



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes de transport d'une famille de lipides d'enveloppe, les polyphléates de tréhalose, chez *Mycobacterium smegmatis*

Laurie Thouvenel

## ► To cite this version:

Laurie Thouvenel. Etude des mécanismes de transport d'une famille de lipides d'enveloppe, les polyphléates de tréhalose, chez *Mycobacterium smegmatis*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30222 . tel-03228100

**HAL Id: tel-03228100**

**<https://theses.hal.science/tel-03228100>**

Submitted on 17 May 2021

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

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



# THÈSE

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

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
Laurie THOUVENEL

Le 19 octobre 2020

Etude des mécanismes de transport d'une famille de lipides d'enveloppe, les polyphléates de tréhalose, chez *Mycobacterium smegmatis*

---

Ecole doctorale : BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité : MICROBIOLOGIE

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

Thèse dirigée par  
CHRISTIAN CHALUT

Jury

**M. Alain BAULARD**, Rapporteur  
**M. Nicolas BAYAN**, Rapporteur  
**Mme Fabienne GIRARD-MISGUICH**, Examinatrice  
**Mme Maryelle TROPIS**, Examinatrice  
**M. Christian CHALUT**, Directeur de thèse



# Remerciements

Une page se tourne... Après plusieurs années à l'IPBS, me voilà partie vers de nouvelles aventures ! Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées, encouragées, soutenues de près ou de loin durant ces trois années de thèse et qui ont fait en sorte que, malgré les circonstances particulières de l'année 2020, ma soutenance de thèse soit une journée inoubliable !

Tout d'abord, je remercie les membres du jury d'avoir évalué mes travaux de thèse et de m'avoir écoutée les présenter et les défendre. Merci à **Alain Baulard** et **Nicolas Bayan**, rapporteurs de mon manuscrit, ainsi qu'à **Fabienne Girard-Misguich**, examinatrice. Malgré mon stress et la visio-conférence, j'ai eu beaucoup de plaisir à échanger avec vous sur mes résultats. Je remercie également chaleureusement la présidente du jury, **Maryelle Tropis**. Tu es une des professeur(e)s qui m'a fait aimer la biochimie. Je te remercie pour tes conseils et encouragements qui ont eu un impact déterminant. Enfin, merci également à **Jean-Yves Bouet** d'avoir été présent en tant que membre invité.

Tout ce travail n'aurait pas pu se produire sans mon directeur de thèse, **Christian Chalut**. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi pendant ces quelques années. Je te remercie pour ta patience, ton calme, ta pédagogie et surtout pour ta disponibilité, même dans les moments où tu étais particulièrement occupé. Tu es pour moi un modèle de rigueur scientifique.

Ensuite, merci à **Christophe Guilhot**, directeur de l'équipe Pathogénie Moléculaire des Mycobactéries. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, ta bienveillance et tes conseils toujours pertinents. Tu es un chef d'équipe comme on en voit peu.

Je souhaite également remercier les autres chercheurs de l'équipe, **Cathy** et **Kaymeuang** pour leur bienveillance, conseils et discussions, sur le plan scientifique mais aussi personnel.

**Wlad**, merci pour tous tes conseils techniques, tu resteras toujours ma référence en termes de biochimie des lipides. Merci aussi pour ta participation à la bonne ambiance lors des manip, à tes conseils en matière de séries et de musique et au guacamole de **Nathalie** !

Merci aux non permanents qui étaient là quand j'ai commencé : **Jacques** premièrement, qui a un peu été comme un mentor à mes débuts. Merci pour tous tes conseils et astuces au labo

sur les lipides, mais n'oublions pas aussi les nombreuses soirées au bar et les super journées de ski ! **Gautier**, mon voisin de bureau, avec qui j'ai bien rigolé pendant 2 ans. **Delphine**, avec qui j'ai partagé ma passion des plantes et de la poterie. Merci de nous avoir prêté ta super maison dans les Pyrénées. J'attends toujours une invitation pour celle du Gers ! Enfin, **Alice**, tu es une personne très douce et positive et j'ai beaucoup apprécié te côtoyer.

Mes années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans les « Guilhot Girls ». Dans l'ordre de rencontre : **Aideen**, depuis le jour où nous nous sommes rencontrées jusqu'à aujourd'hui, tu as été une amie et un soutien formidable. Tu as grandement contribué à la réussite de cette thèse et je te remercie pour tous les rires, les espresso martini et les week-ends à la campagne. Je sais que tu as été au cœur de l'organisation de mes cadeaux et souvenirs de thèse et je te remercie pour tout cela également. J'ai hâte de te rendre visite à Dublin. **Coralie**, ma coloc de confinement, merci pour toute cette bonne humeur et les chansons, danses et fous rires quotidiens qui ont ponctué mes années au labo. Ne change rien ! **Célia**-choupie, je te remercie pour ton soutien tout au long de ma thèse et j'espère avoir été présente pour toi aussi. Enfin, merci **Eva** pour ta bienveillance et ton écoute. J'espère que tu me feras un jour visiter la Calédonie. Vous allez beaucoup me manquer mais j'ai votre super chanson en tête !

