces mycobactériennes a montré que le gène MAB\_0855 est rencontré dans 4 des 5 clades mycobactériens définis par Gupta *et coll.*, et est absent du clade *Mycoclibacter*, constitué exclusivement d'espèces saprophytes (Gupta *et al.*, 2018) (Annexes 9). Le locus MAB\_0855 n'est hautement conservé qu'au sein du clade *Mycobacteroides*. Un gène de ce locus est présent exclusivement chez les *Mycobacteroides* : MAB\_0859, codant une polykétide cyclase. Le gène MAB\_0856, codant un régulateur transcriptionnel de la famille TetR, est également exclusif au clade *Mycobacteroides* et à *Mycobacterium wolinskyi* (proche parent de *M. smegmatis*). Ces deux gènes pourraient jouer des rôles biologiques clefs, en lien avec la biogenèse et le transport des GDND. En effet, les polykétides cyclases sont impliquées dans la synthèse des polykétides tandis que les régulateurs TetR sont connus pour exercer un rétro-contrôle négatif sur la transcription des gènes MmpL. Par ailleurs, des gènes présents dans le locus MAB\_0855, non-conservés chez certaines espèces du clade *Mycobacteroides*, font de ce locus un locus unique à *M. abscessus sensu lato* : il s'agit de gènes codant de petites protéines de fonction inconnue : MAB\_0849 (absent de *M. chelonae* et *M. immunogenum* mais aussi de *Mycobacterium salmoniphilum*), MAB\_0861 (absent de *Mycobacterium saopaulense*), MAB\_0862 et MAB\_0863 (absent de *Mycobacterium franklinii*). Finalement, ces comparaisons mettent à nouveau en lumière la singularité du locus MmpL8<sub>MAB</sub> de *M. abscessus* et démontre l'intérêt de muter les gènes de ce locus, potentiellement impliqués dans la biosynthèse des GDND afin de mieux comprendre la contribution

de ce locus à la virulence de *M. abscessus*. Récemment, nos collaborateurs (équipe de L. Kremer, CNRS de Montpellier, France) ont entrepris la délétion par recombinaison homologue du gène *MAB\_0852* de ce locus codant une acyltransférase potentiellement associée à la synthèse d'un polykétide. L'analyse du profil lipidique par TLC a montré la perte de composés migrant de la même façon que les GDND chez le mutant *papA2* et cela a été restaurée par complémentation avec un gène *papA2* fonctionnel suggérant que l'enzyme PapA2 *MAB\_0852* est impliquée dans la synthèse des GDND (A.-V. Guttierrez, non publié). Le fait que les infections avec le mutant *papA2* soient associées à une survie augmentée du poisson zèbre infecté comparée à la souche WT suggère que la production de GDND contrôle la pathogénèse de l'infection à *M. abscessus* dans ce modèle (A.-V. Guttierrez, non publié). Pour comprendre le rôle des GDND dans ce contrôle, les composés types GDND seront purifiés et des billes fluorescentes seront fixées avec les produits purifiés. Ces particules chargées de lipides seront injectées dans des lignées de poisson zèbre transgéniques présentant des macrophages fluorescents rouges ou des neutrophiles fluorescents verts afin d'étudier la capacité des GDND à moduler la réponse de l'hôte (phagocytose, recrutement de neutrophiles, préformation de granulomes). La contribution des gènes *MAB\_4626c*, *MAB\_1915* et *MAB\_4691* cités précédemment, à la pathogénèse des infections à *M. abscessus* pourra être évaluée selon le même schéma méthodologique.

### *L'Eis2 témoigne de l'existence de pathoadaptations propres à la vie intra-macrophagique*

Nous avons évoqué l'induction de gènes pouvant contribuer à la virulence de *M. abscessus* en macrophages. Parmi ces gènes, certains sont potentiellement impliqués dans la réponse à divers stress (*whib7*, *dosS*), à des stress hypoxiques (*dosS/devR*) et oxydatifs et alcalins (*kata*, *alkB*). Les fonctions moléculaires enrichies parmi ces gènes correspondent à des activités de N-acétylation, d'oxydoréduction, de liaison à l'oxygène ou de détoxification de l'oxyde nitrique par des dioxygénases. La délétion de trois opérons a

été réalisée, comprenant le gène *eis2* (*MAB\_4532c*) codant une N-acétyltransférase, un groupe de gènes (*MAB\_3132c-MAB\_3134c*) dont un codant un transporteur de l'hème et un gène (*MAB\_0086*) codant une taurine dioxygénase. Nous avons également entrepris la délétion du gène *mspA* (*MAB\_0734*) codant une porine et du gène *MAB\_4509c*, le gène le plus induit en macrophages (~55 fois) et dont la fonction demeure inconnue. L'ensemble de ces mutants était atténué en macrophages 3 jours post-infection. Toutefois, seul le mutant *eis2* est éliminé par les macrophages au cours de l'infection alors qu'il survit à la phagocytose ambiante. De façon intéressante, le gène *eis2* ainsi que l'opéron *MAB\_3132c-MAB\_3134c* étaient faiblement induits en amibes, soulignant une réponse spécifique de *M. abscessus* à l'environnement intra-macrophagique.

Le gène *eis2* n'est pas impliqué dans le contrôle de l'autophagie et de l'apoptose des cellules infectées mais il serait impliqué dans le contrôle du relargage de ROS par la cellule et dans la résistance aux dérivés oxygénés comme le peroxyde d'hydrogène. Ces phénotypes sont également observés chez la souche mutée *eis2* complémentée par le gène *eis* de *M. tuberculosis*; suggérant que ces deux gènes possèdent des fonctions communes. Les phénotypes observés expliquent l'atténuation rapide du mutant dans les macrophages. Le mutant *eis2* est fortement impacté dans sa capacité à établir des connexions cytosoliques avec l'hôte. A proximité du gène *eis2* se trouve un orthologue putatif du gène *mmpL11* de *M. tuberculosis*, impliqué notamment dans le transport des esters de mycolate et du TAG (Wright *et al.*, 2017). De façon notable une portion de synthèse est observée entre le locus *eis2* et le locus portant le gène *mmpL11* de *M. tuberculosis*. Etant donné le contexte génique du gène *eis2*, il est possible que celui-ci intervienne dans les modifications post-traductionnelles d'un composé lipidique. Une étude récente réalisée chez *Corynebacterium glutamicum* a montré l'importance d'une acétyltransférase au sein d'un locus impliqué dans la synthèse de composés lipidiques équivalents des TMM mycobactériens, l'acétylation

transitoire de ce produit étant nécessaire à son transport (Yamaryo-Botte *et al.*, 2015). Connaissant la vraisemblable implication de certains lipides pariétaux dans le phénotype de rupture phagosomale tel que le PDIM de *M. tuberculosis* et possiblement les GDND de *M. abscessus*, il n'est pas improbable que l'Eis2 soit impliquée dans ce processus dans l'hypothèse où l'Eis2 contribuerait à l'export de lipides en assurant leur acétylation, comme cela est décrit chez *C. glutamicum*. Le fait que la perte de l'acyltransférase MAB\_0852 suffise à induire un défaut de virulence chez *M. abscessus* est en faveur de cette hypothèse. Toutefois, des expériences complémentaires, telles que des TLC, sont nécessaires pour établir ou non un lien entre le défaut de survie du mutant *eis2* en macrophages et la biosynthèse de composés lipidiques. Par ailleurs, le fait que le mutant *eis2* ne soit pas éliminé en amibes soulèvent des questions et suggère que les phénotypes observés (réponse aux ROS et « échappement phagosomal ») n'expliquent pas à eux seuls l'élimination du mutant par les macrophages.

### Perspectives apportées par les données de transcriptomique

#### *Les voies de modifications post-traductionnelles, le turnover protéique et les chaperonnes moléculaires*

Parmi les voies enrichies au sein des gènes induits en amibes, les voies de modifications post-traductionnelles, le turnover protéique ainsi que les chaperonnes moléculaires pourraient être des candidats pour la caractérisation de l'adaptation de *M. abscessus* à l'hôte amibien en particulier. Ces protéines jouent notamment un rôle clef dans l'homéostasie cellulaire et le maintien d'un milieu intracellulaire fonctionnel (Minton, 2001; Ellis, 2007). Les protéines HSP (heat shock proteins) sont un sous-groupe des chaperonnes moléculaires induites en réponse à des conditions adverses. Parmi ces conditions figurent les stress rencontrés par les micro-organismes au sein des cellules phagocytaires. Un exemple de l'amplitude de la réponse de *M. tuberculosis* à l'infection de l'hôte est l'induction 800 fois augmentée

du gène *acr* (codant la protéine HSP20) dans un modèle murin d'infection (Schnappinger *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré un rôle des protéines HSP dans la virulence des bactéries intracellulaires. Les protéines HSP peuvent être exposées à la surface ou bien être sécrétées et peuvent alors jouer le rôle d'adhésines ou de protéines immunomodulatrices. Une étude récente a mis en avant l'abondance de chaperonnes parmi les protéines sécrétées par *M. tuberculosis* lors de l'infection de macrophages (Chande *et al.*, 2015). L'antigène 65 kDa élicitant une réponse antigénique à *M. leprae* et *M. tuberculosis* est une chaperonne moléculaire (Cpn60) (Young *et al.*, 1987; Zügel and Kaufmann, 1999). Les protéines HSP70 de *M. tuberculosis* et *M. paratuberculosis* jouent elles le rôle de PAMPs capables de moduler l'activité cellulaire de l'hôte (Langelaar *et al.*, 2002; Lehner *et al.*, 2009). Enfin, la protéine Cpn10 de *M. tuberculosis* module également la signalisation extracellulaire (Meghji *et al.*, 1997). L'expression des HSP est régulée positivement par les facteurs Sigma et négativement par la protéine HspR. Chez *M. tuberculosis*, les facteurs Sigma SigE et SigG contrôlent l'expression du gène *hsp* et le facteur Sigma SigH contrôle celle des gènes codant les chaperonnes ClpB et DnaK (Raman *et al.*, 2001). Lors de l'infection des amibes, les gènes *sigH* et *sigE* de *M. abscessus* sont induits. Ces gènes sont également induits en macrophages, de même que le gène *hspR*. En fait, la sur-expression des HSP n'est pas nécessairement favorable à la survie intracellulaire. Chez *M. tuberculosis*, l'inactivation du gène *hspR* et la surexpression du gène *dnaK* résultante est corrélée à une meilleure élimination du bacille dans un modèle murin de la tuberculose. L'expression de ces protéines dans le temps et l'amplitude de cette expression doivent être probablement contrôlée pour permettre la survie intracellulaire du pathogène. De plus, des pathogènes seraient capables de recruter des chaperonnes de l'hôte pour favoriser leur multiplication intracellulaire et contrecarrer les défenses de l'hôte. Certaines protéines NAP, connues pour contrôler la conformation du chromosome et réguler de nombreux gènes, peuvent égale-

ment remplir le rôle de chaperonnes moléculaires comme GroEL1. Chez *M. tuberculosis*, cette chaperonne serait impliquée dans la capacité de la bactérie à éliciter la réponse inflammatoire de l'hôte dans un modèle murin d'infection (Hu *et al.*, 2008). Chez *M. abscessus*, le système GroEL-GroES est induit en amibes et en macrophages. Toutefois cette induction est plus forte en amibes.

Par ailleurs, si chez les mycobactéries le rôle du turnover protéique dans l'adaptation aux stress intracellulaires demeure mal connu, une étude menée sur *M. smegmatis* a démontré une augmentation du turnover protéique en exposition à des stress alcalins (Prahlad K. Rao *et al.*, 2007).

Enfin, à l'échelle moléculaire, nous avons également montré un enrichissement de protéines impliquées dans des modifications post-traductionnelles en macrophages. Chez les bactéries pathogènes *Yersinia*, *Salmonella* et *Listeria*, des effecteurs altèrent les PTM des protéines de l'hôte pour faciliter la réplication, la propagation et l'évasion des agents immunitaires (Ribet and Cossart, 2010). Chez *M. tuberculosis*, les PTM jouent un rôle clef dans la réponse à des stress exogènes via la transduction de signaux par la phosphorylation réversible des protéines. Les acteurs de ce système de défense sont des protéines kinases dont certaines font partie intégrante des systèmes de régulation à deux composantes. De façon intéressante, nos analyses transcriptomiques montrent une induction du système à deux composantes PhoP-PhoR en amibes spécifiquement. Ce système est impliqué dans la régulation de nombreux gènes et notamment de gènes impliqués dans la biosynthèse de lipides, en augmentant par exemple la production de ManLam triacylé chez *M. tuberculosis* (Bordat *et al.*, 2002; Goyal *et al.*, 2011). PhoP-PhoR régule également l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion d'ESAT-6 (Li *et al.*, 2010) et participe donc doublement au contrôle des interactions hôtes-pathogènes.

### Les voies de biosynthèse du MoCo et du transport des polyamines

L'étude des voies de biosynthèse du MoCo et de transport des polyamines, non-enrichies parmi les gènes induits de *M. chelonae* en amibes, pourrait permettre d'identifier d'autres cibles de l'apprêtement amibien, et donc possiblement des gènes de virulence, cette voie métabolique participant notamment à la résistance à la phagocytose en contribuant au blocage de la maturation phagosomale chez *M. tuberculosis* (Brodin *et al.*, 2010). Les polyamines aliphatiques, la putrescine, la spermidine et la spermine, sont des produits ubiquitaires chez les organismes vivants et sont impliquées dans la stabilisation des membranes cellulaires, la biosynthèse de molécules d'information, la croissance cellulaire et la différenciation, ainsi que l'adaptation à des stress osmotiques, ioniques, alcalins et thermiques (Tabor and Tabor, 1984; Slocum *et al.*, 1984; Tabor and Tabor, 1985; Pegg, 1986). Lors de l'infection à *M. tuberculosis*, les taux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) augmentent dans les macrophages, entraînant l'induction de l'enzyme arginase 2 (ARG2). L'ARG2 métabolise ensuite la L-arginine pour générer la production de L-ornithine, précurseur de la synthèse des polyamines. Simultanément, l'augmentation de la production d'ARG2 bloque la production d'oxyde nitrique par la nitric oxyde synthase 2 (NOS2) (Carol *et al.*, 2015), probablement par un phénomène de compétition pour la L-arginine, substrat de NOS2. Ainsi, l'induction de la synthèse de polyamines de l'hôte par le pathogène permet à celui-ci d'échapper à ses défenses microbicides, tandis que l'import des polyamines de l'hôte pourrait contribuer à la survie intracellulaire de la bactérie en participant à des processus cellulaires nécessaires à sa physiologie. Selon l'annotation fournie par le consortium Gene Ontology, 13 gènes seraient impliqués dans le transport de polyamines chez *M. abscessus*. La plupart codent des transporteurs ABC se liant à l'ATP. Six des 13 gènes potentiellement impliqués dans le transport des polyamines sont induits en amibes contre 3 en macrophages. Le criblage de la banque de mutants de transposition a montré



que le gène *MAB\_2752*, codant un transporteur de polyamines, est impliqué dans la survie intracellulaire de *M. abscessus* en amibes et en macrophages (Laencina *et al.*, 2018). Ce gène était légèrement induit en amibes mais non régulé en macrophages. Finalement, l'étude fonctionnelle de cette voie permettrait de mieux évaluer sa contribution à la virulence de *M. abscessus* et pourrait mettre en évidence des interactions de la bactérie avec les cellules-hôtes encore jamais décrites.

#### Autres voies d'intérêt et modèles d'études

Parmi les gènes induits de *M. abscessus* suite à la co-culture amibienne, des orthologues des antioxydants clefs *ahpC* et *ahpD* sont réprimés par *M. chelonae* en amibes tandis que certains gènes, conservés chez *M. chelonae*, sont exclusivement induits chez *M. abscessus* et non-conservés chez *M. tuberculosis* (*MAB\_2492* et *MAB\_2488c*). Ces gènes pourraient contribuer à la virulence singulière de *M. abscessus*. Toutefois des analyses fonctionnelles sont nécessaires pour évaluer la contribution comparée de tels gènes à la virulence de *M. abscessus* par rapport à *M. chelonae*.

Enfin, tout comme cela est rapporté chez *M. marinum* dans le modèle *D. discoideum*, le transcriptome de *M. abscessus* chez *A. castellanii* suggère que *M. abscessus* pourrait synthétiser des TAG lors de la vie intra-amibienne et les stocker ; ce qui ne semble pas être le cas en macrophages. Néanmoins, cette aptitude à synthétiser des TAG joue un rôle clef dans la pathogénèse des infections à mycobactéries pathogènes mais aussi dans la virulence de *M. abscessus* dans un modèle d'infection de macrophages spumeux (Gomez and McKinney, 2004; Zhang, 2004; Low *et al.*, 2009; Daniel *et al.*, 2011; Viljoen *et al.*, 2016). Des études sont requises pour vérifier la synthèse de TAG en amibes d'une part et évaluer d'autre part la contribution potentielle de ce phénotype à la survie de *M. abscessus* en macrophages. Pour se rapprocher du contexte rencontré chez l'homme lors de l'infection, l'emploi de souris immunodéprimées pourrait être adapté puisque chez ces souris des macrophages spumeux sont

présents 40 dpi. Un autre modèle murin d'infection, les souris Kramnik, déficientes pour le récepteur TLR-4, ont la particularité d'être sensibles aux infections à *M. tuberculosis* (Kramnik *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2005). Ainsi le rôle des voies mises en évidence par les analyses de transcriptomique et des gènes requis pour la survie en cellules de *M. abscessus* dans la phase sévère de l'infection peut être testé dans ce type de modèle. Un autre modèle, récemment mis au point au laboratoire, est un modèle CF-like construit chez la drosophile. Le devenir et la survie de mutants d'intérêt dans ce modèle pourrait contribuer à l'identification de gènes favorisant la virulence de *M. abscessus* dans des conditions mimant les contraintes physiologiques liées à la mutation du CFTR chez les individus CF et pourrait donc mener *in fine* à l'identification des pathoadaptations de *M. abscessus* spécifiques à ce contexte.

Finalement si le modèle amibien est promoteur dans la découverte de gènes de virulence chez *M. abscessus*, nous avons mis en évidence des adaptations spécifiques de *M. abscessus* à la vie intra-macrophagique comme l'induction de la voie MEP et de la voie Tat du T2SS. L'entrée dans un état métabolique ralenti de *M. abscessus* en macrophages soulignée par l'analyse des gènes réprimés, suggérait que l'induction des voies MEP ou Tat pouvait contribuer à la survie de la bactérie dans l'environnement stressant du macrophage.

La voie MEP impliquée dans la biosynthèse des isoprénoïdes (IPP, Isoprenoid Precursor Pathway), peut influencer de nombreux aspects de la biologie de la bactérie, connaissant la nature variée des isoprénoïdes (toxines, inhibiteurs de croissance, des lipoquinones). La voie MEP est conservée chez des pathogènes intracellulaires tels que *Listeria*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Brucella*, *Francisella* (Heuston *et al.*, 2012). La contribution des isoprénoïdes à la virulence de *L. monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* et *Brucella abortus* a été démontrée (Begley *et al.*, 2008; Schauer *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2001; Eskra *et al.*, 2001). Chez *K. pneumoniae*, la voie MEP est induite durant l'infection (Lai *et al.*, 2001). De la même façon, chez *B. abortus*, un

gène de la voie MEP est induit en macrophages, ce qui conduirait à l'accumulation d'antioxydants permettant la survie de la bactérie au sein des macrophages dès les premiers temps de l'infection (Eskra *et al.*, 2001). Plusieurs études suggèrent ainsi un rôle antioxydant des isoprénoïdes. Par exemple, les isoprénoïdes protègent des espèces réactives de l'oxygène (Ostrovsky *et al.*, 1998). De façon intéressante, il a été démontré qu'un intermédiaire de la voie MEP, le 2C-méthyl-D-erythritol-2,4-cyclopyro-phosphate (ou MEC), s'accumule chez les mycobactéries et les corynébactéries en réponse à des stress oxydatifs. Ainsi, le défaut de survie des mutants de la voie MEP chez *M. tuberculosis*,  $\Delta ytb$  et  $\Delta dxs$ , au sein du phagosome des macrophages pourrait être la conséquence d'une résistance réduite aux stress oxydatifs rencontrés (Pethe *et al.*, 2004). De plus, chez *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, un mutant de transposition du gène *gcpE* de la voie MEP est impacté dans sa capacité à coloniser le foie et l'intestin de souris BALB/C à la suite d'une infection intrapéritonéale (Shin *et al.*, 2006). Le gène *gcpE* est impliqué dans la bio-synthèse du 1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate (HMB-PP). Ce composé est libéré par les bactéries dans le milieu extracellulaire et stimulerait la réponse des lymphocytes T V $\beta$ 9/V $\delta$ 2 en contact avec des monocytes (Davey *et al.*, 2011). Cette capacité stimulatrice pourrait induire un état de tolérance et permettre à la bactérie d'échapper au système immunitaire (Heuston *et al.*, 2012). Chez *M. abscessus* la voie MEP n'a pas encore été étudiée. Toutefois une étude montre un enrichissement des gènes impliqués dans le métabolisme des isoprénoïdes parmi les gènes accessoires des espèces du complexe *M. abscessus*, suggérant que les isoprénoïdes pourraient jouer un rôle dans l'évolution et l'adaptation de ces espèces à différents environnements (Choo *et al.*, 2014). Finalement l'induction de cette voie durant la vie intracellulaire de *M. abscessus* pourrait être clef. Par exemple, parmi les isoprénoïdes, la ménaquinone (une lipoquinone) pourrait être déterminante.

Par ailleurs, l'étude de la contribution des gènes de la voie Tat induits chez *M. abscessus*

en macrophages pourrait contribuer à une meilleure compréhension du rôle de cette voie dans la virulence de *M. abscessus*.

Enfin, parmi les gènes particulièrement induits en macrophages figure un gène conservé chez *S. typhimurium*, *ydeD*, codant un transporteur de métabolites/antibiotiques pour lequel la contribution à la virulence n'a encore jamais été testée. Ce gène n'est pas induit lors de la co-culture amibienne. Deux autres gènes parmi les plus induits codent des protéines porteuses d'un domaine EamA dont un également induit en amibes. Certains de ces gènes pourraient contribuer à des adaptations de *M. abscessus* propres à la vie intra-macrophagique. Leur contribution à la survie intracellulaire de *M. abscessus* reste une question ouverte.

En conclusion, nous avons identifié par deux approches globales complémentaires – l'approche transcriptomique et le criblage d'une banque de mutants – les adaptations de *M. abscessus* à la vie intracellulaire et une cinquantaine de gènes contribuant à l'aptitude de *M. abscessus* à survivre à la phagocytose par les amibes ou les macrophages. L'approche transcriptomique a mis en évidence des voies métaboliques, de réponse à des stress intracellulaires et des voies de sécrétion possiblement impliquées dans la virulence de *M. abscessus*. Parmi les voies enrichies en amibes et en macrophages, la voie d'assemblage des centres Fe-S pourrait témoigner de la pathoadaptation toute particulière de *M. abscessus* par rapport à son proche parent *M. chelonae*. Enfin, ce travail apporte les premières preuves que l'apprêtement amibien de *M. abscessus* est conféré par la régulation de certains gènes cibles de l'apprêtement amibien tel que le gène *MAB\_2649* codant une protéine MmpS et apportant un avantage majeur pour la survie intracellulaire de *M. abscessus*. Nous avons également montré le rôle dans la virulence de *M. abscessus* de la protéine MmpL8, impliquée dans le transport d'un lipide complexe, et de la protéine Eis2, possiblement impliquée dans l'acétylation d'un lipide complexe. Ainsi, la découverte des cibles de l'Eis2 et de nouveau lipides complexes pourrait mener à l'identifica-

tion de nouveaux facteurs de virulence. Le tout ouvre la porte à diverses recherches futures.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## I. Identification de facteurs de virulence chez *M. abscessus*

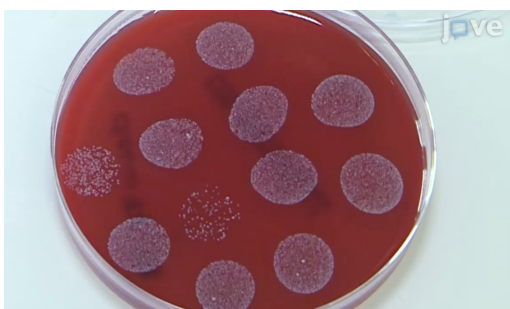
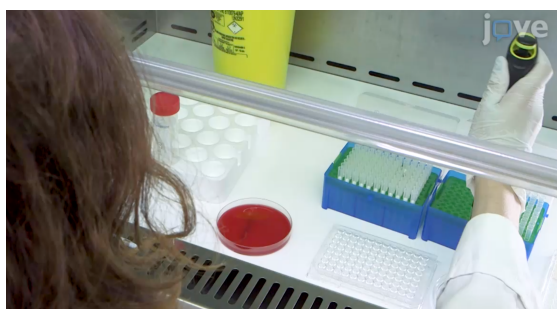
L'article suivant, publié dans Journal of Visualized Experiments (J Vis Exp.), décrit la méthodologie permettant de mettre en évidence les avantages génomiques conférés à *M. massiliense* pour sa survie dans les amibes environnementales et ses adaptations à la vie intra-amibienne. Le criblage d'une banque de mutants de *M. abscessus* est décrit, réalisé par co-culture avec la souche type d'*A. castellanii* axénisée, afin d'identifier des mutants défectueux pour leur croissance intracellulaire par dénombrement des UFC après lyse des cellules. Un second criblage en macrophages est également décrit, pour déterminer si ce défaut de croissance pour-

rait s'étendre chez l'hôte humain. Une méthode a ensuite été décrite dans le même journal permettant l'extraction de l'ARN total des bactéries intracellulaires, après co-culture en présence de l'amibe, dans le but de comprendre les mécanismes mobilisés par *M. abscessus* pour s'adapter à la vie dans les cellules phagocytaires et augmenter sa virulence chez l'hôte humain. Une méthode similaire a ensuite été mise au point pour permettre l'extraction de l'ARN total des bactéries intra-macrophagiques. Ces ARN ont ensuite été séquencés par RNAseq par la plateforme Génome et Epigénome de l'Institut Pasteur de Paris, France. A la suite de ces analyses, une vue plus complète des gènes de *M. abscessus* nécessaires à sa vie intracellulaire a été obtenue.

### Article 5

#### Identification of Virulence Markers of *Mycobacterium abscessus* for Intracellular Replication in Phagocytes

Violaine Dubois, Laura Laencina, Anouchka Bories, Vincent Le Moigne, Alexandre Pawlik, Jean-Louis Herrmann, Fabienne Girard-Misguich





## Video Article

# Identification of Virulence Markers of *Mycobacterium abscessus* for Intracellular Replication in Phagocytes

Violaine Dubois\*<sup>1</sup>, Laura Laencina\*<sup>1</sup>, Anouchka Bories<sup>1</sup>, Vincent Le Moigne<sup>1</sup>, Alexandre Pawlik<sup>2</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>1</sup>, Fabienne Girard-Misguich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>2I, UVSQ, INSERM UMR1173, Université Paris-Saclay

<sup>2</sup>Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Jean-Louis Herrmann at [jean-louis.herrmann@aphp.fr](mailto:jean-louis.herrmann@aphp.fr), Fabienne Girard-Misguich at [fabienne.misguich@uvsq.fr](mailto:fabienne.misguich@uvsq.fr)

URL: <https://www.jove.com/video/57766>

DOI: [doi:10.3791/57766](https://doi.org/10.3791/57766)

Keywords: Immunology and Infection, Issue 139, Microbiology, amoeba, *Acanthamoeba castellanii*, *Mycobacterium abscessus*, transposon library, co-culture amoeba-mycobacteria, RNA extraction of intracellular mycobacteria, RNAseq.

Date Published: 9/27/2018

Citation: Dubois, V., Laencina, L., Bories, A., Le Moigne, V., Pawlik, A., Herrmann, J.L., Girard-Misguich, F. Identification of Virulence Markers of *Mycobacterium abscessus* for Intracellular Replication in Phagocytes. *J. Vis. Exp.* (139), e57766, doi:10.3791/57766 (2018).

## Abstract

What differentiates *Mycobacterium abscessus* from other saprophytic mycobacteria is the ability to resist phagocytosis by human macrophages and the ability to multiply inside such cells. These virulence traits render *M. abscessus* pathogenic, especially in vulnerable hosts with underlying structural lung disease, such as cystic fibrosis, bronchiectasis or tuberculosis. How patients become infected with *M. abscessus* remains unclear. Unlike many mycobacteria, *M. abscessus* is not found in the environment but might reside inside amoebae, environmental phagocytes that represent a potential reservoir for *M. abscessus*. Indeed, *M. abscessus* is resistant to amoebal phagocytosis and the intra-amoeba life seems to increase *M. abscessus* virulence in an experimental model of infection. However, little is known about *M. abscessus* virulence in itself. To decipher the genes conferring an advantage to *M. abscessus* intracellular life, a screening of a *M. abscessus* transposon mutant library was developed. In parallel, a method of RNA extraction from intracellular Mycobacteria after co-culture with amoebae was developed. This method was validated and allowed the sequencing of whole *M. abscessus* transcriptomes inside the cells; providing, for the first time, a global view on *M. abscessus* adaptation to intracellular life. Both approaches give us an insight into *M. abscessus* virulence factors that enable *M. abscessus* to colonize the airways in humans.

## Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/57766/>

## Introduction

The genus *Mycobacterium* includes species ranging from harmless saprophytic organisms to major human pathogens. Well-known pathogenic species such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans* belong to the subgroup of slow-growing mycobacteria (SGM). In contrast, the subgroup of rapid-growing mycobacteria (RGM) is characterized by their ability to form visible colonies in less than 7 days on agar medium. The RGM group comprises more than 180 species, mainly non-pathogenic saprophytic mycobacteria. Studies on RGM interactions with their hosts have mainly focused on *Mycobacterium smegmatis* and demonstrate that these mycobacteria are rapidly eliminated by the bactericidal action of macrophages.

*Mycobacterium abscessus* is one of the rare RGM that are pathogenic to humans and is responsible for a wide range of infections ranging from the skin and soft tissue infections to the pulmonary and disseminated infections. *M. abscessus* is considered, along with *Mycobacterium avium*, to be the main mycobacterial pathogen in cystic fibrosis patients<sup>1</sup>.

Various studies performed on *M. abscessus* indicate that this mycobacterium behaves like an intracellular pathogen, capable of surviving the bactericidal response of macrophages and fibroblasts in the lungs and skin, which is not usually observed in RGM<sup>2,3,4</sup>. *M. abscessus* genome analysis has identified metabolic pathways typically found in environmental microorganisms in contact with the soil, plants and aquatic environments, where free amoebae are often present<sup>5</sup>. They have also demonstrated that *M. abscessus* is endowed with several virulence genes not found in the saprophytic and non-pathogenic RGM, probably acquired by the horizontal gene transfer in a niche favorable to genetic exchange that might gather various amoeba resistant bacteria.

Experimentally, one of the first striking results was the observation of intracellular growth of *M. abscessus* in macrophages as well as for *M. tuberculosis*<sup>6</sup>. *M. abscessus* also resists the acidification of the phagosome, apoptosis and autophagy, three essential mechanisms of the cellular resistance to the infection<sup>2</sup>. It has even been shown that *M. abscessus* is able to establish an immediate communication between the phagosome and the cytosol, a more nutrient-rich environment that might favor bacterial multiplication<sup>2</sup>. Very little is known about the genomic advantages that *M. abscessus* possesses or has acquired to allow survival in an intracellular environment. Amoeba coculture is an efficient method that allowed the isolation of many new amoeba resistant bacteria as *Mycobacterium massiliense*<sup>7,8</sup>. An ability to multiply within amoebae was observed, in a model of aerosolization of *M. abscessus* in mice, which can confer an increased virulence to *M. abscessus*<sup>4</sup>. One hypothesis

is that *M. abscessus* had developed genetic traits encountered within this environment to survive in phagocytic cells, which are different from other non-pathogenic RGM. These acquisitions might favor the ability to spread and its virulence in the human host.

This report describes tools and methods to highlight the genomic advantages conferred to *M. abscessus* to survive in the amoebae environment. For this purpose, the screening of *M. abscessus* transposon mutants is first described, on the *Acanthamoeba castellanii* type strain, which allows the identification of mutant's defective for intracellular growth. A second screening in macrophages is also reported, to confirm if this defect persists in the human host. Secondly, to understand which mechanisms are harnessed in *M. abscessus* to adapt to life in phagocytic cells and increase its virulence in the animal host, a method specifically adapted for *M. abscessus* was developed, after co-culture in the presence of amoebae that allowed the extraction of total RNA from intra-amoebal bacteria. As a consequence, a comprehensive view of *M. abscessus* genes that are required for an intracellular life was developed.

## Protocol

### 1. Library Screening

#### 1. Construction of the *Tn* mutant library

1. Obtain a transposon library.

NOTE: For this experiment, a transposon mutant library was obtained from E.J. Rubin, Harvard School of Public Health, Boston, USA. The library was constructed from a smooth clinical strain (43S) of the *M. abscessus* complex (*M. abscessus* subsp. *massiliense*) with a phagemid introduced into *M. abscessus* allowing the random insertion of a single *Tn* into a TA dinucleotide (91,240 TA sequences in the *M. abscessus* genome). For more details see reference of Rubin *et al.*<sup>9</sup> and Laencina *et al.*<sup>10</sup>.

#### 2. Titration of the library and conservation of the *M. abscessus**Tn* mutants in plates

NOTE: This takes one week.

1. Thaw the library on the ice. Determine the bacterial concentration by performing serial dilutions in 1 mL of water ( $10^{-1}$  to  $10^{-15}$ ). Plate a drop of each dilution on a Petri dish containing 7H11 agar medium with 250 mg/mL kanamycin. Incubate the plates at 37 °C for 3–4 days.

NOTE: Here, a titration of  $10^{11}$  bacteria/mL were recovered.

2. After determining the concentration of the library, dilute the library to a final concentration of 3,000 bacteria/mL in 10 mL of 25% glycerol-water. Aliquot the library in 10 cryotubes with 1 mL of the library in each tube. Store the aliquots at -80 °C.
3. When ready to use, thaw one aliquot of the diluted library on ice and add 100  $\mu$ L of the library to 10 square Mueller-Hinton (MH) agar plates (size 12 cm) to recover 200 to 300 individual colonies after 3–4 days of incubation at 37 °C.
4. With sterile toothpicks, transfer the individual colonies (about 6,000 colonies in 60 x 96-well plates) into 96-well plates filled with 200  $\mu$ L of 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose, 250 mg/mL of kanamycin. Incubate at 37 °C for 5 days without shaking.
5. Transfer 100  $\mu$ L of the culture (step 1.2.4) to a 96-well plate containing 100  $\mu$ L of 7H9 medium with 40% glycerol. Store the ordered library at -80 °C.
6. Repeat steps 1.2.3. to 1.2.5. with the rest of the library until 10,000 individual clones are recovered (around 100 x 96-well plate and 30 MH plates).

#### 3. Preparation of amoebae

1. Culture amoeba *Acanthamoeba castellanii* (AC) in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks at room temperature (RT) in 30 mL of PYG medium (Table 1) for amplification of the cell line<sup>11</sup>.

NOTE: Mature trophozoites from large adhesive cells with numerous digestive vacuoles are clearly visible on a microscope. The cell doubling time is estimated to be 25 h. Cells were amplified every 3 days by spreading one third of the initial culture in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks.

2. Remove the PYG medium with a 25 mL pipette. Wash the cells with 10 mL of AC buffer (Table 2), which does not contain any carbon or nitrogen sources<sup>12</sup>. Repeat the wash twice more.

NOTE: AC buffer that contains no carbon or nitrogen sources avoids the extracellular growth of mycobacteria. This minimum medium leads to the encystment of amoebae. To limit this, heat-inactivated *E. coli* were added as a substrate (step 1.4) to amoebae and very short culture times were promoted (48 h for mutant screening and 4 h or 16 h culture for RNAseq experiments). Alternatively, use this medium but enriched with PYG medium (usually 10%).

3. Detach the amoeba from the bottom of the flask with a single vigorous shake of the tissue culture flask.
4. Count cells with a hemocytometer to adjust the cell concentration to  $5 \times 10^5$  amoebae/mL diluted in AC buffer.

#### 4. Preparation of heat-inactivated *Escherichia coli* bacteria to feed amoeba after infection

1. Grow the *E. coli* clinical isolate strain from a glycerol stock in 100 mL of Luria Broth (LB) overnight at 37 °C.
2. Harvest the bacteria by centrifugation at  $1,835 \times g$  for 10 min in 50 mL tubes. Discard the supernatant. Resuspend the pellet with 10 mL of 10% glycerol-water. Repeat the washing twice more.
3. Resuspend the pellet with 5 mL of 10% glycerol-water. Aliquot 0.5 mL into 1.5 mL tubes. Determine the amount of bacteria/mL by performing serial dilutions and adding dilutions on LB agar plates. Store the aliquots at -80 °C.

4. The day before the amoeba infection, thaw one aliquot on ice and proceed to heat-killing by incubating the tube at 70 °C for 60 min. NOTE: Check the inactivation by plating 100  $\mu$ L of inactivated bacteria on LB agar plates overnight at 37 °C. No colonies should be visible after one night of culture.

5. Dilute the heat-killed bacteria to a concentration of  $10^7$  bacteria in 50  $\mu$ L of AC buffer and store the diluted bacteria at 4 °C for no more than one week.

#### 5. Co-culture of amoebae-*M. abscessus* *Tn* mutant: first screen

NOTE: This takes 3–4 months for the screening of 6,000 mutants.

1. Spread  $5 \times 10^4$  amoebae/well to a 96-well plate in 100  $\mu$ L of AC buffer. Incubate for 1 h at 32 °C without shaking. Allow the floating amoeba trophozoites time to adhere to the wells.
    1. While incubating, thaw bacteria on ice for 1 h.
  2. Add 5  $\mu$ L of the thawed bacteria cultures with an electronic multichannel pipette. Infect for 1.5 h. Screen around 6,000 individualized clones from the 96-well plate *Tn* mutants stock.
 

NOTE: The MOI is unknown at this step of the protocol; however, all the 96-well plates containing *Tn* mutants were cultivated in exactly the same way. This first screen aims to quickly identify intracellular deficient mutants, without considering the variations in inoculum density.
  3. After the 1.5 h of infection, invert the 96-well plate on sterile gauzes placed in a sterilized metal tray to remove the AC medium under a fume hood. Refill with 200  $\mu$ L of AC medium. Repeat this wash twice more.
  4. Add 200  $\mu$ L of fresh medium supplemented with 100  $\mu$ g/mL amikacin to eliminate remaining extracellular mycobacteria.
  5. Incubate for 2 h before proceeding with 3 additional washings (as described in step 1.5.3). After washing, maintain the cultures with 50  $\mu$ g/mL amikacin in 200  $\mu$ L of AC buffer.
  6. Add  $5 \times 10^7$  heat-inactivated *Escherichia coli* bacteria (from step 1.4) at the end of the infection and every 24 h to prevent encystment of amoebae.
  7. After 48 h of co-culture, lyse the cells by adding 10  $\mu$ L of 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) to each well and incubate for 30 min at 32 °C. Proceed with the serial dilution and add on Columbia agar plates containing 5% sheep blood (COS plates) to evaluate the number of intracellular mycobacteria. Seal the plate with the parafilm and incubate at 37 °C.
  8. When colonies appear on the agar plates after 3-4 days, photograph the plate and identify the mutants impaired for intracellular growth by observing the deposits with the lowest number of bacterial colonies.
 

NOTE: Do not mind about the shape, height or density of the colony (**Figure 1A**). 136/6000 mutants were identified.
- 6. Co-culture of amoebae-*M. abscessus* *Tn* mutant: second screen of the mutants identified during the first screen**
- NOTE: This takes 2 weeks. A second screen must be performed with the 136 attenuated mutants obtained after the first screen to quantify precisely the number of bacteria inoculated and the number of intracellular survival bacteria 2 days post-infection.
1. Grown 1 colony of each impacted mutant in 50 mL tubes filled with 20 mL of 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose and 250 mg/mL of kanamycin. Allow the bacteria to reach the exponential phase ( $0.6 < OD < 0.8$ ).
  2. Wash the culture by centrifugation (1,835  $\times$  g for 10 min) in AC medium. Discard the supernatant. Repeat this wash twice more with 20 mL of 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose and 250 mg/mL of kanamycin.
  3. Resuspend the bacteria in 5 mL of AC buffer.
  4. Determine the colony forming unit (CFU) concentration of the mutants. In 24-well plates, add 1 mL of water to the two first rows. Add 100  $\mu$ L of the bacterial suspension to the first well. With a micropipette, mix three times. Then, aspirate 100  $\mu$ L and deposit to the second well.
  5. With a new tip, repeat step 1.6.4 from the second well to the third one, *etc.* until the twelfth well.
  6. Aspirate 30  $\mu$ L of the  $10^{-12}$  dilution and add it to a COS plate. Repeat for the other dilutions.
  7. Wrap the COS plate with parafilm and incubate for 3-4 days at 37 °C. Determine the concentration by counting the colonies.
  8. Perform co-culture assays as described above in triplicate in a 24-well plate with  $5 \times 10^4$  amoeba per well in 1 mL of AC co-culture medium. Inoculate with a multiplicity of infection (MOI) of 10.
  9. After 48 h of co-culture, proceed with the cell lysis as described in step 1.5.7. Perform serial dilutions in water ( $10^{-1}$  to  $10^{-6}$ ) and add 30  $\mu$ L to the COS plates. Incubate the plates for 4 days at 37 °C before proceeding with CFU counting.
 

NOTE: After this second screen, 60 of 136 mutants were conserved.
  10. Store the mutants impacted for their survival inside the cells. Add a colony to a cryotube containing LB medium with glycerol (20% final) or in a cryotube containing commercial solution and microbeads to favor a long-term conservation and facilitate future inoculation and then store at -80 °C.
  11. Assess the *in vitro* mutant growth by measuring the optical density (OD) at 600 nm every 2 days.
    1. Grow 1 colony of each impacted mutant in 50 mL tubes filled with 20 mL of 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose and 250 mg/mL of kanamycin. Allow the bacteria to reach the exponential phase ( $0.6 < OD < 0.8$ ) before adjusting the OD to 0.01 to begin the kinetics.
    2. Exclude mutants with an *in vitro* growth defect when compared with the WT strain from the set of intracellular deficient mutants.
- 7. Co-culture of macrophages-*M. abscessus* *Tn* mutant defective for an intra-amoeba life**
- NOTE: This takes 1 month.
1. Spread  $5 \times 10^4$  J774.2 murine macrophages per well of a 24-well plate in 1 mL of rich medium, DMEM supplemented with 10% of Fetal Calf Serum (FCS). Incubate the plates for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> to allow macrophage adhesion. Provide 3 replicates.
  2. Perform the infection. Inoculate *Tn* mutants, with a MOI of 10, diluted in DMEM with 10% FCS in a volume of 100  $\mu$ L.
  3. After 3 h of infection, perform three washings with 1 mL of DMEM (a vacuum pump can be used). Then treat with 250  $\mu$ g/mL amikacin (in DMEM with 10% FCS) for 1 h to eliminate remaining extracellular mycobacteria.
    1. After 3 additional washes with 1 mL of DMEM, maintain the cultures in 250  $\mu$ g/mL amikacin (in DMEM with 10% FCS) to a final volume of 1 mL to prevent extracellular mycobacterial multiplication.
  4. 72 h after co-culture, remove the medium and lyse the macrophages by adding 1 mL of cold water. Incubate for 30 min at 4 °C.
  5. Perform CFU assays on COS plates to evaluate the number of intracellular bacteria.
    1. In a 24-well plate, add 1 mL of water to the two first rows. Add 100  $\mu$ L of the co-cell lysate to the first well. With a micropipette, mix three times. Aspirate 100  $\mu$ L and deposit them in the second well.
    2. With a new tip, repeat the dilution from the second well to the third one, *etc.* until the twelfth well. Then aspirate 30  $\mu$ L of the  $10^{-12}$  dilution and add it to a COS plate.
    3. Repeat for the other dilutions. Wrap the COS plate with parafilm and wait 3-4 days to observe and count the colonies.



## 8. Identification and sequencing of the site of insertion of the *Tn* in *M. abscessus* mutants

NOTE: This takes 1.5 months for 60 mutants.

### 1. Genomic extraction of the identified *M. abscessus* mutants

1. Grow the mutants in a 50 mL tube with 20 mL of 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose and kanamycin 250 mg/mL to exponential phase ( $OD_{600}=0.8$ ).
2. Harvest 10 mL of the cultures ( $2,396 \times g$ , 5 min). Discard the supernatant. Suspend the bacteria in 500  $\mu$ L of solution I (25% sucrose, 50 mM Tris pH 8, 10 mg/mL lysozyme, 40 mM thiourea). Transfer the solution into 2 mL tubes with screw cap and incubate for 2 h at 37 °C.
3. Add 500  $\mu$ L of solution II (25% sucrose, 50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA). After pipetting up and down 5-10 times, add zirconium beads until a volume of 500  $\mu$ L in the tube.
4. Proceed with cell lysis with a homogenizer (3 x 6,000 rpm, 45 s) with a 1 min incubation on ice between each round.
5. Add 5  $\mu$ L of 20 mg/mL Proteinase K (100  $\mu$ g/mL final) and incubate the samples overnight at 55 °C.
6. Add 1 mL of cold of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) under a fume hood. Mix the samples by vortexing before proceeding with centrifugation at RT and 16,500 x g for 30 min.
7. After centrifugation, recover the aqueous phase and add an equal volume of cold phenol/chloroform/isoamyl alcohol solution under a hood. Centrifuge the samples at 16,500 x g for 30 min to recover the aqueous phase again.
8. Add 0.7 volume of RT isopropanol to the recovered aqueous phase under a fume hood. Invert slowly the tubes to allow DNA precipitation and incubate 5 min at RT. Then centrifuge for 10 min at 16,500 x g and RT.
9. Remove the supernatant and wash the pellet with 500  $\mu$ L of 70% ethanol under a hood. Centrifuge the tubes for 10 min at 16,500 x g at RT before removing the ethanol. Incubate for 10 min to allow remaining alcohol evaporation.
10. Finally, suspend the DNA pellet in 100  $\mu$ L of DNase/RNase free water. Determine DNA yield and purity DNA with a spectrophotometer.
11. Remove 1  $\mu$ g of genomic DNA and digest with 10 U of *Cla*I for one night for sub-cloning the *Tn* insertion site. Use manufacturer's protocol.

NOTE: The *Cla*I enzyme is one of the most highly represented restriction enzymes in the *M. abscessus* genome (2,173 restriction sites). A *Cla*I restriction site is also found in the *Tn* sequence upstream of the kanamycin resistance cassette of the *Tn* mutant. Thus, the *Cla*I-mediated subcloning enables to identify the *Tn* insertion site.

### 2. Sub-cloning in a plasmid of genomic DNA containing the *Tn*

NOTE: Before proceeding with the *Tn*-subcloning in the 2,686 bp pUC19 ampicillin-resistant plasmid, add a *Cla*I restriction site in the multiple cloning site of the plasmid. The sequence of the pUC19 plasmid can be found at this link <https://www.addgene.org/50005/sequences/>.

1. Follow manufacturer's protocol to digest the pUC19 plasmid with *Eco*RI and *Hind*III, which releases a fragment of 51 bp and a fragment of 2635 bp. Purify the double digested vector with a commercial PCR purification kit to eliminate the 51 bp released fragment.
2. Mix 1  $\mu$ L (concentration 25 pmol/ $\mu$ L) of two complementary oligonucleotides (5'AGCT TATA AGATCT TATA ATCGAT TATA3' and 5'AAT TAA TAA TCG ATT ATA AGA TCT TAT A3') of 28 bp each containing the *Cla*I restriction site and at the ends the *Hind*III and *Eco*RI restriction sites. Heat at 100 °C for 10 min and then cool in order to bind them.
3. Digest the paired primers by *Eco*RI and *Hind*III according to manufacturer's protocol.
4. Ligate 150 ng of *Eco*RI/*Hind*III-restricted pUC19 plasmid with different concentration of paired primers (50 pmol/ $\mu$ L, 25 pmol/ $\mu$ L, 2.5 pmol/ $\mu$ L) for 1 h at RT with 1 U of T4 DNA ligase in a final volume of 20  $\mu$ L. Check the cloning by a different enzymatic digestion.
5. Digest the modified plasmid with *Cla*I for 2 h at 37 °C.
6. Ligate 50 ng of *Cla*I-restricted pUC19 plasmid and 50 ng of genomic DNA digested by *Cla*I for 1 h at RT with 1 U of T4 DNA ligase in 10  $\mu$ L.
7. Proceed to *E. coli* electrocompetent bacteria transformation with 5-10  $\mu$ L of the ligation (2500 V, 200 Ohms, 25  $\mu$ F). Select the clones on LB agar plates supplemented with 50  $\mu$ g/mL kanamycin and 50  $\mu$ g/mL ampicillin to select the bacteria bearing plasmids with portions of *Tn* sequences.
8. Grow resistant clones overnight in LB liquid medium with the appropriate antibiotic selection (50  $\mu$ g/mL kanamycin and 50  $\mu$ g/mL ampicillin).
9. Extract plasmid DNA. Check the presence of the insert by enzymatic restriction and sequence the 3' end of the *Tn* to identify the disrupted gene with an oligonucleotide (5' TTAGCGAGTCTTCTGA 3') corresponding to the last 17 base pairs of the *Tn* kanamycin resistance cassette.
10. Align the sequence against the *M. abscessus* GO 06 strain by performing a nucleotide blast (BLAST-N).

## 2. RNA Extraction of Intracellular Mycobacteria for Rnaseq Analysis

NOTE: This takes 4 months for experiments and 4 months for RNAseq analysis.

### 1. Co-culture of amoebae-*M. abscessus* in batches

NOTE: In the following experiment, co-culture is performed in 50 mL tubes with agitation to favor bacteria to cell contacts.

1. Grow *M. abscessus* in 7H9 medium supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose to the mid-exponential phase at 120 rpm.
2. Wash the bacteria twice with 10 mL of AC buffer.
3. Estimate the bacteria concentration by measuring the  $OD_{600nm}$  ( $1 OD_{600}=4 \times 10^8$  mycobacteria). Add  $8.5 \times 10^8$  mycobacteria to  $8.5 \times 10^6$  amoebae in 10 mL of AC medium.
4. Incubate for 1 h at 30 °C with gentle agitation (about 80 rpm).
5. Harvest the cells by centrifuging at 253 x g for 12 min. Remove the supernatant and suspend the cells in 10 mL of AC buffer. Repeat this wash twice more.

- Resuspend the cells in 10 mL of AC buffer containing 50 µg/mL amikacin to eliminate extracellular bacteria and incubate for 4 h at 30 °C with gentle agitation (80 rpm). Wash the cells twice again.

## 2. Extraction of total RNA from intracellular *M. abscessus*

NOTE: Perform steps 2.2.1–2.2.3 under the fume hood due to the use of toxic reagents.

- After the final washings, resuspend the infected amoebae in 4 mL of cold solution III (**Table 3**) with extemporaneously 280 µL of β-mercaptoethanol to disrupt amoebae. This is the guanidinium thiocyanate (GTC) step. Maintain the suspension on ice for 10 min. Centrifuge the cell lysate for 30 min at 2,396 x g and 4 °C to pellet the released intracellular bacteria.
- Remove the supernatant and suspend the bacterial pellet in 1 mL of cold solution III. Harvest the bacteria at 2396 x g for 30 min at 4 °C. Resuspend the pellet in 1 mL of the extraction buffer and transfer into a 2 mL screw tube containing zirconium beads (until the 500 µL gradation of the tube). Store the tubes for at least 24 h at -80 °C.  
NOTE: Storage in the lysis reagent permits the inactivation of RNases and cell dissolution.
- When ready for use, thaw samples on ice and lyse them with a homogenizer by performing two rounds at 6,000 rpm for 25 s, followed by one round at 6,000 rpm for 20 s with a 1 min incubation on ice between each round.
- To cool the sample down, incubate them on ice for 10 min. Then add 200 µL of chloroform diluted in isoamyl alcohol. After vortexing the samples for 1 min, centrifuge for 15 min at 16,500 x g and 4 °C.
- Add 0.8 mL of cold isopropanol to the aqueous phase and incubate the samples for 2–3 h at 20 °C. Centrifuge the samples for 35 min at 16,500 x g and 4 °C. Discard the supernatant.
- Wash the RNA pellet by adding 500 µL of cold 70% ethanol (do not mix).
- Centrifuge the samples at 16,500 x g for 10 min to remove the ethanol. Aspirate the solution and dry in a centrifugal concentrator.
- Once dried, resuspend the pellets in 100 µL of DNase/RNase free water.  
NOTE: Samples must be treated twice with DNases to remove DNA contaminants according to the manufacturer's recommendations.
- Assess the RNA integrity on an agarose gel and confirm by measuring the RNA integrity number (RIN) and the ribosomal ratio with a chip-based capillary electrophoresis method.  
NOTE: The RIN takes the entire electrophoretic trace into account. The RIN software algorithm allows for the classification of total RNA, based on a numbering system from 1 to 10, with 1 being the most degraded profile and 10 being the most intact. To proceed with cDNA library preparation, the RINs must be over 8 and the ribosomal ratio [28S/18S] as high as possible, the ideal value being 2, depending of the organism and its specificities.
- Store RNA samples at -80 °C until preparation of the cDNA library for sequencing.

## 3. Preparation of the cDNA library

- To proceed with library preparation, use a commercially available cDNA synthesis kit (**Table of Materials**) using the manufacturer's protocol.
- Check the library for concentration and quality on a DNA Chip.  
NOTE: More precise and accurate quantification may be performed with sensitive fluorescent-based quantitation assays.

## 4. Library sequencing

- Normalize the samples to 2 nM and proceed to multiplexing according to the flow cell organization.
- Denature the samples at a concentration of 1 nM using 0.1 N NaOH for 5 min at RT.
- Dilute the samples at 10 pM. Load each sample on the flow cell at 10 pM.
- Proceed with sequencing with a high-throughput sequencing system that enables large-scale genomics. Here the run was an SRM run (SR: Single Read, PE: Paired-end Reads, M: multiplexed samples) of 51 cycles with 7 index bases read.
- Assess the quality of the sequencing with the external FastQC program<sup>13</sup>.
- After the trimming of adapter sequences, proceed with read alignments against a reference genome. Align against the eukaryotic cell genome to assess sample contamination and, if necessary, proceed with the trimming of the non-bacterial reads.

## 5. Statistical analysis

- Use several software programs available online to define sets of differentially expressed genes: R software, Bioconductor packages including DESeq2 and the PF2tools package (version 1.2.12) developed at the platform "Transcriptome et Epigénome" (Pasteur Institute, Paris).

## Representative Results

*M. abscessus* has the ability to resist and escape the bactericidal responses of macrophages and environmental protozoa such as amoebae. *M. abscessus* expresses virulence factors when grown in contact with amoebae, which makes it more virulent in mice<sup>4</sup>. The first objective of these methods was to identify the genes present in *M. abscessus* allowing its survival and multiplication within amoebae.

For this, a mutant library of *M. abscessus* subsp. *massiliense*, obtained by *Tn* delivery<sup>9</sup>, was screened following co-culture in the presence of amoebae, to identify mutants with attenuated growth in this intracellular environment (**Figure 1**). The behavior of the same mutants was also evaluated following co-culture with macrophages to analyze whether this growth attenuation was preserved in mice macrophages.

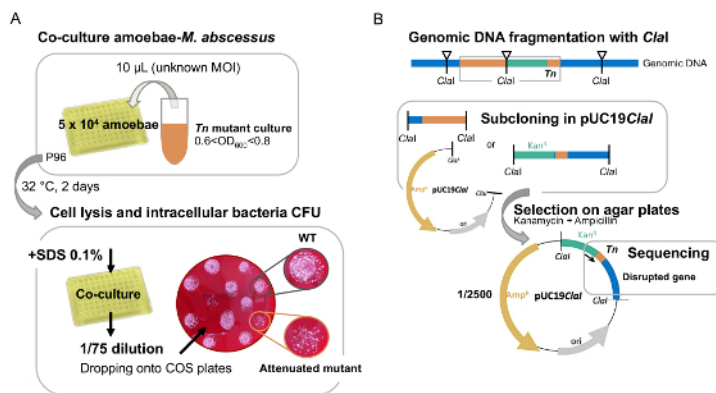
This blind transposon library screening approach, confirmed a defective replication phenotype for 47 of 6,000 mutants that had a survival of 50% or less in amoebae and/or macrophages, compared to controls<sup>10</sup>. To rule out mutants with attenuated intracellular survival that might be due to an intrinsic growth defect of the mycobacterium, the growth curves of all selected *Tn* mutants were evaluated in an *in vitro* liquid culture enriched medium (1% glucose-7H9). *In vitro* growth of all mutants was monitored by following OD<sub>600</sub> of cultures every 2 days. The different mutants that displayed an *in vitro* growth defect compared to the corresponding wild-type strain were excluded from the study.

It was vitally important for this blind test to be reproduced each day using exactly the same protocol. The limitation of this technique was at the first visual screening, photographs were taken of each CFU to provide an accurate image for reference. In this group of mutants, 12 *M. abscessus* mutants (included duplicates) were identified in which the transposon was inserted into genes belonging to the ESX-4 locus of the type VII secretion system which underlines its importance in the intracellular growth of *M. abscessus*<sup>10</sup>.

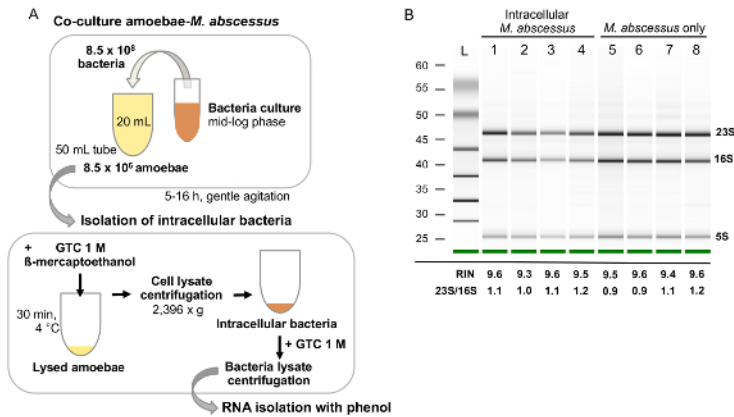
Up until now, the analysis of *M. abscessus* virulence has essentially been based on the comparative analysis of the genome of *M. abscessus* with that of *M. chelonae*, a mycobacterium belonging to the same group but causing only infections of the skin in humans. The objective was to obtain a catalogue of the genes expressed during different co-culture conditions in order to better understand the adaptation and potentially virulence mechanisms involved during co-culture in the presence of environmental professional phagocytes. Analysis of this increased virulence through a comprehensive approach of total sequencing messenger RNAs of *M. abscessus*, was performed in order to detect the RNAs induced or repressed during amoeba co-cultures compared to the RNAs transcribed under *in vitro* conditions. The differential expression of these RNAs can confer to *M. abscessus* an enhanced "virulence" explaining the colonization of the upper airways in humans.

These co-cultures were again carried out in a minimum medium (no source of carbon or nitrogen) as described above, in order to prevent the extracellular growth of *M. abscessus* and to be representative of the environmental conditions faced by these mycobacteria and under the pressure of selection of an antibiotic throughout the duration of co-culture to select intracellular mycobacteria.

Therefore, a technique was developed to isolate the RNA from intracellular mycobacteria. The main difficulty with this extraction of mycobacterial RNA was avoiding contamination with amoebal RNA (Eukaryote type). To avoid this, lysis of amoeba was performed at different times post co-culture, using guanidinium thiocyanate (GTC); since intracellular mycobacteria are resistant. After this step, a mechanical extraction of the mycobacterial RNAs was carried out using a cell-homogenizer in the presence of zirconium beads. This technique allowed us to obtain mycobacterial RNA of good quality, with a RIN number of high quality, essential to improve the ability to undertake a complete analysis of the *M. abscessus* transcriptome, using the messenger RNA sequencing (mRNA) technique (Figure 2). This has never been done before and gave us a fundamental vision of the gene families induced or repressed, by grouping them according to their role: the response of *M. abscessus* to an environment limited in its source of nutrients and minerals, to a hypoxic or acidic environment and resistance of *M. abscessus* to oxidative and nitrosative stress and finally expression of the virulence of *M. abscessus* in environmental amoeba.



**Figure 1: A. First visual screen of *M. abscessus* *Tn* mutants in amoeba. (A)** large-scale screen of *Tn* mutants on amoebae is performed in 96-well plates with a random multiplicity of infection to quickly identify attenuated mutants. **(B)** Identification of the attenuated *Tn* mutants disrupted genes. *Tn* mutants' genomic DNA is fragmented with *Cla*I to clone the *Tn* insertion site. *M. abscessus* genomes harbors 2500 *Cla*I restriction sites which favors the obtaining of short DNA fragments but lowered the probability to clone the *Tn* insertion site (1/2500). The clones are selected with kanamycin, resistance bear by the transposon. The disrupted gene is identified by sequencing with a primer inside the *Tn* kanamycin resistance cassette (black arrow). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 2: Analysis of mycobacterial RNA extraction. (A)** RNA extraction of intracellular *M. abscessus* during amoebae-*M. abscessus* co-culture. Amoebae co-cultures with *M. abscessus* are performed at a high multiplicity of infection (*i.e.*, 100), in large volumes, with gentle agitation, to favor cell to bacteria contacts. After co-cultures, cells are harvested and lysed with a combination of GTC and β-mercaptoethanol. The cell lysate-containing bacteria is treated with GTC again to weaken the bacteria cell wall to facilitate bacteria mechanic lysis prior to RNA extraction. **(B)** RNA quality and integrity assessment with a bioanalyzer. An electrophoresis gel is given on which rRNA is observed (23S, 16S and 5S). RIN must be above 8 to proceed with library preparation for sequencing and rRNA ratios (23S/16S) as high as possible depending on the organism, the ideal value being 2. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

## Discussion

The behavior of *M. abscessus* is much more similar to the behavior of pathogenic SGM such as *M. tuberculosis* than any other mycobacteria belonging to RGM<sup>2</sup>. The key element in the pathogenicity of SGM is their ability to survive or even multiply within antigen-presenting cells, such as macrophages and dendritic cells.

*M. abscessus* has acquired certain genomic advantages as shown by the total sequence of its genome<sup>14</sup> in order to survive within a eukaryotic phagocytic cell. The genome of *M. abscessus* has been shown to be rapidly evolving and very plastic, with many recently introduced insertion sequences such as prophages and new genes<sup>15</sup>. Although there is less data on virulence factors in *M. abscessus* compared to *M. tuberculosis*, *M. abscessus* seems to be able to evolve rapidly and actively towards increased virulence. Until now, the analysis of *M. abscessus* virulence was essentially based on the comparative analysis of the genome of *M. abscessus* with that of *M. chelonae*, a mycobacterium belonging to the same group but causing infections limited to the skin in humans. Some genes not present in *M. chelonae* but present in *M. abscessus*, such as phospholipase C, have partially explained the resistance of *M. abscessus* after phagocytosis by environmental amoebae<sup>4</sup>.

The development of an amoeba co-culture technique supplemented with environmental samples has demonstrated unambiguously amoeba-mycobacterial interactions<sup>16,17</sup>. Thus, mycobacteria could be isolated from lysates co-cultured in the presence of amoebae in a water treatment plant<sup>18</sup>, and *M. massiliense* was isolated from the sputum of a patient after co-culture with amoebae, whereas the culture alone did not allow the isolation of this mycobacteria<sup>8</sup>. Amoebae are increasingly considered as an incubator for mycobacteria<sup>4</sup> and *Acanthamoebasp.* as a natural environmental host for many non-tuberculous mycobacteria. Amoeba plus mycobacteria co-culture systems are increasingly being proposed as simple and rapid models to characterize factors involved in the intracellular growth of mycobacteria<sup>19,20,21,22,23,24</sup>.

In the environment, the interaction between mycobacteria and amoebae is poorly documented. The first article describing evidence of an association between mycobacteria and amoebae in the field came out in 2014, and this study focused on an analysis of a drinking water network<sup>25</sup>.

To our knowledge, this is the first screening described during a co-culture with amoebae. This study allowed us to demonstrate the role played by environmental phagocytes in the acquisition of virulence of an opportunistic pathogen affecting humans. In order to highlight those genes required for the intracellular survival of *M. abscessus*, a screen of a mutant library by transposition was carried out in a subspecies of the *M. abscessus* complex and in a clinical strain. This mutant library was screened with amoebae, this last having been demonstrated as a "training ground" for increasing the virulence of *M. abscessus* in mice<sup>4</sup>, similar to that observed with *M. avium*<sup>26</sup>. The major result was the discovery for the first time in mycobacteria of the essential role of the ESX-4 locus encoding a type VII secretion system, and ancestor of the ESX-1 locus considered essential for virulence and intracellular survival of *M. tuberculosis* *Mycobacterium microti* and *M. marinum*<sup>27,28,29,30,31</sup>.

The second objective was to obtain a catalogue of the genes expressed during different co-culture conditions in order to better understand the adaptation and potential virulence mechanisms involved during co-culture in the presence of environmental professional phagocytes. Analysis of this increased virulence through a comprehensive approach of total sequencing of messenger RNAs of *M. abscessus*, was performed in order to detect the RNAs induced or repressed during amoeba co-cultures compared to the RNAs transcribed under *in vitro* conditions. The differential expression of these RNAs can confer to *M. abscessus* an enhanced "virulence" explaining the colonization of the upper airways in humans. Among RGM species, *M. abscessus* is an exception to the non-pathogenic phenotype along with *M. chelonae*. The ability of *M. abscessus* to cause similar pathologies to tuberculous mycobacteria makes it even more unique. Many studies have reported the intracellular adaptations of *M. tuberculosis* to life inside macrophages<sup>32,33</sup> but none have focused on *M. abscessus* adaptations *in vivo*. Transcriptional response of *M. abscessus* to hypoxia has been described<sup>34</sup> though, highlighting the role of mycobactins and the dosR regulon as described in *M. tuberculosis*. Analysis of the *M. abscessus* transcriptome inside amoebae and macrophages gives an insight into the bacterial adaptations to intracellular life *per se*. A comparison of those transcriptomes permits the assessment of the role of amoebae in triggering *M. abscessus*

virulence in humans and to the deciphering of specific adaptations to mammalian phagocytic cells. A supposition was made that the amoebal environment might constitute a 'training ground' for *M. abscessus* before transfer to human cells, in order to describe *M. abscessus* virulence in terms of evolutionary adaptations, renders this approach original.

## Acknowledgements

We greatly acknowledge Pr. E.J. Rubin (Harvard Medical School, Boston, USA) for the precious gift of the mutant library, and Dr. Ben Marshall (Faculty of Medicine, University of Southampton, UK) for the corrections of the manuscript. We greatly acknowledge the French Patient Association for Cystic Fibrosis "Vaincre la Mucoviscidose" and "L'Association Gregory Lemarchal" for their financial support (RF20150501377). We also thank the National Agency for Research (ANR program DIMIVYR (ANR-13-BSV3-0007-01)), and the Région Ile-de-France (Domaine d'Intérêt Majeur Maladies Infectieuses et Emergentes) for funding the postdoctoral fellowship to V.L.M. L. L. is a doctoral fellow from the "Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

## References

1. Qvist, T. *et al.* Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. **15** (3), 380-385 (2016).
2. Roux, A.-L. *et al.* The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biology*. **6** (11), 160185 (2016).
3. Castañeda-Sánchez, J. *et al.* Defensin Production by Human Limbo-Corneal Fibroblasts Infected with *Mycobacteria*. *Pathogens*. **2** (4), 13-32 (2013).
4. Bakala N'Goma, J.C. *et al.* *Mycobacterium abscessus* phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances *M. abscessus* virulence in mice. *Infection and Immunity*. **83** (2), 780-791 (2015).
5. Ripoll, F. *et al.* Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *Public Library of Science One*. **4** (6), e5660 (2009).
6. Tailleux, L. *et al.* Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Journal of Immunology*. **170** (4), 1939-48 (2003).
7. Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J., Greub, G. Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. *Journal of Visualized Experiments*. (80), e51055 (2013).
8. Adékambi, T. *et al.* Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (12) (2004).
9. Rubin, E.J. *et al.* In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96** (4), 1645-1650 (1999).
10. Laencina, L. *et al.* Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth *in vivo*. with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **115** (5), E1002-E1011 (2018).
11. Rowbotham, T.J. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *Journal of Clinical Pathology*. **36** (9), 978-986 (1983).
12. Moffat, J.F., Tompkins, L.S. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity*. **60** (1), 296-301 (1992).
13. *FastQC program*. at <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2018).
14. Ripoll, F. *et al.* Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *Public Library of Science One*. **4** (6), e5660 (2009).
15. Choo, S.W. *et al.* Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary potential. *Science Reports*. **4** (2015).
16. Greub, G., Raoult, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. **17** (2), 413-433 (2004).
17. Kicka, S. *et al.* Establishment and Validation of Whole-Cell Based Fluorescence Assays to Identify Anti-Mycobacterial Compounds Using the *Acanthamoeba castellanii* - *Mycobacterium marinum* Host-Pathogen System. *Public Library of Science One*. **9** (1), e87834 (2014).
18. Thomas, V., Loret, J.-F., Jousset, M., Greub, G. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology*. **10** (10), 2728-2745 (2008).
19. Lamrabet, O., Medie, F.M., Drancourt, M. *Acanthamoeba* polyphaga-enhanced growth of *mycobacterium smegmatis*. *Public Library of Science One*. **7** (1) (2012).
20. Cosson, P., Soldati, T. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **11** (3), 271-6 (2008).
21. Lelong, E. *et al.* Role of magnesium and a phagosomal P-type ATPase in intracellular bacterial killing. *Cellular microbiology*. **13** (November 2010), 246-258 (2011).
22. Ouertatani-Sakouhi, H. *et al.* Inhibitors of *Mycobacterium marinum* virulence identified in a *Dictyostelium discoideum* host model. *Public Library of Science One*. **12** (7), e0181121 (2017).
23. Trofimov, V. *et al.* Antimycobacterial drug discovery using *Mycobacteria*-infected amoebae identifies anti-infectives and new molecular targets. *Science Reports*. **8** (1), 3939 (2018).
24. Cardenal-Muñoz, E., Barisch, C., Lefrançois, L.H., López-Jiménez, A.T., Soldati, T. When Dicty Met Myco, a (Not So) Romantic Story about One Amoeba and Its Intracellular Pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **7**, 529 (2017).
25. Delafont, V. *et al.* First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environmental Science & Technology*. **48** (20) (2014).
26. Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and Immunity*. **65** (9) (1997).
27. Stamm, L.M. *et al.* *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *Journal of Experimental Medicine*. **198** (9), 1361-8 (2003).
28. Groschel, M.I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., Brosch, R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews Microbiology*. **14** (11), 677-691 (2016).

29. Pym, A.S. *et al.* Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nature Medicine*. **9** (5), 533-539 (2003).
30. Hsu, T. *et al.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100** (21), 12420-12425 (2003).
31. Smith, J. *et al.* Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infection and Immunity*. **76** (12), 5478-87 (2008).
32. Schnappinger, D. *et al.* Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. within Macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. **198** (5), 693-704 (2003).
33. Fontan, P., Aris, V., Ghanny, S., Soteropoulos, P., Smith, I. Global Transcriptional Profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 Human Macrophage Infection. *Infection and Immunity*. **76** (2), 717-725 (2008).
34. Miranda-CasoLuengo, A.A., Staunton, P.M., Dinan, A.M., Lohan, A.J., Loftus, B.J. Functional characterization of the *Mycobacterium abscessus* genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence. *BMC Genomics*. **17** (1), 553 (2016).



Materials List for:

# Identification of Virulence Markers of *Mycobacterium abscessus* for Intracellular Replication in Phagocytes

Violaine Dubois<sup>\*1</sup>, Laura Laencina<sup>\*1</sup>, Anouchka Bories<sup>1</sup>, Vincent Le Moigne<sup>1</sup>, Alexandre Pawlik<sup>2</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>1</sup>, Fabienne Girard-Misguich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>2I, UVSQ, INSERM UMR1173, Université Paris-Saclay

<sup>2</sup>Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Jean-Louis Herrmann at [jean-louis.herrmann@aphp.fr](mailto:jean-louis.herrmann@aphp.fr), Fabienne Girard-Misguich at [fabienne.misguich@uvsq.fr](mailto:fabienne.misguich@uvsq.fr)

URL: <https://www.jove.com/video/57766>

DOI: [doi:10.3791/57766](https://doi.org/10.3791/57766)

## Materials

Name	Company	Catalog Number	Comments
<b>Name of Material/ Equipment</b>			
24-well plates	Thermofisher	11874235	
96-well plates	Thermofisher	10687551	
Beadbeater	Bertin	Precellys 24	
Bioanalyzer	Agilent		
Genepulser Xcell	Biorad		
Nanodrop spectrophotometer 2000	Thermofisher		
QuBit fluorometer	Thermofisher	Q33226	
zirconium beads/silica beads	Biospec products	11079101Z	Beads
<b>Name of reagent/cells</b>			
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	ATCC	30010	strain
Amikacin	Mylan	150927-A	powder
B-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250	solution
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	C1016	>93% granular anhydrous
Chloroform	Fluka	25666	solution
Clal enzyme	New England Biolabs	R0197S	enzyme
Columbia agar	Biomerieux	43041	90 mm
D-Glucose	Sigma-Aldrich	G8270	powder
DMEM	Thermofisher	11500596	medium
DNase and RNase free water	Invitrogen	10977-035	solution
<i>E. coli</i> electrocompetent	Thermofisher	18265017	bacteria
EDTA	Sigma-Aldrich	E4884	powder
<i>Escherichia coli</i>	Clinical isolate	personal stock	bacteria
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )-6H <sub>2</sub> O	EMS	15505-40	sulfate solution 4% aqueous
Fetal Calf Serum	Gibco	10270	serum
Glycerol	Sigma-Aldrich	G5516	solution
Guanidium thiocyanate	Euromedex	EU0046-D	powder
Isopropanol	Sigma-Aldrich	I9516	solution
J774.2 macrophages	Sigma-Aldrich	J774.2	Strain
kanamycin	Sigma-Aldrich	60615	powder
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	P0662	Monobasic, anhydrous
LB liquid medium	Invitrogen	12795-027	powder



Lysozyme	Roche	10837059001	powder
MgSO <sub>4</sub>	Labosi	M275	pur
Microbank TM (cryotubes with beads)	Pro-Lab Diagnostic	PL.170/M	
Middlebrook 7H11 medium	Sigma-Aldrich	M0428	powder
Middlebrook 7H9 medium	Thermofisher	11753473	powder
Müller-Hinton agar	Biorad	3563901	powder
N-Lauryl-sarcosine	Merck	S37700 416	powder
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich	S9390	98-102%
Phenol/chloroforme	Sigma-Aldrich	77617	solution
Proteinase K	Thermofisher	EO0491	powder
proteose peptone	BD	211684	enzymatic digest of animal tissue
pUC19 plasmid	New England Biolabs	54357	plasmid
SDS 20%	Biorad	1610418	solution
Sodium citrate	Calbiochem	567446	powder
Thiourea	Sigma-Aldrich	88810	powder
Tris	Sigma-Aldrich	154563	powder
Trizol	Thermofisher	12044977	solution
Tween 80	Sigma-Aldrich	P1754	solution
Yeast extract	BD	212750	
<b>Kit</b>			
AMBION DNase kit	Thermofisher	10792877	kit
DNA Agilent Chip	Agilent	5067-1504	kit
GeneJET Plasmid Miniprep kit	Thermofisher	K0503	kit
PureLink PCR Purification kit	Invitrogen	K310001	kit
Quant-It" assays kit	Thermofisher	Q33140/Q32884	kit
T4 DNA ligase	Invitrogen	Y90001	kit
TruSeq Stranded RNA LT prep kit	Illumina	15032611	kit

## II. Analyse *in silico* des données de transcriptomique

### 2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Un isolat clinique d'un variant S de *M. massiliense* (43S) et la souche type CCUG 47445 de *M. chelonae* ont été utilisés pour les expériences de RNAseq. Les souches de *M. massiliense* et de *M. chelonae* ont été cultivées en routine en aérobose à 37 °C et 32 °C respectivement, dans le milieu Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 0,2% de glycérol, 1% de glucose.

### 2.2 Core-génomés *M. massiliense* GO 06-*M. abscessus* ATCC 19977 et *M. massiliense* GO 06 - *M. chelonae* CCUG 47445

Les séquences protéines du génome de la souche *M. massiliense* GO 06<sup>5</sup>, de la souche CCUG (Cultutre Collection University of Gothenburg) 47445 de *M. chelonae*<sup>6</sup> ainsi que de la souche type ATCC (American Type Culture Collection) 19977 de *M. abscessus*<sup>7</sup> ont été téléchargées depuis le site NCBI ou National Center for Biotechnology Information<sup>8</sup>. Le core-génome des souches *M. massiliense* GO 06 - *M. abscessus* ATCC 19977 et *M. massiliense* GO 06 - *M. chelonae* ATCC a été obtenu par des blasts réciproques (BBH, bidirectional best hit) sur génome entier, réalisés avec le programme OpSCAN avec les options “-H” and “-O”<sup>9</sup>.

Les équivalences obtenues avec la souche types de *M. abscessus* ont une utilité double : **(1)** la souche 43S étant résistante à de multiples antibiotiques, les études fonctionnelles sont menées dans la souche type de *M. abscessus* ; **(2)** certaines annotations ne sont pas disponibles pour la souche *M. massiliense* GO 06 limitant les analyses *in silico*.

<sup>5</sup> [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1360?genome\\_assembly\\_id=204562](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1360?genome_assembly_id=204562)

<sup>6</sup> [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11088?genome\\_assembly\\_id=274558](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11088?genome_assembly_id=274558)

<sup>7</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1360>

<sup>8</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<sup>9</sup> [www.abi.snv.jussieu.fr/public/opscan/](http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/opscan/)

### 2.3 Comparaison des jeux de données

Une première façon de comparer les jeux de données issus de la transcriptomique (à savoir les gènes différentiellement exprimés), consiste à reporter le niveau de régulation des gènes le long du génome (Schnappinger *et al.*, 2003). Pour comparer les transcriptomes de *M. massiliense* et de *M. chelonae* en amibes, les équivalences (BBH) obtenues entre les souches GO 06 de *M. massiliense* et CCUG 47445 de *M. chelonae* ont été employées et les DEGs d'une condition sont représentés en fonction d'une autre condition sur un graphique à 4 quadrants représentant des régulations opposées entre les deux conditions ou des régulations de même sens.

### 2.4 Annotation COG

L'annotation COG du génome de la souche *M. massiliense* GO 06 a été obtenue sur le site MaGe (Microbial Genome Annotation) correspondant au chromosome NC\_018150<sup>10</sup>. Cette annotation a été employée afin de comparer la proportion de COG assignées aux gènes différentiellement exprimés à celle assignée au génome. La sur- ou sous-représentation peut être déterminée par un test exact de Fisher.

### 2.5 Analyse d'enrichissement des Gene Ontology

L'annotation des Gene Ontology du génome de la souche type de *M. abscessus* a été téléchargée depuis la base de données MycoBase (Garcia *et al.*, 2015)<sup>11</sup>. L'analyse d'enrichissement des Gene Ontology appliquée aux données de transcriptomique a été réalisée avec le package topGO de Bioconductor (Alexa *et al.* 2016).

## III. Etudes fonctionnelles issues des données de transcriptomique

### 3.1 Construction de mutants par double recombinaison, tests de la viabilité des mu-

<sup>10</sup> <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/genomic/classifCOG.php>

<sup>11</sup> <http://strong.ucdenver.edu/mycobase>

### tants *in vitro* et complémentation fonctionnelle

Afin d'étudier l'effet de certains gènes mis en avant par le crible de la banque de mutants ou par l'étude transcriptomique, des délétions géniques réalisées avec la souche lisse type de *M. abscessus* sont obtenues par un système de recombinaison homologue efficace chez les mycobactéries (Kessel and Hatfull, 2007; Medjahed and Singh, 2010). Un schéma illustrant le principe de ce système est donné dans la Figure 3 des données supplémentaires de l'Article 3 (Dubois *et al.*, 2018b). Les détails de la méthode sont également décrits dans cet article. Les mutants sélectionnés sont résistants à la zéocine. La souche type ATCC 19977 de *M. abscessus* et la souche de type CCUG 47445 de *M. chelonae* ont été utilisées pour réaliser des tests de survie intracellulaire et de complémentation. La méthode de complémentation fonctionnelle est également rapportée. La complémentation est réalisée avec un plasmide intégratif, pMVh361, apportant une résistance à l'hygromycine. L'expression des gènes clonés dans ce plasmide dépend d'un promoteur fort (*hsp60*).

La souche type de *M. abscessus* a été cultivée dans les mêmes conditions que la souche *M. massiliense* 43S. Les souches mutées sont cultivées dans le milieu de culture 7H9 supplémenté de zéocine (25 mg/mL) et d'hygromycine (250 mg/mL) pour la culture des souches complémentées. La croissance *in vitro* des souches mutées est vérifiée par mesure journalière pendant 7 jours de la densité optique (OD, optical density) à 600 nm dans 20 mL d'une culture supplémentée avec du glucose 1% comprenant initialement  $4 \cdot 10^6$  bactéries ( $OD_{600 \text{ nm}} = 0.01$ ).

### 3.2 Analyse de la virulence des mutants en modèles cellulaires et animaux

Les modèles cellulaires employés pour tester la virulence des souches mutées sont ceux employés pour les méthodes globales d'identification de facteur de virulence, à savoir la souche axénisée de l'amibe *A. castellanii*, une lignée immortalisée de macrophages murins (J774.2) et une lignée cellulaire pro-monocytaire

d'origine humaine (THP-1). La méthode de co-culture est précisément décrite dans l'article vidéo présenté plus haut (Article 5, Dubois, *et al.*, 2018a). Des tests ont également été menés avec le modèle du poisson zèbre pour lesquels la méthode est décrite dans l'Article 3 (Dubois *et al.*, 2018b).

### 3.3 Test de l'apprêtement à la vie intramacrophagique

Le test de l'apprêtement à la vie intramacrophagique a été adapté de Bakala N'Goma *et al.*, 2015. Brièvement,  $10^6$  amibes ont été co-cultivées avec la souche type de *M. abscessus* ou de *M. chelonae* à 32°C à une MOI de 25 pendant 72 h selon le protocole décrit dans l'Article 5 (Dubois, *et al.*, 2018a). Les cellules ont été lysées avec du SDS 0,1% pour récupérer, par centrifugation du lysat à 4000 RPM pendant 10 min, les bactéries intracellulaires. Les bactéries sont lavées une fois avec du PBS (phosphate buffered saline) et finalement resuspendues dans une solution de PBS contenant 10% de glycérol pour la conservation à -20°C. La concentration de ces batchs d'infection est déterminée par comptage des UFC de dilutions sériées. Quatre-vingt-dix-mille macrophages ont été infectés pendant 2 h, à 32°C, avec les batch d'infection resuspendus dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF inactivé et ce à faible MOI (MOI de 1). Après différents lavages et traitements antibiotiques selon le protocole décrit dans l'Article 5 (Dubois, *et al.*, 2018a). Les co-cultures sont maintenues à 32°C pendant 48 h en milieu supplémenté avec de l'amikacine (50 mg/L). A l'issue de l'infection, les cellules sont lysées avec de l'eau froide et les UFC sont réalisées par dilution sériée des lysats dans de l'eau puis dépôt sur gélose de type COS (Biomérieux).

### 3.4 Test de l'adhésion des mycobactéries aux macrophages par cytométrie en flux

Ce test est décrit dans l'Article 3 (Dubois *et al.*, 2018b) et a été adapté de Hytönen *et al.*, 2006. Il permet l'identification de la population de macrophages à laquelle les bactéries ont adhéré par marquage des bactéries avec le composé fluorescent CFDA-se (carboxyfluorescein

diacetate succinimidyl ester, Thermofisher), perméable aux bactéries. Les macrophages et les bactéries n'ont pas les mêmes propriétés de granulométrie et de taille ce qui permet de distinguer les populations de bactéries seules des populations de cellules sur lesquelles les bactéries se sont fixées.

### 3.5 Détermination du devenir intracellulaire : mesure de l'acidification et de la rupture phagosomale

Le test d'acidification phagosomale a été adapté des articles Pethe *et al.*, 2004 et Roux *et al.*, 2016. Le principe de ce test est illustré dans la **Figure 18A**. Succinctement, des bactéries exprimant un plasmide mCherry sont marquées en surface par une solution de FITC (fluorescein isothiocyanate) à 100 µg/ml (Sigma-Aldrich), un fluorochrome qui émet à une longueur d'onde différente en fonction du pH. Les macrophages sont infectés à une MOI de 10 pendant 15 min et une mesure séquentielle de la fluorescence émise par le FITC (485 nm) et la protéine mCherry (565 nm) synthétisée par les bactéries est réalisée toutes les 5 min pendant 30 min. Une courbe de pH standard a été établie grâce à une série de tampons standards de pH allant de 4,6 à 7,6, ce qui permet d'inférer la valeur du pH intraphagosomal à un temps donné.

Le test de la rupture phagosomale a été réalisé selon la méthode décrite par Simeone *et al.*, 2012 et en collaboration avec le Dr Laleh Majlessi (Institut Pasteur, Paris, France). Le principe de cette méthode est illustré par la **Figure 18B**. Elle repose sur le shift de fluorescence du composé CCF-4 après sa rupture par une  $\beta$ -lactamase bactérienne. L'intégrité des cellules est par ailleurs vérifiée par reconnaissance d'un antigène de surface par l'anticorps fluorescent anti-CD11b-APC (BD). La rupture phagosomale est associée à la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , maturée par la voie dépendante de la Caspase-1, et à la sécrétion d'INF- $\beta$  chez *M. tuberculosis*. Chez *M. abscessus* l'infection des cellules n'induit pas l'expression d'INF- $\beta$  (Aulicino *et al.*, 2015). Seul l'IL-1 $\beta$  est donc mesuré avec le kit DuoSet ELISA development system Human IL-1 $\beta$  (R&D systems).

L'ensemble de ces tests est décrit dans l'Article 3 et l'Article 6 en annexes.

### 3.6 Test de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène

La sensibilité au peroxyde d'hydrogène a été évaluée par culture des bactéries en milieu 7H9 en présence de peroxyde d'hydrogène 3% (Laboratoires Gilbert) à une concentration finale de 20 µm pendant 8 heures, à 37°C, avec agitation (120 RPM/min). La quantité de bactéries vivantes après différents temps d'incubation a été déterminée par comptage des UFC de dilutions sériées.

### 3.7 Test de la croissance en milieu déplété en fer

Pour mimer une condition rencontrée par la bactérie dans le phagosome, une déplétion artificielle en fer peut être créée en ajoutant un chélateur de fer au milieu de culture des bactéries. Dans notre étude, nous avons utilisé le 2,2-dipyridyl (Sigma-Aldrich). Ce produit est dilué à 50 µm en milieu 7H9 et la mesure de croissance des bactéries dans ce milieu est comparée à celle en milieu 7H9 par mesure de la densité optique à 600 nm.

### 3.8 Réponse des cellules à l'infection : mesure de la production de ROS, viabilité cellulaire et autophagie

La production de ROS par les cellules a été évaluée 15 min après l'infection par cytométrie en flux à l'aide du kit MitoSOX Red (Thermofisher). Le réactif MitoSOX Red pénètre dans les cellules vivantes où il cible les mitochondries de manière sélective. Il est oxydé rapidement par l'ion superoxyde et non par d'autres dérivés réactifs de l'oxygène et dérivés réactifs d'azote.

En parallèle, la viabilité des cellules infectées est mesurée avec le kit Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis (Thermofisher) pour la cytométrie en flux selon les recommandations du fournisseur.

L'autophagie des cellules infectées a été mesurée avec le kit Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B (Thermofisher). De la chloroquine est fournie par le kit comme témoin négatif de

l'expérience (culture de 48 h à 30 µm). Une solution de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco) est employée comme témoin positif (culture de 2 h). Pour l'analyse en microscopie confocale, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% et le noyau des cellules est marqué à l'Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Au moins 40 cellules par condition ont été analysées par microscopie confocale. Le nombre de particules autophagiques par cellule et l'acidification des autophagosomes ont été déterminés à l'aide du logiciel Fiji.

#### IV. Etudes phylogénomiques

Pour décrire l'histoire évolutive des familles de protéines MmpL et MmpS dans le but de fournir une annotation reflétant l'histoire naturelle de ces familles chez les mycobactéries, nous avons entrepris des études phylogénomiques. Ces études ont été réalisées en collaboration avec R. C Rodriguez de la Vega (Université Paris-Sud 11, Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, France), L. A. Galindo (UVSQ, U1173, France) et E. Dumas (Université Paris-Sud 11, laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, France).

##### 4.1 Phylogénie des mycobactéries

R. C de la Vega, L. A. Galindo

Une phylogénie de 76 espèces a été construite à partir des orthogroupes majoritairement conservés (à 75%) dans les génomes de ces espèces, ce qui représente 396 orthogroupes. Deux méthodes indépendantes (la méthode des maximums de ressemblance et la méthode bayésienne) ont été employées.

##### 4.2 Obtention d'un HMM des MmpL et MmpS mycobactériennes

V. Dubois, E. Dumas

Pour détecter les protéines contenant un domaine MmpL/MmpS avec une sensibilité et une spécificité élevées, une « seed » de plusieurs protéines contenant un domaine MmpL/MmpS hautement conservé a été construite à l'aide du logiciel oméga Clustal (Sievers et Higgins, 2014) et de Skylign (Wheeler *et al.*, 2014). Les

séquences alignées sont des séquences complètes. Une séquence protéique consensus est obtenue en sélectionnant l'acide aminé le mieux conservé à chaque position des alignements.

##### 4.3 Identification des séquences de MmpL et MmpS chez 76 génomes mycobactériens

V. Dubois, R. C de la Vega

Les protéines MmpL et MmpS sont identifiées dans plus de 100 souches mycobactériennes par blast du HMM contre les séquences fasta des acides aminés des souches considérées. Une autre méthode consistant à blaster les 100 premiers nucléotides conservés dans ces familles de gènes a été employée pour identifier les séquences nucléotidiques des MmpL et des MmpS chez ces souches.

##### 4.4 Identification des orthogroupes et profils phylogénomiques des MmpL et des MmpS

R. C de la Vega

Les séquences de *mmpL/mmpS* de chaque espèce ont été blastées les unes contre les autres permettant de définir des orthogroupes ou groupes de gènes orthologues ou paralogues au sein des espèces. Cela a permis de définir un profil phylogénomique des espèces étudiées pour les familles de gènes *mmpL* et *mmpS*.

##### 4.5 Phylotrack des MmpL et des MmpS

R. C de la Vega

L'apparition de chaque groupe d'orthologues MmpL/MmpS dans l'histoire évolutive des espèces a été modélisée à partir de l'arbre d'espèce et du profil phylogénomique des espèces pour les familles de gènes des *mmpS* et des *mmpL*. Cela définit des pistes phylogénétiques (« phylotrack ») retraçant l'histoire évolutive de ces familles au sein de la phylogénie des espèces selon le modèle Birth, Death and Innovation (Karev *et al.*, 2004).

##### 4.6 Phylonetwork des MmpL et des MmpS

R. C de la Vega

Les phylonetworks des MmpL et MmpS ont été construits avec le package igraph de Bioconductor, en utilisant la fonction hclust basée sur

l'identification du chemin le plus court entre deux nœuds quelconques (ici deux groupes d'orthologues quelconques).



- Aagaard**, C., Govaerts, M., Meikle, V., Gutiérrez-Pabello, J.A., McNair, J., Andersen, P., *et al.* (2010) Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med* **96**: 161–169.
- Aagaard**, C., Hoang, T., Dietrich, J., Cardona, P.-J., Izzo, A., Dolganov, G., *et al.* (2011) A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* **17**: 189–194.
- Abdallah**, A.M., Savage, N.D.L., Zon, M. van, Wilson, L., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Wel, N.N. van der, *et al.* (2008) The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J Immunol* **181**: 7166–75.
- Abdallah**, A.M., Verboom, T., Weerdenburg, E.M., Gey van Pittius, N.C., Mahasha, P.W., Jiménez, C., *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.
- Abomoelak**, B., Marcus, S.A., Ward, S.K., Karakousis, P.C., Steinberg, H., and Talaat, A.M. (2011) Characterization of a novel heat shock protein (Hsp22.5) involved in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **193**: 3497–505.
- Abu Kwaik**, Y. (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2022–8.
- Achard**, M.E.S., Stafford, S.L., Bokil, N.J., Chartres, J., Bernhardt, P.V., Schembri, M.A., *et al.* (2012) Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J* **444**: 51–57.
- Adékambi**, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M.-J., 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**: 5493–501.
- Adékambi**, T., Salah, S. Ben, Khelif, M., Raoult, D., and Drancourt, M. (2006) Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5974–81.
- Adjemian**, J., Frankland, T.B., Daida, Y.G., Honda, J.R., Olivier, K.N., Zelazny, A., *et al.* (2017) Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease and Tuberculosis, Hawaii, USA. *Emerg Infect Dis* **23**: 439–447.
- Adjemian**, J., Olivier, K.N., Seitz, A.E., Holland, S., and Prevots, D.R. (2011) Prevalence Of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections Among U.S. Medicare Beneficiaries, 1997–2007. In *A105. Nontuberculous mycobacteria: pathophysiology to treatment*. American Thoracic Society, pp. A2400–A2400.
- Adl**, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., *et al.* (2007) Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Syst Biol* **56**: 684–689.
- Agizew**, T., Basotli, J., Alexander, H., Boyd, R., Letsibogo, G., Auld, A., *et al.* (2017) Higher-than-expected prevalence of non-tuberculous mycobacteria in HIV setting in Botswana: Implications for diagnostic algorithms using Xpert MTB/RIF assay. *PLoS One* **12**: e0189981.
- Aguilar-Ayala**, D.A., Tillemann, L., Nieuwerburgh, F. Van, Deforce, D., Palomino, J.C., Vandamme, P., *et al.* (2017) The transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich dormancy model through RNAseq analysis. *Sci Rep* **7**: 17665.
- Ahmed**, N., Saini, V., Raghuvanshi, S., Khurana, J.P., Tyagi, A.K., Tyagi, A.K., and Hasnain, S.E. (2007) Molecular Analysis of a Leprosy Immunotherapeutic *Bacillus* Provides Insights into *Mycobacterium* Evolution. *PLoS One* **2**: e968.
- Al-Saeedi**, M., and Al-Hajoj, S. (2017) Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist* **10**: 333–342.
- Alexa** A, Rahnenfuhrer J (2016). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*. R package version 2.32.0.
- Aliyu**, G., El-Kamary, S.S., Abimiku, A., Brown, C., Tracy, K., Hungerford, L., and Blattner, W. (2013) Prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Nigeria. *PLoS One* **8**: e63170.
- Almirón**, M., Link, A.J., Furlong, D., and Kolter, R. (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**: 2646–54.
- Altschul**, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–10.
- Andries**, K., Villellas, C., Coeck, N., Thys, K., Gevers, T., Vranckx, L., *et al.* (2014) Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Bedaquiline. *PLoS One* **9**: e102135.
- Angenent**, L.T., Kelley, S.T., Amand, A. St., Pace, N.R., and Hernandez, M.T. (2005) Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 4860–4865.
- Aniento**, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* **123**: 1373–87.
- Arthur**, J.S.C., and Ley, S.C. (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**: 679–692.
- Asiimwe**, B.B., Bagyenzi, G.B., Ssengooba, W., Mumbowa, F., Mboowa, G., Wajja, A., *et al.* (2013) Species and genotypic diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from chil-



- dren investigated for pulmonary tuberculosis in rural Uganda. *BMC Infect Dis* **13**: 88.
- Askoura**, M., Mattawa, W., Abujamel, T., and Taher, I. (2011) Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med* **6**: 5870.
- Audrin**, J., and Degommier, J. (1957) [Use in current practice of a new method of staining tubercle bacilli for fluorescence examination]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **93**: 413–7.
- Augenstreich**, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., et al. (2017) ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol*.
- Aulicino**, A., Dinan, A.M., Miranda-CasoLuengo, A.A., Browne, J.A., Rue-Albrecht, K., MacHugh, D.E., and Loftus, B.J. (2015) High-throughput transcriptomics reveals common and strain-specific responses of human macrophages to infection with *Mycobacterium abscessus* Smooth and Rough variants. *BMC Genomics* **16**: 1046.
- Aussel**, L., Loiseau, L., Hajj Chehade, M., Pocachard, B., Fontecave, M., Pierrel, F., and Barras, F. (2014) *ubij*, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**: 70–9.
- Baek**, S.-H., Li, A.H., and Sasseti, C.M. (2011) Metabolic Regulation of *Mycobacterial* Growth and Antibiotic Sensitivity. *PLoS Biol* **9**: e1001065.
- Bailo**, R., Bhatt, A., and Aínsa, J.A. (2015) Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochem Pharmacol* **96**: 159–167.
- Bakala N’Goma**, J.C., Moigne, V. Le, Soismier, N., Laencina, L., Chevalier, F. Le, Roux, A.-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**: 780–91.
- Baltierra-Urbe**, 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.
- Barisch**, C., Paschke, P., Hagedorn, M., Maniak, M., and Soldati, T. (2015) Lipid droplet dynamics at early stages of *Mycobacterium marinum* infection in *Dictyostelium*. *Cell Microbiol* **17**: 1332–1349.
- Barisch**, C., and Soldati, T. (2017) *Mycobacterium marinum* Degrades Both Triacylglycerols and Phospholipids from Its *Dictyostelium* Host to Synthesise Its Own Triacylglycerols and Generate Lipid Inclusions. *PLoS Pathog* **13**: e1006095.
- Barker**, J., and Brown, M.R.W. (1994) Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**: 1253–1259.
- Barker**, J., Scaife, H., and Brown, M.R. (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2684–8.
- 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**: 1497–504.
- Bartek**, I.L., Woolhiser, L.K., Baughn, A.D., Basaraba, R.J., Jacobs, W.R., Lenaerts, A.J., and Voskuil, M.I. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* Lsr2 Is a Global Transcriptional Regulator Required for Adaptation to Changing Oxygen Levels and Virulence. *MBio* **5**: e01106-14.
- Basu**, J., Shin, D.-M., and Jo, E.-K. (2012) *Mycobacterial* signaling through toll-like receptors. *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 145.
- Begley**, M., Bron, P.A., Heuston, S., Casey, P.G., Englert, N., Wiesner, J., et al. (2008) Analysis of the Isoprenoid Biosynthesis Pathways in *Listeria monocytogenes* Reveals a Role for the Alternative 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway in Murine Infection. *Infect Immun* **76**: 5392–5401.
- Behr**, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., and Small, P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**: 1520–3.
- Belardinelli**, J.M., Larrouy-Maumus, G., Jones, V., Sorio de Carvalho, L.P., McNeil, M.R., and Jackson, M. (2014) Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **289**: 27952–65.
- Belardinelli**, J.M., Yazidi, A., Yang, L., Fabre, L., Li, W., Jacques, B., et al. (2016) Structure-Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect Dis* **2**: 702–713.
- Belisle**, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420–2.
- Bellis**, G., Lemonnier, L., Mucoviscidose, V. la, and Duplaix, J.-P. (2016) Registre français de la mucoviscidose.
- Belon**, C., Soccia, C., Bernut, A., Laubier, A., Bleves, S., and Blanc-Potard, A.-B. (2015) A Macrophage Subversion Factor Is Shared by Intracellular and Extracellular Pathogens. *PLoS Pathog* **11**: e1004969.
- Benghezal**, M., Fauvarque, M.-O., Tournebize, R., Froquet, R., Marchetti, A., Bergeret, E., et al. (2006) Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. *Cell Microbiol* **8**: 139–148.
- Berk**, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., and Ashburn, R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**: 279–86.
- 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. (2016a) Mycobacterium abscessus-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking. *PLOS Pathog* **12**: e1005986.
- Bernut**, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., et al. (2016b) Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* **99**: 866–883.
- Besada**, E. (2011) Rapid growing mycobacteria and TNF- $\alpha$  blockers: case report of a fatal lung infection with Mycobacterium abscessus in a patient treated with infliximab, and literature review. *Clin Exp Rheumatol* **29**: 705–7.
- Bitter**, W., Houben, E.N.G., Bottai, D., Brodin, P., Brown, E.J., Cox, J.S., et al. (2009) Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathog* **5**: e1000507.
- Bishai**, W.R., Dannenberg, A.M., Parrish, N., Ruiz, R., Chen, P., Zook, B.C., et al. (1999) Virulence of Mycobacterium tuberculosis CDC1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method. *Infect Immun* **67**: 4931–4.
- Blouin**, Y., Cazajous, G., Dehan, C., Soler, C., Vong, R., Hassan, M.O., et al. (2014) Progenitor "Mycobacterium canettii" clone responsible for lymph node tuberculosis epidemic, Djibouti. *Emerg Infect Dis* **20**: 21–8.
- Blumenthal**, A., Trujillo, C., Ehrt, S., and Schnappinger, D. (2010) Simultaneous Analysis of Multiple Mycobacterium tuberculosis Knockdown Mutants In Vitro and In Vivo. *PLoS One* **5**: e15667.
- Bordat**, Y., Martin, C., Puzo, G., Gilleron, M., Gicquel, B., and Ludwiczak, P. (2002) Mycobacterium tuberculosis phoP mutant: lipoarabinomannan molecular structure. *Microbiology* **148**: 3029–3037.
- Boritsch**, E.C., Frigui, W., Cascioferro, A., Malaga, W., Etienne, G., Laval, F., et al. (2016) pks5-recombination-mediated surface remodelling in Mycobacterium tuberculosis emergence. *Nat Microbiol* **1**: 15019.
- Boritsch**, E.C., Supply, P., Honoré, N., Seeman, T., Stinear, T.P., Brosch, R., and 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.
- Botella**, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., et al. (2011) Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* **10**: 248–59.
- Bottai**, D., Batoni, G., Esin, S., Florio, W., Brancatisano, F.L., Favilli, F., et al. (2006) The secretion antigen SA5K has a role in the adaptation of Mycobacterium bovis bacillus Calmette–Guérin to intracellular stress and hypoxia. *Microbes Infect* **8**: 2254–2261.
- Bottai**, D., Luca, M. Di, Majlessi, L., Frigui, W., Simeone, R., Sayes, F., 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.
- Bozue**, J.A., and Johnson, W. (1996) Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**: 668–73.
- Brambilla**, C., Llorens-Fons, M., Julián, E., Noguera-Ortega, E., Tomàs-Martínez, C., Pérez-Trujillo, M., et al. (2016) Mycobacteria Clumping Increase Their Capacity to Damage Macrophages. *Front Microbiol* **7**: 1562.
- Braunstein**, M., Brown, A.M., Kurtz, S., and Jacobs, W.R. (2001) Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol* **183**: 6979–90.
- Braunstein**, M., Espinosa, B.J., Chan, J., Belisle, J.T., and Jacobs, W.R. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* **48**: 453–64.
- Brennan**, M.J. (2017) Biofilms and Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **85**: e00411-17.
- Brennan**, M.J., and Delogu, G. (2002) The PE multigene family: a "molecular mantra" for mycobacteria. *Trends Microbiol* **10**: 246–9.
- Brennan**, M.J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., Alavi, M., and Jacobs, W.R. (2001) Evidence that Mycobacterial PE\_PGRS Proteins Are Cell Surface Constituents That Influence Interactions with Other Cells. *Infect Immun* **69**: 7326–7333.
- Bretl**, D.J., Demetriadou, C., and Zahrt, T.C. (2011) Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 566–582.
- Briffotiaux**, J., Huang, W., Wang, X., and Gicquel, B. (2017) MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in Mycobacterium species. *Tuberculosis* **107**: 13–19.
- Brode**, S.K., Daley, C.L., and Marras, T.K. (2014) The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* **18**: 1370–1377.
- Brodin**, P., Jonge, M.I. de, Majlessi, L., Leclerc, C., Nilges, M., Cole, S.T., and Brosch, R. (2005) Functional Analysis of Early Secreted Antigenic Target-6, the Dominant T-cell Antigen of Mycobacterium tuberculosis, Reveals Key Residues Involved in Secretion, Complex Formation, Virulence, and Immunogenicity. *J Biol Chem* **280**: 33953–33959.
- Brodin**, P., Majlessi, L., Marsollier, L., Jonge, M.I. de,

- Bottai, D., Demangel, C., 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., Poquet, Y., Levillain, F., Peguillet, I., Larrouy-Maumus, G., Gilleron, M., et al. (2010) High Content Phenotypic Cell-Based Visual Screen Identifies *Mycobacterium tuberculosis* Acyltrehalose-Containing Glycolipids Involved in Phagosome Remodeling. *PLoS Pathog* **6**: e1001100.
- 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**: 716–46.
- Bruggemann**, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Gouyette, C., et al. (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **8**: 1228–1240.
- Brundage**, L., Hendrick, J.P., Schiebel, E., Driessen, A.J., and Wickner, W. (1990) The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**: 649–57.
- Bryant**, J.M., Grogono, D.M., Parkhill, J., and Floto, R.A. (2013) Transmission of *M. abscessus* in patients with cystic fibrosis - Authors' reply. *Lancet* **382**: 504.
- Buchmeier**, N., Blanc-Potard, A., Ehrt, S., Piddington, D., Riley, L., and Groisman, E.A. (2000) A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **35**: 1375–82.
- Burbaud**, S., Laval, F., Lemassu, A., Daffé, M., Guilhot, C., and Chalut, C. (2016) Trehalose Polyphosphates 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**: 4700–7.
- Caire-Brändli**, I., Papadopoulos, A., Malaga, W., Marais, D., Cnaan, S., Thilo, L., and Chastellier, C. de (2014) Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis. *Infect Immun* **82**: 476–90.
- Camacho**, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Lanéelle, M.-A., Triccas, J.A., Gicquel, B., et al. (2001) Analysis of the Phthiocerol Dimycocerosate Locus of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **276**: 19845–19854.
- Camacho**, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **34**: 257–267.
- Carol**, M., Elizabeth, P., William, B., Juzar, A., and Arnold, Z. (2015) cAMP-induced arginase and their role in *Mycobacterium tuberculosis* growth: Emerging of new adjunctive therapies. *Front Immunol* **6**.
- Carson**, L.A., Bland, L.A., Cusick, L.B., Favero, M.S., Bolan, G.A., Reingold, A.L., and Good, R.C. (1988) Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Appl Environ Microbiol* **54**: 3122–5.
- Cascioferro**, A., Daleke, M.H., Ventura, M., Donà, V., Delogu, G., Palù, G., et al. (2011) Functional Dissection of the PE Domain Responsible for Translocation of PE\_PGRS33 across the Mycobacterial Cell Wall. *PLoS One* **6**: e27713.
- Catherinot**, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J.-F., Daffé, M., et al. (2007) Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* **75**: 1055–8.
- Catherinot**, E., Roux, A.-L., Macheras, E., Hubert, D., Matmar, M., Dannhoffer, L., et al. (2009) Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* **47**: 271–4.
- Catherinot**, E., Roux, A.-L., Vibet, M.-A., Bellis, G., Lemonnier, L., Roux, E. Le, et al. (2013) Inhaled therapies, azithromycin and *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* **41**: 1101–6.
- Ceci**, P., Ilari, A., Falvo, E., and Chiancone, E. (2003) The Dps Protein of *Agrobacterium tumefaciens* Does Not Bind to DNA but Protects It toward Oxidative Cleavage. *J Biol Chem* **278**: 20319–20326.
- Cellier**, M.F., Courville, P., and Campion, C. (2007) Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes Infect* **9**: 1662–1670.
- Chadha**, R., Grover, M., Sharma, A., Lakshmy, A., Deb, M., Kumar, A., and Mehta, G. (1998) An outbreak of post-surgical wound infections due to *Mycobacterium abscessus*. *Pediatr Surg Int* **13**: 406–10.
- Chalermkulrat**, W., Sood, N., Neuringer, I.P., Hecker, T.M., Chang, L., Rivera, M.P., et al. (2006) Nontuberculous mycobacteria in end stage cystic fibrosis: implications for lung transplantation. *Thorax* **61**: 507–13.
- Chalut**, C. (2016) MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis* **100**: 32–45.
- Chande**, A.G., Siddiqui, Z., Midha, M.K., Sirohi, V., Ravichandran, S., and Rao, K.V.S. (2015) Selective enrichment of mycobacterial proteins from infected host macrophages. *Sci Rep* **5**: 13430.
- Chastellier**, C. de, 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.
- Chatterjee**, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M.R., and Brennan, P.J. (1992) Lipoarabinomannan of

- Mycobacterium tuberculosis. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem* **267**: 6234–9.
- Chen**, G., Zhuchenko, O., and Kuspa, A. (2007) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* **317**: 678–81.
- Chen**, S. (1997) Maternal and fetal infection with Mycobacterium tuberculosis. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* **77**: F77–F77.
- Chevalier**, F. Le, Cascioferro, A., Frigui, W., Pawlik, A., Boritsch, E.C., Bottai, D., et al. (2015) Revisiting the role of phospholipases C in virulence and the lifecycle of Mycobacterium tuberculosis. *Sci Rep* **5**: 16918.
- Chiaradia**, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Bulet-Schiltz, O., Etienne, G., et al. (2017) Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep* **7**: 12807.
- Chim**, N., Torres, R., Liu, Y., Capri, J., Batot, G., Whitelegge, J.P., and Goulding, C.W. (2015) The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from Mycobacterium tuberculosis. *Chem Biol* **22**: 1098–1107.
- 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., Cho, Y.-J., Koh, W.-J., Chun, J., Cho, S.-N., and Shin, S.J. (2012) Draft genome sequence of Mycobacterium abscessus subsp. bolletii BD(T). *J Bacteriol* **194**: 2756–7.
- Choi**, S., Jeon, J., Yang, J.-S., and Kim, S. (2008) Common occurrence of internal repeat symmetry in membrane proteins. *Proteins Struct Funct Bioinforma* **71**: 68–80.
- Choo**, S.W., Wee, W.Y., Ngeow, Y.F., Mitchell, W., Tan, J.L., Wong, G.J., et al. (2014) Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen Mycobacterium abscessus reveals high evolutionary potential. *Sci Rep* **4**: 4061.
- Christie**, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**: 451–485.
- Chung**, J., Haile, D.J., and Wessling-Resnick, M. (2004) Copper-induced ferroportin-1 expression in J774 macrophages is associated with increased iron efflux. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 2700–2705.
- Cianciotto**, N.P., and Fields, B.S. (1992) Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5188–91.
- Cirillo**, J.D., Cirillo, S.L.G., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Intracellular Growth in Acanthamoeba castellanii Affects Monocyte Entry Mechanisms and Enhances Virulence of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **67**: 4427–4434.
- 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**: 3759–67.
- Claeys**, T.A., and Robinson, R.T. (2018) The many lives of nontuberculous mycobacteria. *J Bacteriol* **JB.00739-17**.
- Clarke**, M., Lohan, A.J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., et al. (2013) Genome of Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* **14**: R11.
- Clary**, G., Sasindran, S.J., Nesbitt, N., Mason, L., Cole, S., Azad, A., et al. (2018) Mycobacterium abscessus Smooth and Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes but Are Killed by Acetic Acid. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.
- 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**: 257–70.
- Cole**, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–44.
- Collin**, M., Upton, A., Euler, C.W., Luquin, M., Llorens-Fons, M., Pérez-Trujillo, M., et al. (2017) Trehalose Polyphosphates, External Cell Wall Lipids in Mycobacterium abscessus, Are Associated with the Formation of Clumps with Cording Morphology, Which Have Been Associated with Virulence. .
- 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**: 6121–6.
- Cornelis**, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811–825.
- Coros**, A., DeConno, E., and Derbyshire, K.M. (2008) IS6110, a Mycobacterium tuberculosis Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of Mycobacterium smegmatis, Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. *J Bacteriol* **190**: 3408–3410.
- Corsaro**, D., and Greub, G. (2006) Pathogenic Potential of Novel Chlamydiae and Diagnostic Approaches to Infections Due to These Obligate Intracellular Bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**: 283–297.
- Corsaro**, D., Venditti, D., and Valassina, M. (2002) New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples. *Res Microbiol* **153**: 563–7.
- Cosma**, C.L., Klein, K., Kim, R., Beery, D., and Ramakrishnan, L. (2006) Mycobacterium mari-

- num Erp is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracellular survival. *Infect Immun* **74**: 3125–33.
- Cosma**, C.L., Sherman, D.R., and Ramakrishnan, L. (2003) The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **57**: 641–676.
- Cosson**, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., et al. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* **184**: 3027–33.
- Coulon**, C., Collignon, A., McDonnell, G., and Thomas, V. (2010) Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. *J Clin Microbiol* **48**: 2689–2697.
- Cox**, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**: 79–83.
- Cullen**, A.R., Cannon, C.L., Mark, E.J., and Colin, A.A. (2000) *Mycobacterium abscessus* Infection in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 641–645.
- Cystic Fibrosis Foundation** (2016) Patient Registry Annual Data Report. .
- Daffé**, M. (2018) *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Springer International Publishing, Cham.
- Daffé**, M. (2015) The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis* **95**: S155–S158.
- Daffé**, M., and Draper, P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131–203.
- Daffé**, M., and Laneelle, M.A. (1988) Distribution of Phthiocerol Diester, Phenolic Mycosides and Related Compounds in Mycobacteria. *Microbiology* **134**: 2049–2055.
- Dailloux**, M., Abalain, M.L., Laurain, C., Lebrun, L., Loos-Ayav, C., Lozniewski, A., et al. (2006) Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients. *Eur Respir J* **28**: 1211–1215.
- Daleke**, M.H., Cascioferro, A., Punder, K. de, Ummels, R., Abdallah, A.M., Wel, N. van der, et al. (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.
- Damo**, S.M., Kehl-Fie, T.E., Sugitani, N., Holt, M.E., Rathi, S., Murphy, W.J., et al. (2013) Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 3841–3846.
- Danelishvili**, L., Wu, M., Stang, B., Harriff, M., Cirillo, S., Cirillo, J., et al. (2007) Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 11038–11043.
- Daniel**, J., Deb, C., Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Morbidoni, H.R., and Kolattukudy, P.E. (2004) Induction of a Novel Class of Diacylglycerol Acyltransferases and Triacylglycerol Accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as It Goes into a Dormancy-Like State in Culture. *J Bacteriol* **186**: 5017–5030.
- Daniel**, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* Uses Host Triacylglycerol to Accumulate Lipid Droplets and Acquires a Dormancy-Like Phenotype in Lipid-Loaded Macrophages. *PLoS Pathog* **7**: e1002093.
- Dantec**, C. Le, Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., and Vincent, V. (2002) Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5318–25.
- Dao**, D.N., Kremer, L., Guérardel, Y., Molano, A., Jacobs, W.R., Porcelli, S.A., and Briken, V. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* **72**: 2067–74.
- Davey**, M.S., Lin, C.-Y., Roberts, G.W., Heuston, S., Brown, A.C., Chess, J.A., et al. (2011) Human Neutrophil Clearance of Bacterial Pathogens Triggers Anti-Microbial  $\gamma\delta$  T Cell Responses in Early Infection. *PLoS Pathog* **7**: e1002040.
- 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 $\beta$ D2 gene expression and IL-8 release. *PLoS One* **6**: e29148.
- Davies**, B., and Edwards, S.W. (1991) Chemiluminescence and superoxide production in *Acanthamoeba castellanii*: free radicals generated during oxidative stress. *J Gen Microbiol* **137**: 1021–1027.
- Degiacomi**, G., Benjak, A., Madacki, J., Boldrin, F., Provvedi, R., Palù, G., et al. (2017) Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on *Mycobacterium tuberculosis* gene expression. *Sci Rep* **7**: 43495.
- Delafont**, V., Mougari, F., Cambau, E., Joyeux, M., Bouchon, D., Héchar, Y., and Moulin, L. (2014) First Evidence of Amoebae–Mycobacteria Association in Drinking Water Network. *Environ Sci Technol* **48**: 11872–11882.
- Delmar**, J.A., Su, C.-C., and Yu, E.W. (2014) Bacterial multidrug efflux transporters. *Annu Rev Biophys* **43**: 93–117.
- Demangel**, C., Brodin, P., Cockle, P.J., Brosch, R., Majlessi, L., Leclerc, C., and Cole, S.T. (2004) Cell envelope protein PPE68 contributes to *Mycobacterium tuberculosis* RD1 immunogenicity independently of a 10-kilodalton culture filtrate protein and ESAT-6. *Infect Immun* **72**: 2170–6.
- Dermine**, J.-F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R.G., and Desjardins, M. (2001) Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing Phagosomes. *J Biol Chem* **276**: 18507–18512.
- Deshayes**, C., Bach, H., Euphrasie, D., Attarian, R.,

- Coureuil, M., Sougakoff, W., et al. (2010) MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **78**: 989–1003.
- Deshayes**, C., Perrodou, E., Euphrasie, D., Frapy, E., Poch, O., Bifani, P., et al. (2008) Detecting the molecular scars of evolution in the *Mycobacterium tuberculosis* complex by analyzing interrupted coding sequences. *BMC Evol Biol* **8**: 78.
- Devulder**, G., Montclos, M.P. de, and Flandrois, J.P. (2005) A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 293–302.
- Dillon**, S.C., and Dorman, C.J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* **8**: 185–195.
- 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**: 3492–501.
- Donohue**, M.J., Mistry, J.H., Donohue, J.M., O'Connell, K., King, D., Byran, J., et al. (2015) Increased Frequency of Nontuberculous *Mycobacteria* Detection at Potable Water Taps within the United States. *Environ Sci Technol* **49**: 6127–6133.
- Duarte**, R.S., Lourenço, M.C.S., Fonseca, L. de S., Leão, S.C., Amorim, E. de L.T., Rocha, I.L.L., et al. (2009) Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* **47**: 2149–55.
- Dubois**, V., Laencina, L., Bories, A., Moigne, V. Le, Pawlik, A., Herrmann, J.-L., and Girard-Misguich, F. (2018a) Identification of Virulence Markers of *Mycobacterium abscessus* for Intracellular Replication in Phagocytes. *J Vis Exp*.
- Dubois**, V., Viljoen, A., Laencina, L., Moigne, V. Le, Bernut, A., Dubar, F., et al. (2018b) MmpL8MAB controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 201812984.
- Dubrou**, S., Konjek, J., Macheras, E., Welté, B., Guidicelli, L., Chignon, E., et al. (2013) Diversity, community composition, and dynamics of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria in an urban tap water production and distribution system. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5498–508.
- Ducati**, R.G., Breda, A., Basso, L.A., and Santos, D.S. (2011) Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem* **18**: 1258–75.
- Dumas**, E., Christina Boritsch, E., Vandenbogaert, M., Rodríguez de la Vega, R.C., Thiberge, J.-M., Caro, V., et al. (2016) Mycobacterial Pan-Genome Analysis Suggests Important Role of Plasmids in the Radiation of Type VII Secretion Systems. *Genome Biol Evol* **8**: 387–402.
- Dupont**, C., Viljoen, A., Dubar, F., Blaise, M., Bernut, A., Pawlik, A., et al. (2016) A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol* **101**: 515–529.
- Dupuy**, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.-H., et al. (2014) Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int J Hyg Environ Health* **217**: 335–339.
- Economou**, A., and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**: 835–43.
- Eda**, S., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2003) Function of the MexB Efflux-Transporter Divided into Two Halves †. *Biochemistry* **42**: 7238–7244.
- Eddyani**, M., Jonckheere, J.F. De, Durnez, L., Suykerbuyk, P., Leirs, H., and Portaels, F. (2008) Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6547–53.
- Ehlers**, S., and Schaible, U.E. (2012) The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol* **3**: 411.
- Eicher**, T., Seeger, M.A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., et al. (2014) Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *Elife* **3**.
- Eichinger**, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Suggang, R., Berriman, M., et al. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43–57.
- Ellis**, R.J. (2007) Protein Misassembly. In *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*. Springer New York, New York, NY. pp. 1–13.
- Eoh**, H., and Rhee, K.Y. (2013) Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 6554–6559.
- Eoh**, H., and Rhee, K.Y. (2014) Methylcitrate cycle defines the bactericidal essentiality of isocitrate lyase for survival of *Mycobacterium tuberculosis* on fatty acids. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 4976–4981.
- Eskra**, L., Canavessi, A., Carey, M., and Splitter, G. (2001) *Brucella abortus* Genes Identified following Constitutive Growth and Macrophage Infection. *Infect Immun* **69**: 7736–7742.
- 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**: 117–23.
- Etienne**, G., Astarie-Dequeker, C., Dupont, M.-A., Daffé, M., Villeneuve, C., and Billman-Jacobe, H. (2002) The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **148**: 3089–3100.
- Etienne**, G., Malaga, W., Laval, F., Lemassu, A., Guilhot, C., and Daffé, M. (2009) Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccha-

- rides in mycobacteria. *J Bacteriol* **191**: 2613–21.
- Fajardo**, M., Schleicher, M., Noegel, A., Bozzaro, S., Killinger, S., Heuner, K., et al. (2004) Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology* **150**: 2825–2835.
- Falkinham**, J.O., Iseman, M.D., Haas, P. De, and Soolingen, D. Van *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. .
- 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., et al. (2014) Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **52**: 3362–9.
- Faou**, A. Le, Valassina, M., Corsaro, D., Venditti, D., and Guglielmetti, P. (2001) A new chlamydia-like 16S rDNA sequence from a clinical sample. *Microbiology* **147**: 515–516.
- 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.
- Ferrari**, G., Langen, H., Naito, M., and Pieters, J. (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**: 435–47.
- Ferroni**, A., Vu-Thien, H., Lanotte, P., Bourgeois, M. Le, Sermet-Gaudelus, I., Fauroux, B., 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**: 2237–9.
- Fitzpatrick**, D.A. (2009) Lines of Evidence for Horizontal Gene Transfer of a Phenazine Producing Operon into Multiple Bacterial Species. *J Mol Evol* **68**: 171–185.
- Flanagan**, R.S., Cosío, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**: 355–66.
- Floto**, R.A., Olivier, K.N., Saiman, L., Daley, C.L., Herrmann, J.-L., Nick, J.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 Suppl 1**: i1-22.
- Forbes**, J.R., and Gros, P. (2001) Divalent-metal transport by NRAMPs at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **9**: 397–403.
- Forrellad**, M.A., Klepp, L.I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H.R., Santangelo, M. de la P., et al. (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **4**: 3–66.
- Fortune**, S.M., Jaeger, A., Sarracino, D.A., Chase, M.R., Sasseti, C.M., Sherman, D.R., et al. (2005) Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 10676–10681.
- Fratti**, R.A., Backer, J.M., Gruenberg, J., Corvera, S., and Deretic, V. (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* **154**: 631–644.
- Fratti**, R.A., Chua, J., Vergne, I., and Deretic, V. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5437–42.
- Freeman**, A.F., Olivier, K.N., Rubio, T.T., Bartlett, G., Ochi, J.W., Claypool, R.J., et al. (2009) Intrathoracic nontuberculous mycobacterial infections in otherwise healthy children. *Pediatr Pulmonol* **44**: 1051–6.
- Frehel**, C., Ryter, A., Rastogi, N., and David, H. (1986) The electron-transparent zone in phagocytized *Mycobacterium avium* and other mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**: 239–57.
- Fridovich**, I. (1995) Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**: 97–112.
- Fritsche**, T.R., Gautom, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L., and Lindquist, T.D. (1993) Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* **31**: 1122–6.
- Fritsche**, T.R., Horn, M., Wagner, M., Herwig, R.P., Schleifer, K.H., and Gautom, R.K. (2000) Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2613–9.
- Fukuda**, T., Matsumura, T., Ato, M., Hamasaki, M., Nishiuchi, Y., Murakami, Y., et al. (2013) Critical Roles for Lipomannan and Lipoarabinomannan in Cell Wall Integrity of *Mycobacteria* and Pathogenesis of Tuberculosis. *MBio* **4**: e00472-12.
- Furuya**, E.Y., Paez, A., Srinivasan, A., Cooksey, R., Augenbraun, M., Baron, M., 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.
- Ganbat**, D., Seehase, S., Richter, E., Vollmer, E., Reiling, N., Fellenberg, K., et al. (2016) *Mycobacteria* infect different cell types in the human lung and cause species dependent cellular changes in infected cells. *BMC Pulm Med* **16**: 19.
- Ganguly**, N., Giang, P.H., Gupta, C., Basu, S.K., Siddiqui, I., Salunke, D.M., and Sharma, P. (2008)

- Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunol Cell Biol* **86**: 98–106.
- Gannoun-Zaki**, L., Alibaud, L., Carrère-Kremer, S., Kremer, L., and Blanc-Potard, A.-B. (2013) Overexpression of the KdpF Membrane Peptide in *Mycobacterium bovis* BCG Results in Reduced Intramacrophage Growth and Altered Cording Morphology. *PLoS One* **8**: e60379.
- Gao**, L.-Y., Groger, R., Cox, J.S., Beverley, S.M., Lawson, E.H., and Brown, E.J. (2003) Transposon mutagenesis of *Mycobacterium marinum* identifies a locus linking pigmentation and intracellular survival. *Infect Immun* **71**: 922–9.
- 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.
- Gao**, L.-Y., Pak, M., Kish, R., Kajihara, K., and Brown, E.J. (2006) A Mycobacterial Operon Essential for Virulence In Vivo and Invasion and Intracellular Persistence in Macrophages. *Infect Immun* **74**: 1757–1767.
- Gao**, L.Y., Harb, O.S., and Abu Kwaik, Y. (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* **65**: 4738–46.
- 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**: 260–7.
- Garces**, A., Atmakuri, K., Chase, M.R., Woodworth, J.S., Krastins, B., Rothchild, A.C., et al. (2010) EspA Acts as a Critical Mediator of ESX1-Dependent Virulence in *Mycobacterium tuberculosis* by Affecting Bacterial Cell Wall Integrity. *PLoS Pathog* **6**: e1000957.
- Garcia**, B.J., Datta, G., Davidson, R.M., and Strong, M. (2015) MycoBASE: expanding the functional annotation coverage of mycobacterial genomes. *BMC Genomics* **16**: 1102.
- Geijtenbeek**, T.B.H., Vliet, S.J. Van, Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Appelmelk, B., and Kooyk, Y. Van (2003) Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* **197**: 7–17.
- Gengenbacher**, M., and Kaufmann, S.H.E. (2012) *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 514–532.
- Gengenbacher**, M., Rao, S.P.S., Pethe, K., and Dick, T. (2010) Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiology* **156**: 81–87.
- Gerstmans**, H., Rodriguez-Rubio, L., Lavigne, R., and Briers, Y. (2016) From endolysins to Artilysin(R)s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochem Soc Trans* **44**: 123–128.
- Giffin**, M.M., Shi, L., Gennaro, M.L., and Sohaskey, C.D. (2016) Role of Alanine Dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* during Recovery from Hypoxic Nonreplicating Persistence. *PLoS One* **11**: e0155522.
- Gilljam**, M., Scherstén, H., Silverborn, M., Jönsson, B., and Ericsson Hollsing, A. (2010) Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and *Mycobacterium abscessus* infection. *J Cyst Fibros* **9**: 272–276.
- Girard-Misguich**, F., Laencina, L., Dubois, V., Moigne, V. Le, Kremer, L., Maljessi, L., et al. (2018) ESX-4, un système de sécrétion mycobactérien ancestral, essentiel pour la croissance de *Mycobacterium abscessus* dans les phagocytes environnementaux et humains. *médecine/sciences* **34**: 795–797.
- 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**: 717–27.
- Glover**, N., Holtzman, A., Aronson, T., Froman, S., Berlin, O.G.W., Dominguez, P., et al. (1994) The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. *Int J Environ Health Res* **4**: 63–72.
- Goldberg**, A.L., and John, A.C. St. (1976) Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells: Part 2. *Annu Rev Biochem* **45**: 747–804.
- Gomez**, J.E., and McKinney, J.D. (2004) M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* **84**: 29–44.
- Gomila**, M., Ramirez, A., Gasco, J., and Lalucat, J. (2008) *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2769–2773.
- Goodfellow**, M., Lind, A., Mordarska, H., Pattyns, S., and Tsukamura, M. (1974) A Co-operative Numerical Analysis of Cultures Considered to Belong to the “rhodochrous” Taxon. *J Gen Microbiol* **85**: 291–302.
- Gordon**, B.R.G., Li, Y., Wang, L., Sintsova, A., Bakel, H. van, Tian, S., et al. (2010) Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 5154–5159.
- Gordon**, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., and Cole, S.T. (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* **32**: 643–55.



- Goslee**, S., and Wolinsky, E. (1976) Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* **113**: 287–92.
- Goy**, G., Thomas, V., Rimann, K., Jatón, K., Prod'hom, G., and Greub, G. (2007) The Neff strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool for testing the virulence of *Mycobacterium kansasii*. *Res Microbiol* **158**: 393–397.
- Goyal**, R., Das, A.K., Singh, R., Singh, P.K., Korpole, S., and Sarkar, D. (2011) Phosphorylation of PhoP Protein Plays Direct Regulatory Role in Lipid Biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **286**: 45197–45208.
- Graham**, L., Warren, N.G., Tsang, A.Y., Dalton, H.P., and Dalton, H.P. (1988) *Mycobacterium avium* complex pseudobacteriuria from a hospital water supply. *J Clin Microbiol* **26**: 1034–6.
- Greub**, G., Collyn, F., Guy, L., and Roten, C.-A. (2004b) A genomic island present along the bacterial chromosome of the Parachlamydiaceae UWE25, an obligate amoebal endosymbiont, encodes a potentially functional F-like conjugative DNA transfer system. *BMC Microbiol* **4**: 48.
- Greub**, G., and Raoult, D. (2002) *Parachlamydiaceae*: Potential Emerging Pathogens. *Emerg Infect Dis* **8**: 626–630.
- Greub**, G., and Raoult, D. (2003a) History of the ADP/ATP-translocase-encoding gene, a parasitism gene transferred from a Chlamydiales ancestor to plants 1 billion years ago. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5530–5.
- Greub**, G., and Raoult, D. (2003b) Biocides Currently Used for Bronchoscope Decontamination Are Poorly Effective Against Free-Living Amoebae. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**: 784–786.
- Greub**, G., and Raoult, D. (2004a) Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413–433.
- Greub**, G., Scola, B. La, and Raoult, D. (2003c) *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. *Ann N Y Acad Sci* **990**: 628–34.
- Griffith**, D.E. (2003) Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 810–2.
- Griffith**, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., et al. (2012) An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases.
- 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.
- Groote**, M.A. De, and Huitt, G. (2006) Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Clin Infect Dis* **42**: 1756–1763.
- Grzegorzewicz**, A.E., Pham, H., Gundi, V.A.K.B., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., et al. (2012) Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol* **8**: 334–341.
- Guo**, X. V., Monteleone, M., Klotzsche, M., Kamionka, A., Hillen, W., Braunstein, M., et al. (2007) Silencing *Mycobacterium smegmatis* by using tetracycline repressors. *J Bacteriol* **189**: 4614–23.
- Gupta**, R.S., Lo, B., and Son, J. (2018) Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol* **9**: 67.
- Gutiérrez**, A.V., Viljoen, A., Ghigo, E., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2018) Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the *Mycobacterium abscessus* Complex. *Front Microbiol* **9**: 1145.
- Gutierrez**, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., et al. (2005) Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**: e5.
- Gutierrez**, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**: 753–66.
- Hagedorn**, M., Rohde, K.H., Russell, D.G., and Soldati, T. (2009) Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* **323**: 1729–33.
- Hagedorn**, M., and Soldati, T. (2007) Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of *Dictyostelium* to *Mycobacterium marinum* infection. *Cell Microbiol* **9**: 2716–2733.
- Hägele**, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., and Steinert, M. (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* **2**: 165–71.
- Halloum**, I., Carrère-Kremer, S., Blaise, M., Viljoen, A., Bernut, A., Moigne, V. Le, 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**: E4228-37.
- Halloum**, I., Viljoen, A., Khanna, V., Craig, D., Bouchier, C., Brosch, R., et al. (2017) Resistance to Thiacetazone Derivatives Active against *Mycobacterium abscessus* Involves Mutations in the MmpL5 Transcriptional Repressor MAB\_4384. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.
- Hampfl**, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 3859–3864.
- Harada**, T., Akiyama, Y., Kurashima, A., Nagai, H., Tsuyuguchi, K., Fujii, T., et al. (2012) Clinical and Microbiological Differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* Lung Diseases. *J Clin Microbiol* **50**: 3556–3561.

- Hart**, C.A., and Makin, T. (1991) Legionella in hospitals: a review. *J Hosp Infect* **18 Suppl A**: 481–9.
- 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.
- Hayes**, D. (2005) *Mycobacterium abscessus* and Other Nontuberculous Mycobacteria: Evolving Respiratory Pathogens in Cystic Fibrosis: A Case Report and Review. *South Med J* **98**: 657–661.
- Hegedus**, Z.L. (2000) The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology* **145**: 85–101.
- Herrmann**, J.-L. (2004) Question 3 e partie Quels sont les nouveaux outils diagnostiques de la tuberculose ? Quel est leur intérêt pour la prise en charge du malade et quelles sont leurs indications ? .
- Heuston**, S., Begley, M., Gahan, C.G.M., and Hill, C. (2012) Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology* **158**: 1389–1401.
- Hillas**, P.J., Alba, F.S. del, Oyarzabal, J., Wilks, A., and Ortiz de Montellano, P.R. (2000) The AhpC and AhpD Antioxidant Defense System of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **275**: 18801–18809.
- Hinchey**, J., Lee, S., Jeon, B.Y., Basaraba, R.J., Venkataswamy, M.M., Chen, B., et al. (2007) Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* **117**: 2279–2288.
- Hoffmann**, C., Leis, A., Niederweis, M., Pitzko, J.M., and Engelhardt, H. (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 3963–3967.
- Horn**, M., and Wagner, M. (2004) Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol* **51**: 509–14.
- Horwitz**, M.A. (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 2108–26.
- Horwitz**, M.A., Lee, B.W., Dillon, B.J., and Harth, G. (1995) Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1530–4.
- Horwitz**, M.A., and Silverstein, S.C. (1980) Legionnaires' Disease Bacterium (*Legionella pneumophila*) Multiplies Intracellularly in Human Monocytes. *J Clin Invest* **66**: 441–450.
- Hossain**, M.M., and Norazmi, M.-N. (2013) Pattern Recognition Receptors and Cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection – The Double-Edged Sword? *Biomed Res Int* **2013**: 1–18.
- Houben**, E.N.G., Walburger, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Thompson, C.J., Miess, C., et al. (2009) Differential expression of a virulence factor in pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* **72**: 41–52.
- Howard**, S.T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., et al. (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**: 1581–90.
- Hu**, Q., Li, L., and Liu, J. (1999) [Postoperative infection outbreak of *M. chelonae* subsp. *abscessus*]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **22**: 393–5.
- Hu**, Y., Henderson, B., Lund, P.A., Tormay, P., Ahmed, M.T., Gurcha, S.S., et al. (2008) A *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the groEL homologue cpn60.1 is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection. *Infect Immun* **76**: 1535–46.
- 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**, Y.-C., Liu, M.-F., Shen, G.-H., Lin, C.-F., Kao, C.-C., Liu, P.-Y., and Shi, Z.-Y. (2010) Clinical Outcome of *Mycobacterium abscessus* Infection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Microbiol Immunol Infect* **43**: 401–406.
- Hughes**, A.L. (2002) Adaptive evolution after gene duplication. *Trends Genet* **18**: 433–4.
- 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.
- 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.
- Iantomasi**, R., Sali, M., Cascioferro, A., Palucci, I., Zumbo, A., Soldini, S., et al. (2012) PE\_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* **14**: 356–367.
- Ilangumaran**, S., Arni, S., Poincelet, M., Theler, J.M., Brennan, P.J., Nasir-ud-Din, and Hoessli, D.C. (1995) Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes. *J Immunol* **155**: 1334–42.
- Indrigo**, J., Actor, J.K., and Hunter, R.L. (2002) Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* **148**: 1991–1998.
- Ingen**, J. van, Bendien, S.A., Lange, W.C.M. de, Hoefsloot, W., Dekhuijzen, P.N.R., Boeree, M.J., and Soolingen, D. van (2009) Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* **64**: 502–506.

- Inglis**, T.J., Rigby, P., Robertson, T.A., Dutton, N.S., Henderson, M., and Chang, B.J. (2000) Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* species results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. *Infect Immun* **68**: 1681–6.
- Ioanoviciu**, A., Yukl, E.T., Moëne-Loccoz, P., and Ortiz de Montellano, P.R. (2007) DevS, a Heme-Containing Two-Component Oxygen Sensor of *Mycobacterium tuberculosis* †. *Biochemistry* **46**: 4250–4260.
- Ishikawa**, E., Mori, D., and Yamasaki, S. (2017) Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. *Trends Immunol* **38**: 66–76.
- Jackson**, M. (2014) The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**.
- Jacquier**, N., Aeby, S., Lienard, J., and Greub, G. (2013) Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. *J Vis Exp* e51055.
- Jain**, M., and Cox, J.S. (2005) Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS Pathog* **1**: e2.
- Jamet**, S., Quentin, Y., Coudray, C., Texier, P., Laval, F., Daffé, M., et al. (2015) Evolution of Mycolic Acid Biosynthesis Genes and Their Regulation during Starvation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **197**: 3797–811.
- Jang**, S., and Imlay, J.A. (2007) Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes. *J Biol Chem* **282**: 929–937.
- Jarand**, J., Levin, A., Zhang, L., Huitt, G., Mitchell, J.D., and Daley, C.L. (2011) Clinical and Microbiologic Outcomes in Patients Receiving Treatment for *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease. *Clin Infect Dis* **52**: 565–571.
- Jarlier**, V., and Nikaido, H. (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* **172**: 1418–23.
- Jeon**, K., Kwon, O.J., Lee, N.Y., Kim, B.-J., Kook, Y.-H., Lee, S.-H., et al. (2009) Antibiotic Treatment of *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* **180**: 896–902.
- John**, G.S., 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* **98**: 9901–9906.
- Jones**, C.M., Wells, R.M., Madduri, A.V.R., Renfrow, M.B., Ratledge, C., Moody, D.B., and Niederweis, M. (2014) Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by interrupting siderophore recycling. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 1945–1950.
- Kahane**, S., Dvoskin, B., Mathias, M., and Friedman, M.G. (2001) Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4789–95.
- Kang**, G.C.W., Gan, A.W.T., Yam, A., Tan, A.B.H., and Tay, S.C. (2010) *Mycobacterium abscessus* Hand Infections in Immunocompetent Fish Handlers: Case Report. *J Hand Surg Am* **35**: 1142–1145.
- Karev**, G.P., Wolf, Y.I., Berezovskaya, F.S., and Koonin, E. V (2004) Gene family evolution: an in-depth theoretical and simulation analysis of non-linear birth-death-innovation models. *BMC Evol Biol* **4**: 32.
- Karl Bernhard Lehmann**, R.O.N. (1896) *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*. .
- Kehrmann**, J., Kurt, N., Rueger, K., Bange, F.-C., and Buer, J. (2016) GenoType NTM-DR for Identifying *Mycobacterium abscessus* Subspecies and Determining Molecular Resistance: TABLE 1. *J Clin Microbiol* **54**: 1653–1655.
- Keller**, R., Ziegler, C., and Schneider, D. (2014) When two turn into one: evolution of membrane transporters from half modules. *Biol Chem* **395**: 1379–88.
- Kessel**, J.C. van, and Hatfull, G.F. (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods* **4**: 147–152.
- Khoo**, K.H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J., and Chatterjee, D. (1995a) Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan. *Glycobiology* **5**: 117–27.
- Khoo**, K.H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J., and Chatterjee, D. (1995b) Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J Biol Chem* **270**: 12380–9.
- Killick**, K.E., Ní Cheallaigh, C., O’Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D.E., and Harris, J. (2013) Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. *Cell Microbiol* **15**: 1484–1495.
- Kim**, B.-J., Kim, B.-R., Lee, S.-Y., Kook, Y.-H., and Kim, B.-J. (2013) Rough colony morphology of *Mycobacterium massiliense* Type II genotype is due to the deletion of glycopeptidolipid locus within its genome. *BMC Genomics* **14**: 890.
- Kim**, B.J., Lee, S.H., Lyu, M.A., Kim, S.J., Bai, G.H., Chae, G.T., et al. (1999) Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* **37**: 1714–20.
- Kitada**, S., Maekura, R., Toyoshima, N., Fujiwara, N., Yano, I., Ogura, T., et al. (2002) Serodiagnosis of Pulmonary Disease Due to *Mycobacterium avium* Complex with an Enzyme Immunoassay that Uses a Mixture of Glycopeptidolipid Antigens. *Clin Infect Dis* **35**: 1328–1335.
- Kobayashi**, T., Stang, E., Fang, K.S., Moerlose, P. de, Parton, R.G., and Gruenberg, J. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**: 193–197.
- Koeck**, J.-L., Fabre, M., Simon, F., Daffé, M., Garnotel, é., Matan, A.B., et al. (2011) Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli “*Mycobacterium canettii*” infection suggest the existence

- of an environmental reservoir. *Clin Microbiol Infect* **17**: 1013–1019.
- Koh**, W.-J., Jeon, K., Lee, N.Y., Kim, B.-J., Kook, Y.-H., Lee, S.-H., et al. (2011) Clinical Significance of Differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 405–410.
- Korduláková**, J., Gilleron, M., Puzo, G., Brennan, P.J., Gicquel, B., Mikušová, K., and Jackson, M. (2003) Identification of the Required Acyltransferase Step in the Biosynthesis of the Phosphatidylinositol Mannosides of *Mycobacterium* Species. *J Biol Chem* **278**: 36285–36295.
- Korf**, J., Stoltz, A., Verschoor, J., Baetselier, P. De, and Grooten, J. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *Eur J Immunol* **35**: 890–900.
- Kramnik**, I., Dietrich, W.F., Demant, P., and Bloom, B.R. (2000) Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8560–5.
- Kubica**, G.P., Baess, I., Gordon, R.E., Jenkins, P.A., Kwapinski, J.B.G., Mcdurmont, C., et al. (1972) A Co-operative Numerical Analysis of Rapidly Growing *Mycobacteria*. *J Gen Microbiol* **73**: 55–70.
- Kumar**, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z., and Hasnain, S.E. (2017) Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol* **307**: 481–489.
- Kumar**, A., Deshane, J.S., Crossman, D.K., Bolisetty, S., Yan, B.-S., Kramnik, I., et al. (2008) Heme Oxygenase-1-derived Carbon Monoxide Induces the *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Regulon. *J Biol Chem* **283**: 18032–18039.
- Kumar**, A., Farhana, A., Guidry, L., Saini, V., Hondalus, M., and Steyn, A.J.C. (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev Mol Med* **13**: e39.
- Kumar**, A., Toledo, J.C., Patel, R.P., Lancaster, J.R., Steyn, A.J.C., and Steyn, A.J.C. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11568–73.
- Kumar**, P., Amara, R.R., Challu, V.K., Chadda, V.K., and Satchidanandam, V. (2003) The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model. *Infect Immun* **71**: 1929–37.
- 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**: 2077–8.
- 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.
- Kurtz**, S., McKinnon, K.P., Runge, M.S., Ting, J.P.-Y., and Braunstein, M. (2006) The SecA2 Secretion Factor of *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Growth in Macrophages and Inhibits the Host Immune Response. *Infect Immun* **74**: 6855–6864.
- Kurup**, R., and Chester, K. (2014) Comparative evaluation of ziehl neelsen staining and knowledge, attitudes and practices of laboratory personnel in relation to ziehl nielsen. *West Indian Med J* **63**: 34–9.
- 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* **42**: 240–5.
- Kuwabara**, P.E., and Labouesse, M. (2002) The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* **18**: 193–201.
- Laencina**, L., Dubois, V., Moigne, V. Le, Viljoen, A., Majlessi, L., Pritchard, J., et al. (2018) Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci* **115**: E1002–E1011.
- Lage**, R., Biccigo, D.G.Z., Santos, F.B.C., Chimara, E., Pereira, E.S.P., and Costa, A. da (2015) *Mycobacterium chelonae* cutaneous infection in a patient with mixed connective tissue disease. *An Bras Dermatol* **90**: 104–7.
- Lai**, Y.C., Peng, H.L., and Chang, H.Y. (2001) Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. *Infect Immun* **69**: 7140–5.
- 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**: 2533–40.
- Lamrabet**, O., Mba Medie, F., and Drancourt, M. (2012b) *Acanthamoeba polyphaga*-enhanced growth of *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One* **7**: e29833.
- Lamrabet**, O., Merhej, V., Pontarotti, P., Raoult, D., and Drancourt, M. (2012a) The genealogic tree of mycobacteria reveals a long-standing sympatric life into free-living protozoa. *PLoS One* **7**: e34754.
- Langelaar**, M., Koets, A., Müller, K., Eden, W. van, Noordhuizen, J., Howard, C., et al. (2002) *Mycobacterium paratuberculosis* heat shock protein 70 as a tool in control of paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* **87**: 239–44.
- Lavania**, M., Katoch, K., Katoch, V.M., Gupta, A.K., Chauhan, D.S., Sharma, R., et al. (2008) Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol* **8**: 627–631.
- Lau**, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., and Mavrodi,

- D. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Is Critical for Lung Infection in Mice. *Infect Immun* **72**: 4275–4278.
- Leao, S.C., Tortoli, E., Euzéby, 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 *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2311–3.
- Lee, P.A., Tullman-Ercek, D., and Georgiou, G.** (2006) The Bacterial Twin-Arginine Translocation Pathway. *Annu Rev Microbiol* **60**: 373–395.
- Lee, S.-H., Yoo, H.K., Kim, S.H., Koh, W.-J., Kim, C.K., Park, Y.K., and Kim, H.J.** (2014) Detection and Assessment of Clarithromycin Inducible Resistant Strains Among Korean *Mycobacterium abscessus* Clinical Strains: PCR Methods. *J Clin Lab Anal* **28**: 409–414.
- Lee, S.K., Lee, E.J., Kim, S.K., Chang, J., Jeong, S.H., and Kang, Y.A.** (2012) Changing epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease in South Korea. *Scand J Infect Dis* **44**: 733–738.
- Lefébure, T., and Stanhope, M.J.** (2007) Evolution of the core and pan-genome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol* **8**: R71.
- Lehmann, R.O.N.** (1896) *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*.
- Lehner, T., Wang, Y., Whittall, T., and Bergmeier, L.A.** (2009) Heat Shock Proteins, Their Cell Surface Receptors and Effect on the Immune System. In *Molecular Chaperones and Cell Signalling*. Henderson, B., and Pockley, A.G. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 160–178.
- Letek, M., González, P., MacArthur, I., Rodríguez, H., Freeman, T.C., Valero-Rello, A., et al.** (2010) The Genome of a Pathogenic *Rhodococcus*: Cooptive Virulence Underpinned by Key Gene Acquisitions. *PLoS Genet* **6**: e1001145.
- Lewis, K.N., Liao, R., Guinn, K.M., Hickey, M.J., Smith, S., Behr, M.A., and Sherman, D.R.** (2003) Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *J Infect Dis* **187**: 117–123.
- Li, A.H., Waddell, S.J., Hinds, J., Malloff, C.A., Bains, M., Hancock, R.E., et al.** (2010) Contrasting Transcriptional Responses of a Virulent and an Attenuated Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Infecting Macrophages. *PLoS One* **5**: e11066.
- Li, W., Sanchez-Hidalgo, A., Jones, V., Moura, V.C.N. de, North, E.J., and Jackson, M.** (2017) Synergistic Interactions of MmpL3 Inhibitors with Antitubercular Compounds *In Vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: e02399-16.
- Li, W., Upadhyay, A., Fontes, F.L., North, E.J., Wang, Y., Crans, D.C., et al.** (2014) Novel Insights into the Mechanism of Inhibition of MmpL3, a Target of Multiple Pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 6413–6423.
- Li, W., Yazidi, A., Pandya, A.N., Hegde, P., Tong, W., Calado Nogueira de Moura, V., et al.** (2018) MmpL3 as a Target for the Treatment of Drug-Resistant Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Front Microbiol* **9**: 1547.
- Long, F., Su, C.-C., Zimmermann, M.T., Boyken, S.E., Rajashankar, K.R., Jernigan, R.L., and Yu, E.W.** (2010) Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature* **467**: 484–8.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S.** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Low, K.L., Rao, P.S.S., Shui, G., Bendt, A.K., Pethe, K., Dick, T., and Wenk, M.R.** (2009) Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Bacteriol* **191**: 5037–43.
- Lubelski, J., Konings, W.N., and Driessen, A.J.M.** (2007) Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 463–76.
- Lun, S., Guo, H., Onajole, O.K., Pieroni, M., Gunosewoyo, H., Chen, G., et al.** (2013) Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **4**: 2907.
- Lyons, C.R., Byrd, T.F., and Howard, S.T.** (2002) A polymorphic region in *Mycobacterium abscessus* contains a novel insertion sequence element b. *Microbiology* **148**: 2987–2996.
- Lyu, J., Jang, H.J., Song, J.W., Choi, C.-M., Oh, Y.-M., Lee, S. Do, et al.** (2011) Outcomes in patients with *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease treated with long-term injectable drugs. *Respir Med* **105**: 781–787.
- 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., Konjek, J., Roux, A.-L., Thiberge, J.-M., Bastian, S., Leão, S.C., 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.
- MacMicking, J.D.** (2012) Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* **12**: 367–382.
- Macomber, L., and Imlay, J.A.** (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad*

- Sci* **106**: 8344–8349.
- Madejczyk**, M.S., and Ballatori, N. (2012) The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1818**: 651–657.
- 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**: 1274–82.
- Malcolm**, K.C., Caceres, S.M., Honda, J.R., Davidson, R.M., Epperson, L.E., Strong, M., et al. (2017) *Mycobacterium abscessus* Displays Fitness for Fomite Transmission. *Appl Environ Microbiol* **83**: e00562-17.
- Malcolm**, K.C., Nichols, E.M., Caceres, S.M., Kret, J.E., Martiniano, S.L., Sagel, S.D., et al. (2013) *Mycobacterium abscessus* Induces a Limited Pattern of Neutrophil Activation That Promotes Pathogen Survival. *PLoS One* **8**: e57402.
- Målen**, H., Berven, F.S., Fladmark, K.E., and Wiker, H.G. (2007) Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* **7**: 1702–1718.
- Manca**, C., Reed, M.B., Freeman, S., Mathema, B., Kreiswirth, B., Barry, C.E., and Kaplan, G. (2004) Differential Monocyte Activation Underlies Strain-Specific *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. *Infect Immun* **72**: 5511–5514.
- Manca**, C., Tsenova, L., Barry, C.E., Bergtold, A., Freeman, S., Haslett, P.A., et al. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* **162**: 6740–6.
- Manca**, C., Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J.M., et al. (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- $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci* **98**: 5752–5757.
- Marrakchi**, H., Lanéelle, M.-A., and Daffé, M. (2014) Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem Biol* **21**: 67–85.
- Marras**, T.K., Chedore, P., Ying, A.M., and Jamieson, F. (2007) Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. *Thorax* **62**: 661–666.
- Marras**, T.K., Mendelson, D., Marchand-Austin, A., May, K., and Jamieson, F.B. (2013) Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Ontario, Canada, 1998–2010. *Emerg Infect Dis* **19**: 1889–91.
- Martin I. Voskuil**, R.W.H. and A.J.C.S. (2009) Oxygen, Nitric Oxide, and Carbon Monoxide Signaling. In *Mycobacterium: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, pp. 118–147.
- Martinez**, A., and Kolter, R. (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* **179**: 5188–94.
- Matsuyama**, S. -i., Yokota, N., and Tokuda, H. (1997) A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* **16**: 6947–6955.
- Matsuyama**, S., Tajima, T., and Tokuda, H. (1995) A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J* **14**: 3365–72.
- Maugein**, J., Dailloux, M., Carbonnelle, B., Vincent, V., Grosset, J., and French Mycobacteria Study Group (2005) Sentinel-site surveillance of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Eur Respir J* **26**: 1092–1096.
- Mazur**, T., Hadaś, E., and Iwanicka, I. (1995) The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* **46**: 106–8.
- McDonough**, J.A., Hacker, K.E., Flores, A.R., Pavelka, M.S., and Braunstein, M. (2005) The twin-arginine translocation pathway of *Mycobacterium smegmatis* is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases. *J Bacteriol* **187**: 7667–79.
- McKinney**, J.D., zu Bentrup, K.H., Muñoz-Elías, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.-T., et al. (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**: 735–738.
- 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., and Reytrat, J.-M. (2009) Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1331–8.
- Medjahed**, H., and Singh, A.K. (2010) Genetic manipulation of *Mycobacterium abscessus*. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 10**: Unit 10D.2.
- Meghji**, S., White, P.A., Nair, S.P., Reddi, K., Heron, K., Henderson, B., et al. (1997) *Mycobacterium tuberculosis* chaperonin 10 stimulates bone resorption: a potential contributory factor in Pott's disease. *J Exp Med* **186**: 1241–6.
- Mehra**, A., Zahra, A., Thompson, V., Sirisaengtaksin, N., Wells, A., Porto, M., et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis* Type VII Secreted Effector EsxH Targets Host ESCRT to Impair Trafficking. *PLoS Pathog* **9**: e1003734.
- Meissner**, G., Schroder, K.H., Amadio, G.E., Anz, W., Chaparas, S., Engel, H.W.B., et al. (1974) A Cooperative Numerical Analysis of Nonscoto- and Nonphotochromogenic Slowly Growing Mycobacteria. *J Gen Microbiol* **83**: 207–235.
- Middlebrook**, G., Dubos, R.J., and Pierce, C. (1947) Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J Exp Med* **86**: 175–84.
- Mignard**, S., and Flandrois, J.-P. (2008) A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees.

- Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1432–1441.
- Milano**, A., Pasca, M.R., Proveddi, R., Lucarelli, A.P., Manina, G., Luisa de Jesus Lopes Ribeiro, A., et al. (2009) Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5–MmpL5 efflux system. *Tuberculosis* **89**: 84–90.
- Miltner**, E.C., and Bermudez, L.E. (2000) *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1990–4.
- Minton**, A.P. (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem* **276**: 10577–80.
- Miranda-CasoLuengo**, A.A., Staunton, P.M., Dinan, A.M., Lohan, A.J., and Loftus, B.J. (2016) Functional characterization of the *Mycobacterium abscessus* genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence. *BMC Genomics* **17**: 553.
- Moigne**, V. Le, Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., et al. (2016) MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection. *Infect Immun* **84**: 2895–2903.
- Moliner**, C., Fournier, P.-E., and Raoult, D. (2010) Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 281–294.
- Moliner**, C., Raoult, D., and Fournier, P.-E. (2009) Evidence of horizontal gene transfer between amoeba and bacteria. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 2**: 178–80.
- Moncrief**, M.B., and Maguire, M.E. (1998) Magnesium and the role of MgtC in growth of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **66**: 3802–9.
- Montecalvo**, M.A., Forester, G., Tsang, A.Y., Moulin, G. du, and Wormser, G.P. (1994) Colonisation of potable water with *Mycobacterium avium* complex in homes of HIV-infected patients. *Lancet (London, England)* **343**: 1639.
- Moore**, M., and Frerichs, J.B. (1953) An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J Invest Dermatol* **20**: 133–69.
- Mougari**, F., Guglielmetti, L., Raskine, L., Sermet-Gaudelus, I., Veziris, N., and Cambau, E. (2016) Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* **14**: 1139–1154.
- Moulin**, G.C. du, Stottmeier, K.D., Pelletier, P.A., Tsang, A.Y., and Hedley-Whyte, J. (1988) Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *JAMA* **260**: 1599–601.
- 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**: 33–7.
- Mukhopadhyay**, S., Nair, S., and Ghosh, S. (2012) Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 463–485.
- Muñoz-Elías**, E.J., and McKinney, J.D. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med* **11**: 638–44.
- Murakami**, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**: 587–593.
- Nair**, S., and Finkel, S.E. (2004) Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase. *J Bacteriol* **186**: 4192–4198.
- Nakashima**, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Hayashi, K., Nagata, C., Hoshino, K., et al. (2013) Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* **500**: 102–106.
- Nazarova**, E. V, Montague, C.R., La, T., Wilburn, K.M., Sukumar, N., Lee, W., et al. (2017) Rv3723/LucA coordinates fatty acid and cholesterol uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Elife* **6**.
- Neckers**, L., and Tatu, U. (2008) Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe* **4**: 519–27.
- Nelson**, N., and Harvey, W.R. (1999) Vacuolar and Plasma Membrane Proton-Adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* **79**: 361–385.
- Nessar**, R., Cambau, E., Reyrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2012) *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* **67**: 810–8.
- 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.
- Newman**, M.J., Addo, K.K., Aboagye, S., Bonsu, F.A., Caulley, P., Hesse, I.F.A., et al. (2007) Culture and sensitivity of mycobacterial isolates from cases of pulmonary tuberculosis classified as treatment failures in a teaching hospital. *West Afr J Med* **26**: 131–3.
- Neyrolles**, O., Hernández-Pando, R., Pietri-Rouxel, F., Fornès, P., Tailleux, L., Payán, J.A.B., et al. (2006) Is Adipose Tissue a Place for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence? *PLoS One* **1**: e43.
- Nightingale**, S.D., Byrd, L.T., Southern, P.M., Jockusch, J.D., Cal, S.X., and Wynne, B.A. (1992) Incidence of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis* **165**: 1082–5.
- Nigou**, J., Gilleron, M., Rojas, M., García, L.F., Thurnher, M., and Puzo, G. (2002) *Mycobacterium*

- lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes Infect* **4**: 945–53.
- Nigou, J.**, Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., and Puzo, G. (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* **166**: 7477–85.
- Nikaido, H.** (2009) Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**: 119–146.
- Nishiuchi, Y.**, Iwamoto, T., and Maruyama, F. (2017) Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Front Med* **4**: 27.
- Nishiuchi, Y.**, Maekura, R., Kitada, S., Tamaru, A., Taguri, T., Kira, Y., et al. (2007) The Recovery of *Mycobacterium avium*-intracellulare Complex (MAC) from the Residential Bathrooms of Patients with Pulmonary MAC. *Clin Infect Dis* **45**: 347–351.
- Nishiuchi, Y.**, Tamura, A., Kitada, S., Taguri, T., Matsumoto, S., Tateishi, Y., et al. (2009) *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Jpn J Infect Dis* **62**: 182–6.
- Nosanchuk, J.D.**, and Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* **5**: 203–23.
- O'Driscoll, C.**, Konjek, J., Heym, B., Fitzgibbon, M.M., Plant, B.J., Ní Chróinín, M., 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**: 170–8.
- Ochman, H.**, Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299–304.
- Ogata, H.**, Scola, B. La, Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C., et al. (2006) Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet* **2**: e76.
- 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.
- Ojha, A.**, Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., and Hatfull, G.F. (2005) GroEL1: A Dedicated Chaperone Involved in Mycolic Acid Biosynthesis during Biofilm Formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **123**: 861–873.
- Olivier, K.N.**, Weber, D.J., Wallace, R.J., Faiz, A.R., Lee, J.-H., Zhang, Y., et al. (2003) Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 828–834.
- Onwueme, K.C.**, Vos, C.J., Zurita, J., Ferreras, J.A., and Quadri, L.E.N. (2005) The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Prog Lipid Res* **44**: 259–302.
- Opperman, T.J.**, and Nguyen, S.T. (2015) Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front Microbiol* **6**: 421.
- Ostroff, R.M.**, Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**: 5915–23.
- Ostrovsky, D.**, Diomina, G., Lysak, E., Matveeva, E., Ogrel, O., and Trutko, S. (1998) Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains. *Arch Microbiol* **171**: 69–72.
- Owens, C.P.**, Chim, N., Graves, A.B., Harmston, C.A., Iniguez, A., Contreras, H., et al. (2013) The *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein Rv0203 transfers heme to membrane proteins MmpL3 and MmpL11. *J Biol Chem* **288**: 21714–28.
- Pabst, M.J.**, Gross, J.M., Brozna, J.P., and Goren, M.B. (1988) Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **140**: 634–40.
- Pacheco, S.A.**, Hsu, F.-F., Powers, K.M., and Purdy, G.E. (2013) MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **288**: 24213–22.
- Pagnier, I.**, Raoult, D., and Scola, B. La (2008) Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ Microbiol* **10**: 1135–1144.
- Pak, J.E.**, Ekende, E.N., Kifle, E.G., O'Connell, J.D., Angelis, F. De, Tessema, M.B., et al. (2013) Structures of intermediate transport states of ZneA, a Zn(II)/proton antiporter. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 18484–18489.
- Pan, H.**, Yan, B.-S., Rojas, M., Shebzukhov, Y. V., Zhou, H., Kobzik, L., et al. (2005) *lpr1* gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* **434**: 767–772.
- Pandey, A.K.**, and Sasseti, C.M. (2008) Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 4376–4380.
- Park, I.K.**, Hsu, A.P., Tettelin, H., Shallom, S.J., Drake, S.K., Ding, L., et al. (2015) Clonal Diversification and Changes in Lipid Traits and Colony Morphology in *Mycobacterium abscessus* Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* **53**: 3438–47.
- Pasca, M.R.**, Gugliera, P., Rossi, E. De, Zara, F., and Riccardi, G. (2005) *mmpL7* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Responsible for Isoniazid Efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4775–4777.



- Pasula**, R., Wisniewski, P., and Martin, W.J. (2002) Fibronectin facilitates Mycobacterium tuberculosis attachment to murine alveolar macrophages. *Infect Immun* **70**: 1287–92.
- Paulsen**, I.T., Brown, M.H., and Skurray, R.A. (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**: 575–608.
- Pawlik**, A., Garnier, G., Orgeur, M., Tong, P., Lohan, A., Chevalier, F. Le, Sapriel, G., Roux, A.-L., Conlon, K., Honoré, N., Dillies, M.-A., Ma, L., Bouchier, C., Coppée, J.-Y., Gaillard, J.-L., Gordon, S. V., 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.
- Pegg**, A.E. (1986) Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* **234**: 249–62.
- Pennini**, M.E., Pai, R.K., Schultz, D.C., Boom, W.H., and Harding, C. V (2006) Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein inhibits IFN- $\gamma$ -induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J Immunol* **176**: 4323–30.
- Peracino**, B., Wagner, C., Balest, A., Balbo, A., Pergolizzi, B., Noegel, A.A., et al. (2006) Function and Mechanism of Action of Dictyostelium Nramp1 (Slc11a1) in Bacterial Infection. *Traffic* **7**: 22–38.
- Pérez**, J., Garcia, R., Bach, H., Waard, J.H. de, Jacobs, W.R., Av-Gay, Y., et al. (2006) Mycobacterium tuberculosis transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 6–12.
- Peters**, M., Müller, C., Rüscher-Gerdes, S., Seidel, C., Göbel, U., Pohle, H.D., and Ruf, B. (1995) Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infection in AIDS patients? *J Infect* **31**: 39–44.
- 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* **101**: 13642–13647.
- Peyron**, P., Vaubourgeix, J., Poquet, Y., Levillain, F., Botanch, C., Bardou, F., et al. (2008) Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for M. tuberculosis Persistence. *PLoS Pathog* **4**: e1000204.
- Phillips**, P.L., and Schultz, G.S. (2012) Molecular Mechanisms of Biofilm Infection: Biofilm Virulence Factors. *Adv Wound Care* **1**: 109–114.
- Pierre-Audigier**, C., Ferroni, A., Sermet-Gaudelus, I., Bourgeois, M. Le, Offredo, C., Vu-Thien, H., 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 Chastellier, C. de (2004) and 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.
- Poce**, G., Consalvi, S., and Biava, M. (2016) MmpL3 Inhibitors: Diverse Chemical Scaffolds Inhibit the Same Target. *Mini Rev Med Chem* **16**: 1274–1283.
- Poulet**, S., and Cole, S.T. (1995) Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in Mycobacterium tuberculosis. *Arch Microbiol* **163**: 87–95.
- Pradhan**, G., Shrivastva, R., and Mukhopadhyay, S. (2018) Mycobacterial PknG Targets the Rab711 Signaling Pathway To Inhibit Phagosome-Lysosome Fusion. *J Immunol* **201**: 1421–1433.
- Prahlad** K. Rao, †, Bryan A. P. Roxas, † and, and Qingbo Li\*, †,‡ (2007) Determination of Global Protein Turnover in Stressed Mycobacterium Cells Using Hybrid-Linear Ion Trap-Fourier Transform Mass Spectrometry. .
- Prevots**, D.R., and Marras, T.K. (2015) Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Chest Med* **36**: 13–34.
- Prince**, D.S., Peterson, D.D., Steiner, R.M., Gottlieb, J.E., Scott, R., Israel, H.L., et al. (1989) Infection with *Mycobacterium avium* Complex in Patients without Predisposing Conditions. *N Engl J Med* **321**: 863–868.
- Proca-Ciobanu**, M., Lupascu, G.H., Petrovici, A. I., and Ionescu, M.D. (1975) Electron microscopic study of a pathogenic Acanthamoeba castellanii strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol* **5**: 49–56.
- Puckett**, S., Trujillo, C., Wang, Z., Eoh, H., loerger, T.R., Krieger, I., et al. (2017) Glyoxylate detoxification is an essential function of malate synthase required for carbon assimilation in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E2225–E2232.
- Pukatzi**, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002) The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3159–3164.
- Pym**, A.S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., et al. (2003) Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* **9**: 533–539.
- Quigley**, J., Hughitt, V.K., Velikovskiy, C.A., Mariuzza, R.A., El-Sayed, N.M., and Briken, V. (2017) The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of Mycobacterium tuberculosis. *MBio* **8**.
- Qvist**, T., Taylor-Robinson, D., Waldmann, E., Olesen, H.V., Hansen, C.R., Mathiesen, I.H., 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.
- Ragas**, A., Roussel, L., Puzo, G., and Rivière, M. (2007) The Mycobacterium tuberculosis cell-surface glycoprotein apa as a potential adhesin to

- colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *J Biol Chem* **282**: 5133–42.
- Raghavan**, S., Manzanillo, P., Chan, K., Dovey, C., and Cox, J.S. (2008) Secreted transcription factor controls Mycobacterium tuberculosis virulence. *Nature* **454**: 717–721.
- Raman**, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W.R., Husson, R.N., and Husson, R.N. (2001) The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* **183**: 6119–25.
- Rampini**, S.K., Selchow, P., Keller, C., Ehlers, S., Böttger, E.C., and Sander, P. (2008) LspA inactivation in Mycobacterium tuberculosis results in attenuation without affecting phagosome maturation arrest. *Microbiology* **154**: 2991–3001.
- Rao**, S.P.S., Lakshminarayana, S.B., Kondreddi, R.R., Herve, M., Camacho, L.R., Bifani, P., et al. (2013) Indolcarboxamide Is a Preclinical Candidate for Treating Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Sci Transl Med* **5**: 214ra168–214ra168.
- Rao**, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A., and Glickman, M.S. (2005) Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med* **201**: 535–543.
- Rastogi**, N., and David, H.L. (1988) Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie* **70**: 1101–1120.
- Ravn**, P., Demissie, A., Eguale, T., Wondwosson, H., Lein, D., Amoudy, H.A., et al. (1999) Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* **179**: 637–645.
- Raynaud**, C., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganeli, R., et al. (2002) Phospholipases C are involved in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* **45**: 203–17.
- Reed**, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., et al. (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* **431**: 84–87.
- Remuñán**, M.J., Pérez-Herrán, E., Rullás, J., Alemparte, C., Martínez-Hoyos, M., Dow, D.J., et al. (2013) Tetrahydropyrazolo[1,5-a]Pyrimidine-3-Carboxamide and N-Benzyl-6',7'-Dihydrospiro[Piperidine-4,4'-Thieno[3,2-c]Pyran] Analogues with Bactericidal Efficacy against Mycobacterium tuberculosis Targeting MmpL3. *PLoS One* **8**: e60933.
- Reva**, O., Korotetskiy, I., and Ilin, A. (2015) Role of the horizontal gene exchange in evolution of pathogenic Mycobacteria. *BMC Evol Biol* **15**: S2.
- Rhee**, K.Y., Carvalho, L.P.S. de, Bryk, R., Ehrt, S., Marrero, J., Park, S.W., et al. (2011) Central carbon metabolism in Mycobacterium tuberculosis: an unexpected frontier. *Trends Microbiol* **19**: 307–14.
- Rhoades**, E.R., Archambault, A.S., Greendyke, R., Hsu, 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- $\alpha$  by Preventing Interaction with TLR2. *J Immunol* **183**: 1997–2007.
- Ribet**, D., and Cossart, P. (2010) Pathogen-Mediated Posttranslational Modifications: A Re-emerging Field. *Cell* **143**: 694–702.
- Richard**, M., Gutiérrez, A.V., Viljoen, A.J., Ghigo, E., Blaise, M., and Kremer, L. (2018) Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in Mycobacterium abscessus. *Front Microbiol* **9**: 649.
- Rigel**, N.W., Gibbons, H.S., McCann, J.R., McDonough, J.A., Kurtz, S., and Braunstein, M. (2009) The Accessory SecA2 System of Mycobacteria Requires ATP Binding and the Canonical SecA1. *J Biol Chem* **284**: 9927–36.
- Ringshausen**, F.C., Apel, R.-M., Bange, F.-C., Roux, A. de, Pletz, M.W., Rademacher, J., et al. (2013) Burden and trends of hospitalisations associated with pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections in Germany, 2005-2011. *BMC Infect Dis* **13**: 231.
- Ripoll**, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., et al. (2009) Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. *PLoS One* **4**: e5660.
- Rodrigues**, L., Machado, D., Couto, I., Amaral, L., and Viveiros, M. (2012) Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Infect Genet Evol* **12**: 695–700.
- Rodríguez-Zaragoza**, S. (1994) Ecology of Free-Living Amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**: 225–241.
- Rodriguez**, G.M. (2006) Control of iron metabolism in Mycobacterium tuberculosis. *Trends Microbiol* **14**: 320–327.
- Rodríguez**, J.E., Ramírez, A.S., Salas, L.P., Helguera-Repetto, C., Gonzalez-y-Merchand, J., Soto, C.Y., and Hernández-Pando, R. (2013) Transcription of Genes Involved in Sulfolipid and Polyacyltrehalose Biosynthesis of Mycobacterium tuberculosis in Experimental Latent Tuberculosis Infection. *PLoS One* **8**: e58378.
- Rohde**, K.H., Abramovitch, R.B., and Russell, D.G. (2007) Mycobacterium tuberculosis Invasion of Macrophages: Linking Bacterial Gene Expression to Environmental Cues. *Cell Host Microbe* **2**: 352–364.
- Rominski**, A., Selchow, P., Becker, K., Brülle, J.K., Dal Molin, M., and Sander, P. (2017) Elucidation of Mycobacterium abscessus aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **72**: 2191–2200.
- Rosa**, V. La, Poce, G., Canseco, J.O., Buroni, S., Pasca, M.R., Biava, M., et al. (2012) MmpL3 Is the Cellular Target of the Antitubercular Pyrrole Derivative BM212. *Antimicrob Agents Chemo-*

- ther **56**: 324–331.
- Rosenzweig**, D.Y. (1979) Pulmonary mycobacterial infections due to *Mycobacterium intracellulare-avium* complex. Clinical features and course in 100 consecutive cases. *Chest* **75**: 115–9.
- 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.
- Roukens**, A.H., Mendels, E.J., Verbeet, N.L., Borne, P.A. von dem, Nicolae-Cristea, A.R., Bentvelsen, R.G., et al. (2014) Disseminated Cutaneous *Mycobacterium chelonae* Infection in a Patient With Acute Myeloid Leukemia. *Open Forum Infect Dis* **1**: ofu103-ofu103.
- Rousseau**, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.-C., et al. (2003) Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. *Cell Microbiol* **5**: 405–15.
- Rousseau**, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Avé, P., et al. (2004) Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol* **6**: 277–87.
- Roux**, A.-L., Catherinot, E., Ripoll, F., Soismier, N., Macheras, E., Ravilly, S., 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., Catherinot, E., Soismier, N., Heym, B., Bellis, G., Lemonnier, 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., Ray, A., Pawlik, A., Medjahed, H., Etienne, G., Rottman, M., et al. (2011) Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol* **13**: 692–704.
- Roux**, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., et al. (2016) The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* **6**.
- Rowbotham**, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–83.
- Rowbotham**, T.J. (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* **22**: 678–89.
- Ruggerone**, P., Murakami, S., Pos, K.M., and Vargiu, A. V. (2013) RND efflux pumps: structural information translated into function and inhibition mechanisms. *Curr Top Med Chem* **13**: 3079–100.
- Runyon**, E.H. (1965) Typical mycobacterial: their classification. *Am Rev Respir Dis* **91**: 288–9.
- Russell**, D.G., VanderVen, B.C., Lee, W., Abramovitch, R.B., Kim, M., Homolka, S., et al. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* Wears What It Eats. *Cell Host Microbe* **8**: 68–76.
- Saavedra**, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L.A., and López-Marín, L.M. (2001) Mycobacterial di-O-acyl-trehalose inhibits mitogen- and antigen-induced proliferation of murine T cells in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 1081–8.
- Saier**, M.H. (2006) Protein Secretion and Membrane Insertion Systems in Gram-Negative Bacteria. *J Membr Biol* **214**: 75–90.
- Saier**, M.H., Tam, R., Reizer, A., and Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11**: 841–7.
- Saito**, H., and Tsukamura, M. (1976) *Mycobacterium intracellulare* from public bath water. *Jpn J Microbiol* **20**: 561–3.
- Salah**, I. Ben, Adékambi, T., and Drancourt, M. (2009a) *Mycobacterium phocaicum* in therapy pool water. *Int J Hyg Environ Health* **212**: 439–444.
- Salah**, I. Ben, and Drancourt, M. (2010) Surviving within the amoebal exocyst: the *Mycobacterium avium* complex paradigm. *BMC Microbiol* **10**: 99.
- Salah**, I.B., Ghigo, E., and Drancourt, M. (2009b) Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* **15**: 894–905.
- Samba-Louaka**, A., Robino, E., Cochard, T., Branger, M., Delafont, V., Aucher, W., et al. (2018) Environmental *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Hosted by Free-Living Amoebae. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 28.
- Sánchez**, A., Espinosa, P., García, T., and Mancilla, R. (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.
- 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: Fig. 1. *J Clin Microbiol* **49**: 2293–2295.
- Sander**, P., Rezwan, M., Walker, B., Rampini, S.K., Kroppenstedt, R.M., Ehlers, S., et al. (2004) Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **52**: 1543–1552.
- Sandhu**, P., and Akhter, Y. (2018) Evolution of structural fitness and multifunctional aspects of mycobacterial RND family transporters. *Arch Microbiol* **200**: 19–31.
- Sandhu**, P., and Akhter, Y. (2015) The internal gene duplication and interrupted coding sequences in the *MmpL* genes of *Mycobacterium tuberculosis*: Towards understanding the multidrug

- transport in an evolutionary perspective. *Int J Med Microbiol* **305**: 413–423.
- Sandhu**, P., and Akhter, Y. (2016) The drug binding sites and transport mechanism of the RND pumps from *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from molecular dynamics simulations. *Arch Biochem Biophys* **592**: 38–49.
- Sanguinetti**, M., Ardito, F., Fiscarelli, E., Sorda, M. La, 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., Houben, E.N.G., Geurtsen, J., Pierson, J., Punder, K. de, Zon, M. van, *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.
- Santucci**, P., Bouzid, F., Smichi, N., Poncin, I., Kremer, L., Chastellier, C. De, *et al.* (2016) Experimental Models of Foamy Macrophages and Approaches for Dissecting the Mechanisms of Lipid Accumulation and Consumption during Dormancy and Reactivation of Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol* **6**: 122.
- Sapriel**, G., Konjek, J., Orgeur, M., Bouri, L., Frézal, L., Roux, A.-L., *et al.* (2016) Genome-wide mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: evolutionary and epidemiological implications. *BMC Genomics* **17**: 118.
- 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.
- Sassi**, M., and Drancourt, M. (2014) Genome analysis reveals three genomospecies in *Mycobacterium abscessus*. *BMC Genomics* **15**: 359.
- Sayes**, F., Sun, L., Di Luca, M., Simeone, R., Degaiffier, N., Fiette, L., *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.
- Scarlata**, G., Pellerito, A.M., Benedetto, M. Di, Massenti, M.F., and Nastasi, A. (1985) Isolation of Mycobacteria from drinking water in Palermo. *Boll Ist Sieroter Milan* **64**: 479–82.
- Schauer**, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T., and Fuchs, T.M. (2010) Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* **11**: 573.
- Schets**, F.M., Berg, H.H. van den, Zwaan, R. de, Soolingen, D. van, and Roda Husman, A.M. de (2015) The microbiological quality of water in fish spas with *Garra rufa* fish, the Netherlands, October to November 2012. *Euro Surveill* **20**: 2–8.
- Schnappinger**, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., *et al.* (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages. *J Exp Med* **198**: 693–704.
- Seddon**, P., Fidler, K., Raman, S., Wyatt, H., Ruiz, G., Elston, C., *et al.* (2013) Prevalence of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis clinics, United Kingdom, 2009. *Emerg Infect Dis* **19**: 1128–30.
- Segal**, G., Purcell, M., and Shuman, H.A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1669–74.
- Sekizuka**, T., Kai, M., Nakanaga, K., Nakata, N., Kazumi, Y., Maeda, S., *et al.* (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.
- Senaratne**, R.H., Mobasher, H., Papavinasundaram, K.G., Jenner, P., Lea, E.J., and Draper, P. (1998) Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* **180**: 3541–7.
- Senaratne**, R.H., Silva, A.D. De, Williams, S.J., Mougous, J.D., Reader, J.R., Zhang, T., *et al.* (2006) 5'-Adenosinephosphosulphate reductase (CysH) protects *Mycobacterium tuberculosis* against free radicals during chronic infection phase in mice. *Mol Microbiol* **59**: 1744–1753.
- Sennhauser**, G., Bukowska, M.A., Briand, C., and Grütter, M.G. (2009) Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **389**: 134–145.
- Serafini**, A., Boldrin, F., Palu, 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.
- Serafini**, A., Pisu, D., Palù, G., Rodriguez, G.M., and Manganelli, R. (2013) The ESX-3 secretion system is necessary for iron and zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **8**: e78351.
- Sermet-Gaudelus**, I., Bourgeois, M. Le, Pierre-Audigier, C., Offredo, C., Guillemot, D., Halley, S., *et al.* (2003) *Mycobacterium abscessus* and children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* **9**: 1587–91.
- Shah**, P., and Swiatlo, E. (2008) A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **68**: 4–16.
- Sharbati-Tehrani**, S., Stephan, J., Holland, G., Appel, B., Niederweis, M., and Lewin, A. (2005) Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **151**: 2403–2410.
- Shi**, L., Sohaskey, C.D., Pfeiffer, C., Datta, P., Parks, M., McFadden, J., *et al.* (2010) Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. *Mol Microbiol* **78**: 1199–1215.
- Shiloh**, M.U., Manzanillo, P., and Cox, J.S. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* Senses Host-

- Derived Carbon Monoxide during Macrophage Infection. *Cell Host Microbe* **3**: 323–330.
- Shim**, T.N., Lew, T.T., and Preston, P.W. (2012) Disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae*. *Lancet Infect Dis* **12**: 254.
- Shin**, D.-M., Yang, C.-S., Yuk, J.-M., Lee, J.-Y., Kim, K.H., Shin, S.J., et al. (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.
- Shin**, D.-M., Jeon, B.-Y., Lee, H.-M., Jin, H.S., Yuk, J.-M., Song, C.-H., et al. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* Eis Regulates Autophagy, Inflammation, and Cell Death through Redox-dependent Signaling. *PLoS Pathog* **6**: e1001230.
- Shin**, S.J., Wu, C.-w., Steinberg, H., and Talaat, A.M. (2006) Identification of Novel Virulence Determinants in *Mycobacterium paratuberculosis* by Screening a Library of Insertional Mutants. *Infect Immun* **74**: 3825–3833.
- Shinnick**, T.M., and Good, R.C. (1994) *Mycobacterial* taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**: 884–901.
- Siddiqui**, R., and Khan, N.A. (2012) *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Exp Parasitol* **130**: 95–97.
- Siegrist**, M.S., Unnikrishnan, M., McConnell, M.J., Borowsky, M., Cheng, T.-Y., Siddiqi, N., et al. (2009) *Mycobacterial* Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 18792–18797.
- Sieling**, P.A., Chatterjee, D., Porcelli, S.A., Prigozy, T.I., Mazzaccaro, R.J., Soriano, T., et al. (1995) CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**: 227–30.
- Sievers**, F., and Higgins, D.G. (2014) Clustal omega. *Curr Protoc Bioinforma* **48**: 3.13.1-16.
- Silva**, C.L., Ekizlerian, S.M., and Fazioli, R.A. (1985) Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Am J Pathol* **118**: 238–47.
- Silva**, J.L. da, Nguyen, J., Fennelly, K.P., Zelazny, A.M., and Olivier, K.N. (2018) Survival of pathogenic *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* in *Acanthamoeba castellanii*. *Res Microbiol* **169**: 56–60.
- Simeone**, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012) Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* **8**: e1002507.
- Simeone**, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015) Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathog* **11**: e1004650.
- Singh**, A., Crossman, D.K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M.I., Renfrow, M.B., and Steyn, A.J.C. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 Maintains Redox Homeostasis by Regulating Virulence Lipid Anabolism to Modulate Macrophage Response. *PLoS Pathog* **5**: e1000545.
- Singh**, A., Guidry, L., Narasimhulu, K. V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K.E., et al. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O<sub>2</sub> and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 11562–11567.
- Singh**, A., Gupta, R., Vishwakarma, R.A., Narayanan, P.R., Paramasivan, C.N., Ramanathan, V.D., and Tyagi, A.K. (2005) Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in the spleens of guinea pigs. *J Bacteriol* **187**: 4173–86.
- Singh**, R., Singh, A., and Tyagi, A.K. (2005) Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **85**: 325–335.
- Sison**, J.P., Kemper, C.A., Loveless, M., McShane, D., Visvesvara, G.S., and Deresinski, S.C. (1995) Disseminated *acanthamoeba* infection in patients with AIDS: case reports and review. *Clin Infect Dis* **20**: 1207–16.
- Slim-Saidi**, L., Mehiri-Zeghal, E., Ghariani, A., and Tritar, F. (2015) Nouvelles méthodes de diagnostic de la tuberculose. *Rev Pneumol Clin* **71**: 110–121.
- Slocum**, R.D., Kaur-Sawhney, R., and Galston, A.W. (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch Biochem Biophys* **235**: 283–303.
- Smith**, I. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **16**: 463–96.
- Solomon**, J.M., Leung, G.S., and Isberg, R.R. (2003) Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin. *Infect Immun* **71**: 3578–86.
- Solomon**, J.M., Rupper, A., Cardelli, J.A., and Isberg, R.R. (2000) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect Immun* **68**: 2939–47.
- Sondén**, B., Kocíncová, D., Deshayes, C., Euphrasie, D., Rhayat, L., Laval, F., et al. (2005) Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Mol Microbiol* **58**: 426–40.
- Soolingen**, D. Van, Hoogenboezem, T., Haas, P.E.W. De, Hermans, P.W.M., Koedam, M.A., Teppema, K.S., et al. (1997) A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1236–1245.
- Sousa**, E.H.S., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2007) DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci* **16**: 1708–19.
- Sousa**, S., Bandeira, M., Carvalho, P.A., Duarte, A., and Jordao, L. (2015) Nontuberculous mycobacteria

- pathogenesis and biofilm assembly. *Int J Mycobacteriology* **4**: 36–43.
- Spargo**, B.J., Crowe, L.M., Ionedo, T., Beaman, B.L., and Crowe, J.H. (1991) Cord Factor ( $\alpha,\alpha$ -Trehalose 6,6'-Dimycolate) Inhibits Fusion Between Phospholipid Vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 737–740.
- Stadthagen**, G., Jackson, M., Charles, P., Boudou, F., Barilone, N., Huerre, M., et al. (2006) Comparative investigation of the pathogenicity of three *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the synthesis of p-hydroxybenzoic acid derivatives. *Microbes Infect* **8**: 2245–2253.
- Stahl**, C., Kubetzko, S., Kaps, I., Seeber, S., Engelhardt, H., and Niederweis, M. (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **40**: 451–64.
- Stamm**, L.M., Morisaki, J.H., Gao, L.-Y., Jeng, R.L., McDonald, K.L., Roth, R., et al. (2003) *Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. *J Exp Med* **198**: 1361–1368.
- Stanford**, J.L., Pattynot, R., Portaelt, F., and Gunthorpe, J. (1972) Studies on *Mycobacterium chelonae*.
- Stanley**, S.A., Grant, S.S., Kawate, T., Iwase, N., Shimizu, M., Wivagg, C., et al. (2012) Identification of Novel Inhibitors of *M. tuberculosis* Growth Using Whole Cell Based High-Throughput Screening. *ACS Chem Biol* **7**: 1377–1384.
- 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**: 3143–52.
- 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* **100**: 13001–13006.
- Stec**, J., Onajole, O.K., Lun, S., Guo, H., Merenbloom, B., Vistoli, G., et al. (2016) Indole-2-carboxamide-based MmpL3 Inhibitors Show Exceptional Antitubercular Activity in an Animal Model of Tuberculosis Infection. *J Med Chem* **59**: 6232–6247.
- Steinert**, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., and Quinn, F. (1998a) *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2256–61.
- Steinert**, M., Ockert, G., Lück, C., and Hacker, J. (1998b) Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralbl Bacteriol* **288**: 331–42.
- Stelzmueller**, I., Dunst, K.M., Wiesmayr, S., Zangerle, R., Hengster, P., and Bonatti, H. (2005) *Mycobacterium chelonae* skin infection in kidney-pancreas recipient. *Emerg Infect Dis* **11**: 352–4.
- Stewart**, G.R., Patel, J., Robertson, B.D., Rae, A., and Young, D.B. (2005) *Mycobacterium* Mutants with Defective Control of Phagosomal Acidification. *PLoS Pathog* **1**: e33.
- Steyn**, A.J.C., Collins, D.M., Hondalus, M.K., Jacobs, W.R., Kawakami, R.P., and Bloom, B.R. (2002) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3147–3152.
- Stine**, T.M., Harris, A.A., Levin, S., Rivera, N., and Kaplan, R.L. (1987) A Pseudoepidemic due to Atypical *Mycobacteria* in a Hospital Water Supply. *JAMA J Am Med Assoc* **258**: 809.
- Stinear**, T.P., Seemann, T., Harrison, P.F., Jenkin, G.A., Davies, J.K., Johnson, P.D.R., et al. (2008) Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* **18**: 729–741.
- Storey**, M. V., Winiacka-krusnell, J., Ashbolt, N.J., and Stenström, T. (2004) The Efficacy of Heat and Chlorine Treatment against Thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* **36**: 656–662.
- Strahl**, E.D., Gillaspay, G.E., and Falkinham, J.O. (2001) Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4432–9.
- Stuart**, L.M., and Ezekowitz, R.A.B. (2005) Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity* **22**: 539–550.
- Strong**, E.J., and West, N.P. (2018) Use of Soluble Extracellular Regions of MmpL (SERoM) as Vaccines for Tuberculosis. *Sci Rep* **8**: 5604.
- Sturgill-Koszycki**, S., Schaible, U.E., and Russell, D.G. (1996) *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* **15**: 6960–8.
- Sturgill-Koszycki**, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., et al. (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**: 678–81.
- Su**, C.-C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H., and Yu, E.W. (2006) Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J Bacteriol* **188**: 7290–6.
- Su**, C.-C., Long, F., and Yu, E.W. (2011b) The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle. *Protein Sci* **20**: 6–18.
- Su**, C.-C., Long, F., Zimmermann, M.T., Rajashankar, K.R., Jernigan, R.L., and Yu, E.W. (2011a) Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature* **470**: 558–62.
- 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**, M.S., and Isberg, R.R. (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**: 3609–20.
- Székely**, R., and Cole, S.T. (2016) Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function. *Mol Microbiol* **99**: 831–834.
- Tabor**, C.W., and Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**: 749–790.
- Tabor**, C.W., and Tabor, H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* **49**: 81–99.
- Tahlan**, K., Wilson, R., Kastrinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., et al. (2012) SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1797–809.
- Tailleux**, L., Schwartz, O., Herrmann, J.-L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., et al. (2003) DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* **197**: 121–7.
- Tajima**, T., Yokota, N., Matsuyama, S., and Tokuda, H. (1998) Genetic analyses of the in vivo function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *FEBS Lett* **439**: 51–4.
- Tan**, J.L., Ng, K.P., Ong, C.S., and Ngeow, Y.F. (2017) Genomic Comparisons Reveal Microevolutionary Differences in *Mycobacterium abscessus* Subspecies. *Front Microbiol* **8**: 2042.
- Tan**, J.L., Ngeow, Y.F., and Choo, S.W. (2015) Support from Phylogenomic Networks and Subspecies Signatures for Separation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium boletii*. *J Clin Microbiol* **53**: 3042–3046.
- 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.
- 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.
- Taylor**, S.J., Ahonen, L.J., Leij, F.A.A.M. de, and Dale, J.W. (2003) Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4316–9.
- 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.
- Tenant**, R., and Bermudez, L.E. (2006) *Mycobacterium avium* Genes Upregulated Upon Infection of *Acanthamoeba castellanii* Demonstrate a Common Response to the Intracellular Environment. *Curr Microbiol* **52**: 128–133.
- Tettelin**, H., Sampaio, E.P., Daugherty, S.C., Hine, E., Riley, D.R., Sadzewicz, L., et al. (2012) Genomic Insights into the Emerging Human Pathogen *Mycobacterium massiliense*. *J Bacteriol* **194**: 5450–5450.
- Thoma-Uszynski**, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M.T., Engele, M., Sieling, P.A., et al. (2001) Induction of Direct Antimicrobial Activity Through Mammalian Toll-Like Receptors. *Science (80- )* **291**: 1544–1547.
- Thomas**, J.M., and Ashbolt, N.J. (2011) Do Free-Living Amoebae in Treated Drinking Water Systems Present an Emerging Health Risk? *Environ Sci Technol* **45**: 860–869.
- Thomas**, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., and Levi, Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* **97**: 950–963.
- Thomas**, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., and Greub, G. (2006) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2428–38.
- 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.
- Thomas**, V., and McDonnell, G. (2007) Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett Appl Microbiol* **45**: 349–357.
- Thomson**, R., Tolson, C., Sidjabat, H., Huygens, F., and Hargreaves, M. (2013) *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. *BMC Infect Dis* **13**: 241.
- Timpe**, A., and Runyon, E.H. (1954) The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med* **44**: 202–9.
- Tomashefski**, J.F., 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* **154**: 523–528.
- Tortoli**, E., Kohl, T.A., Trovato, A., Baldan, R., Campana, S., Cariani, L., et al. (2017) *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis: low impact of inter-human transmission in Italy. *Eur Respir J* **50**: 1602525.
- 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* **77**: 125–130.
- Touchette**, M.H., Holsclaw, C.M., Previti, M.L., Solomon, V.C., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., and Seeliger, J.C. (2015) The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis* polyacyltrehalose lipid biosynthesis. *J Bacteriol* **197**: 201–10.
- Touchette**, M.H., and Seeliger, J.C. (2017) Transport of outer membrane lipids in mycobacteria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1862**: 1340–1354.

- Toy**, B.R., and Frank, P.J. (2003) Outbreak of Mycobacterium abscessus infection after soft tissue augmentation. *Dermatol Surg* **29**: 971–3.
- Tseng**, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., and Saier, M.H. (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 107–25.
- Tsukamura**, M., Mizuno, S., and Toyama, H. (1984) Differentiation of Mycobacterial Species by Investigation of Petroleum Ether-Soluble Sulfolipids Using Thin-Layer Chromatography after Incubation with [35S]Sulfate. .
- Tufariello**, J.M., Chapman, J.R., Kerantzas, C.A., Wong, K.-W., Vilchère, C., Jones, C.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.
- Tullius**, M. V., Harmston, C.A., Owens, C.P., Chim, N., Morse, R.P., McMath, L.M., et al. (2011) Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5051–6.
- Turenne**, C.Y., Collins, D.M., Alexander, D.C., and Behr, M.A. (2008) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and M. avium subsp. avium are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of M. avium organisms. *J Bacteriol* **190**: 2479–87.
- Uslan**, D.Z., Kowalski, T.J., Wengenack, N.L., Virk, A., and Wilson, J.W. (2006) Skin and Soft Tissue Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Arch Dermatol* **142**: 1287–92.
- Vaerewijck**, M.J.M., Huys, G., Palomino, J.C., Swings, J., and Portaels, F. (2005) Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 911–934.
- Varela**, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., et al. (2012) MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem Biol* **19**: 498–506.
- 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**: 312–4.
- Velmurugan**, K., Chen, B., Miller, J.L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., et al. (2007) Mycobacterium tuberculosis nuoG Is a Virulence Gene That Inhibits Apoptosis of Infected Host Cells. *PLoS Pathog* **3**: e110.
- Vergne**, I., Chua, J., Singh, S.B., and Deretic, V. (2004) Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 367–394.
- Viljoen**, A., Blaise, M., Chastellier, C. de, and Kremer, L. (2016) MAB\_3551c encodes the primary triacylglycerol synthase involved in lipid accumulation in *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol* **102**: 611–627.
- 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.
- Villeneuve**, C., Etienne, G., Abadie, V., Montrozier, H., Bordier, C., Laval, F., et al. (2003) Surface-exposed glycopeptidolipids of Mycobacterium smegmatis specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J Biol Chem* **278**: 51291–300.
- Volkman**, H.E., Clay, H., Beery, D., Chang, J.C.W., Sherman, D.R., and Ramakrishnan, L. (2004) Tuberculous Granuloma Formation Is Enhanced by a Mycobacterium Virulence Determinant. *PLoS Biol* **2**: e367.
- Volkman**, H.E., Pozos, T.C., Zheng, J., Davis, J.M., Rawls, J.F., and Ramakrishnan, L. (2010) Tuberculous Granuloma Induction via Interaction of a Bacterial Secreted Protein with Host Epithelium. *Science (80- )* **327**: 466–469.
- Voss**, J.J. De, Rutter, K., Schroeder, B.G., Su, H., Zhu, Y., Barry, C.E., et al. (2000) The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1252–7.
- Wada**, Y., Saitoh, H., Nakasone, I., and Yamane, N. (2000) [Application of DNA-DNA hybridization, DDH MYCOBACTERIA “Kyokuto” to species-identification of mycobacteria grown in Middlebrook 7H9 broth]. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* **11**: 47–50.
- Wagner**, Y., Noack, B., Hoffmann, T., Jacobs, E., and Christian Lück, P. (2006) Periodontopathogenic bacteria multiply in the environmental amoeba Acanthamoeba castellanii. *Int J Hyg Environ Health* **209**: 535–539.
- Walburger**, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., et al. (2004) Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival Within Macrophages. *Science (80- )* **304**: 1800–1804.
- Wallace**, R.J., Brown, B.A., and Griffith, D.E. (1998) Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**: 453–90.
- Wallace**, R.J., Zhang, Y., Brown, B.A., Fraser, V., Mazurek, G.H., and Maloney, S. (1993) DNA large restriction fragment patterns of sporadic and epidemic nosocomial strains of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus. *J Clin Microbiol* **31**: 2697–701.
- Walochnik**, J., Aichelburg, A., Assadian, O., Steuer, A., Visvesvara, G., Vetter, N., and Aspöck, H. (2008) Granulomatous amoebic encephalitis caused by Acanthamoeba amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol* **46**: 338–40.
- Wang**, J., Thorson, L., Stokes, R.W., Santosuosso, M., Huygen, K., Zganiacz, A., et al. (2004) Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis.



- J Immunol* **173**: 6357–65.
- Wang**, Z., Wu, M., and Sloan, D. (2017) Comparative Genomic Analysis of *Acanthamoeba* Endosymbionts Highlights the Role of Amoebae as a “Melting Pot” Shaping the Rickettsiales Evolution. *Genome Biol Evol* **9**: 3214–3224.
- Wards**, B.J., Lisle, G.W. de, 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., Gulen, M.F., Sala, C., Perin, S.G., Lou, Y., Rybniker, J., et al. (2015) *Mycobacterium tuberculosis* Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. *Cell Host Microbe* **17**: 799–810.
- Wayne**, L.G., Dietz, T.M., Gernez-Rieux, C., Jenkins, P.A., Käppler, W., Kubica, G.P., et al. (1971) A cooperative numerical analysis of scotochromogenic slowly growing mycobacteria. *J Gen Microbiol* **66**: 255–71.
- Wayne**, L.G., and Diaz, G.A. (1985) Identification of mycobacteria by specific precipitation of catalase with absorbed sera. *J Clin Microbiol* **21**: 721–5.
- Wayne**, L.G., and Good, R.C. (1985) The “Atypical” Mycobacteria: Recognition and Disease Association. *CRC Crit Rev Microbiol* **12**: 185–222.
- Wel**, N. van der, Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., Zon, M. van, Pierson, J., et al. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* **129**: 1287–1298.
- Wells**, R.M., Jones, C.M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K.S., et al. (2013) Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **9**: e1003120.
- Wendt**, S.L., George, K.L., Parker, B.C., Gruft, H., and Falkinham, J.O. (1980) Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. *Am Rev Respir Dis* **122**: 259–63.
- Whan**, L., Grant, I.R., and Rowe, M.T. (2006) Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol* **6**: 63.
- Whang**, J., Back, Y.W., Lee, K.-I., Fujiwara, N., Paik, S., Choi, C.H., et al. (2017) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis* **8**: e3012.
- Wheeler**, T.J., Clements, J., Finn, R.D., Krogh, A., Brown, M., Mian, I., et al. (2014) Skylign: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models. *BMC Bioinformatics* **15**: 7.
- White**, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., and Petris, M.J. (2009) A Role for the ATP7A Copper-transporting ATPase in Macrophage Bactericidal Activity. *J Biol Chem* **284**: 33949–33956.
- 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**: 401–2.
- 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.
- Wiker**, H.G., and Harboe, M. (1992) The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* **56**: 648–61.
- Williams**, M., Mizrahi, V., and Kana, B.D. (2014) Molybdenum cofactor: A key component of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Crit Rev Microbiol* **40**: 18–29.
- Wilson**, R., Sykes, D.A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G.W., and Cole, P.J. (1988) Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* **56**: 2515–7.
- Winthrop**, K.L., McNelley, E., Kendall, B., Marshall-Olson, A., Morris, C., Cassidy, M., et al. (2010) Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med* **182**: 977–82.
- Wolfe**, L.M., Mahaffey, S.B., Kruh, N.A., and Dobos, K.M. (2010) Proteomic Definition of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res* **9**: 5816–5826.
- 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.
- Wright**, C.C., Hsu, F.F., Arnett, E., Dunaj, J.L., Davidson, P.M., Pacheco, S.A., et al. (2017) The *Mycobacterium tuberculosis* MmpL11 Cell Wall Lipid Transporter Is Important for Biofilm Formation, Intracellular Growth, and Nonreplicating Persistence. *Infect Immun* **85**: e00131-17.
- Xu**, F.F., and Imlay, J.A. (2012) Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3614–21.
- Xu**, Z., Meshcheryakov, V.A., Poce, G., and Chng, S.-S. (2017) MmpL3 is the flippase for mycolic acids in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 7993–7998.
- Yamaryo-Botte**, Y., Rainczuk, A.K., Lea-Smith, D.J., Brammananth, R., Peet, P.L. van der, Meikle, P., et al. (2015) Acetylation of Trehalose Mycolates Is Required for Efficient MmpL-Mediated Membrane Transport in *Corynebacterineae*. *ACS Chem Biol* **10**: 734–746.
- Yang**, L., Lu, S., Belardinelli, J., Huc-Claustre, E., Jones, V., Jackson, M., and Zgurskaya, H.I. (2014)

- RND transporters protect *Corynebacterium glutamicum* from antibiotics by assembling the outer membrane. *Microbiologyopen* **3**: 484–496.
- Young**, D.B., Ivanyi, J., Cox, J.H., and Lamb, J.R. (1987) The 65kDa antigen of mycobacteria—a common bacterial protein? *Immunol Today* **8**: 215–219.
- 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**: 11–8.
- Zani**, M.L., Pourcher, T., and Leblanc, G. (1993) Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties. *J Biol Chem* **268**: 3216–21.
- Zelazny**, A.M., Root, J.M., Shea, Y.R., Colombo, R.E., Shamputa, I.C., Stock, F., 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**, L., English, D., and Andersen, B.R. (1991) Activation of human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*-derived sulfolipid-1. *J Immunol* **146**: 2730–6.
- Zhang**, L., Zhang, H., Zhao, Y., Mao, F., Wu, J., Bai, B., et al. (2012) Effects of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein on the Autophagy Function of Mouse Macrophages. *DNA Cell Biol* **31**: 171–179.
- Zhang**, S., Chen, J., Cui, P., Shi, W., Zhang, W., and Zhang, Y. (2015) Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Table 1. *J Antimicrob Chemother* **70**: 2507–2510.
- Zhang**, Y. (2004) Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. *Front Biosci* **9**: 1136–56.
- Zullo**, A.J., and Lee, S. (2012) *Mycobacterial* induction of autophagy varies by species and occurs independently of mammalian target of rapamycin inhibition. *J Biol Chem* **287**: 12668–78.
- Zhang**, Y., Rajagopalan, M., Brown, B.A., Wallace, R.J., and Jr (1997) Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J Clin Microbiol* **35**: 3132–9.
- 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.
- Zhang**, Y., Yang, Y., Woods, A., Cotter, R.J., and Sun, Z. (2001) Resuscitation of Dormant *Mycobacterium tuberculosis* by Phospholipids or Specific Peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 542–547.
- Zhang**, Y.J., Ioerger, T.R., Huttenhower, C., Long, J.E., Sasseti, C.M., Sacchetti, J.C., and Rubin, E.J. (2012) Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **8**: e1002946.
- Zhou**, X., He, X., Liang, J., Li, A., Xu, T., Kieser, T., et al. (2005) A novel DNA modification by sulphur. *Mol Microbiol* **57**: 1428–1438.
- Zolg**, J.W., and Philipp-Schulz, S. (1994) The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J Clin Microbiol* **32**: 2801–12.
- Zuber**, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffe, M. (2008) Direct Visualization of the Outer Membrane of *Mycobacteria* and *Corynebacteria* in Their Native State. *J Bacteriol* **190**: 5672–5680.
- Zügel**, U., and Kaufmann, S.H. (1999) Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* **201**: 22–35.
- Zulauf**, K.E., Sullivan, J.T., and Braunstein, M. (2018) The SecA2 pathway of *Mycobacterium tuberculosis* exports effectors that work in concert to arrest phagosome and autophagosome maturation. *PLOS Pathog* **14**: e1007011.







**Régulation des gènes codant des protéines Fe-S et des protéines  
d'assemblage des centres Fe-S en amibes et en macrophages**

1



**Tableau 13 | Régulation des gènes codant des protéines Fe-S ou des protéines d'assemblage des centres Fe-S chez *M. abscessus* en amibes et en macrophages comparée à *M. tuberculosis*.**

L'induction des gènes de *M. tuberculosis* (Mtb) en macrophages 24 hpi est représentée par un cercle rouge, la répression par un cercle bleu. Pour *M. massiliense* (Mmas), une échelle de couleurs proportionnelle au niveau d'expression des gènes, rouges ou bleues, indique que les gènes sont induits ou réprimés respectivement. Les orthologues putatifs de ces gènes chez *M. abscessus* (Mabs) et *M. tuberculosis* (Mtb) sont donnés.

	Mmas gene	Mabs BBH	Mtb BBH	Mtb $\phi$ 24 hpi	Mmas Ac, 4 hpi	Mmas Ac, 16 hpi	Mmas M $\Phi$ , 16 hpi
<b>4Fe-4S Ferredoxin</b>	MYCMA_RS02710	MAB_4293	Rv0338c	•	2,41	1,25	1,16
	MYCMA_RS18800	MAB_0930	Rv0886	•	0,00	0,00	1,50
	MYCMA_RS16940	MAB_1327	Rv1177	•	0,00	0,00	0,73
	MYCMA_RS13680	MAB_2142	Rv3153	•	0,00	-1,98	-2,51
	MYCMA_RS13660	MAB_2146	Rv3157	•	-1,78	-2,21	-2,85
	MYCMA_RS05855	MAB_3673	Rv3316	•	1,26	0,71	1,41
	MYCMA_RS05845	MAB_3675	Rv3318	•	0,64	0,73	1,03
	MYCMA_RS05840	MAB_3676	Rv3319	•	0,00	0,00	0,96
<b>WhiB</b>	MYCMA_RS06445	MAB_3539	Rv3219	•	1,89	1,50	1,13
	MYCMA_RS05605	MAB_3726	Rv3416	•	-3,37	-2,94	0,00
	MYCMA_RS21100	MAB_0409	Rv3681c	•	-0,74	-1,73	-2,45
	MYCMA_RS06600	MAB_3508c	Rv3197A		5,76	4,37	4,24
<b>4Fe-4S other than WhiB</b>	MYCMA_RS09020	MAB_3048c	Rv2733c	•	0,00	0,00	0,45
	MYCMA_RS15275	MAB_1661c	Rv2392	•	1,62	1,85	1,60
	MYCMA_RS11070	MAB_2674c	Rv1594		2,95	1,79	2,57
<b>Acotinase</b>	MYCMA_RS10795	MAB_2730	Rv1475c	•	0,88	0,00	1,47
	MYCMA_RS07765	MAB_3294c	Rv2988c	•	1,19	0,00	0,00
<b>Endonuclease II</b>	MYCMA_RS21055	MAB_0418	Rv3674c	•	0,00	0,00	0,64
<b>GATASE Type II</b>	MYCMA_RS02700	MAB_4295c	Rv0322	•	-1,51	-1,44	1,50
<b>Sirohaem</b>	MYCMA_RS06530	MAB_3522c	Rv0252	•	-6,30	-4,64	1,76
<b>Nitrogenase 2</b>	MYCMA_RS19560	MAB_0713	Rv0808	•	0,00	-0,79	0,80
	MYCMA_RS17825	MAB_1147c	Rv1017c	•	0,00	0,00	-0,41
	MYCMA_RS10025	MAB_2877c	Rv2584c	•	-1,81	0,00	-0,69
	MYCMA_RS06345	MAB_3585c	Rv3242c	•	0,00	0,00	0,99
	MYCMA_RS20500	MAB_0523	Rv3624c	•	0,00	0,00	-0,51
<b>2Fe-2S Ferredoxin</b>	MYCMA_RS02270	MAB_4423	Rv0247c	•	-2,17	0,00	-3,21
	MYCMA_RS22565	MAB_0088c	Rv2776c	•	0,00	-0,74	0,00
	MYCMA_RS20205	MAB_0583c	Rv3571	•	1,68	1,09	0,00
<b>Rieske protein</b>	MYCMA_RS14230	MAB_1967c	Rv2195	•	-0,97	0,00	0,90
<b>Rubredoxin</b>	MYCMA_RS06275	MAB_3597c	Rv3250c	•	0,00	0,00	0,35
<b>2Fe-2S of Ferrochelatase</b>	MYCMA_RS10840	MAB_2721c	Rv1485	•	-0,66	0,00	0,00
<b>Fe-S Cluster assembly machinery</b>	MYCMA_RS10695	MAB_2750c	Rv1460		2,05	3,08	2,12
	MYCMA_RS10705	MAB_2748c	Rv1462	•	0,60	1,29	1,06
	MYCMA_RS10710	MAB_2747c	Rv1463	•	0,77	1,18	0,88
	MYCMA_RS10715	MAB_2746c	Rv1464	•	0,00	0,83	1,09
	MYCMA_RS10720	MAB_2745c	Rv1465	•	0,00	0,00	0,52
	MYCMA_RS10725	MAB_2744c	Rv1466	•	0,44	-0,63	0,00
	MYCMA_RS07375	MAB_3357c	Rv3025c		0,82	0,00	0,48

FC (Fold Change) : variation d'expression d'un gène donné en Log base 2. Ac : *A. castellanii*. M $\Phi$  : macrophages.





**Régulation de gènes codant des NAP parmi les gènes induits en amibes**

**2**



**Tableau 14 | Gènes codant des protéines associées au nucléotide induits en amibes.** Des orthologues putatifs (BBH) des gènes de *M. massiliense* (Mmas) chez *M. abscessus* (Mabs) sont donnés.

Mmas gene	Encoded protein	Mabs BBH	FC Ac, 4 hpi	FC Ac, 16 hpi	FC MΦ, 16 hpi
MYCMA_RS22430	MULTISPECIES: secretion protein EspR	MAB_0115c	0,88	0,70	0,32
MYCMA_RS20390	Protein Lsr2 precursor	MAB_0545	0,65	0,49	0,77
MYCMA_RS07530	MULTISPECIES: AsnC family transcriptional regulator (Lrp-like)	MAB_3327c	6,10	4,58	0,00
MYCMA_RS04730	DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps)	MAB_3900c	1,89	0,00	2,32
MYCMA_RS00745	DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps)	MAB_4735	2,51	0,00	-0,98

FC (Fold Change) : variation d'expression d'un gène donné en Log base 2. Ac : *A. castellanii*. MΦ : macrophages.



**Régulation du métabolisme et du transport du triacylglycérol en amibes  
et en macrophages**

3



**Tableau 15 | Régulation du métabolisme et transport du triacylglycérol en amibes et en macrophages.** Les orthologues putatifs (BBH) des gènes de *M. massiliense* (Mmas) chez *M. abscessus* (Mabs) sont donnés.

Mmas gene	Encoded protein	Mabs BBH	FC Ac, 4 hpi	FC Ac, 16 hpi	FC MΦ, 16 hpi
MYCMA_RS06385 (tgs1)	Diacylglycerol O-acyltransferase	MAB_3551c	-1,36	-1,33	-0,33
MYCMA_RS14500 (tgs2)	Diacylglycerol O-acyltransferase	MAB_1917	1,16	0	-0,56
MYCMA_RS20575 (tgs3)	Diacylglycerol O-acyltransferase	MAB_0507	0	-1,46	-2,04
MYCMA_RS01705 (tgs4)	MULTISPECIES: diacylglycerol O-acyltransferase	MAB_4544c	-1,34	-1,14	-1,44
MYCMA_RS04415 (tgs5)	Acyltransferase	MAB_3964	1,35	0,00	0,00
MYCMA_RS17170 (tgs6)	MULTISPECIES: hypothetical protein	MAB_1278	-0,98	0,00	-1,63
MYCMA_RS19035 (tgs7)	Hypothetical protein	MAB_0854	-3,81	-3,52	0,00
MYCMA_RS04800	Triacylglycerol lipase	MAB_3889	-3,21	-4,16	-0,55
MYCMA_RS10380 (lprG)	Lipoprotein LprG precursor (27 kDa lipoprotein)	MAB_2806	-0,59	0,64	-1,08
MYCMA_RS10375	MFS transporter	MAB_2807	-1,32	0,00	-1,312

FC (Fold Change) : variation d'expression d'un gène donné en Log base 2. Ac : *A. castellanii*. MΦ : macrophages.





### Généralités

L'induction du gène *plc* en amibes (et non en macrophages) et son rôle mis en évidence dans la survie de *M. abscessus* en macrophages et en souris, met en avant l'idée de préparation de *M. abscessus* à la vie au sein de macrophages humains ou murins par la vie intra-amibienne. Si l'on compare *M. abscessus* à *M. chelonae*, son espèce sœur, plusieurs études montrent que *M. chelonae* est moins apte à survivre au sein des macrophages que *M. abscessus* (Rottman *et al.*, 207 ; Sousa *et al.*, 2015). Ceci reste vrai en amibes comparativement à *M. abscessus* (**Figure 41A**). De même, une co-culture amibienne préalable, n'accroît pas la survie de *M. chelonae* dans les macrophages (**Figure 41B**). Ce résultat tend à montrer le caractère spécifique de l'influence de la préparation amibienne vis-à-vis de *M. abscessus*. Afin de mieux comprendre cela, nous avons comparé les gènes différentiellement exprimés chez *M. abscessus* et chez *M. chelonae* 16 hpi en amibes.

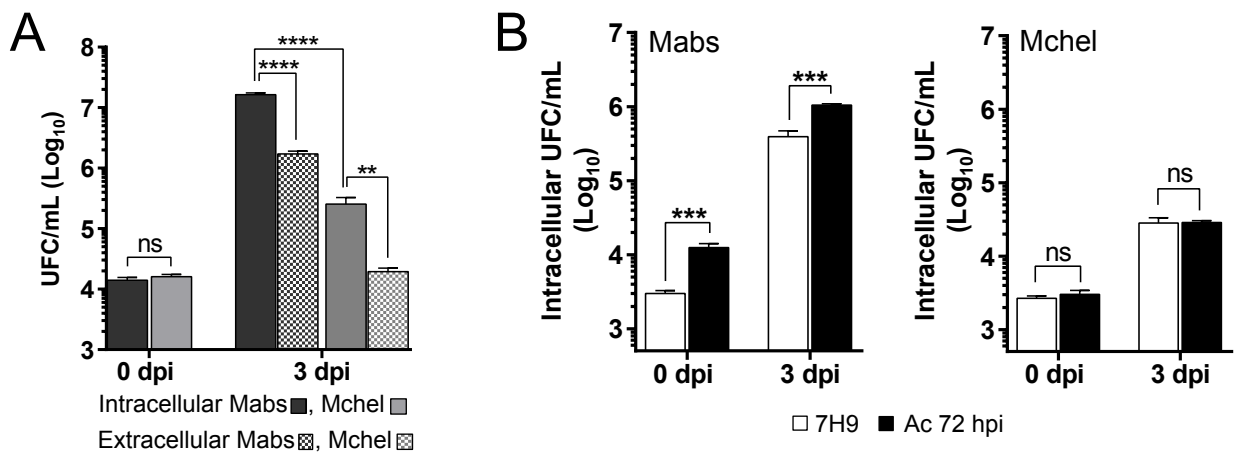
Il apparaît que *M. abscessus* et *M. chelonae* connaissent des adaptations différentes en amibes, avec plus de 70% de DEGs spécifiques, ou présentant une régulation opposée (**Figure 42A**). La plupart des DEGs sont peu régulés chez *M. chelonae* (Low DEGs, 81%) et il y a moins de fortes variations ( $M_{\text{Med+High}}^{\text{DEGs}}$  : 24,3%,  $M_{\text{Med+High}}^{\text{DEGs}}$  : 19%) (**Figure 42B**, panneau de gauche). Davantage de gènes sont réprimés qu'induits parmi les Low et les High DEGs tandis que davantage de gènes sont induits que réprimés parmi les Med DEGs (**Figure 41B**, panneau de droite). Parmi les gènes induits, peu de catégories fonctionnelles sont enrichies, seules les COG C (Production et conversion d'énergie) et Q (Biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires) de la classe du « métabolisme » sont surreprésentées au sein des High et Med DEGs respectivement (**Figure 42C**). Le tout montre que les adaptations de *M. chelonae* à la vie intra-amibienne mettent en jeu des gènes et des régulations différentes par rapport aux adaptations de *M. abs-*

*cessus* et cela semble également se traduire par des adaptations fonctionnelles différentes.

Une analyse d'enrichissement ontologique des voies biologiques appliquée aux gènes induits de *M. chelonae* en amibes montre de faibles enrichissements (< 2, en vert) de grands groupes de gènes (plus de 100) impliqués dans le catabolisme des acides aminés aromatiques (GO:0009074) et dans l'homéostasie ionique (GO:0006873) (**Figure 43**). Une poignée de gènes (10-50) sont faiblement enrichis et correspondent à une réponse à des stimuli externes (GO:0009605) et au transport du fer (GO:0006826, GO:0015688) (**Figure 43**). D'autres voies témoignant d'adaptations à des stress intracellulaires sont enrichies parmi de petits groupes de gènes (moins de 10), à savoir la réponse aux ROS (GO:0000302) et leur métabolisme (GO:0072593) (**Figure 43**). Parmi les voies métaboliques sollicitées les plus enrichies figurent le métabolisme du D-ribose (GO:0006014, en orange) et le transport de xénobiotiques (GO:0042908) (**Figure 43**). Par comparaison, peu de voies métaboliques communes à *M. abscessus* et *M. chelonae* sont enrichies à l'exception du métabolisme des acides aminés aromatiques, du tryptophane, des composés azotés et la réponse/métabolisme des espèces réactives de l'oxygène ([Article 1](#), **Figure 2** & **Figure 43**). De façon notable, de nombreuses voies potentiellement impliquées dans la virulence et enrichies chez *M. abscessus*, ne sont pas enrichies chez *M. chelonae* comme la voie de biosynthèse du MoCo, la voie SAP et la voie de biosynthèse de l'H<sub>2</sub>S, ou encore le transport de polyamines. De plus, le catabolisme des acides gras, enrichi chez *M. abscessus*, n'est pas enrichi chez *M. chelonae* ([Article 1](#), **Figure 2** & **Figure 43**).

### Adaptations spécifiques et opposées de *M. abscessus* et *M. chelonae* à la vie intra-amibienne

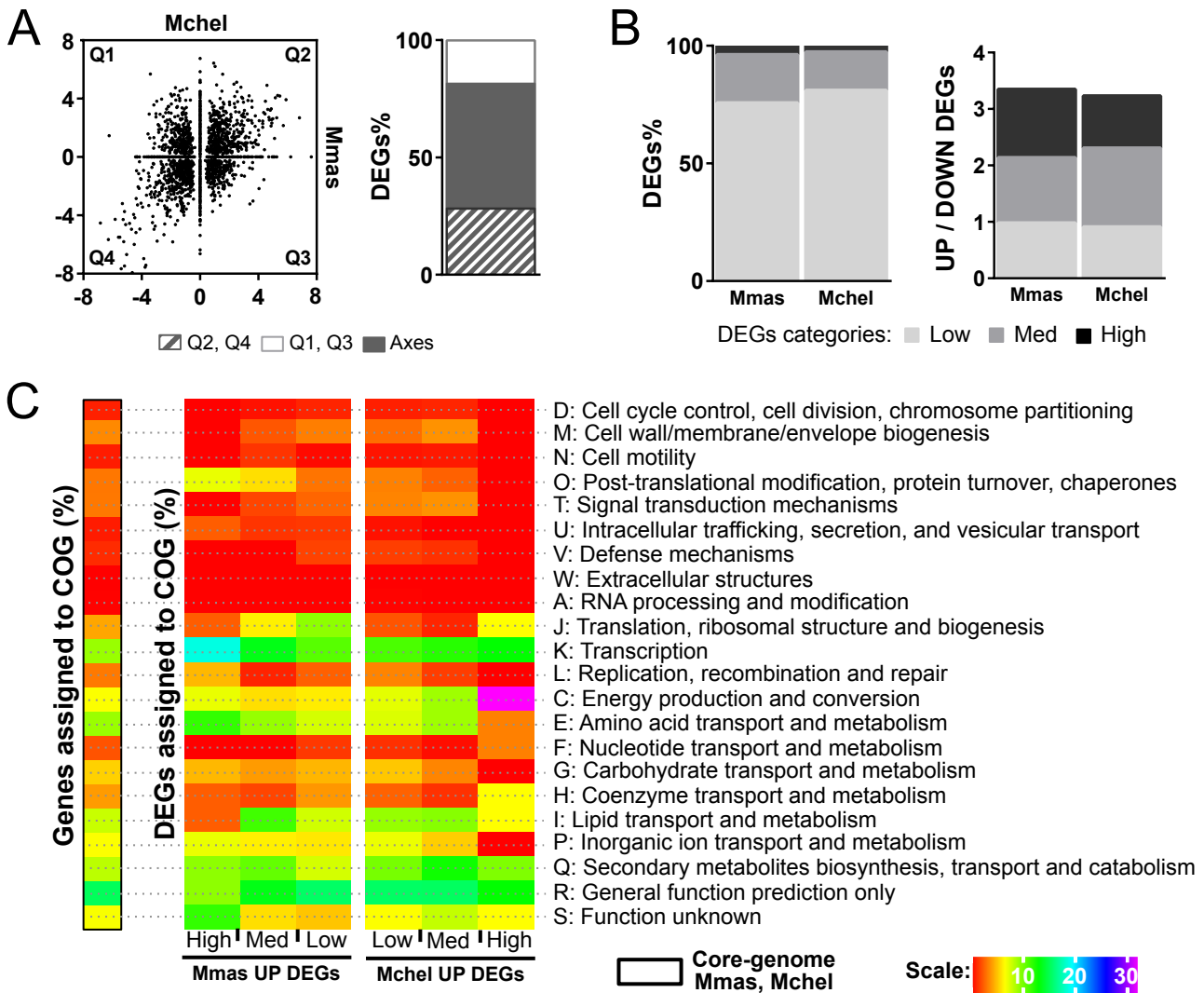
Suite à la co-culture prolongée avec l'amibe, une vingtaine de gènes réprimés au moins 4



**Figure 41 | Impact de la co-culture amibienne sur la virulence de *M. abscessus* et *M. chelonae*.**

A : L'amibe *A. castellanii* a été infectée avec *M. abscessus* ou *M. chelonae* à une MOI de 10, à 32 °C et les unités formant colonies (UFC) des bactéries intra- et extracellulaires ont été dénombrées 4 hpi (J0) et 3 dpi. Les statistiques ont été calculées à partir de 3 réplicats biologiques et sont représentatives de deux expériences indépendantes.

B : *M. abscessus* (Mabs) et *M. chelonae* (Mchel) ont été cultivées préalablement avec l'amibe *A. castellanii* pendant 72 h (Ac 72 hpi) puis inoculées à faible MOI (MOI de 1) à des macrophages murins, à 32 °C. Les statistiques ont été calculées à partir de 3 réplicats biologiques et sont représentatives de deux expériences indépendantes.

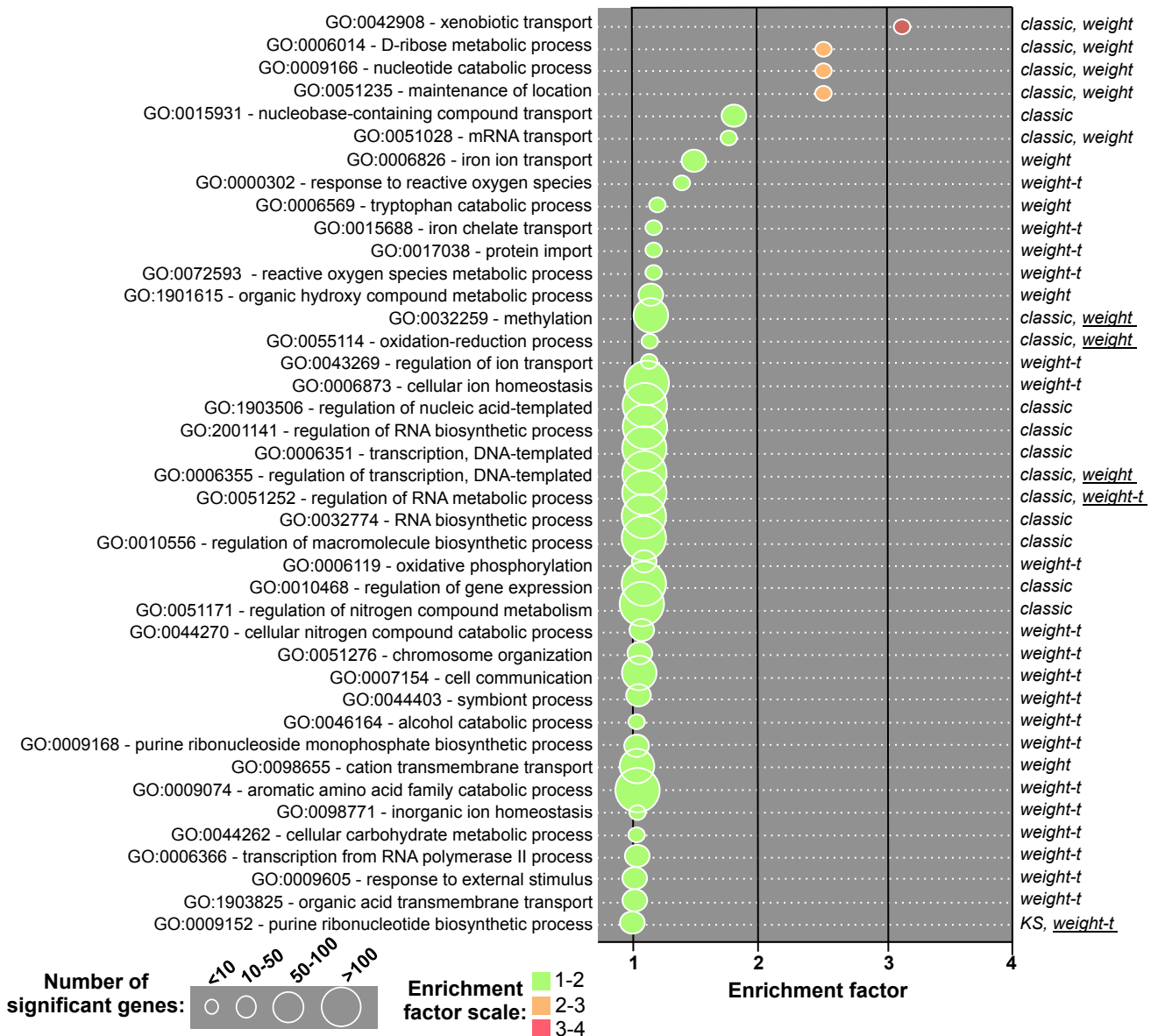


**Figure 42 | *M. chelonae* et *M. abscessus* ne répondent pas de la même façon à l'environnement intra-amibien.**

A : Les adaptations de *M. abscessus* et *M.chelonae* en amibes sont propres à l'une et l'autre. Les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de *M. massiliense* (Mmas) en amibes 16 hpi sont comparés aux gènes différentiellement exprimés de *M. chelonae* (Mchel) en amibes 16 hpi (panneau de gauche). Les quadrants Q2 et Q4 montrent des régulations de même sens (induction ou répression dans les deux conditions), tandis que les quadrants Q1 et Q3 montrent des régulations de sens opposé (induction dans une condition, répression dans l'autre et inversement). Les DEGs projetés sur les axes du graphique sont propres à l'une ou l'autre des conditions. Les proportions de DEGs connaissant des régulations de même sens, de sens opposé ou bien des régulations propres aux conditions testées sont indiquées (panneau de droite).

B : Les gènes induits prédominent sur les gènes réprimés parmi les gènes hautement et moyennement régulés. Les gènes différentiellement exprimés (DEGs) sont catégorisés selon leur niveau d'expression en Low DEGs ( $\text{Log}_2\text{FC} < |2|$ ), Med DEGs ( $|2| < \text{Log}_2\text{FC} < |4|$ ) et High DEGs ( $\text{Log}_2\text{FC} > |4|$ ). Les proportions de chaque catégorie de DEGs sont indiquées (panneau de gauche), ainsi que la proportion de gènes induits (UP DEGs) relative aux gènes réprimés (DOWN DEGs) selon la catégorie de DEGs (Low, Med ou High) chez *M. massiliense* (Mmas) et *M. chelonae* (Mchel) (panneau de droite).

C : Comparaison des fonctions biologiques sur-représentées parmi les gènes induits chez *M. abscessus* et chez *M. chelonae* suite à la co-culture amibienne 16 hpi. Le pourcentage de gènes assignés aux clusters de groupes orthologues de la classification COG chez *M. abscessus* (Mmas UP DEGs, panneau de gauche) et chez *M. chelonae* (Mchel UP DEGs, panneau de droite) est représenté face à l'annotation du core-génome de *M. abscessus-M. chelonae* (panneau du milieu).



**Figure 43 | Mise en évidence des voies biologiques reflétant des adaptations propres de *M. chelonae* à la vie intra-amibienne comparée à *M. abscessus*.**

Analyse d'enrichissement ontologique appliquée aux gènes induits de *M. chelonae* en amibes 16 hpi avec le package topGO de R. Les GO (Gene Ontology) enrichies sont triées en fonction de leur facteur d'enrichissement, ce qui correspond au ratio du nombre de gènes induits attribués à une GO par rapport au nombre de gènes attendus pour cette même GO. Les GO enrichies sont représentées par des cercles dont la taille est proportionnelle au nombre de gènes induits et selon une échelle représentant le facteur d'enrichissement. Des tests statistiques positifs sont donnés pour chaque GO. La méthode donnant la plus petite p-value est soulignée.

**Tableau 16 | Régulation de sens contraire de *M. abscessus* et *M. chelonae* en amibes 16 hpi.** Seuls les gènes de *M. chelonae* (Mchel) présentant une répression supérieure ou égale à 2 ( $FC \leq -2$ ) sont représentés et rangés par ordre croissant selon leur niveau de répression par rapport à leur orthologue putatif (BBH) chez *M. massiliense* (Mmas). Les orthologues putatifs de ces gènes chez *M. abscessus* (Mabs) et *M. tuberculosis* (Mtb) sont donnés.

Mmas BBH	Encoded protein	Mabs BBH	Mtb BBH	FC Mmas	FC Mchel
MYCMA_RS05405	50S ribosomal protein L17	MAB_3769c	<i>rplQ</i>	1,67	-2,03
MYCMA_RS00035	Chromosome partitioning protein	MAB_4950c	<i>parA</i>	0,62	-2,06
MYCMA_RS00030	16S rRNA methyltransferase G	MAB_4951c	<i>gid</i>	0,84	-2,09
MYCMA_RS04775	Transcription termination/antitermination protein NusG	MAB_3894c	<i>nusG</i>	1,26	-2,11
MYCMA_RS00025	MULTISPECIES: single-stranded DNA-binding protein	MAB_4952c	<i>Rv3920c</i>	1,66	-2,14
MYCMA_RS15280	MULTISPECIES: sulfate adenylyltransferase subunit 2	MAB_1660c	-	1,57	-2,15
<b>MYCMA_RS02345</b>	<b>MULTISPECIES: alkyl hydroperoxide reductase</b>	<b>MAB_4408c</b>	<b><i>ahpC</i></b>	<b>4,04</b>	<b>-2,17</b>
MYCMA_RS17025	MULTISPECIES: GTP-binding protein	MAB_1310	<i>typA</i>	0,87	-2,17
MYCMA_RS07690	MULTISPECIES: phosphoglycerate dehydrogenase	MAB_3304c	<i>serA1</i>	1,65	-2,20
MYCMA_RS04785	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L1	MAB_3892c	<i>rplA</i>	0,94	-2,37
MYCMA_RS15285	Sulfate adenylyltransferase	MAB_1659c	-	1,29	-2,43
MYCMA_RS04780	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L11	MAB_3893c	<i>rplK</i>	0,88	-2,51
MYCMA_RS12795	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L35	MAB_2322	<i>rpml</i>	1,02	-2,61
MYCMA_RS14450	Two-component sensor histidine kinase	MAB_1927	-	0,79	-2,62
MYCMA_RS03265	MFS transporter	MAB_4195c	-	2,00	-2,66
MYCMA_RS04320	Carbonate dehydratase	MAB_3984c	<i>ctpA</i>	1,39	-2,68
MYCMA_RS05010	MULTISPECIES: elongation factor Tu	MAB_3848c	<i>tuf</i>	1,01	-2,70
MYCMA_RS04910	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	MAB_3868c	<i>rpoC</i>	0,88	-3,00
<b>MYCMA_RS02350</b>	<b>MULTISPECIES: alkyl hydroperoxide reductase AhpD</b>	<b>MAB_4407c</b>	<b><i>ahpD</i></b>	<b>3,63</b>	<b>-3,02</b>
MYCMA_RS17230	MULTISPECIES: hypothetical protein	MAB_1264	-	3,42	-3,22
MYCMA_RS07695	MULTISPECIES: 3-isopropylmalate dehydrogenase	MAB_3303c	<i>leuB</i>	1,39	-3,30
MYCMA_RS12695	Argininosuccinate synthase	MAB_2342	<i>argG</i>	0,87	-3,75

FC (Fold Change) : variation d'expression d'un gène donné en Log base 2.

**Tableau 17 | Régulations propres de gènes de *M. abscessus* en amibes comparées à *M. chelonae* selon leur niveau d'induction.** Les orthologues putatifs (BBH) des gènes de *M. massiliense* (Mmas) chez *M. abscessus* (Mabs) et *M. tuberculosis* (Mtb) sont donnés.

Mmas gene	Encoded protein	FC	Mabs BBH	Mtb BBH
MYCMA_RS11985	Sulfite reductase subunit alpha	2,55	MAB_2492	-
MYCMA_RS12005	Hypothetical protein (9 kDa antigen)	2,01	MAB_2488c	-
MYCMA_RS12040	MFS transporter	1,90	MAB_2481	-
MYCMA_RS20795	Hypothetical protein	1,77	MAB_0469c	-
MYCMA_RS11970	Acyl-CoA dehydrogenase	1,24	MAB_2495	-
MYCMA_RS12035	N5, N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase	1,06	MAB_2482	-
MYCMA_RS11965	Acyl-CoA dehydrogenase	1,04	MAB_2496	-
MYCMA_RS05510	LLM class F420-dependent oxidoreductase	0,87	MAB_3748	-

FC (Fold Change) : variation d'expression d'un gène donné en Log base 2. « - » : absence de BBH.

fois chez *M. chelonae*, sont induits chez *M. abscessus* (**Tableau 16**). Parmi ces gènes, 3 sont induits plus de 4 fois chez *M. abscessus* dont deux gènes codant les alkyl hydroperoxyréductases AhpC et AhpD, conservées chez *M. tuberculosis* et représentant deux éléments clefs du système de défense antioxydant de *M. tuberculosis* (Hillas *et al.*, 2000).

Enfin parmi 8 gènes spécifiquement induits chez *M. abscessus* et conservés chez *M. chelonae*, figurent des gènes non-conservés chez *M. tuberculosis*. Ces gènes seraient des éléments favorisant l'adaptation spécifique de *M. abscessus* à la vie intracellulaire (**Tableau 17**). Six de ces huit gènes s'étendent sur une région recouvrant 15 gènes (*MAB\_2481-MAB\_2496c*) dont deux sont plus particulièrement induits (plus de 4 fois) : *MAB\_2492* et *MAB\_2488c*, codant respectivement l'unité alpha d'une sulfite-réductase et une protéine hypothétique pouvant correspondre à l'antigène 9 kDa selon un blast réciproque. La voie de biosynthèse de la cystéine, principal moyen d'assimilation du sulfate, a été associée à la survie de *M. tuberculosis* pendant la phase chronique de l'infection, conférant la résistance aux ROS et RNI (Senaratne *et al.*, 2006). Cette voie est enrichie chez *M. abscessus* parmi les gènes

induits lors de la co-culture amibienne (**Article 1**, Figure 2). Au sein de cette voie, la réduction du sulfate est une étape essentielle, d'où l'intérêt particulier pour les sulfite-réductases telle que *MAB\_2492* catalysant cette réaction. Par comparaison avec le génome de *M. tuberculosis*, il apparaît que *MAB\_2488c* est l'homologue de *Rv1174c*, codant un antigène sécrété de 8,4 kDa (TB8.4). C'est un antigène immunodominant qui serait impliqué dans la réactivation de mycobactéries en dormance (Coler *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Chez *M. bovis* l'homologue de ce gène est impliqué dans la résistance aux stress intracellulaires engendrés par les ROS et les RNI ainsi qu'à l'hypoxie (Bottai *et al.*, 2006). Par ailleurs *MAB\_2488c* possède un domaine liant l'hème (HBD, Heme Binding Domain) faisant de cette protéine un hémophore potentiel. Les hémophores sont des protéines se liant à l'hème libre ou provenant de l'hémoglobine de l'hôte pour le délivrer aux protéines membranaires le faisant passer à travers la membrane vers le cytoplasme de la bactérie (Tullius *et al.*, 2011). Chez *M. tuberculosis* un seul hémophore est annoté, *Rv0203*, qui interagit avec les protéines *MmpL3* et *-11*, toutes deux impliquées dans la virulence de la bactérie *in vivo* (Owens *et al.*, 2013).





**Fonctions moléculaires enrichies parmi les gènes les plus induits de  
*M. abscessus* en macrophages**

5



**Tableau 18 | Analyse d'enrichissement ontologique des fonctions moléculaires des gènes fortement induits de *M. abscessus* en macrophages.** Les 5 enrichissements les plus significatifs sont donnés selon 4 tests statistiques (« Classic », « KS », « Weight » et « Weight,t »).

GO ID	Term	EF	Classic	KS	Weight	Weight,t
GO:0019825	Oxygen binding	40	0,001	0,516	0,001	0,909
GO:0008941	Nitric oxide dioxygenase activity	40	0,001	0,984	0,001	0,909
GO:0016708	Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NADH or NADPH as one donor, and incorporation of two atoms of oxygen into one donor	20	0,005	0,914	1	4,60E-07
GO:0016705	Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	3,7	0,010	0,372	0,467	0,715
GO:0015297	Antiporter activity	12,5	0,011	0,823	1	4,60E-07
GO:0042623	ATPase activity, coupled	1,4	0,435	2,70E-04	1	4,60E-07
GO:0016818	Hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	1,8	0,099	0,001	0,0466	0,812
GO:0016817	Hydrolase activity, acting on acid anhydrides	1,8	0,101	0,001	1	0,993
GO:0016820	Hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances	1,9	0,278	0,002	1	4,60E-07
GO:0016462	Pyrophosphatase activity	1,6	0,213	0,002	1	2,20E-06
GO:0019825	Oxygen binding	40	0,001	0,516	0,001	0,909
GO:0008941	Nitric oxide dioxygenase activity	40	0,001	0,984	0,001	0,909
GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	9,5	0,019	0,448	0,019	0,897
GO:0008080	N-acetyltransferase activity	4,8	0,024	0,979	0,024	0,927
GO:0071949	FAD binding	8	0,025	0,965	0,025	0,893
GO:0016616	Oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	0,7	0,791	0,066	1	2,70E-07
GO:0140101	Catalytic activity, acting on a tRNA	1,1	0,618	0,071	1	2,70E-07
GO:0004312	Fatty acid synthase activity	1,2	0,585	0,094	1	2,70E-07
GO:0003723	RNA binding	0,5	0,895	0,154	1	2,70E-07
GO:0052689	Carboxylic ester hydrolase activity	1,6	0,474	0,167	1	2,70E-07

GO : Gene Ontology. EF : facteur d'enrichissement.



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

Laura Laencina, Violaine Dubois, Vincent Le Moigne, Albertus Viljoen, Laleh Majlessi, Justin Pritchard, Audrey Bernut, Laura Piel, Anne-Laure Roux, Jean-Louis Gaillard, Bérengère Lombard, Damarys Loew, Eric J. Rubin, Roland Brosch, Laurent Kremer, Jean-Louis Herrmann, and Fabienne Girard-Misguich



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

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

<sup>a</sup>Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, INSERM UMR1173, 78000 Versailles, France; <sup>b</sup>Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, Université de Montpellier, CNRS UMR 9004, 34293 Montpellier, France; <sup>c</sup>Unité de Pathogénomique Mycobactérienne, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; <sup>d</sup>Department of Immunology and Infectious Disease, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115; <sup>e</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Ile de France Ouest, Ambroise Paré, Boulogne and Raymond Poincaré, 92380 Garches, France; <sup>f</sup>Laboratoire de spectrométrie de masse protéomique, Institut Curie, Paris Science and Letters Research University, 75248 Paris, France; and <sup>g</sup>INSERM, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France

Edited by Marcel A. Behr, McGill International TB Centre, Montreal, Quebec, Canada, and accepted by Editorial Board Member Carl F. Nathan December 18, 2017 (received for review July 25, 2017)

*Mycobacterium abscessus*, a rapidly 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 up-regulate several virulence factors during transient infection of amoebae, thereby becoming more virulent in subsequent respiratory infections in mice. Here, we sought to identify the *M. abscessus* genes required for replication within amoebae. To this end, we constructed and screened a transposon (*Tn*) insertion library of an *M. abscessus* subspecies *massiliense* clinical isolate 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 EccB<sub>4</sub> component. To confirm the screening results and to get further insight into the contribution of ESX-4 to *M. abscessus* growth and survival in amoebae and macrophages, we generated a deletion mutant of eccB<sub>4</sub> that 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 contact, as demonstrated by a combination of cellular and immunological assays. This study attributes an unexpected and genuine biological role to the underexplored mycobacterial ESX-4 system and its substrates.

TVISS-ESX4 | *M. abscessus* | survival

Mycobacteria and eukaryotic cells have 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 nontuberculous bacteria (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 probably also for selected mycobacterial species that can survive within amoebae (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* increases 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 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 hyper-proinflammatory, a property that has been linked to the expression of Toll-like receptor 2 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 nonmycobacterial origin in its genome that were originally acquired by ancient horizontal gene-transfer events from unrelated microorganisms, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia* spp., or *Stenotrophomonas*

## Significance

The coevolution of mycobacteria and amoebae seems to have contributed to shaping the virulence of nontuberculous mycobacteria in macrophages. We identified a pool of genes essential for the intracellular survival of *Mycobacterium abscessus* inside amoebae and macrophages and discovered a hot spot of transposon insertions within the orthologous ESX-4 T75S locus. We generated a mutant with the deletion of a structural key ESX component, EccB<sub>4</sub>. We demonstrate rupture of the phagosomal membrane only in the presence of an intact eccB<sub>4</sub> gene. These results suggest an unanticipated role of ESX-4 T75S 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 for ESX-1 in *M. tuberculosis*.

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

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. M.A.B. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Published under the PNAS license.

<sup>1</sup>Present address: Department of Biomedical Engineering and the Huck Institutes of the Life Sciences, Pennsylvania State University, State College, PA 16801.

<sup>2</sup>Present address: Bateson Centre, Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Disease, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, United Kingdom.

<sup>3</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: jean-louis.herrmann@aphp.fr or fabienne.misguich@uvsq.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1713195115/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1713195115/-DCSupplemental).



spp. (29). Interestingly, these bacteria can also be found in amoebae (30, 31) and share with *M. abscessus* the same pathophysiological niche, such as the CF patient airways. Of interest, phospholipase C and the 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 (MΦ) (10, 32). These observations suggest that *M. abscessus* strains are equipped with a genetic arsenal acquired during their evolution to survive within environmental amoebae. The same genetic program might also help *M. abscessus* cause infection in human cells. It is thus interesting to identify the genes expressed by *M. abscessus* inside the amoeba, where it faces the harsh and microbicidal conditions employed by host cells to control bacterial infection. In this study, we sought to identify such amoeba-induced survival (AIS) genes by using an *M. abscessus* genome-scale *Himar mariner* transposon (*Tn*) library (33) generated in the *M. abscessus* subspecies *massiliense* clinical isolate 43S. By selecting *Tn* mutants exhibiting decreased fitness and intraamoebal survival capacity, we identified a selection of AIS gene candidates that were subsequently monitored and validated for their importance in intracellular survival and growth in infected human MΦ. This allowed the definition of a unique “core” of genes required by *M. abscessus* to survive in both its environmental (amoeba) and human (MΦ) 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

**Selection of *M. abscessus* *Tn* Mutants with Impaired Intracellular Replication.** A library of 6,000 *Tn* mutants generated in an S clinical isolate of *M. abscessus* subspecies *massiliense* (Mabs43S) was screened using an intracellular survival assay in *Acanthamoeba castellanii*, as illustrated in *SI Appendix, Fig. S1A*. The survival of the control parental Mabs43S strain at 48 h postinfection (hpi) in amoebae was arbitrarily placed at 100%. One hundred thirty-six *Tn* mutants (2.3% of the total tested) displayed various degrees of intracellular growth inhibition compared with Mabs43S. These 136 mutants were individually screened in *A. castellanii* for 48 h and in MΦ for 72 h, at a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell, and intracellular cfus were determined (10). This confirmed the replication-defective phenotype of 47 mutants, which exhibited a survival in amoebae 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 was 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 previously reported for *M. marinum* (8).

**Intraamoebal Survival of ESX-4 *Tn* Mutants Is Strongly Impeded.** Subcloning 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 in *SI Appendix, Table S1*). Importantly, 12 (including five duplicates) of the 47 *Tn* mutants with less than 50% intraamoebal 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); related systems can also be found in other Actinobacteria and in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes (36). Among these 12 *Tn* mutants, nine with *Tn* insertions in the *esx-4* genes [*eccE*<sub>4</sub> (two mutants), *eccD*<sub>4</sub> (two mutants), and *eccB*<sub>4</sub> (five mutants)] showed a 75% reduction in intraamoebal replication. The remaining three mutants with a

50% intraamoebal survival defect presented *Tn* insertions in the *esx-4* genes *mycP*<sub>4</sub> (one mutant) and *eccE*<sub>4</sub> (two mutants) (Fig. 1B and Table 1). Moreover four mutants were identified outside the ESX-4 locus: one mutant in *sigM* and three mutants in the ESX-secreted protein *espI*. Of note in *M. tuberculosis*, *espI* negatively regulates ESX-1-mediated secretion under conditions where cellular ATP levels are depleted (37). In comparison, part of the *sigM* regulon included genes encoding two pairs of ESX family proteins and genes adjacent to the ESX-4 secretion locus (38). Supporting the important contribution of the ESX-4 locus to intracellular survival, *Tn* insertions in *espI* and *sigM* also conferred a severe defect in intraamoebal 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 (*SI Appendix, Fig. S1B and C*).

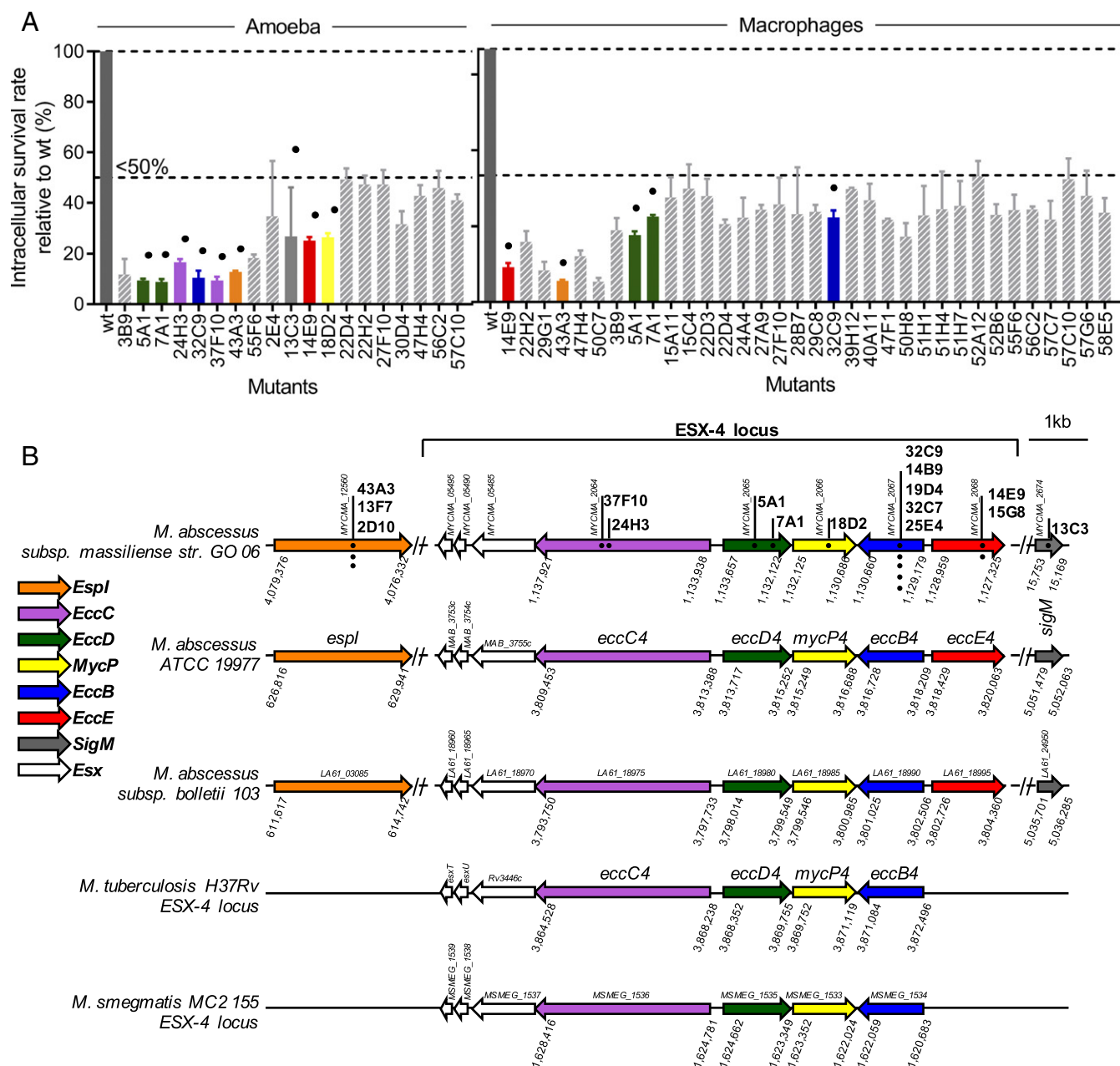
To exclude the possible polar effect of *Tn* in *eccD*<sub>4</sub> and *eccC*<sub>4</sub> on transcription of *mycP*<sub>4</sub> and *MAB\_3755c*, respectively, qRT-PCR was performed (*SI Appendix, Table S2*). Neither *mycP*<sub>4</sub> nor *MAB\_3755c* mRNA levels were affected by the *Tn* in *eccD*<sub>4</sub> and *eccC*<sub>4</sub>, respectively.

**Severely Impaired Intracellular Survival of an *eccB*<sub>4</sub>-KO Mutant in the Reference *M. abscessus* Strain.** Because Mabs43S was able to grow in presence of both zeocin and hygromycin, 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*<sub>4</sub> (*MAB\_3759c*)-KO mutant in the *M. abscessus* 104536<sup>T</sup> type strain (MabsCIP, zeocin sensitive), using a double-crossover strategy as previously reported (10). As illustrated in *SI Appendix, Fig. S2A*,  $\Delta eccB_4$  was obtained by allelic exchange of nearly the entire *eccB*<sub>4</sub> coding sequence with a zeocin-resistance cassette (*SI Appendix, Fig. S2B*) (10, 32). The complemented strain (*C.ΔeccB*<sub>4</sub>) was obtained by cloning the *eccB*<sub>4</sub> 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.ΔeccB*<sub>4</sub>, and the parental MabsCIP strains, which had similar growth rates in axenic cultures (*SI Appendix, Fig. S2C*), was assessed in the amoeba and murine MΦ infection models. Compared with MabsCIP,  $\Delta eccB_4$  showed a pronounced and reproducible survival defect in amoebae (Fig. 2A) and in MΦ (Fig. 2B), with a 0.5-log reduction in the number of cfus at 3 days postinfection (dpi) in both cell types and a 1.5-log reduction at 7 dpi in MΦ. Complementation with *eccB*<sub>4</sub> 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. 2). The distinct survival rates were not due to differences in the adherence capacity (*SI Appendix, Fig. S3A and B*) or in the internalization (*SI Appendix, Fig. S3C and D*) of  $\Delta eccB_4$  with amoebae or MΦ.

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

***M. abscessus* *EccB*<sub>4</sub> Is Involved in the Blockage of Phagosome Acidification.** Inhibition of 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 intraphagosomal 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.ΔeccB*<sub>4</sub> 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



**Fig. 1.** Quantitative screening of the *Mabs435* *Tn* library for reduced intracellular survival. (A, Left) *A. castellanii* cells. (Right) MΦ. *A. castellanii* cells or J774.2 MΦ were infected with individual selected mutants in triplicate and were cocultured for 2 days in minimum medium or for 3 days of coculture in MΦ medium supplemented with amikacin, respectively. Then cells were lysed, and the bacteria were enumerated by counting cfus. *Tn* mutants with less than 50% of intracellular survival in amoeba or MΦ (as compared with a 100% survival rate for the parental *MabsCIP* strain) are shown as means  $\pm$  SD. Duplicates (i.e., the same *Tn* insertions) are not shown. Dots represent mutants with *Tn* insertions in the ESX-4 locus and *espl* and *sigM* genes. (B) Dots show the *Tn* positions within the different locus ESX-4 genes and *espl* and *sigM* genes. Identical mutants with the same TA insertion are represented by dots placed vertically. Numbers represent the position of the genes in the genome (NCBI annotations): *M. abscessus* subspecies *massiliense* strain GO 06, *M. abscessus* subspecies *abscessus* ATCC 19977, *M. abscessus* subspecies *bolletii* 103, *M. tuberculosis* H37Rv, and *M. smegmatis* MC2 155. The same color code is used in A and B to highlight mutants presenting a *Tn* insertion in the different the ESX-4 gene loci and the position of this gene within the locus.

of phagosomes containing  $\Delta eccB_4$  colocalized with the Lyso-Tracker dye compared with phagosomes containing the wild-type or *C.ΔeccB<sub>4</sub>* strains (Fig. 3B). Results of the colocalization studies are shown as plots (Fig. 3B) and as Pearson's correlation coefficient (PCC) of the quantified colocalization signals (Fig. 3C).

Together, these findings suggest that the impaired intracellular replication of  $\Delta eccB_4$  is linked to the progressive acidification of  $\Delta eccB_4$ -containing compartments.

**$\Delta eccB_4$  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 phagosome-to-cytosol communication (34). Since *EccB<sub>4</sub>* appears to be involved in the inhibition of phagosome acidification, which is a prerequisite for the induction of phagosomal rupture (41), we evaluated the capacity of  $\Delta eccB_4$  to induce a phagosomal rupture. To this end, we applied the previously developed FRET-based

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

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

\*Mutants with the same TA insertion site found several times: duplications are 14B9, 19D4, 32C7, and 25E4.

<sup>†</sup>Mutants with the same TA insertion site found several times: duplication is 15G8.

<sup>‡</sup>Mutants with the same TA insertion site found several times: duplications are 13F7 and 2D10.

phagosomal rupture assay (34, 42), which depends on the activity of the *M. abscessus* endogenous  $\beta$ -lactamase (43). In this assay, when the  $\beta$ -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 the subsequent switch of fluorescence emission from green to blue. In contrast to MabsCIP, and similarly to heat-killed MabsCIP, the  $\Delta eccB_4$  strain 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.ΔeccB<sub>4</sub>*, thus supporting the involvement of EccB<sub>4</sub> in establishing 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 MΦ with the different strains. An intense labeling with galectin-3 was observed upon infection with MabsCIP and *C.ΔeccB<sub>4</sub>*. In contrast, the percentage of galectin-3-positive cells infected with either  $\Delta eccB_4$  or heat-killed MabsCIP was significantly lower (Fig. 4 C and D). This indicates that, in the absence of functional EccB<sub>4</sub>, only reduced signs of phagosomal lysis are observed.

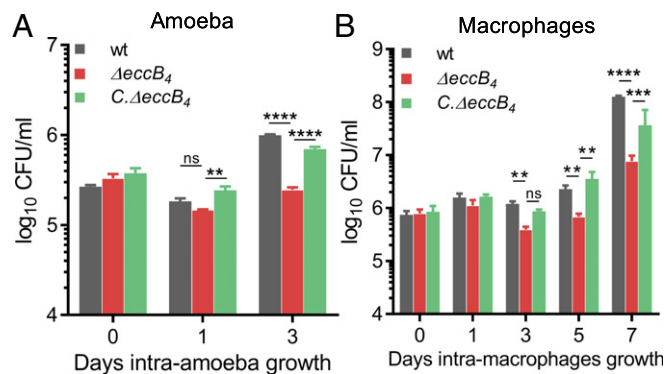
Recently, synergy between the phthiocerol dimycocerosate and the ESX-1 pathways has been proposed as a cause of phagosomal membrane rupture in *M. tuberculosis* (44), prompting us to analyze and compare the lipid profiles in  $\Delta eccB_4$  and MabsCIP. No obvious differences in the polar or apolar lipid fractions or in the mycolic acid pattern were noticed (SI Appendix, Fig. S4).

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

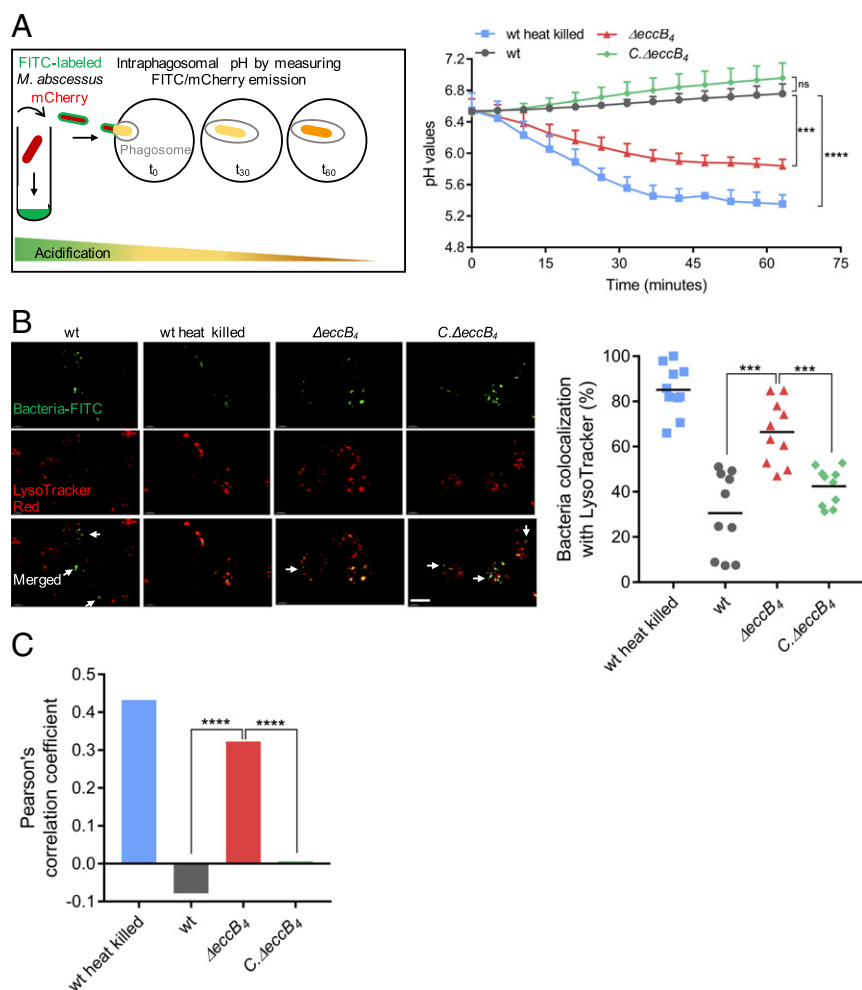
Recent studies reported that, during infection of differentiated human THP-1 cells, *M. tuberculosis* engages distinct cytosolic pattern recognition receptor systems, namely the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-IFN-I axis and the inflammasome-IL-1 $\beta$  pathway. The relative abundance of ESX-1 effectors determines which pathway is triggered (45–47). We therefore quantified IL-1 $\beta$  and IFN- $\beta$  in the culture supernatant of THP-1 cells by ELISA. A time-dependent increase in IL-1 $\beta$  production was observed for both the parental and complemented strains. In contrast, reduced levels of IL-1 $\beta$  were observed in the supernatant of MΦ infected with  $\Delta eccB_4$ , further substantiating a functional involvement of EccB<sub>4</sub> in phagosome-to-cytosol communication (Fig. 4E). We confirmed that the difference in IL-1 $\beta$  production was due to caspase-1 activation and not to an altered pro-IL-1 $\beta$  transcription in  $\Delta eccB_4$  compared with MabsCIP (Fig. 4 F and G). In contrast,

we were not able to detect IFN- $\beta$  in the supernatant of THP-1 cells infected with either MabsCIP or  $\Delta eccB_4$  for up to 40 hpi.

**EccB<sub>4</sub>-Dependent Secretome.** A proteomic-based approach was used to analyze and compare the concentrated culture supernatants from MabsCIP and  $\Delta eccB_4$  on four replicates to unveil proteins possibly missing or present in diminished quantity in the  $\Delta eccB_4$  mutant relative to the MabsCIP strain. Three comparisons were made using two *M. abscessus* proteomes (UP000007137 and UP0000038470) and a *M. tuberculosis* proteome (UP000001584), with the restriction that a full and comprehensive proteome comparison could not be done for the *M. tuberculosis* proteome 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  $\Delta eccB_4$  (SI Appendix, Tables S3 and S4). The analysis highlighted the following proteins of particular interest: (i) three PE/PPE proteins (MAB\_0664, MAB\_0047, and MAB\_4141) that are not part of ESX-4 locus were decreased in  $\Delta eccB_4$ ; (ii) four putative MmpL transporters, two MmpS proteins, and four Mce-like proteins were diminished in  $\Delta eccB_4$ ; and (iii) secretion of four lipoproteins (LpqY, LprC, LppL, and LprN) was decreased in the  $\Delta eccB_4$  mutant (SI Appendix, Tables S3 and S4). For the ESX-4-encoded proteins, a decrease of EccB<sub>4</sub> in  $\Delta eccB_4$  was noticed ( $P = 0.24$ ; SI Appendix, Fig. S5A). Importantly, the presence of EsxT (MAB\_3753c) and EsxU (MAB\_3754c) in the supernatant was reduced by 52 and 27%, respectively, in the  $\Delta eccB_4$  mutant compared



**Fig. 2.** Intracellular survival of  $\Delta eccB_4$  and *C.ΔeccB<sub>4</sub>* during coculture. Intracellular survival kinetics of wild-type,  $\Delta eccB_4$ , and *C.ΔeccB<sub>4</sub>* strains determined by cfu counts during infection within amoeba *A. castellanii* (A) or J774.2 MΦ (B) at a MOI of 10:1. Histograms with error bars represent means  $\pm$  SD that are representative data of three independent experiments.  $P$  values were generated by ANOVA, with the Dunnett's test using GraphPad prism program: ns, nonsignificant; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



**Fig. 3.** Evaluation of phagosomal acidification in MΦ infected with different *M. abscessus* strains. (A, Left) Differentiated THP-1 cells were infected with FITC-labeled and mCherry-expressing (fluorescent protein) wild-type (wt) *M. abscessus* (MabsCIP),  $\Delta eccB_4$ , *C.* $\Delta eccB_4$ , or heat-killed MabsCIP strains. Fluorescent signals were measured sequentially using excitation at 485 nm (FITC) and 565 nm (mCherry). The pH at each time point was extrapolated from a standardized pH curve. (Right) The intraphagosomal pH of the different MΦ strains was measured every 5 min for more than 1 h. (B) Analysis of the bacterial compartment by confocal microscopy using a fluorescent marker for acidic compartments. (Left) Colocalization of FITC-labeled wild-type MabsCIP, heat-killed wild-type MabsCIP,  $\Delta eccB_4$ , and *C.* $\Delta eccB_4$  with the acidotropic dye LysoTracker Red in infected J774.2 MΦ. Arrows indicate intracellular mycobacteria not colocalizing with LysoTracker Red. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (Right) The percentage of FITC-labeled strains colocalized with LysoTracker was quantified by counting at least 100 infected cells in 10 different fields. Horizontal bars show the mean percentages of bacilli colocalized with red acidic compartments in MΦ infected with heat-killed wild-type, wild-type,  $\Delta eccB_4$ , and *C.* $\Delta eccB_4$  strains. (C) 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. *P* values were determined by ANOVA with the Dunnett's test using GraphPad prism program (A and C) and unpaired *t* test (B); ns, nonsignificant; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001.

with 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) (SI Appendix, Fig. S5A).

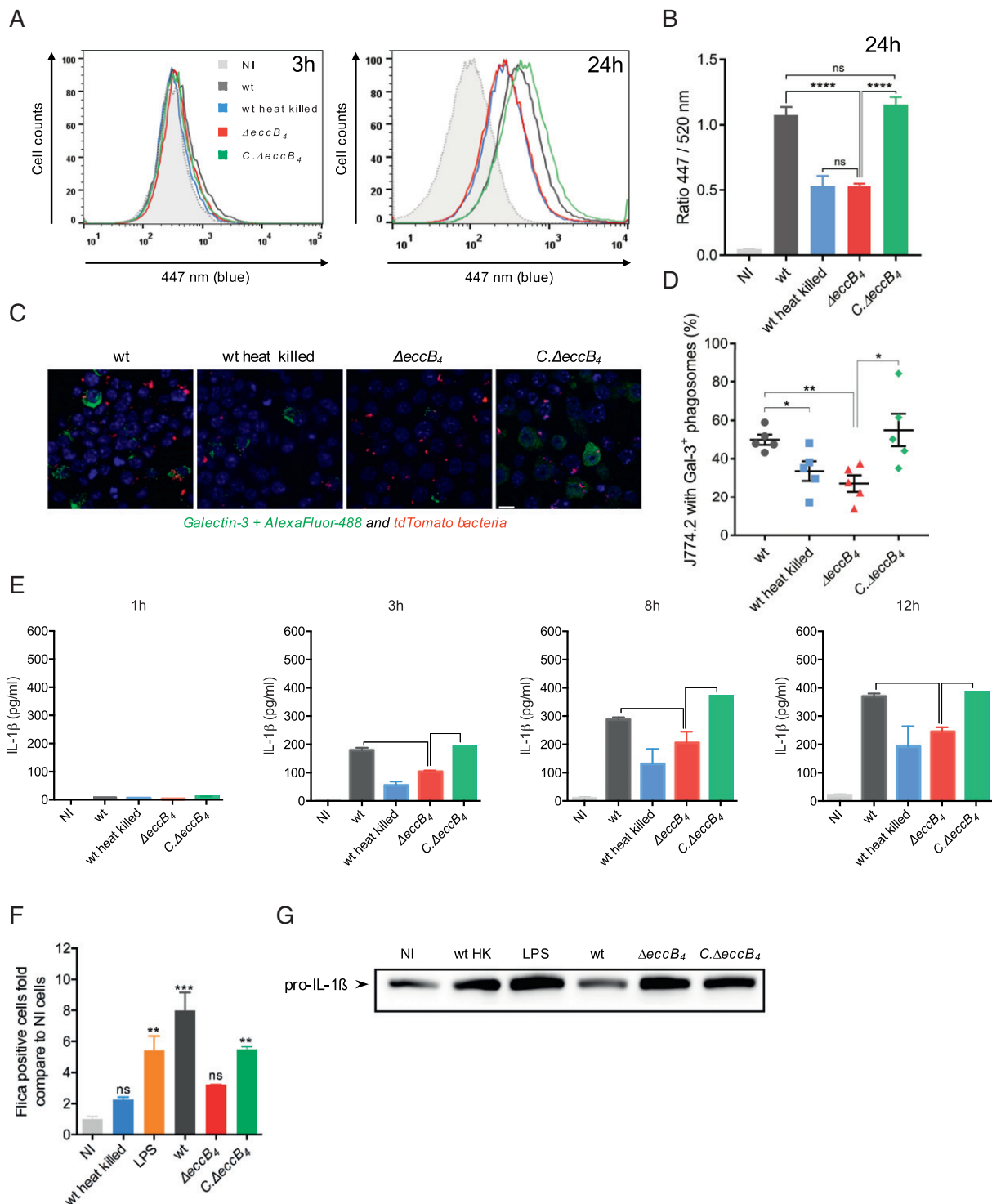
To further explore these findings, the *esxU-esxT* operon was placed downstream of the *hsp60* promoter in a replicative plasmid to generate a His-tagged EsxT fusion protein. The construct was introduced in MabsCIP and  $\Delta eccB_4$ , and expression of His-EsxT was analyzed by immunoblotting (SI Appendix, Fig. S5B). As shown in SI Appendix, Fig. S5B, His-EsxT was not detected in the culture supernatant of either MabsCIP or the  $\Delta eccB_4$  mutant. However, His-EsxT was detected in the cytosol and the cell membrane—but not in the cell wall—extracts of both MabsCIP and the  $\Delta eccB_4$  mutant (SI Appendix, Fig. S5B), but its expression levels were lower in the  $\Delta eccB_4$  construct (SI Appendix, Fig. S5B) despite similar amount of proteins loaded (SI Appendix, Fig. S5C). In addition, the *esxT* transcript levels remained unchanged, as indicated by qRT-PCR analyses performed on both strains (ratio of 1.15 compared with *sigA*). Taken together, these results

confirm the decreased expression/secretion of ESX-4 substrates, such as PE/PPE proteins and EsxU/T, in the  $\Delta eccB_4$  mutant.

## Discussion

Mycobacteria and free-living amoebae have coevolved 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). Here we have identified a pool of genes essential for the intracellular survival/growth of *M. abscessus* inside amoebae and MΦ (SI Appendix, 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*



**Fig. 4.** Phagosomal rupture detected by CCF-4 FRET-based flow cytometry, galectin-3 immunostaining confocal microscopy, and IL-1 $\beta$  activation and production. (A) Results are depicted as signal overlays per group with 1,000,000 events per condition acquired in wild-type (dark gray line), heat-killed wild-type (blue line),  $\Delta eccB_4$  (red line),  $C.\Delta eccB_4$  (green line), and noninfected (NI, light gray filled curve) strains. (B) Histograms represent the ratio of blue MFI at 447 nm and green MFI at 520 nm and SD from at least three independent experiments. (C) Representative confocal images of M $\Phi$  infected with different tdTomato *M. abscessus* wild-type, heat-killed wild-type,  $\Delta eccB_4$ , and  $C.\Delta eccB_4$  strains (red) and stained for galectin-3 (green). (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (D) The percentage of infected M $\Phi$  containing at least one positively stained phagosome (Gal-3<sup>+</sup>) was determined. The values represent the mean  $\pm$  SEM of 100 infected cells in five different fields. (E) Kinetics of IL-1 $\beta$  production during THP-1 infection by wild-type, heat-killed wild-type,  $\Delta eccB_4$ , and  $C.\Delta eccB_4$  strains. (F) Caspase-1 activation was measured with the FAM-PLICA caspase-1 assay. THP-1 cells were infected or not infected (NI) with wild-type, heat-killed wild-type,  $\Delta eccB_4$ , and  $C.\Delta eccB_4$  strains at a MOI of 10 for 3 h. As a positive control of apoptosis induction, cells were incubated with LPS 500 nM for 8 h at 37  $^{\circ}$ 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 before staining with 30 $\times$  FAM-VAD-FMK for the CD11b antibody and were 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-1 $\beta$  was performed after cell lysis (conditions are as in F). *P* values were generated by ANOVA, with the Dunnett's test (B and D) or unpaired *t* test (C) using GraphPad prism program: ns, nonsignificant; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001.

*smegmatis*, in that it contains the ESX conserved component EccE<sub>4</sub> (Fig. 1B) (35). 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 EccB<sub>4</sub>, using an allelic exchange strategy. This approach confirmed the essential role of the *eccB<sub>4</sub>* gene in intramoebal and intra-MΦ replication/survival of *M. abscessus*. The replication/survival defect of  $\Delta$ *eccB<sub>4</sub>* resulted neither from decreased adhesion to the host cell surface nor from defective phagocytosis but from the intracellular fate of the mycobacteria.

In contrast to most other RGM, MabsCIP can replicate inside the MΦ thanks to the inhibition of phagosomal acidification (10, 34). We recently proved that the *M. abscessus* MAB\_4780 locus, which encodes a dehydratase that is involved in the metabolism of mycolic acids, participates in the blockage of phagolysosomal fusion (49). The present study demonstrates that EccB<sub>4</sub> 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 MΦ. Unexpectedly, this phenotype was also lost in the absence of a functional EccB<sub>4</sub>. 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<sub>4</sub>* gene. FG3 was originally used to visualize vacuole lysis induced by extraphagosomal pathogens (50, 51) and has been used successfully 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-1β secretion. Indeed, recent reports have suggested that mycobacterial access to the cytosolic compartment has several consequences for the innate immune response, including enhanced activation of the inflammasome and release of functional IL-1β (45, 46). Quantification of IL1-β produced by THP-1 cells infected with different *M. abscessus* mutants demonstrates the involvement of EccB<sub>4</sub> 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; a possible explanation is the potential absence of *M. abscessus* DNA release into the cytosol. In the case of *M. tuberculosis*, mycobacterial dsDNA, liberated from the bacteria by still unknown mechanisms and translocated to the cytosol, most likely through the ESX-1-mediated phagosomal membrane rupture, is recognized as being responsible for the activation of the IFN-I axis (46).

Whether ESX-4 plays a direct role in phagosomal acidification and membrane permeabilization or is involved in a signaling event that occurs before 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 demonstrated decreased expression of *M. abscessus* ESX-4 substrates such as EsxT in the  $\Delta$ *eccB<sub>4</sub>* mutant, showing that such compounds have a similar role in the *M. abscessus*-induced phagosomal membrane damage. Taken together, these results suggest an unanticipated role for the ESX-4 T7SS, and particularly EccB<sub>4</sub>, 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 (53). *M. abscessus* 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 (54). Of importance, induction of *esx-4* transcripts in the recipient requires a functional recipient ESX-1 secretion system (54). *M. smegmatis* lacks EccE<sub>4</sub> compared with *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 (53), 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 the most ancestral T7SS in mycobacteria (35), and it is also the smallest (9,870 bp) in *M. tuberculosis*, comprising only seven 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<sub>4</sub>*,” which is absent in the ESX-4 loci of all the other mycobacteria, including SGM species (Fig. 1B) (35). The presence of the complete set of *eccB<sub>4</sub>-eccC<sub>4</sub>-eccD<sub>4</sub>-eccE<sub>4</sub>* genes encoding the structural components of the ESX machine is reminiscent of other ESX loci, including ESX-5, whose structural organization was recently unveiled (55, 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<sub>5</sub>* when *eccC<sub>5</sub>* or *eccD<sub>5</sub>* was mutated (55). Of note, the related *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium immunogenium* species possesses an ESX-4 locus similar to that of the *M. abscessus* complex with an intact *eccE<sub>4</sub>* gene, for which the closest paralogues so far identified are *eccE<sub>5</sub>* and *eccE<sub>1</sub>* of *M. tuberculosis* (35). The ubiquitous absence of gene *eccE<sub>4</sub>* from the ESX-4 loci of almost all interrogated mycobacterial species suggests that in *M. abscessus*, where this gene is exceptionally present, its gene product EccE<sub>4</sub> 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 lack 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  $\Delta$ *eccB<sub>4</sub>* mutant. This situation is reminiscent of 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 with the membrane fraction, and decreased levels of EsxT were found in the membrane of  $\Delta$ *eccB<sub>4</sub>*, supporting the proteomic data. Whether EsxU and EsxT fulfill functions in *M. abscessus* similar to that of EsxA/B in *M. tuberculosis* will deserve further studies.

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

## Materials and Methods

**Strains, Cells, and Culture Conditions.** *M. abscessus* subspecies *massiliense* 435 (Mabs435) is a smooth clinical isolate from Korea used to generate the *Tn* mutant library. The CIP 104536<sup>T</sup> type strain of *M. abscessus* subspecies *abscessus* (MabsCIP) was also used to generate the *eccB<sub>4</sub>*-deletion mutant. Mycobacterial strains and mutants were routinely grown aerobically at 37 °C in Middlebrook 7H9 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.2% glycerol, 1% glucose, and 250 mg/L kanamycin (Thermo Fisher Scientific) when necessary, with 25 mg/L zeocin (Thermo Fisher Scientific) for the  $\Delta$ *eccB<sub>4</sub>* strain, and

with 25 mg/L zeocin plus 250 mg/L hygromycin (Thermo Fisher Scientific) for *C.ΔeccB<sub>4</sub>*. Reporter strains and markers were used as described previously (23, 34). *A. castellanii* (ATCC 30010) was grown at room temperature without CO<sub>2</sub> in peptone yeast extract glucose (PYG) broth for the amplification of the strain. J774.2 and THP-1 MΦ cell lines were grown and used as described (32, 34).

**Cell Infection Assays.** The *A. castellanii* culture was washed four times in 10 mL of AC buffer [4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 M CaCl<sub>2</sub>, 0.1% sodium citrate dehydrate, 0.05 mM Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>, 2.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, pH 6.5] and distributed into 96-well plates at a concentration of 5 × 10<sup>4</sup> amoebae per well. Following 1 h of incubation at 32 °C, the amoebae monolayer was inoculated with 5 μL of a 4-day culture of each *Tn* mutant. After 1.5 h of incubation at 32 °C, extracellular mycobacteria were removed by one washing in AC buffer followed by 2 h 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 of 10<sup>7</sup> heat-inactivated *Escherichia coli* (70 °C for 60 min) every 24 h (10). After 2 days of coculture, 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 onto a blood agar plate to perform the screen. Mutants with a 50% or greater reduction in cfus were selected (SI Appendix, Fig. S1). For the second screen, cfu counts were performed to confirm the intracellular behavior, as reported earlier (10). Infection of J774.2 and/or THP-1 MΦ and cfu counts were performed as described (10, 34). Adhesion and internalization assays were carried out in 24-well plates, as described (SI Appendix, Fig. S3) (60).

**Subcloning and Sequencing of *Tn*-Adjacent Genomic Regions.** Genomic DNA was extracted from each mutant, *Clal* restricted, and subcloned in pUC19 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (61). Genomic DNA was sequenced using a 5' primer in the *Tn* (TTGACGAGTCTCTCTGA). Genomic sequence comparisons were made using the BLAST server [genome database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website]. Sequence data were used to design primers to confirm the exact position of the *Tn* insertion by PCR amplification on Mabs43S genomic DNA and sequencing. The web interface MaGe (Magnifying Genomes) was used to automatically assign the gene product function of the genome of *M. abscessus* CIP 104536<sup>T</sup> and of the mutated gene responsible of the resistance to degradation in MΦ cells (SI Appendix, Table S1).

**Δ*EccB<sub>4</sub>* Mutant Construction and Complementation.** Disruption of the *eccB<sub>4</sub>* gene was performed using the recombineering system as described previously (10, 61). Complementation was performed after amplifying and cloning *eccB<sub>4</sub>* into the integrative plasmid pMVH361 as described (SI Appendix, Fig. S2) (10).

**Analysis of Phagosomal Acidification by pH Measurements.** *M. abscessus* strains expressing the fluorescent protein mCherry were labeled with FITC (Sigma-Aldrich) and dispensed into 24-well plates containing J774.2 MΦ 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 before fluorescence measurements (34). Fluorescent signals were then measured by sequential excitation at 485 nm (FITC) and 565 nm (mCherry) using a Tecan 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 MΦ after placing infected cell monolayers in standard series of buffers from pH 4.6–7.6 (25).

**Analysis of Phagosomal Acidification by LysoTracker Colocalization.** Fully confluent monolayers of MΦ in 24-well plates 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 phagosomal acidification and maturation. J774.2 MΦ were distributed into 12-well plates containing glass coverslips and were infected with FITC-labeled *M. abscessus* (100 mg/mL of FITC for 2 h at room temperature). At the end of the infection, LysoTracker was added to each well. The percentage of FITC-labeled mycobacteria that colocalized with LysoTracker-labeled phagosomes was determined by analyzing more than 100 infected cells from at least 10 random fields with a Leica SP8-X confocal microscope. Pictures analyses and PCC evaluation were done with IMARIS software.

**Galectin-3 Immunostaining to Detect Phagosomal Membrane Damage.** MΦ 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-specific monoclonal antibody (555746; BD Pharmingen) 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 mycobacteria-containing 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 five different fields. All images were analyzed with IMARIS software.

**Flow Cytometry Analysis to Study Phagosomal Rupture and Caspase-1 Activation.** CCF-4 FRET measurements to study phagosomal rupture were performed as recently described (42).

The FAM FLICA Caspase-1 Assay Kit (ImmunoChemistry Technologies) was used to evaluate the presence of catalytically active forms of caspase 1 p10 and p12. THP-1 cells were infected at a MOI of 10 bacteria per cell for 3 h. As a positive control of apoptosis induction, cells were incubated with LPS (500 nM) for 8 h 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 before staining with 30× FAM-VAD-FMK for 30 min at 37 °C. For specific gating, the cells were also stained with the CD11b antibody (42) before being fixed with 5% paraformaldehyde. 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-1β (1:1,000; Abcam ab2105,) by Western blot analysis.

**ELIS Analysis.** Supernatants from THP-1 MΦ/*M. abscessus* cocultures were collected and assayed for human IL-1β secretion using the IL-1β kit DY201-05 (Bio-Techne) and for IFN-β secretion using the human IFN-β kit 09341410-1 (tebu-bio), according to the manufacturer's recommendations.

**EsxU and EsxT Secretion Analysis.** *MAB\_3754c* and *MAB\_3753c* were cloned in the *PvuI* and *HindIII* sites of pMVH361. Primers were designed to incorporate a His-tag at the C terminus of the *MAB\_3753c* protein. A stop codon was also introduced between the two genes. The plasmid was transformed in the wild-type and Δ*eccB<sub>4</sub>* strains.

Bacterial cultures were recovered at an OD<sub>600</sub> of 0.8, resuspended in PBS containing PMSF and 1 mM EDTA (1 mL/g), sonicated, and subjected to fractionation. After a first centrifugation at 1,000 × *g* to eliminate nonlysed 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 h to separate the plasma membranes from the cytosolic compartment. Equal protein amounts were subjected to SDS/PAGE and immunoblotting and were revealed using mice anti-His antibodies conjugated with peroxidase (Sigma-Aldrich) (SI Appendix, Fig. S5).

**Secretome Analysis.** *M. abscessus* CIP and Δ*eccB<sub>4</sub>* strains were grown in 7H9 medium to OD<sub>600</sub> = 0.8 (four biological duplicates). Then cells were diluted with Sauton medium plus glucose (1%), the appropriate antibiotics (see *Strains, Cells, and Culture Conditions*, above), and 0.05% Tween 80 to an OD<sub>600</sub> of 0.1. The diluted cells were incubated until OD<sub>600</sub> = 0.6–0.7 was reached. Then bacteria were centrifuged, washed three times with cold PBS 1×, diluted again Sauton's medium plus glucose (1%) and antibiotics, and incubated to an OD<sub>600</sub> of 0.8–1. Culture supernatants then were concentrated 100× with Amicon Ultra centrifugal filters (3-kDa cutoff), and the protein concentration was measured with the Pierce protein BCA assay. Briefly, secretomes were diluted with ammonium bicarbonate and incubated for 4 h with 0.2 μg trypsin/LysC (Promega) at 37 °C. Samples then were loaded onto a homemade C18 Sep-Pak-packed stage tip for desalting. Samples were eluted using 40% ACN/0.1% formic acid and were vacuum concentrated to dryness. Desalted samples were reconstituted in 2% ACN/0.3% TFA that contained iRT peptides (Biognosys) for quality control. Samples were then analyzed by nanoLC-MS/MS for protein identification. Spectra were recorded on a Q-Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) and analyzed with Sequest through Proteome Discoverer 2.0 using the UniProt *M. abscessus* UP000038470 and UP000007137 databases. All data were further processed using myProMS software (SI Appendix, Fig. S5 and Tables S3 and S4) (62).

**Lipid Extractions and Analysis by TLC.** 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 (63). Lipid fractions were applied

to aluminum TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck) and were 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. TLCs with polar lipids were treated with a mist of 0.1% orcinol (dissolved in 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) before charring (*SI Appendix, Fig. S4*).

**RNA Extraction and RT-PCR Analysis.** Bacterial RNA was extracted from various *M. abscessus* strains as described previously (10). Briefly, total RNA was extracted using TRIzol reagent and a bead beater. PCR was performed with a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad). The primer sequences used for qRT-PCR are listed in *SI Appendix, Table S5*. Controls without reverse transcriptase were done on each RNA sample to rule out DNA contamination. The *sigA* gene was used as an internal control (*SI Appendix, Table S2*) (10).

- 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.
- Boritsch EC, et al. (2014) A glimpse into the past and predictions for the future: The molecular evolution of the tuberculosis agent. *Mol Microbiol* 93:835–852.
- Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33:1179–1183.
- 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* 46:86–95.
- 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* 31:1122–1126.
- 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* 69:159–175.
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17:413–433.
- 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* 83:1778–1788.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE (1997) Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65:3759–3767.
- 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.
- Wallace RJ, Jr, Brown BA, Griffith DE (1998) Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 52:453–490.
- Duarte RS, et al. (2009) Epidemic of post-surgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol* 47:2149–2155.
- 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.
- Olivier KN, et al.; Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group (2003) Nontuberculous mycobacteria. I. Multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:828–834.
- Roux A-L, et al.; Jean-Louis Herrmann for the OMA Group (2009) Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol* 47:4124–4128.
- Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ, Jr (1993) Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* 147:1271–1278.
- 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.
- Jönsson BE, et al. (2007) Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 45:1497–1504.
- Bryant JM, et al. (2016) Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous *Mycobacterium*. *Science* 354:751–757.
- Cullen AR, Cannon CL, Mark EJ, Colin AA (2000) *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* 161:641–645.
- Kreutzfeldt KM, et al. (2013) Molecular longitudinal tracking of *Mycobacterium abscessus* spp. during chronic infection of the human lung. *PLoS One* 8:e63237.
- Catherinot E, et al. (2009) Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* 47:271–274.
- Bernut A, et al. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E943–E952.
- 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.
- Bernut A, et al. (2016) Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* 99:866–883.
- Catherinot E, et al. (2007) Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* 75:1055–1058.
- 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*, 10.3389/fcimb.2017.00100.
- Roux A-L, et al. (2011) Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol* 13:692–704.
- Ripoll F, et al. (2009) Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 4:e5660.
- Falkingham JO, 3rd, 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* 123:749–758.
- Cateau E, et al. (2014) *Stenotrophomonas maltophilia* and *Vermamoeba vermiformis* relationships: Bacterial multiplication and protection in amoeba-derived structures. *Res Microbiol* 165:847–851.
- Le Moigne V, et al. (2016) MgtC as a host-induced factor and vaccine candidate against *Mycobacterium abscessus* infection. *Infect Immun* 84:2895–2903.
- Rubin EJ, et al. (1999) In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1645–1650.
- Roux A-L, et al. (2016) The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* 6:160185.
- 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* 8:387–402.
- Unnikrishnan M, Constantinidou C, Palmer T, Pallen MJ (2017) The enigmatic Exs proteins: Looking beyond mycobacteria. *Trends Microbiol* 25:192–204.
- Zhang M, et al. (2014) EspI regulates the ESX-1 secretion system in response to ATP levels in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 93:1057–1065.
- Raman S, et al. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* SigM positively regulates Exs secreted protein and nonribosomal peptide synthetase genes and down regulates virulence-associated surface lipid synthesis. *J Bacteriol* 188:8460–8468.
- Armstrong JA, Hart PD (1971) Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134:713–740.
- Sturgill-Koszycki S, et al. (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678–681.
- 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)* 95:5150–5154.
- 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:e1004650.
- Soroka D, et al. (2014) Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 69:691–696.
- Augenstein 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* 19:e12726.
- Majlessi L, Brosch R (2015) *Mycobacterium tuberculosis* meets the cytosol: The role of cGAS in anti-mycobacterial immunity. *Cell Host Microbe* 17:733–735.
- Vassermann R, et al. (2015) *Mycobacterium tuberculosis* differentially activates cGAS- and inflammasome-dependent intracellular immune responses through ESX-1. *Cell Host Microbe* 17:799–810.
- Gröschel 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* 18:2752–2765.
- Adékambi T, Ben Salah S, Khelif M, Raoult D, Drancourt M (2006) Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* 72:5974–5981.
- Halloum I, et al. (2016) Deletion of a dehydratase important for intracellular growth and cording renders rough *Mycobacterium abscessus* avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E4228–E4237.
- Paz I, et al. (2010) Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell Microbiol* 12:530–544.
- 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* 482:414–418.
- Simeone R, et al. (2012) Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* 8:e1002507.



53. Kim YS, et al. (2017) Mycobacterium abscessus ESX-3 plays an important role in host inflammatory and pathological responses during infection. *Microbes Infect* 19:5–17.
54. Gray TA, et al. (2016) Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. *Science* 354:347–350.
55. Houben ENG, et al. (2012) Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Mol Microbiol* 86:472–484.
56. Abdallah AM, et al. (2007) Type VII secretion–Mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 5:883–891.
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* 73:329–340.
59. 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* 18:1489–1507.
60. Tanne A, et al. (2009) A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 206:2205–2220.
61. Medjahed H, Singh AK (2010) Genetic manipulation of Mycobacterium abscessus. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 10:Unit 10D.2.
62. Pouillet P, Carpentier S, Barillot E (2007) myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* 7: 2553–2556.
63. Besra GS (1998) Preparation of cell-wall fractions from mycobacteria. *Mycobacteria Protocols* (Humana, Totowa, NJ), pp 91–108.

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

Mutant	<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Protein name	Amoeba % survival	MΦ % survival
37F10	MAB_3756c	Rv3447c	EccC - Type VII secretion protein FtsK/SpoIIIE family protein (TA insertion 15bp after 24H3)	9	>50
5A1	MAB_3757	Rv3448	EccD - Type VII secretion protein	9	26
7A1	MAB_3757	Rv3448	EccD - Type VII secretion protein (TA insertion 426bp after 5A1)	9	34
32C9 <sup>a</sup>	MAB_3759c	Rv3450c	EccB - Type VII secretion protein	11	34
3B9	MAB_0364c		ATPase, BadF/BadG/BcrA/BcrD type	12	28
43A3 <sup>b</sup>	MAB_0628		EspI - Secretion protein	13	8
24H3	MAB_3756c	Rv3447c	EccC - Type VII secretion protein FtsK/SpoIIIE family protein	17	>50
55F6	MAB_0855		MmpL - Membrane protein	18	36
14E9 <sup>c</sup>	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 (before MAB_4608)		≈ 20 bp before 3-oxoacyl-ACP synthase FabF; β-ketoacyl- ACP synthase II, KASII	41	49
47H4	MAB_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	Rv0551c	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

<b>51H7</b>	<i>MAB_4691c</i>		PstA - Peptide synthetase	>50	38
<b>40A11</b>	<i>MAB_3658c</i>	<i>Rv3305c</i>	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	>50	40
<b>15A11</b>	<i>MAB_3326c</i>	<i>Rv3329</i>	Aminotransferase, class III	>50	41
<b>57G6</b>	Intergenic domain (before <i>MAB_3866c</i> )		≈ 90 nucleotides before a permease	>50	42
<b>22D3</b>	<i>MAB_2426</i>	<i>Rv1851</i>	UreF - Urease accessory protein	>50	42
<b>15C4</b>	<i>MAB_2992c</i>	<i>Rv2689c</i>	23S rRNA methyltransferase	>50	45
<b>39H12</b>	<i>MAB_4593c</i>		Unknown	>50	45
<b>52A12</b>	<i>MAB_4173</i>	<i>Rv3526</i>	Oxygenase	>50	50

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

**Table S2. Evaluation of the polar effect of *Tn* insertion. Genes mean normalized expression relative to *sigA*.**

	<b>Mabs</b>	<b>24H3</b> ( <i>Tn eccC<sub>4</sub></i> )	<b>7A1</b> ( <i>Tn eccD<sub>4</sub></i> )
<i>MAB_3755c</i> <i>esx</i>	1.0	1.2	ND
<i>MAB_3756c</i> <i>eccC<sub>4</sub></i>	1.0	0.5	ND
<i>MAB_3757</i> <i>eccD<sub>4</sub></i>	1.0	ND	0.1
<i>MAB_3758</i> <i>mycP<sub>4</sub></i>	1.0	ND	1.9
<i>sigA</i>	1.0	1.0	1.0

**Table S3. List of proteins present only in wild-type strain compared to *ΔeccB4* strain (proteome UP000007137) and quantified by using quantification grouping XIC extraction.**

Gene & Synonyms	Delta-ECCB4/WT						Total Peptides	MW (kDa)	Description
	Ratio	Log2	p-value	Coeff. var.	Dist. pept. used	Pept. used			
MAB 1372	0.6496537	-0.6222572	0.3922764	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	0.5701225	-0.810656	0.063134	0.3943692	3	24	24	58.0	Putative oligopeptide ABC transporter solute-binding protein
MAB 2821c	0.8233974	-0.2820924	0.8288937	0.6799251	3	22	22	42.8	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC
MAB 1340	0.931499	-0.1027339	0.9447592	0.8373199	4	20	20	27.4	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribosyltransferase
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 2736c	1.2064554	0.2707746	0.6827613	0.6648359	3	18	18	58.6	Probable macrolide ABC transporter, ATP-binding protein
MAB 0056c	1.1497825	0.2013609	0.9067549	1.2044549	2	16	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	0.5503971	-0.8614551	0.2486619	0.6398866	2	16	16	18.3	Uncharacterized protein
MAB 0855	0.9945128	-0.0079382	0.9964129	0.2966129	2	15	15	111.2	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	0.1767175	-0.4804149	0.9016702	2.6266578	2	15	15	44.3	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit
MAB 0574c	1.0325039	0.0461472	0.9797785	1.2574889	2	14	14	25.0	Uncharacterized protein
MAB 4204	0.6260738	-0.6755954	0.6534113	1.1160815	2	14	14	73.3	Amine oxidase
MAB 3285	0.4865464	-1.0395306	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 4506	0.5885759	-0.7646095	0.6817498	1.4375098	2	12	12	49.5	Hypothetical MCE-family protein
MAB 4336	0.5552355	-0.8488284	0.5132653	0.356738	2	12	12	77.0	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadF
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	0.1405161	-2.8311928	0.2323173	1.3772418	2	10	15	52.0	Uncharacterized protein
MAB 2368	1.6615752	0.7325516	0.6199509		1	8	8	32.2	Uncharacterized protein
MAB 0118c	1.5779745	0.6580739	0.4847307		1	8	8	23.0	Superoxide dismutase
MAB 0636c	1.5396859	0.6236361	0.4665977		1	8	8	100.2	Putative cation antiporter NADH dehydrogenase subunit
MAB 3373c	1.379172	0.4638024	0.5510935		1	8	8	31.8	Uncharacterized protein
MAB 4906	1.3353332	0.4171998	0.115377		1	8	8	20.9	Putative transcriptional regulator, PadR family
MAB 2106c	1.2798472	0.3559716	0.7958945		1	8	8	37.1	Probable conserved lipoprotein LppL
MAB 2610	1.2285437	0.3086448	0.9038505		1	8	8	46.9	Putative aminotransferase
MAB 1812c	1.1876447	0.2481033	0.8766006		1	8	8	11.3	Uncharacterized protein
MAB 4086	1.1707961	0.2274899	0.8691924		1	8	8	27.2	Possible TetR-family transcriptional regulator
MAB 4465	1.650177	0.2203518	0.6086966		1	8	8	49.6	Uncharacterized protein
MAB 1917	1.587741	0.2125993	0.7923269		1	8	8	49.5	Diacylglycerol O-acyltransferase
MAB 1570	1.1027819	0.1411475	0.8895544		1	8	8	31.1	Uncharacterized protein
MAB 1633	1.0588792	0.082538	0.9466742		1	8	8	33.3	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	0.9773886	-0.0329959	0.9739455		1	8	8	43.3	Possible monooxygenase (Luciferase-like)
MAB 0291	0.9563647	-0.0643672	0.9525471		1	8	8	67.2	Uncharacterized protein
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-succinylbenzoate acid-CoA ligase MenE
MAB 1414c	0.896895	-0.156989	0.9238506		1	8	8	68.6	Probable ABC transporter, ATP-binding protein
MAB 2220c	0.8455928	-0.241965	0.4969969		1	8	16	32.0	Uncharacterized protein
MAB 2494c	0.832265	-0.2648852	0.8872935		1	8	8	36.7	Putative hydrolase, alpha/beta fold
MAB 4652c	0.8231909	-0.2824547	0.8419106		1	8	8	10.3	Uncharacterized protein
MAB 4719c	0.8113779	-0.301554	0.864635		1	8	8	7.3	Uncharacterized protein
MAB 4796	0.7992279	-0.3233212	0.8766006		1	8	8	35.4	Uncharacterized protein
MAB 4635	0.7822857	-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
MAB 0138	0.7752029	-0.3673541	0.7414211		1	8	8	22.4	Putative transcriptional regulator, TetR family
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	0.7114393	-0.4911875	0.4300089		1	8	8	33.1	Uncharacterized protein
MAB 2855c	0.7080441	-0.4980889	0.4888575		1	8	8	41.8	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	-0.6058777	0.6381113		1	8	8	37.2	Uncharacterized protein
MAB 1650c	0.6388738	-0.6465971	0.5275136		1	8	8	53.7	Uncharacterized protein
MAB 0956c	0.6363683	-0.6520662	0.697375		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	0.6236522	-0.6811864	0.6272757		1	8	16	50.6	Probable sensor histidine kinase PrtB
MAB 0708	0.6205949	-0.6882762	0.192952		1	8	8	65.5	Uncharacterized protein
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 3344	0.5803566	-0.7849886	0.1662721		1	8	8	66.3	Probable glycosyl transferase
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	0.5317647	-0.91114	0.2323173		1	8	8	42.4	Putative fumarylacetoacetase
MAB 2151c	0.5292579	-0.9179571	0.2182385		1	8	8	52.4	Putative cytochrome P450
MAB 4151c	0.5237772	-0.9329749	0.2250795		1	8	8	37.9	Hypothetical MCE-family protein
MAB 0988c	0.5029013	-0.9848128	0.0797395		1	8	8	16.6	Probable membrane protein, MmpS
MAB 4086c	0.4898363	-0.0296283	0.3107978		1	8	8	15.1	Uncharacterized protein
MAB 4460	0.4838248	-1.0474433	0.0597673		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	0.4630488	-1.1107638	0.0359669		1	8	8	32.0	Uncharacterized protein
MAB p15c	0.4187231	-1.2559317	0.0597673		1	8	8	119.4	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 4546c	0.3740554	-1.4186762	0.244018		1	8	8	26.1	Putative TetR-family transcriptional regulator
MAB 1993	1.5941057	0.6727473	0.259769		1	7	7	35.4	Methylenetetrahydrofolate reductase
MAB 1399	1.2364216	0.3061708	0.8442147		1	7	7	45.1	Probable peptidase
hisl_MAB 26d	1.1478122	0.1988866	0.9426841		1	7	7	12.5	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase
MAB 3466c	0.9018817	-0.1489899	0.8691924		1	7	7	5.4	Uncharacterized protein
MAB 4325c	0.439549	-1.0130722	0.3658655		1	7	7	36.6	Uncharacterized protein
MAB 0965	0.4637355	-1.0698388	0.2323173		1	7	7	39.4	Putative lipase
MAB 4703c	0.4661445	-1.011508	0.552147		1	7	7	103.3	Probable membrane protein, MmpL
MAB 0107c	0.7943708	-0.3321154	0.822221		1	6	6	16.4	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase
MAB 1314	0.5754183	-0.797317	0.698942		1	6	6	23.5	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	0.7721405	-0.3730648	0.8930716		1	5	5	44.8	Possible glycosyl transferase
MAB 4306	0.4388274	-1.1882746	0.1762696		1	5	5	28.8	Putative transglutaminase-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	1000	1000			1	4	4	48.4	Probable peptidase
MAB 2934	2.1097025	1.0770396	0.4555747		1	4	4	25.7	Probable Asp/Glu racemase
MAB 3901	1.9740702	0.9811733	0.7617026		1	4	4	19.6	Peptidase C56 PipI
MAB 0269c	0.4742197	-1.0788084	0.554235		1	4	4	12.0	Uncharacterized protein
MAB 4141	0.3683075	-1.4410173	0.3533505		1	4	4	55.1	PE/PE family protein
MAB 2270c	0.001	-1000			1	4	4	43.4	Putative peptidase
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
MAB 2989	0.001	-1000			1	1	1	26.2	Chloramphenicol acetyltransferase
MAB 1820c	0.001	-1000			1	1	1	21.8	Putative resolvase

**Table S4. List of proteins present only in wild-type strain compared to *ΔeccB4* strain (proteome UP000038470) and quantified by using quantification grouping XIC extraction.**

120/166 proteins	Delta-ECCB4/WT					Total Peptides	MW (kD)	Description	
	Ratio	Log2	p-value	Coeff. var.	Dist. pept. used				
AA00U0XHK9	0.6516033	-0.6179341	0.4095446	0.9694194	5	35	35	50.8	Probable sugar ABC transporter, sugar-binding protein LpyY
AA00U1A6G4	0.8251966	-0.2771902	0.8330575	0.6780384	3	22	22	42.8	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC
AA00U0ZYQ4	1.302317	0.811412	0.9179987	2.2820302	3	21	29	106.8	Membrane protein mmpL10
AA00U1T0W8	0.9358249	-0.0958695	0.9417481	0.8365823	4	20	20	27.4	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase
AA00U0Z1D4	1.2092983	0.2741701	0.673302	0.6704797	3	18	18	58.6	ABC transporter
AA00U0Z1E5	1.1976146	0.2601495	0.8383833	0.840254	2	16	16	21.6	Putative transcriptional regulator, TetR family
AA00U1A0V7	1.152064	0.2042028	0.9179987	1.2044549	2	16	16	144.2	ATP-dependent helicase HpaA
AA00U1A2Y2	1.1232806	0.1677184	0.9320953	1.0041597	2	16	16	25.8	4-Hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase
AA00U1ADX3	1.0469636	0.0662113	0.9420111	0.4838856	1	16	16	55.7	Putative monoxygenase EriA
AA00U1A4Z1	0.7482196	-0.4184663	0.8781956	1.9224785	2	16	16	53.4	Hydrolase
AA00U1A1Q8	0.669483	-0.5788808	0.4463197	0.4718889	2	16	16	56.1	D-Di-ribose-binding periplasmic protein ddpA
AA00U1A4E4	1.0847928	0.172495	0.9580852	1.3032107	2	15	15	57.4	Uncharacterized protein containing a von Willebrand factor type A (VWA) domain
AA00U0Y5W0	0.7253176	-0.4631535	0.4888152	0.4294923	2	15	15	44.5	Uncharacterized protein
AA00U1A3F3	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
AA00U0ZY15	0.3376304	-1.5664833	0.2664075	1.4703604	2	13	13	30.3	Uncharacterized protein
AA00U1AXX2	0.6210686	-0.6871754	0.3327292	0.3442104	1	12	12	11.5	Conserved exported protein of uncharacterised function
AA00U0ZY77	0.591489	-0.7575768	0.6888724	1.4405969	2	12	12	49.6	Hypothetical MCE-family protein
AA00U0W7G6	0.1407043	-2.8292617	0.2378297	1.3786172	2	10	15	52.0	ESX-4 secretion system protein eccB4
AA00U1A0P1	1.7021268	0.7673385	0.1005493		1	8	8	25.0	Uncharacterized protein
AA00U1T2V0	1.6648723	0.7354115	0.6273841		1	8	8	32.2	Segregation and condensation protein A
AA00U1AEF5	1.6429364	0.7162767	0.744083		1	8	8	15.9	Probable molibdopterin biosynthesis protein Moe
AA00U1AVW0	1.5811056	0.6609338	0.4656354		1	8	8	23.0	Superoxide dismutase
AA00U1A870	1.5296279	0.6131808	0.7276229		1	8	8	30.1	Putative short chain dehydrogenase/reductase
AA00U0Z2A3	1.355631	0.4389987	0.6934338		1	8	8	22.0	Possible transposase fusion protein
AA00U1BK36	1.3379829	0.420897	0.6720268		1	8	8	20.9	PsaB family transcriptional regulator
AA00U1A2G9	1.2823869	0.5888314	0.7837886		1	8	8	36.4	Probable conserved lipoprotein LipI
AA00U1A0Z5	1.2691444	0.3483562	0.7006055		1	8	8	40.5	Putative dihydrodipicolinate reductase
AA00U1B373	1.2014456	0.2647713	0.6709206		1	8	8	48.8	Putative manganese-dependent inorganic pyrophosphatase
AA00U0XGZ3	1.1975807	0.2601229	0.589263		1	8	8	38.0	Glutamate 5-kinase
AA00U1A0V6	1.1953024	0.2577577	0.9320953		1	8	8	38.1	Topoisomerase IB
AA00U1A1L6	1.1826384	0.2402091	0.9582842		1	8	8	31.2	ESPI_C-terminal conserved region
AA00U0ZYX2	1.173193	0.230197	0.8655601		1	8	8	26.9	Possible TetR-family transcriptional regulator
AA00U0W2M6	1.1673294	0.2232117	0.616595		1	8	8	49.6	Uncharacterized protein
AA00U1ASW6	1.165761	0.2212721	0.8486992		1	8	8	26.4	ABC transporter, ATP-binding protein
AA00U1A7K6	1.1610734	0.2154592	0.7785398		1	8	8	49.4	Diacetylglucosyl O-acetyltransferase
AA00U1A1Q8	1.1267126	0.1721195	0.8154307		1	8	8	45.2	Probable aminotransferase/cysteine desulfurase
AA00U1T0K9	1.1248312	0.169786	0.9179987		1	8	8	16.4	AsnC family transcriptional regulator
AA00U1A1G8	1.119779	0.163214	0.9179987		1	8	8	39.4	Uncharacterized protein
AA00U0Z1E4	1.048109	0.067888	0.9179987		1	8	8	36.8	ATDP-glucose 4,6-dehydratase
AA00U0ZYR9	1.038238	0.0507786	0.957204		1	8	8	40.9	Probable glycosyl transferase
AA00U0ZYV9	1.0190197	0.027182	0.9697378		1	8	8	17.8	Uncharacterized protein
AA00U1B2F8	1.0069365	0.0099727	0.9952523		1	8	8	51.4	RNA modification GTPase MnmE
AA00U1A3E7	0.9600903	-0.0587581	0.9677545		1	8	8	43.1	Flavin-dependent monoxygenase, oxygenase subunit HsaA
AA00U1A1Z9	0.9582824	-0.0615074	0.9582842		1	8	8	66.6	Uncharacterized protein
AA00U0ZKX0	0.9363858	-0.094825	0.9443016		1	8	8	39.4	Possible O-succinylbenzoic acid-CoA ligase MenE
AA00U0ZYP6	0.8859952	-0.1746292	0.9309316		1	8	8	55.0	Probable aldehyde dehydrogenase
AA00U1A0A8	0.8780524	-0.187621	0.6868324		1	8	8	54.0	Exopolysaccharide biosynthesis poly(γ)-glucosylphosphotransferase
AA00U1B4D4	0.8677466	-0.2046543	0.9179323		1	8	8	57.7	Primase C terminal 1 (PrnC-T1)
AA00U0ZX17	0.8670776	-0.205767	0.9275237		1	8	8	31.1	Uncharacterized protein
AA00U1A1X6	0.8477707	-0.239105	0.4888152		1	8	8	32.0	Uncharacterized protein
AA00U1B3E3	0.814133	-0.2490791	0.8253962		1	8	8	45.3	N-isopropylantennic acid(isopropyl) amidohydrolase
AA00U0Z0W1	0.8238224	-0.2798948	0.8411385		1	8	8	10.4	Uncharacterized protein
AA00U1A0X7	0.8184827	-0.2971782	0.6112286		1	8	8	22.9	Pyroldone-carboxylate peptidase
AA00U1A0M3	0.8109656	-0.3022871	0.8603658		1	8	8	137.2	Uncharacterized protein
AA00U1A0E7	0.8008138	-0.3204613	0.884889		1	8	8	35.4	Alpha/beta hydrolase
AA00U0Z0C0	0.7967938	-0.3277216	0.8383438		1	8	8	41.1	Putative Mee family protein
AA00U1A1G3	0.7793219	-0.3396905	0.4938333		1	8	8	26.7	Uncharacterized protein
AA00U1A1X3	0.7767471	-0.3648945	0.7386307		1	8	8	27.8	Putative transcriptional regulator, TetR family
AA00U1A1Z7	0.7389065	-0.4365362	0.8486992		1	8	8	27.8	Probable enoyl-CoA hydratase/isomerase
AA00U1A0V2	0.7363624	-0.4415122	0.3056219		1	8	8	32.0	Putative pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein
AA00U1A0P9	0.712851	-0.4883276	0.4239446		1	8	8	33.1	Membrane protein
AA00U1A0M0	0.7119051	-0.4902431	0.3217986		1	8	8	24.3	Acid phosphatase
AA00U1B0F7	0.7084984	-0.4971634	0.7252589		1	8	8	11.8	Uncharacterized protein
AA00U1B3H5	0.7084984	-0.4971634	0.7252589		1	8	8	68.1	Heavy metal metalloprotein P-lyse ATPase
AA00U1A0X3	0.7060639	-0.5021293	0.7895929		1	8	8	51.4	RNA/RNA cytosine-C5-methylase
AA00U1A0S1	0.7052243	-0.505846	0.6708058		1	8	8	33.2	Cullin, a subunit of E3 ubiquitin ligase
AA00U0ZVK0	0.700045	-0.5144804	0.5168702		1	8	8	51.2	Probable aldehyde dehydrogenase
AA00U1A0M6	0.6946548	-0.5256310	0.3959609		1	8	8	46.5	Uncharacterized protein
AA00U1B280	0.6826891	-0.5506995	0.3729399		1	8	8	46.0	Prophage integrase
AA00U1A1I9	0.6676097	-0.5823862	0.1919099		1	8	8	48.5	ABC transporter
AA00U1A1S8	0.6404115	-0.6433772	0.5273785		1	8	8	53.8	Putative secreted protein
AA00U1A3N1	0.637631	-0.6492063	0.7041882		1	8	8	49.1	Probable sugar-transport integral membrane protein
AA00U1A197	0.6067402	-0.7208493	0.4938333		1	8	8	22.7	Putative transcriptional regulator, TetR family
AA00U0ZW29	0.591578	-0.7573596	0.0513261		1	8	8	34.0	Putative hydrolase, alpha-beta fold
AA00U1A0V1	0.5815082	-0.7821287	0.1825567		1	8	8	66.3	Mannosyltransferase vvaA
AA00U1A1U3	0.5712956	-0.8076905	0.1642423		1	8	8	37.7	Uncharacterized protein
AA00U0Z0M5	0.5665333	-0.8197671	0.2013371		1	8	8	43.2	Uncharacterized protein
AA00U0Z3Z0	0.5633255	-0.8279594	0.1327773		1	8	8	17.1	Single-stranded DNA-binding protein
AA00U1A1X1	0.5377925	-0.8948785	0.0279107		1	8	8	33.6	Pseudouridine synthase
AA00U1B0P3	0.5248165	-0.930115	0.2378297		1	8	8	37.5	Hypothetical MCE-family protein
AA00U1A2H3	0.522485	-0.936385	0.47399		1	8	8	13.6	Uncharacterized protein
AA00U1A0S1	0.5077381	-0.9778456	0.0532732		1	8	8	21.4	Uncharacterized protein
AA00U1A0F1	0.5062939	-0.9809829	0.0677768		1	8	8	16.1	Probable membrane protein, MmpS
AA00U1A0C0	0.4978637	-1.0061773	0.1827297		1	8	8	139.0	ATP-dependent helicase/dextrinase subunit B
AA00U1A0K0	0.464268	-1.1069702	0.4922793		1	8	8	89.8	Probable phosphoketolase
AA00U1AEZ5	0.4639676	-1.1079039	0.0341203		1	8	8	31.9	Uncharacterized protein
AA00U1A0M3	0.4561332	-1.1324729	0.4938333		1	8	8	65.4	ABC transporter, transmembrane region
AA00U1B0T1	0.4493854	-1.1539748	0.2218203		1	8	8	69.3	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain-containing protein SAO1/HSC_02979
AA00U1A1Z7	0.4077329	-1.2943058	0.0126321		1	8	8	42.0	Eflux transporter, RND family, MFP subunit
AA00U0Z0N6	0.3902729	-1.3574447	0.0126321		1	8	8	19.0	Putative lipoprotein LipC
AA00U0ZY17	0.3747976	-1.4158163	0.2469415		1	8	8	27.3	HTH-type transcriptional regulator
AA00U1A0D9	0.3624978	-1.4639558	0.0893864		1	8	8	64.7	Fibronectin-binding protein A-N-terminus (FbpA)
AA00U1A1C3	0.3025407	-1.7247991	0.2931233		1	8	8	21.7	Two-component system response regulator
AA00U1A0N3	1.6040163	0.6816888	0.2585021		1	7	7	35.4	Methylenetetrahydrofolate reductase
AA00U1A0K3	1.234988	0.1097569	0.8330575		1	7	7	45.2	Probable peptidase
AA00U1A1H4	1.190576	0.251589	0.8360519		1	7	7	29.3	Phosphomethylpyrimidine kinase
AA00U1A1E8	0.4793771	-1.0608874	0.238235		1	7	7	41.5	Putative lipase
AA00U1A0Y9	1.685964	0.7532591	0.8183341		1	6	14	20.6	Fimbrial isopeptide formation D2 domain
AA00U1A1V6	1.3823432	0.4671158	0.8411385		1	6	6	60.4	Putative 3-ketosteroid 1-dehydrogenase or fumarate reductase/succinate dehydrogenase
AA00U0ZYB5	1.2743253	0.3497336	0.9019967		1	6	6	15.4	Uncharacterized protein
AA00U1A0V9	0.801601	-0.3190438	0.8330575		1	6	6	16.4	4-Hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase
AA00U0Z0P8	0.6432711	-0.635387	0.8272281		1	6	6	76.9	Probable acyl-CoA dehydrogenase FadE
AA00U1B0Y0	0.557475	-0.8430146	0.2359601		1	6	6	46.6	Acyl-CoA dehydrogenase
AA00U0Z0G2	0.428444	-1.228215	0.2680524		1	6	6	73.3	Amine oxidase
AA00U1A0D0	0.379926	-1.3962096	0.1825567		1	6	6	27.6	Putative short-chain dehydrogenase/reductase
AA00U1B3W2	0.3425718	-1.545218	0.4664508		1	6	6	79.7	ABC-type amino acid transport system, periplasmic component
AA00U0ZW57	0.2194704	-2.1879017	0.0326167		1	6	6	15.4	Putative membrane protein, MmpS
AA00U0Z0V7	1.169381	0.2527292	0.939024		1	5	5	16.1	Uncharacterized protein
AA00U1A1V6	0.8134736	0.2973261	0.9417481		1	5	5	120.4	Chromosome partition ATPase protein
AA00U0Y1U5	0.7774957	-0.3630935	0.9088657		1	5	5	44.8	Glycogen synthase
AA00U1B0K2	0.4403966	-1.1831248	0.1822436		1	5	5	28.9	Putative transglutaminase-like protein
AA00U0Z0V2	0.1435321	-2.8005552	0.2637772		1	5	5	44.1	Putative Mee family protein
AA00U1A0H8	0.1152733	-3.1168695	0.4020695		1	5	5	9.8	PE family protein
AA00U1A0Z9	1.000	1.000			1				

In our Label-free protein quantification approach to build up both Tables S3 and S4, we used the Quantification grouping XIC extraction, and the option Matching between runs from MaxQuant, which is an option forcing the match between runs. The information of the runs regarding the identifications from one run will be used to screen another run looking for peptide peaks closely located in the same retention time range. Match between runs is used to boost number of identifications, meaning for peptides, which are present in several samples, but not identified via the MS/MS data search in all of them, can still be identified via matching between runs. In the case of EccB<sub>4</sub>, which was not identified in the LC-MS/MS search of the  $\Delta$ -eccB<sub>4</sub> sample, the option match between runs could extract in the 4 replicates only one peptide (and not the same one) in 3 of the 4 replicates. In our MS criteria, 1 peptide is not enough to identify a protein but with this option we could have quantifications and not only absent/present values.

**Table S5. Primers used in RT-qPCR.**

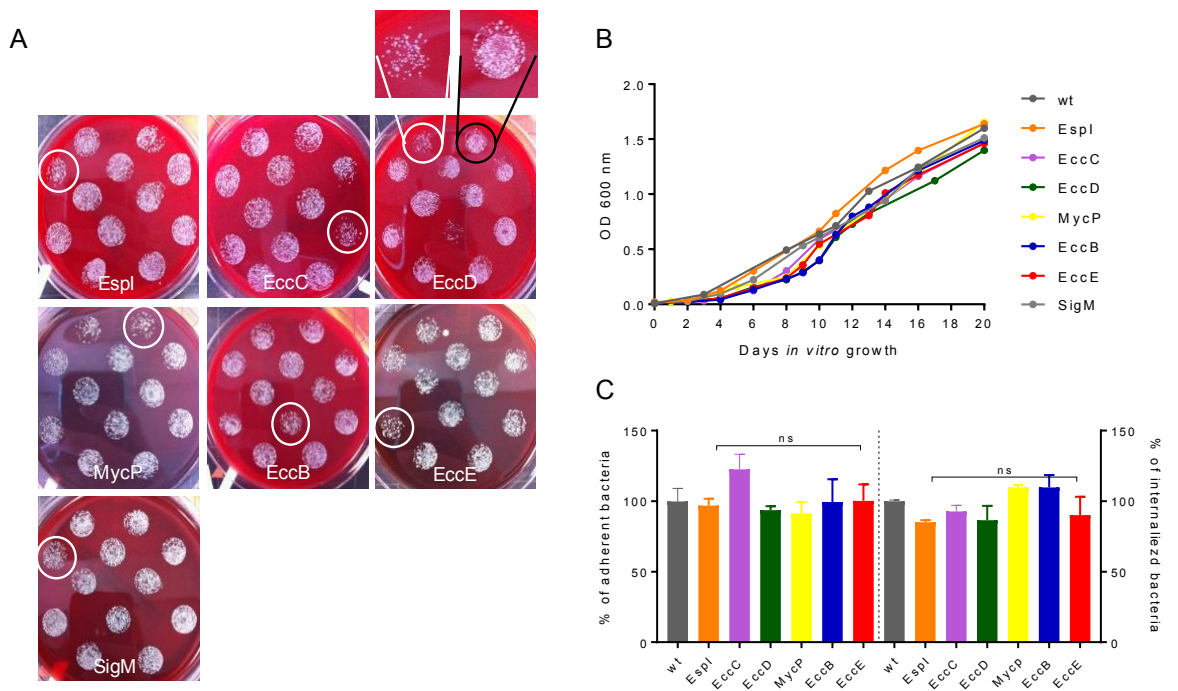
<i>sigA F</i>		TCCGAGAAAGACAAGGCTTC
<i>sigA R</i>		CCAGCTCGACTTCCTCTTCG
<i>MYCMA 05485 F</i>	<i>esx</i>	GTCCCGTCTCGCGCCCTGTG
<i>MYCMA 05485 R</i>	<i>esx</i>	ACCGCACCGTCAACGTCGCA
<i>MYCMA 2064 F</i>	<i>eccC<sub>4</sub></i>	GCCATCGGTGTGCCGGATGC
<i>MYCMA 2064 R</i>	<i>eccC<sub>4</sub></i>	CACCACTTCGGCGGGTCGCA
<i>MYCMA 2065 F</i>	<i>eccD<sub>4</sub></i>	AACGGCGGAAAAGCCACGG
<i>MYCMA 2065 R</i>	<i>eccD<sub>4</sub></i>	GGGTGCCTCGGTCTGCGGG
<i>MYCMA 2066 F</i>	<i>mycP<sub>4</sub></i>	GTCGTCGTGGTGGTGGCAGC
<i>MYCMA 2066 R</i>	<i>mycP<sub>4</sub></i>	GCCGCCGAGACTGAATTTGGACG



**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 MΦ.**

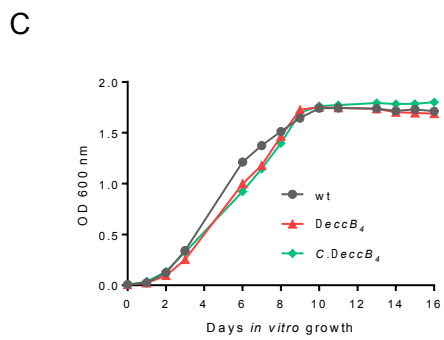
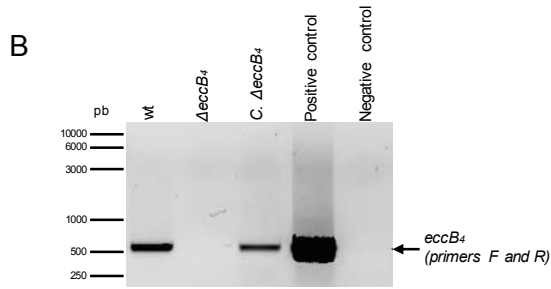
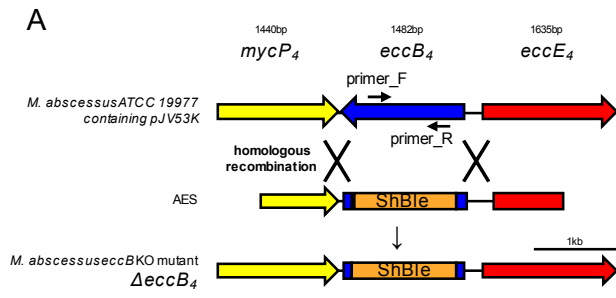
(A) Examples of mutants identified are highlighted with a white circle and are named according to the plate number and location in the 96-well plates of the original library. For comparison a non-selected mutant is shown with a black circle. (B) The *in vitro* growth of the selected mutants with a reduced 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 MΦ 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 that had adhered to the MΦ were enumerated by CFU counting. Internalization assay (right): J774.2 MΦ cells were infected with the different mycobacterial strains during 1 hr 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 ± SD that are representative data of three independent experiments. Statistical analysis: Unpaired *t* test using GraphPad prism program, ns non-significant.

Fig.S1



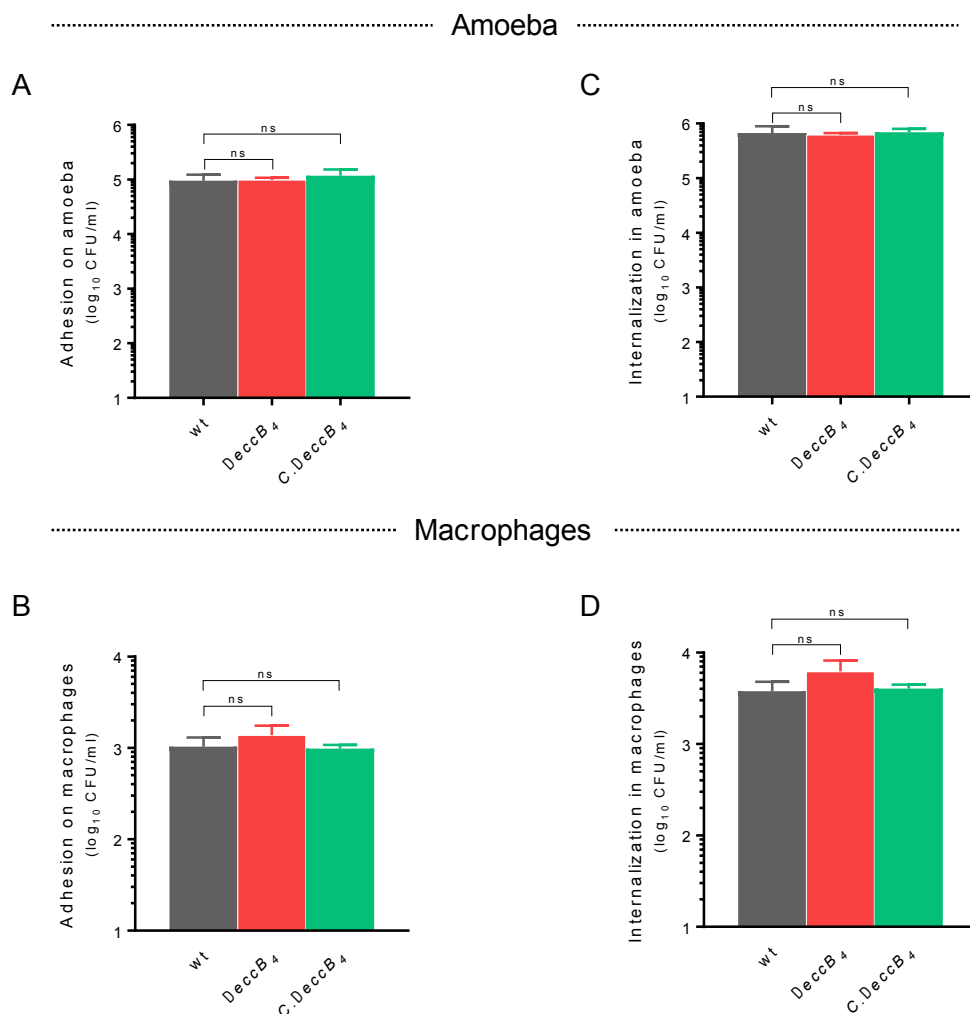
**Fig. S2. Construction of the *M. abscessus* KO mutant strain  $\Delta eccB_4$  by homologous recombination.** (A) *M. abscessus*  $\Delta eccB_4$  KO mutant was constructed by first preparing the Allelic Exchange Substrate (AES) fragment, which contains an antibiotic resistance cassette (the zeocin resistance gene *ble* of *Streptoalloteichus hindustanus*) flanked by 1,000 bp of the DNA upstream and downstream of the target gene *eccB<sub>4</sub>*. 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<sub>4</sub>* by homologous recombination. Primers are identified by arrows (primers F and R). (C) *In vitro* growth curves estimated by spectrophotometry (OD 600<sub>nm</sub>) of *M. abscessus* MabsCIP (wt),  $\Delta eccB_4$ , and *C.ΔeccB<sub>4</sub>* strains.

Fig.S2



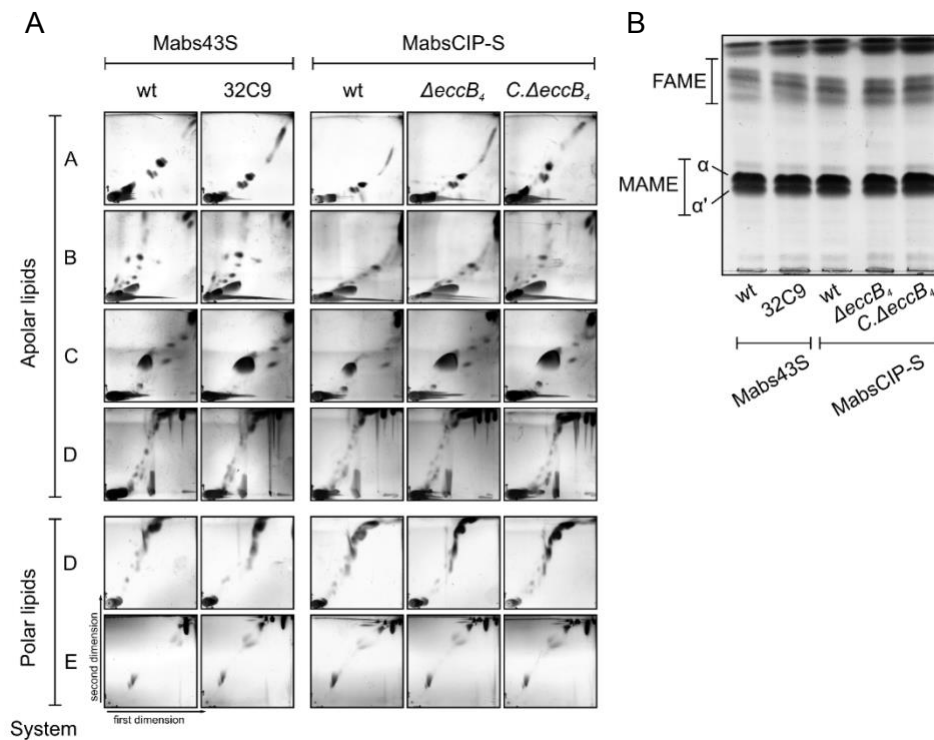
**Fig. S3. Evaluation of mycobacterial adhesion and internalization on amoeba (A, C) or MΦ (B, D).** (A, B) The different mycobacterial strains wild-type (wt),  $\Delta eccB_4$  and  $C.\Delta eccB_4$  were added to a 24-wells plate containing *A. castellanii* amoeba or J774.2 MΦ cells. The plate was 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 amoeba or MΦ were enumerated evaluating CFU. (C, D) *A. castellanii* amoeba or J774.2 MΦ cells were infected with wild-type (wt),  $\Delta eccB_4$  and  $C.\Delta eccB_4$  during 1 h 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.S3



**Fig S4. Systematic thin layer liquid chromatographic (TLC) analysis reveal no changes in cell wall lipid compositions between *M. abscessus*  $\Delta eccB_4$  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.

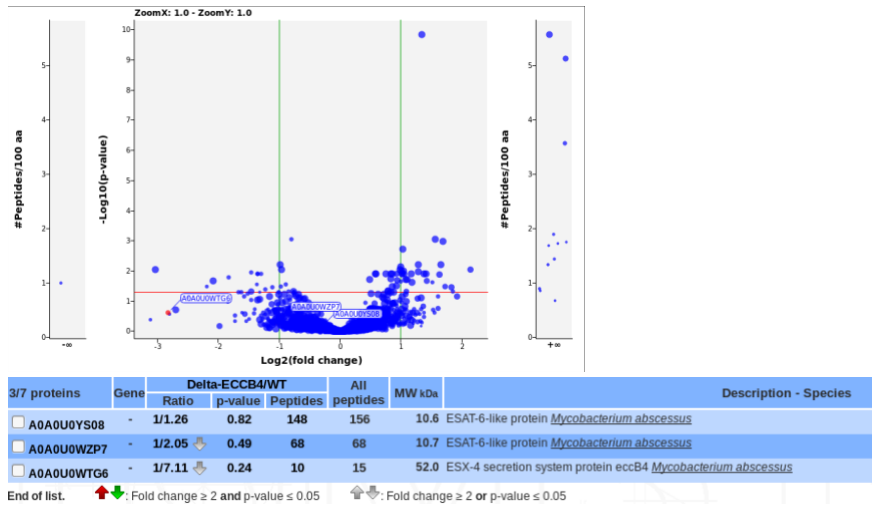
Fig.S4



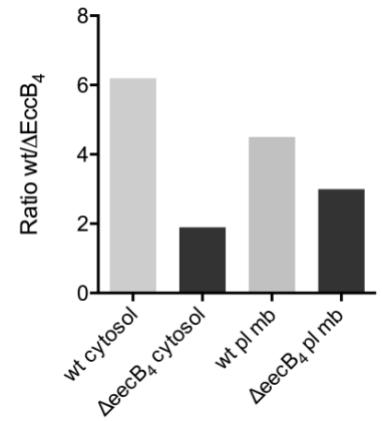
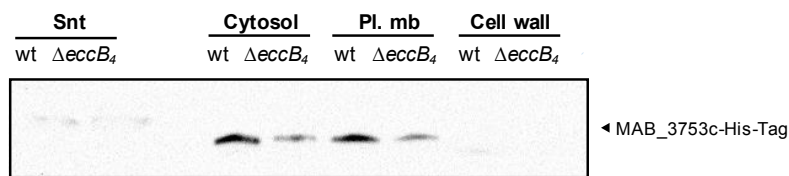
**Fig S5. EccB<sub>4</sub>-dependant secretome** (A) Proteomic analysis of concentrated supernatants from wild-type (wt) and  $\Delta eccB_4$  mutants. The figure represents the volcano plots for finding significant and not significant proteins using *t* test. The below table represents the results concerning EccB<sub>4</sub>, EsxT and EsxU (referred as ESAT-6 like proteins). A fold-change  $\geq 2$  was found for EccB<sub>4</sub> and EsxT although the fold change was considered non significant. (B) Left: His-EsxT (*Mab\_3753c*) detection using a Histidine Tag antibody in different bacterial compartments: cytosol, plama membrane (Pl. mb) and cell wall, and in the supernatant (Snt) of wild-type (wt),  $\Delta eccB_4$  mutant. Right: quantification of His-Esx-T band intensity (ImageJ software). (C) Red Ponceau stain of the different bacterial compartments (as in B).

Fig. S5

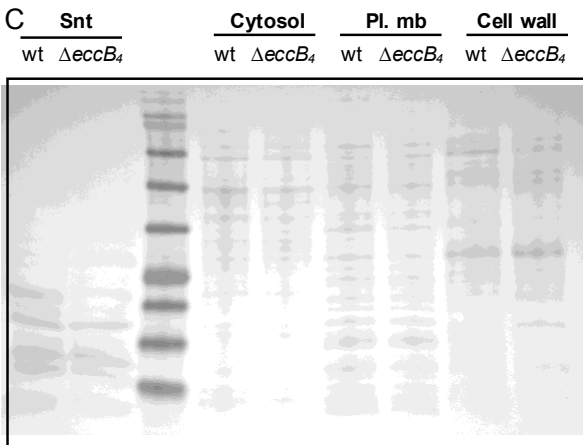
A



B



C







**The most ancestral mycobacterial ESX-4 secretion system is essential and conserved for intracellular growth of *Mycobacterium abscessus* in environmental and human phagocytes**

Fabienne Girard-Misguich, Laura Laencina, Violaine Dubois, Vincent Le Moigne, Laurent Kremer, Laleh Maljessi, Roland Brosch, Jean-Louis Herrmann





## RÉFÉRENCES

- Mahlapu M, Håkansson J, Ringstad L, et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol* 2016 ; 6 : 194.
- Engler AC, Tan JP, Ong ZY, et al. Antimicrobial polycarbonates: investigating the impact of balancing charge and hydrophobicity using a same-centered polymer approach. *Biomacromolecules* 2013 ; 14 : 4331-9.
- Wender PA, Gallier WC, Goun EA, et al. Design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 ; 60 : 452-72
- Chindera K, Mahato M, Sharma AK et al. The antimicrobial polymer PMHB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 23121.
- Medina E. Murine model of polymicrobial septic peritonitis using cecal ligation and puncture (CLP). *Meth Mol Biol* 2010 ; 602 : 411-15.
- Carcone A, Page A, Gilbert C. Le phage KTN4, un candidat prometteur dans la lutte contre les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa* ? *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 869.

## NOUVELLE

### ESX-4, un système de sécrétion mycobactérien ancestral, essentiel pour la croissance de *Mycobacterium abscessus* dans les phagocytes environnementaux et humains

Fabienne Girard-Misguich<sup>1</sup>, Laura Laencina<sup>1</sup>, Violaine Dubois<sup>1</sup>, Vincent Le Moigne<sup>1</sup>, Laurent Kremer<sup>2,3</sup>, Laleh Maljessi<sup>4</sup>, Roland Brosch<sup>4</sup>, Jean-Louis Herrmann<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, Inserm UMR1173, 78000 Versailles, France.

<sup>2</sup>Institut de recherche en infectiologie de Montpellier, Université de Montpellier, CNRS UMR 9004, 34293 Montpellier, France.

<sup>3</sup>Inserm, institut de recherche en infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France.

<sup>4</sup>Unité de pathogénomique mycobactérienne, institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

<sup>5</sup>Hôpitaux universitaires Île de France Ouest, Ambroise Paré, Boulogne et Raymond Poincaré, 92380 Garches, France.

[fabienne.misguich@uvsq.fr](mailto:fabienne.misguich@uvsq.fr)

#### *Mycobacterium abscessus*, un pathogène majeur chez les patients atteints de la mucoviscidose

*Mycobacterium abscessus* est une mycobactérie pathogène opportuniste, à croissance rapide (RGM), responsable d'infections cutanéomuqueuses et pulmonaires. Ces dernières sont particulièrement sévères chez les patients atteints de mucoviscidose [1]. Les études épidémiologiques ont révélé la persistance de *M. abscessus* chez l'hôte infecté, parfois pendant plusieurs années [2]. Plus que d'autres infections par des bactéries pathogènes retrouvées chez les personnes atteintes de mucoviscidose, les infections pulmonaires à *M. abscessus* altèrent la fonction ventilatoire, entraînant une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez ces patients. L'origine de l'infection par *M. abscessus* reste à déterminer. Une étude britannique récente, fondée sur la recherche de mutations spécifiques dans les souches de *M. abscessus* circulant en Grande-Bretagne, suggère soit une contamination

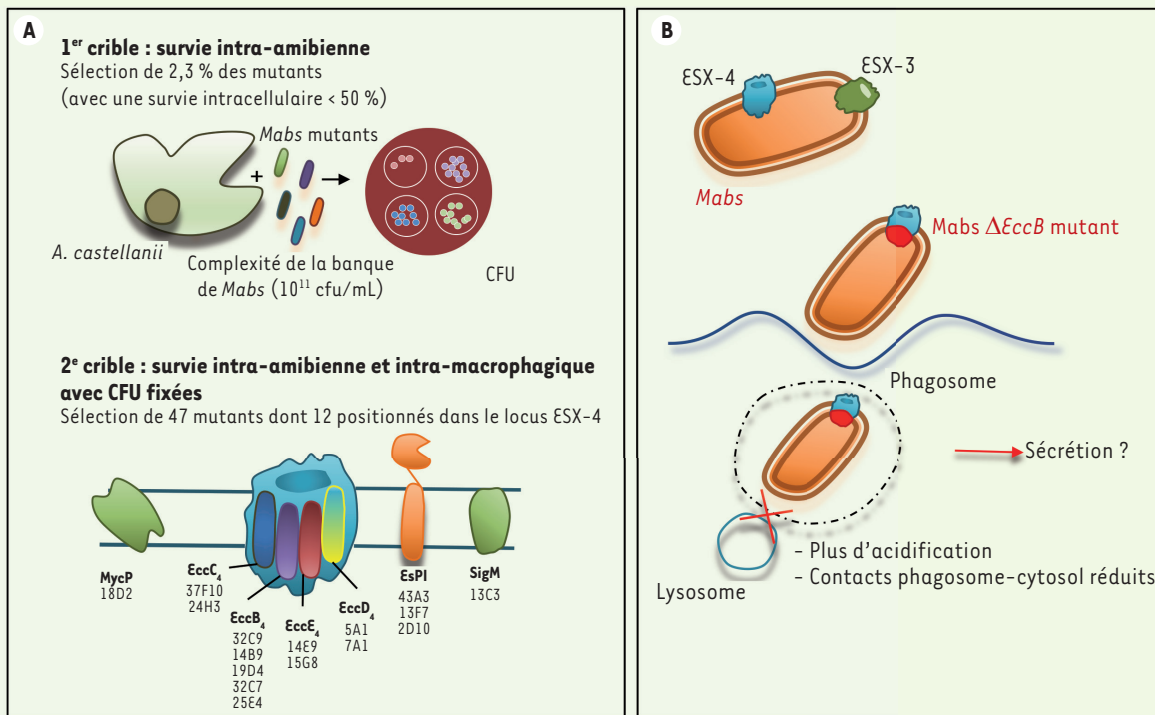
entre patients, soit une contamination par l'environnement proche du patient [3]. Le réservoir environnemental de *M. abscessus* reste encore mal défini [4]. Les études génomiques, par séquençage du génome total, montrent la présence de gènes non-mycobactériens acquis par transfert horizontal au sein du génome de *M. abscessus*, ainsi que la présence de gènes de résistance pour la survie intracellulaire de la bactérie. D'autres études suggèrent que ces échanges génétiques horizontaux se réaliseraient dans un écosystème commun, notamment à l'interface sol/eau où les amibes environnementales sont présentes. Ces amibes représentent un hôte eucaryote unicellulaire naturel et un réservoir pour de nombreuses bactéries pathogènes, telles que *Legionella*, *Chlamydia* et *Pseudomonas*, et probablement aussi pour certaines espèces mycobactériennes, comme *M. abscessus*, qui peuvent ainsi survivre dans l'environnement. Des résultats publiés par notre équipe montrent que *M. abscessus* est capable

de se multiplier au sein d'amibes. Une co-culture d'amibes et de *M. abscessus* avant infection chez l'animal, augmente la virulence de la mycobactérie [5], comme cela avait déjà été démontré pour une autre mycobactérie, *Mycobacterium avium* [6]. Au cours du processus infectieux, les amibes peuvent ainsi contribuer à forger la virulence des mycobactéries pour s'adapter face à la réponse immunitaire.

Chez l'homme, une différence clé entre les mycobactéries non pathogènes et pathogènes, comme le bacille de la tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*, est la capacité des mycobactéries pathogènes à survivre et à se répliquer dans les macrophages et les cellules dendritiques en bloquant la maturation des phagosomes [7].

Nous avons démontré récemment que *M. abscessus* possède également ces propriétés de survie intracellulaire [8] (→). La coexistence de *M. abscessus* avec les

(→) Voir la Nouvelle de A. Bernut et al. *m/s* n° 5, mai 2014, page 499



**Figure 1.** Le système de sécrétion de type VII (ESX-4) impliqué dans la virulence de *Mycobacterium abscessus*. **A.** Crible de survie intracellulaire chez l'amibe de 6 000 mutants de la banque de *M. abscessus* lors d'une co-culture en présence de l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. La survie intracellulaire des mutants est évaluée par comptage des CFU (*colony-forming unit*) ; 136 mutants défectueux pour leur croissance intracellulaire (soit 2,3 % de la banque) ont été identifiés. Un second crible de survie intracellulaire, chez l'amibe et en présence de macrophages, a ensuite permis de confirmer l'atténuation de 47 mutants dont 12 portant des mutations localisées (y compris des doublons) dans le locus *esx-4* du système de sécrétion de type VII (SST7). Parmi ces 12 mutants, 9 présentent une insertion dans les gènes *eccC*<sub>4</sub> (*esx-conserved component* : 2 mutants-souches 37F10 et 24H3), *eccD*<sub>4</sub> (2 mutants-5A1 ; 7A1), *MycP*<sub>4</sub> (*mycosin-1 protease* : 18D4), *eccB*<sub>4</sub> (5 mutants-32C9 ; 14B9 ; 19D4 ; 32C7 ; 25E4), *eccE*<sub>4</sub> (2 mutants 14E9 ; 15G8) et du locus *esx-4*. Trois mutants supplémentaires présentent des mutations localisées dans le gène *espi* (*esx-1 secretion-associated protein* : 43A3 ; 13F7 ; 2D10) impliqués dans la régulation d'ESX-1 chez *M. tuberculosis*, et 1 mutant supplémentaire dans le gène *sigM* (*sigma factor gene* : 13C3). **B.** L'analyse du génome de *M. abscessus* indique la présence de 2 systèmes de sécrétion, ESX-3 et ESX-4. Un mutant obtenu par double recombinaison homologue du gène *eccB*<sub>4</sub> a permis de confirmer, par des expériences de co-cultures entre ce mutant (*Mabs*- $\Delta$ *EccB*) et des macrophages humains, que ce gène, et par conséquent le système de sécrétion ESX-4, sont impliqués dans la survie intracellulaire, le blocage de l'acidification phagosomale, et favorisent les contacts entre la bactérie et le cytosol. Le sécrétome de ce mutant versus celui de la souche parentale est actuellement en cours d'étude afin d'identifier les substrats de cette machinerie de sécrétion.

amibes semble ainsi avoir contribué à façonner la virulence des mycobactéries non tuberculeuses chez l'homme. L'un des acteurs de cette survie intracellulaire est représenté par le système de sécrétion de protéines, dit de type VII (SST7).

### Le système de sécrétion de type VII (ESX-4) impliqué dans la virulence de *M. abscessus*

Cinq locus SST7 sont retrouvés chez les mycobactéries pathogènes, désignés

*esx-1* à 5 [9]. L'ancêtre commun est *esx-4*, à partir duquel dériverait *esx-1*, dont les gènes codent les éléments de l'appareil de sécrétion ESX-1, indispensable à la virulence et la survie intracellulaire de *M. tuberculosis*. *M. abscessus* ne possède que 2 locus *esx* : *esx-3* et *esx-4*. Aucun rôle n'était à ce jour connu pour un éventuel système de sécrétion ESX-4. Nous avons démontré qu'il jouait un rôle similaire à ESX-1, dans la survie intracellulaire et la virulence de *M. abscessus* [10].

Partant de l'hypothèse que *M. abscessus* possédait l'arsenal génétique nécessaire pour survivre au sein d'amibes, nous avons criblé 6 000 mutants obtenus par transposition, en utilisant un test de survie intracellulaire chez l'amibe environnementale axénisée<sup>1</sup> *Acanthamoeba castellanii* (Figure 1A). Quarante-sept mutants de *M. abscessus*, présentant un taux de survie inférieur à 50 % par rapport à la souche parentale à l'intérieur

<sup>1</sup> Exemple d'autres germes.



d'amibes ou de macrophages, ont été retenus. Le séquençage du site d'insertion du transposon pour chaque mutant a permis d'identifier plusieurs mutants possédant une insertion au sein de cinq gènes (*eccC<sub>4</sub>* [*esx-conserved component C4*], *eccD<sub>4</sub>*, *mycP<sub>4</sub>* [*mycosin-1 protease*], *eccB<sub>4</sub>*, et *eccE<sub>4</sub>*) appartenant au locus *esx-4*. Pour confirmer les résultats du crible et comprendre la contribution d'*ESX-4* à la croissance et à la survie intracellulaire de *M. abscessus* chez les amibes et dans les macrophages, nous avons construit un mutant de délétion d'*eccB<sub>4</sub>*, qui code un élément structural de base du système *ESX-4*. La croissance intracellulaire de ce mutant s'est avérée atténuée chez les amibes et dans les macrophages (Figure 1B). La diminution de la survie intracellulaire du mutant est liée à son incapacité à bloquer l'acidification du phagosome, mais surtout à la diminution du contact entre le phagosome et le cytosol, tel qu'il est observé pour la souche parentale. Ces caractéristiques montrent donc la capacité unique de *M. abscessus*, en tant que mycobactérie pathogène opportuniste, à se répliquer à l'intérieur des phagocytes professionnels, contournant ainsi certaines réponses antibactériennes de l'hôte.

Le locus *esx-4* de *M. abscessus* comprend un gène supplémentaire, *eccE<sub>4</sub>*, qui est absent de tous les autres locus *esx-4*

retrouvés chez les mycobactéries pathogènes. Sa présence pourrait expliquer la fonctionnalité du système *ESX-4* chez *M. abscessus*, à l'instar du système *ESX-1* chez *M. tuberculosis*.

Au cours de la dernière décennie, les *SST7* sont apparus comme essentiels pour la virulence des mycobactéries et, parmi eux, notamment le système *ESX-1* absent chez *M. abscessus*. Nous montrons par cette étude le rôle biologique inattendu et authentique du système *ESX-4* dans la virulence de *M. abscessus*. Nos observations montrent donc que *M. abscessus* est bien équipé d'un arsenal génétique acquis au cours de l'évolution pour survivre dans les amibes de l'environnement. Ce même arsenal génétique aiderait *M. abscessus* à provoquer une infection chez l'homme. Les substrats sécrétés par *ESX-1* de *M. tuberculosis* comprennent *ESAT-6* (6-kDa early secreted antigenic target) et *CFP-10* (10-kDa culture filtrate protein) et plusieurs autres protéines. Ces dernières sont des acteurs clés dans l'interaction de la mycobactérie avec les cellules immunitaires de l'hôte. Les substrats d'*ESX-4* présents chez *M. abscessus* sont donc à identifier dans le futur. ♦

**The most ancestral mycobacterial ESX-4 secretion system is essential for intracellular growth of *Mycobacterium abscessus* within environmental and human phagocytes**

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Qvist T, Taylor-Robinson D, Waldmann E, et al. Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2016 ; 15 : 380-5.
2. Cullen AR, Cannon CL, Mark EJ, et al. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 161 : 641-5.
3. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2013 ; 381 : 1551-60.
4. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 2009 ; 4 : e5660.
5. Bakala N'Goma JC, Moigne V Le, Soismier N, et al. *Mycobacterium abscessus* phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances *M. abscessus* virulence in mice. *Infect Immun* 2015 ; 83 : 780-91.
6. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, et al. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 1997 ; 65 : 3759-67.
7. Bernut A, Herrmann JL, Lutfalla G, et al. Les cordes mycobactériennes : un nouveau moyen d'échappement au système immunitaire ? *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 499-522.
8. Roux A-L, Vijjoen A, Bah A, et al. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* 2016 ; 6 : 160185.
9. Groschel MI, Sayes F, Simeone R, et al. *ESX* secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol* 2016 ; 14 : 677-91.
10. Laencina L, Dubois V, Moigne V Le, et al. Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the *ESX-4* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; 115 : E1002-11.

## Bon de commande

À retourner à EDP Sciences, 17, avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis, France  
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC**

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

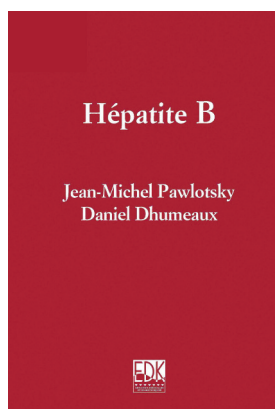
Par carte bancaire :  Visa  Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages



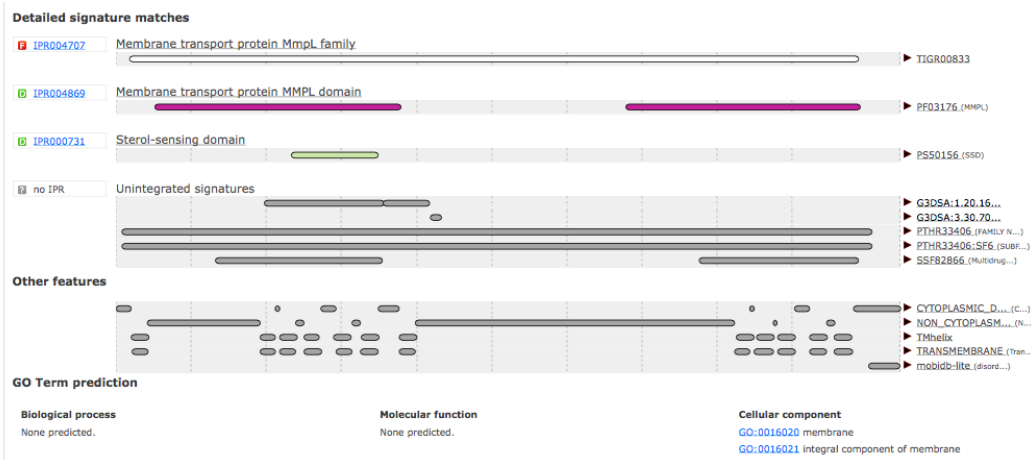
**Analyse IP5 de la protéine MmpL8<sub>MAB</sub> et des protéines MmpL-8, -10 et -12  
de *M. tuberculosis***

8

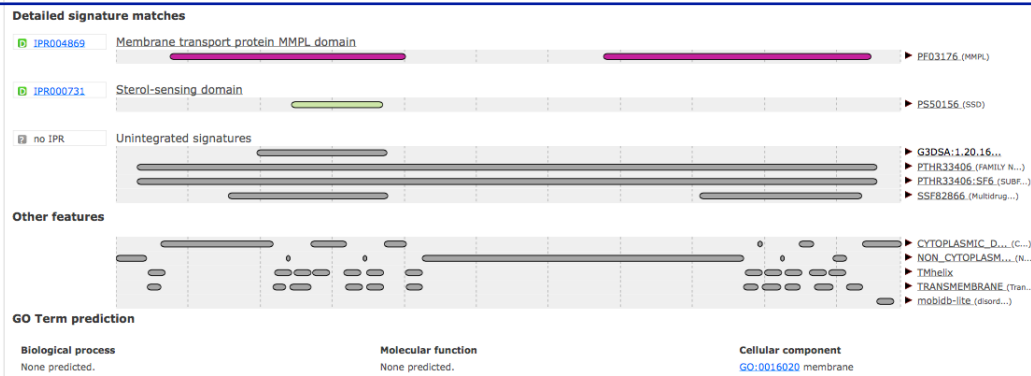




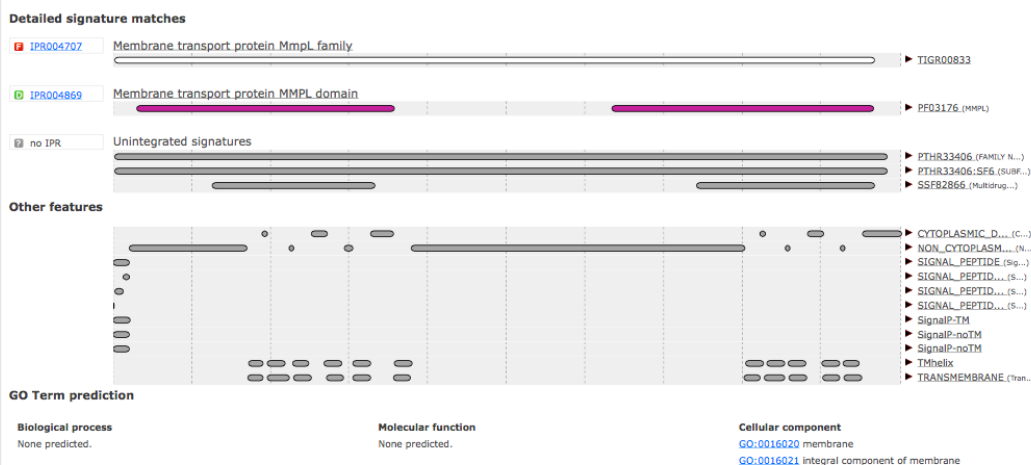
## MmpL8<sub>MAB</sub>



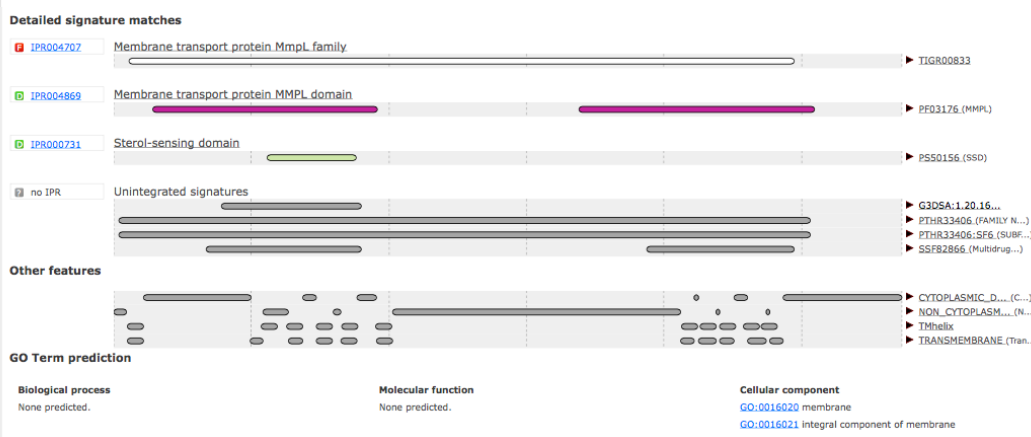
## MmpL8<sub>MTB</sub>



## MmpL10<sub>MTB</sub>



## MmpL12<sub>MTB</sub>



**Figure 44 | Analyse de motif protéique avec IP5 des protéines MmpL8<sub>MAB</sub> de *M. abscessus* et des protéines MmpL8<sub>MTB</sub>, MmpL10<sub>MTB</sub> et MmpL12<sub>MTB</sub> de *M. tuberculosis*.**

Les séquences d'acides aminés des protéines ont été soumises à IP5 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). IPR: InterPro.



**Conservation du locus *mmpL*<sub>MAB</sub> chez les mycobactéries**

9

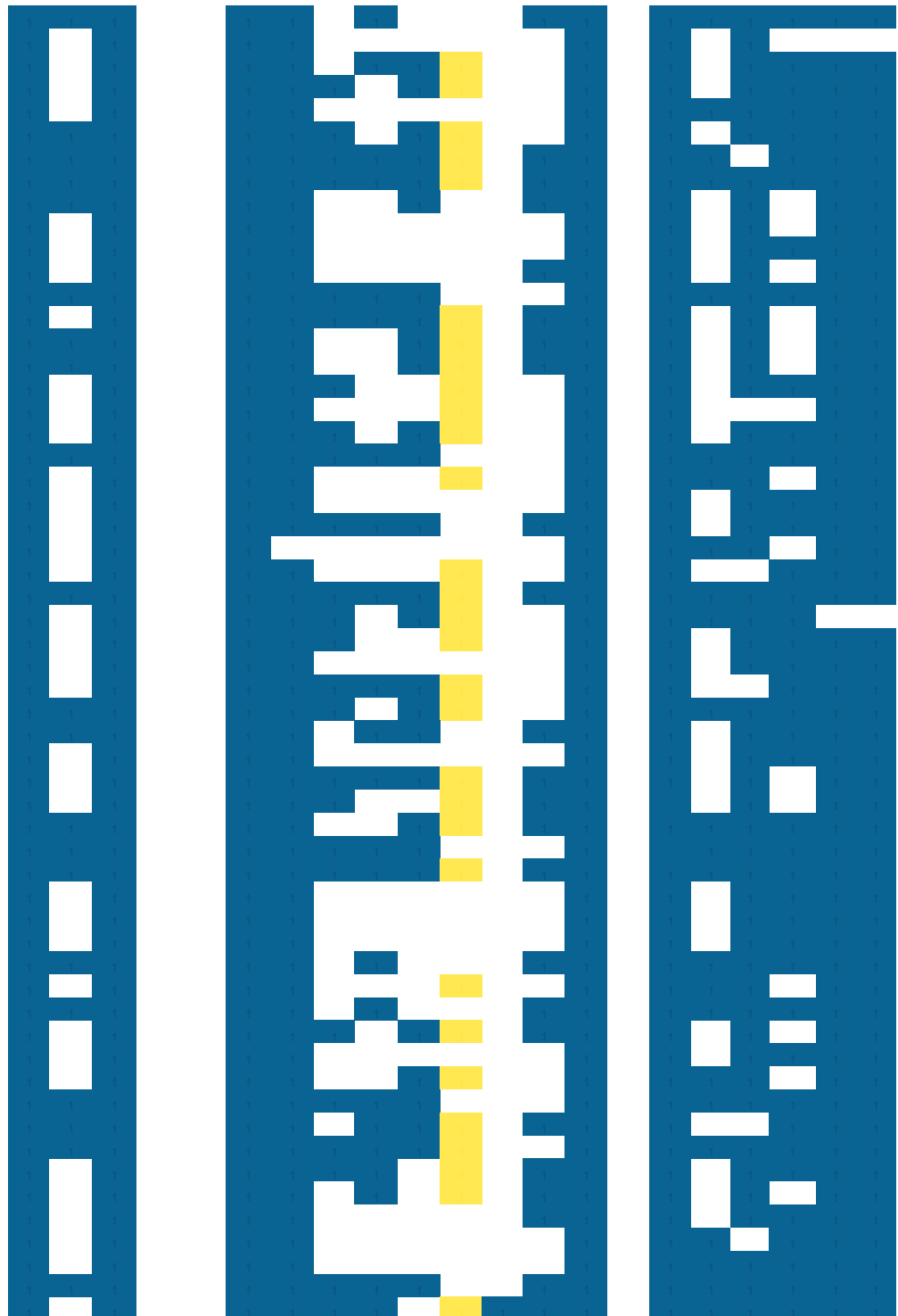


**Mycobacteroides**

*M. chelonae*  
*M. immunogenum*  
*M. franklinii*  
*M. saopaulense*  
*M. salmoniphilum*

**Mycocilicibacterium**

*M. fortuitum*  
*M. acapulense*  
*M. aromaticocivirans*  
*M. aurum*  
*M. austroafricanum*  
*M. bacteremicum*  
*M. boenickei*  
*M. brisbanense*  
*M. canariasense*  
*M. celeriflavum*  
*M. chlorophenicum*  
*M. chubuense*  
*M. conceptionense*  
*M. confluentis*  
*M. cosmeticum*  
*M. diernhoferi*  
*M. doricum*  
*M. elephantis*  
*M. fallax*  
*M. farcinogenes*  
*M. flasvescens*  
*M. gilvum*  
*M. goodi*  
*M. hassiacum*  
*M. holsaticum*  
*M. houstonense*  
*M. insubricum*  
*M. iranicum*  
*M. komanii*  
*M. litorale*  
*M. latzerense*  
*M. mageritense*  
*M. malmesburyense*  
*M. monacense*  
*M. moriokaense*  
*M. mucogenicum*  
*M. neoaurum*  
*M. neworleansense*  
*M. novocastrense*  
*M. obuense*  
*M. parafortuitum*  
*M. peregrinum*  
*M. phlei*  
*M. porcinum*  
*M. rhodeisae*  
*M. rufum*  
*M. rutilum*  
*M. senegalense*  
*M. septicum*  
*M. setense*  
*M. smegmatis*  
*M. thermoresistibile*  
*M. tusciae*  
*M. vaccae*  
*M. vanbaalenii*  
*M. vulneris*  
*M. wolinskyi*



**Figure 45 | Conservation du locus  $mmpL8_{MAB}$  ( $MAB_{0855}$ ) chez les mycobactéries à croissance rapide.** Les orthologues putatifs des gènes  $MAB_{0845}$ - $MAB_{0865}$  ont été identifiés par recherche du meilleur hit bijectif (BBH) de chaque gène chez les génomes cibles à l'aide du programme OpSCAN. La présence de BBH est signalée par un rectangle bleu à l'exception des BBH obtenues pour le gène  $MAB_{0855}$  représentées en jaune.

**Mycobilacter**

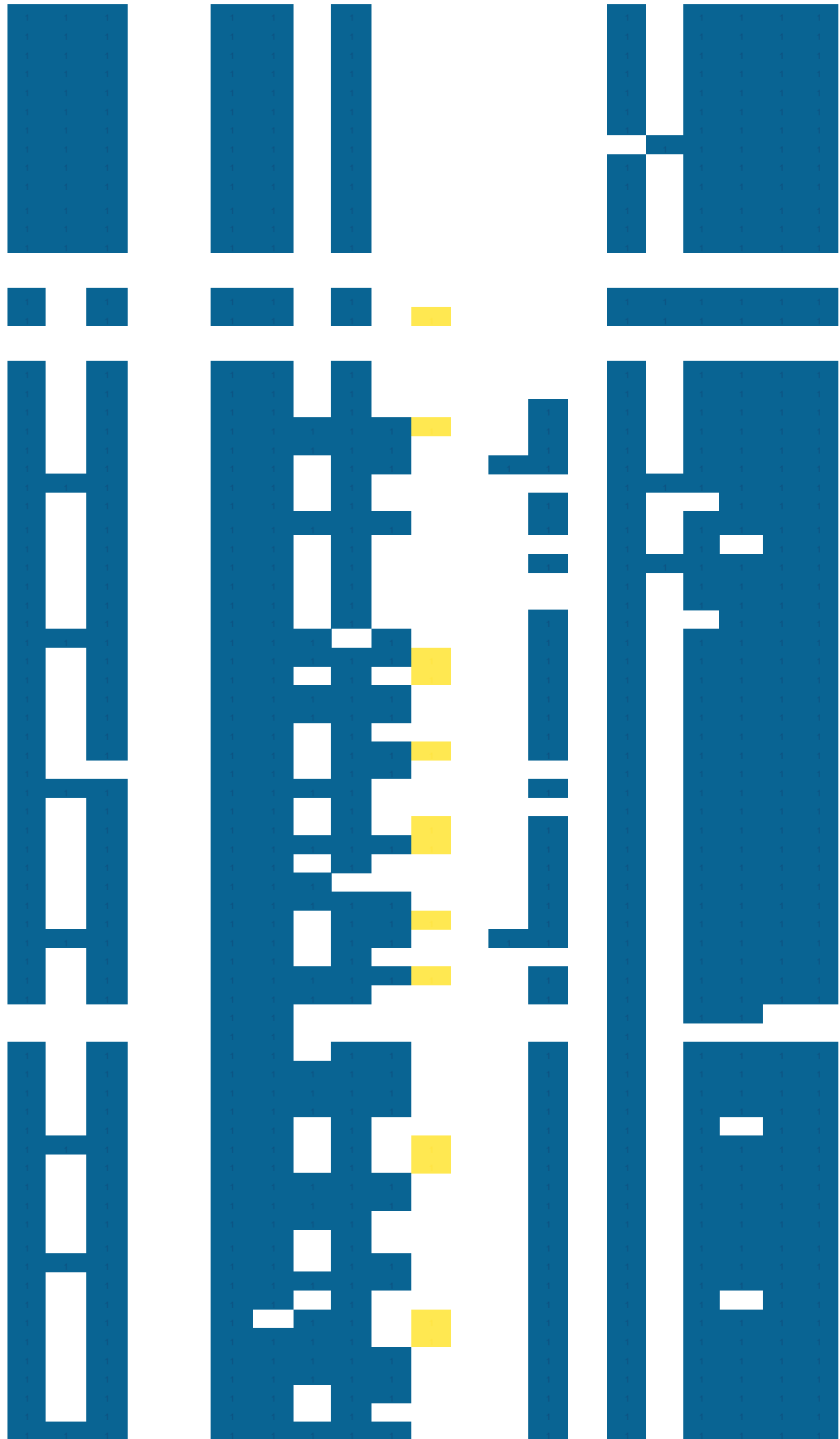
*M. terrae*  
*M. algericus*  
*M. arupensis*  
*M. engbaekii*  
*M. heraklionensis*  
*M. hiberniae*  
*M. icosiummassiliensis*  
*M. kumamotoensis*  
*M. longobardus*  
*M. minnesotensis*  
*M. nonchromogenicus*  
*M. senuensis*  
*M. sinensis*

**Mycobilacillus**

*M. trivialis*  
*M. koreensis*

**Mycobacterium**

*M. tuberculosis*  
*M. africanum*  
*M. abscessus*  
*M. angelicum*  
*M. arsiense*  
*M. asiaticum*  
*M. avium*  
*M. bohemicum*  
*M. bouchodurhonense*  
*M. bovis*  
*M. branderi*  
*M. canettii*  
*M. caprae*  
*M. celatum*  
*M. chimaera*  
*M. colombiense*  
*M. conspicuum*  
*M. europaeum*  
*M. florentinum*  
*M. fragae*  
*M. gastri*  
*M. genavense*  
*M. gordonae*  
*M. haemophilum*  
*M. heckeshornense*  
*M. heidelbergense*  
*M. interjectum*  
*M. intermedium*  
*M. intracellulare*  
*M. kansasii*  
*M. kubicae*  
*M. kyurinense*  
*M. lacus*  
*M. lentiflavum*  
*M. leprae*  
*M. lepromatosis*  
*M. malmoense*  
*M. mantenii*  
*M. marinum*  
*M. marseillense*  
*M. microti*  
*M. nebraskense*  
*M. noviomagense*  
*M. palustre*  
*M. paraense*  
*M. riyadhense*  
*M. saskatchewanense*  
*M. scrofulaceum*  
*M. sherrisii*  
*M. shimoidei*  
*M. shinjukuense*  
*M. szulgai*  
*M. timonense*  
*M. triplex*  
*M. ulcerans*  
*M. xenopi*  
*M. yongonense*



**Figure 46 | Conservation du locus *mmpL8*<sub>MAB</sub> (*MAB\_0855*) chez les mycobactéries à croissance lente.** Les orthologues putatifs des gènes *MAB\_0845*-*MAB\_0865* ont été identifiés par recherche du meilleur hit bijectif (BBH) de chaque gène chez les génomes cibles à l'aide du programme OpSCAN. La présence de BBH est signalée par un rectangle bleu à l'exception des BBH obtenues pour le gène *MAB\_0855* représentées en jaune.





**Titre :** Adaptations comparées de *Mycobacterium abscessus* à la phagocytose amibienne et macrophagique : recherche de gènes de virulence par des approches globales

**Mots clés :** *Mycobacterium abscessus*, amibe, macrophage, transcriptome intracellulaire

**Résumé :** La mycobactérie à croissance rapide *Mycobacterium abscessus* est un pathogène opportuniste de l'homme, particulièrement des poumons, capable de se multiplier au sein de macrophages (MΦ) mais aussi d'amibes environnementales. Nous avons pu montrer que l'environnement amibien est propice à l'adaptation de *M. abscessus* à cette survie intra-macrophagique. Par des analyses transcriptomiques comparant les adaptations de *M. abscessus* au sein d'amibes ou de MΦ, nous observons des enrichissements de voies biologiques démontrant des adaptations au stress oxydatif et des adaptations métaboliques telle que la bêta-oxydation des lipides et l'assimilation des sulfates. Ces adaptations ont également été observées chez *Mycobacterium tuberculosis*, mycobactérie pathogène pulmonaire stricte de l'homme responsable de la tuberculose. Parmi les gènes induits par *M. abscessus* au sein des amibes figurent des gènes impliqués dans le transport de polyamines, la biosynthèse du MoCo (molybdoptéridin cofacteur) ainsi que l'assemblage des centres fer-soufre (Fe-S). L'induction de tels gènes, décrits comme des facteurs de virulence chez certaines bactéries intracellulaires, contribuerait à la virulence de *M. abscessus* en permettant sa survie intra-macrophagique. Quarante-cinq gènes ont été identifiés comme fortement induits en amibes chez *M. abscessus*. *Mycobacterium chelonae*, appartenant au même complexe génomique que *M. abscessus* et responsable exclusivement d'infections cutanées, ne présente pas de telles inductions après analyse de son transcriptome intracellulaire, ce qui pourrait expliquer son absence de survie en MΦ. Cinq opérons recouvrant 10 gènes ont été délétés au sein du génome de *M. abscessus* par recombinaison homologe. Ces gènes sont requis pour la survie de *M. abscessus* en amibes et en MΦ. La surexpression chez *M. chelonae* de deux de ces gènes, *MAB\_1517c* et *MAB\_2649*, codant respectivement une protéine TcmP (tetracenomycine polyketide synthase O-méthyltransférase) et une MmpS (mycobactérielle membrane protein small), a conféré

une survie intra-macrophagique à *M. chelonae*, suggérant que l'induction de ces gènes en amibes favorise la survie intracellulaire de *M. abscessus* en MΦ. Enfin, l'analyse du transcriptome de *M. abscessus* en MΦ révèle des adaptations propres à la vie intra-macrophagique. Différents gènes particulièrement induits sont impliqués dans le métabolisme de la proline, la sécrétion de protéines par le système de sécrétion de type II ou appartiennent la voie MEP (méthylérythritol phosphate), des voies biologiques contribuant à la virulence de pathogènes. De plus, parmi les gènes induits, certains correspondent à des activités de N-acétylation, d'oxydoréduction, de liaison à l'oxygène ou de détoxification de l'oxyde nitrique par des dioxygénases qui sont enrichies. Comparé à 5 autres opérons délétés, sélectionnés selon leur niveau d'induction et leur activité biologique, le gène *eis2* (*MAB\_4532c*), codant une N-acétyltransférase, est essentiel à la survie de *M. abscessus* en MΦ.

L'utilisation d'une approche complémentaire, le criblage d'une banque de mutants de transposition chez *M. abscessus* en amibes, a révélé le rôle essentiel du gène *mmpL8* (mycobactérielle membrane protein large 8) parmi la famille de protéines MmpL, impliquées dans le transport et/ou la synthèse de lipides mycobactériens. Chez *M. abscessus*, l'absence de production de cette protéine est corrélée à un défaut d'export d'un nouveau glycolipide (GDND, glycosyl diacetylated nonadecyl diol) et à un phénotype délétère pour la bactérie en MΦ.

En conclusion, notre travail a montré le rôle fondamental de l'amibe dans l'apprêtement de *M. abscessus* à la survie intra-macrophagique. Trois gènes ayant fait l'objet d'études approfondies, *mmpL8*, *eis2* ainsi que le gène *eccB<sub>4</sub>* (*MAB\_3759c*) mis en évidence par le crible amibien de la banque de mutants de transposition, participent à ce phénotype, confirmant le caractère pathogène de *M. abscessus*.

**Titre :** Comparative adaptations of *Mycobacterium abscessus* to amoebal and macrophagic phagocytosis : identification of virulence genes by global approaches

**Mots clés :** *Mycobacterium abscessus*, amoeba, macrophage, intracellular transcriptome

**Résumé :** *Mycobacterium abscessus* is a rapidly growing mycobacterium, causing opportunistic infections in humans, and notably pulmonary infections. *M. abscessus* is able to multiply inside macrophages (MΦ) and environmental amoebae. Here we demonstrate that *M. abscessus* undergoes adaptations in amoebae allowing its survival in MΦ. Intracellular adaptations of *M. abscessus* to amoebae and MΦ were assessed by RNAseq. We observed a significant enrichment of biological pathways reflecting adaptations to oxidative stress and metabolic adaptations illustrated by the consumption of fatty acids and activation of the sulfate assimilation pathway. These adaptations have been described in intramacrophagic *Mycobacterium tuberculosis*, a strictly pathogenic mycobacteria infecting the lung of humans and causing tuberculosis. Among the set of genes induced by *M. abscessus* during the amoebal co-culture are genes implicated in polyamine transport, MoCo (molybdoptéridin cofactor) biosynthesis and iron-sulfur (Fe-S) cluster assembly. The induction of such genes, described as virulence factors from intracellular bacteria, might enhance *M. abscessus* virulence and thus allow its survival in MΦ. Forty-five genes are highly induced along the amoebal co-culture. In comparison, the amoebal co-culture with *Mycobacterium chelonae*, a mycobacterium that belongs to the same genomic complex as *M. abscessus* and causing solely extrapulmonary infections, does not elicit the same adaptations; potentially explaining *M. chelonae* inability to persist in macrophages. Five operons, representing a total of 10 genes, were deleted from *M. abscessus* genome by homologous recombineering. These genes are required for both *M. abscessus* survival in amoebae and MΦ. Overexpression of two of these genes in *M. chelonae*, *MAB\_1517c* and *MAB\_2649*, encoding a TcmP (tetracenomycine polyketide synthase O-méthyltransférase) protein and an MmpS (mycobactérielle membrane

protein small) protein respectively, enhances *M. chelonae* survival in MΦ, suggesting that the induction of these genes favors *M. abscessus* survival in MΦ. Analyses of *M. abscessus* transcriptome in MΦ also shed light on adaptations specific to the bacterium intra-macrophagic life. Several genes highly induced in macrophages are implicated in biological pathways known to contribute to bacteria virulence, including proline metabolism, protein secretion by the type II secretion system and the MEP (methylerythritol phosphate) pathway. Among the set of induced genes selected according to their level of induction and their biological activity, N-acetylation and redox activities, bounding to oxygen and detoxification from nitric oxide by dioxygenases are significantly enriched. Among operons from this set of genes, it appears that *M. abscessus eis2* gene (*MAB\_4542c*), encoding a N-acetyltransferase, is essential for *M. abscessus* survival in MΦ.

In addition, a complementary approach to RNAseq, the screening of a transposon (*Tn*) mutant library of *M. abscessus* inside amoebae, revealed important roles of the *mmpL8* gene encoding a mycobactérielle membrane protein large belonging to a family of proteins implicated in lipid biosynthesis and export to the cell surface. When this protein was no longer produced by *M. abscessus*, a lower amount of a new glycolipid family (GDND, glycosyl diacetylated nonadecyl diol) was observed as well as a deleterious phenotype in MΦ.

To conclude, our work has shown a fundamental role of amoebae in triggering the virulence of *M. abscessus*, further allowing its survival in macrophages. Besides, three genes that have been studied more extensively – *mmpL8*, *eis2* and *eccB<sub>4</sub>* (revealed by the *Tn* library screening) – are required for *M. abscessus* survival in macrophages and confirmed its pathogenic behavior.