Je remercie l'équipe « Ségrégation des génomes bactériens : mécanismes et diversité » du LMGM-CBI avec qui j'ai eu la chance de collaborer pendant ces trois années et le plaisir de plonger dans l'univers de la microscopie de fluorescence. En particulier, merci à **Jean-Yves Bouet** pour son accueil et les nombreuses discussions que nous avons eu autour du projet. Un grand merci à **Jérôme** pour sa bonne humeur, son aide et sa disponibilité. Tu es une personne que j'apprécie beaucoup et avec qui il est très agréable de travailler. J'espère que nous resterons en contact. Merci également à **Valentin, Hicham, Franck** et **Catherine**.

Merci à Dr **Adam**, qui, en plus d'être doté d'un humour et d'un cynisme incroyable, a été directement impliqué dans ma thèse en écrivant le script informatique qui m'a sauvé énormément de temps et d'énergie. Merci mille fois !

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, **Nathalie Campo** et **Stéphane Canaan**, qui m'ont suivi pendant ces trois ans et qui m'ont prodigué de nombreux conseils.

L'IPBS est un environnement de travail très riche, notamment grâce à toutes les personnes que j'ai pu y rencontrer. Une pensée spéciale pour **Dušan** et **Ximena, Amélie, JB** et **Giulia**. Vous êtes des amis très chers. Nos chemins vont peut-être moins souvent se croiser à partir de maintenant mais je sais que nous resterons en contact ! Merci également à **Adrien, Bym,**

**Tamara, Aurélien, Denis et Juliette.** Les anciens, qui sont partis du labo depuis un petit moment : **Lucie, Pauline, Alexia et Guillaume.** Et les autres doctorant(e)s, particulièrement **Alexandrine, Diana et Elena.**

Merci également à l'ensemble des personnels de l'IPBS qui contribuent au bon fonctionnement de l'institut, et plus particulièrement **Mylène** et **Yvane** du service administratif et **Sébastien** du service informatique pour leur efficacité redoutable et leur disponibilité.

Mais la vie ce n'est pas que le labo ! Je souhaite remercier aussi tous mes amis en dehors du labo. **Clémence et Juliette,** mes amies d'enfance. Mes amis de fac : **Thomas et Sylvert** (la meilleure coloc du monde) ainsi que **Lulu, Lucile, Lillo, Charles, Matthieu, Gaby.** Je n'oublie pas les lotois : **Pablo, Quentin, Lucie, Tom, Thomas, Loric, Maëva.**

Je remercie également chaleureusement ma famille, qui m'a accompagnée depuis le début. **Mes parents** bien sûr, ainsi que **Charlotte, Mathieu et Zoé.** Je n'oublie pas non plus ma **tantine** préférée ainsi que **Nicolas, Lou et Christophe.** Enfin, merci à mes quatre **grands-parents** qui m'ont beaucoup soutenue.

**Michèle** et **Anna,** merci de m'avoir accueillie à bras ouverts et merci pour votre bonne humeur, depuis sept ans c'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous ainsi qu'avec **Jeannot et Coco,** qui sont des personnes d'une gentillesse incroyable.

Enfin, je n'aurais jamais pu réaliser tout cela sans le soutien incommensurable et quotidien de **Neil.** En particulier, merci de m'avoir écoutée, corrigée, encouragée et de m'avoir laissée me plaindre sans broncher pendant les derniers mois de thèse. « Je te dois une reconnaissance éternelle » comme disent les martiens dans Toy Story. Plus simplement, merci de faire partie de ma vie.

Et maintenant il ne me reste plus qu'à remercier ceux qui liront ce manuscrit. En espérant que la lecture leur sera agréable et qu'ils apprendront des choses. Bonne lecture !



# Abréviations

<b>ABC (transporteur)</b>	ATP-binding cassette
<b>Acc</b>	Complexes acétyl-CoA carboxylases
<b>ACP</b>	Acyl-carrier protein
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AM</b>	D-arabino D-mannane
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>AT</b>	Acide téichoïque
<b>AT (domaine)</b>	Acyltransférase
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Bam</b>	B-barrel assembly machine
<b>BCG</b>	Bacille Calmette-Guérin
<b>CmpL</b>	Corynebacterial membrane protein large
<b>CoA</b>	Coenzyme A
<b>CR3</b>	Récepteur du complément 3
<b>CSI</b>	Conserved signature indels
<b>CSP</b>	Conserved signature proteins
<b>DAT/TAT/PAT</b>	Di-, tri- et polyacyltréhaloses
<b>DC-SIGN</b>	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
<b>DH</b>	Dehydratase
<b>DIC</b>	Differential interference contrast/contraste de phase
<b>DIM</b>	Dimycosérosates de phthiocérol
<b>DrrABC</b>	Doxorubicin resistance ABC transporter
<b>ER</b>	Enoyl reductase
<b>ESAT-6</b>	6 kDa early secretory antigenic target
<b>FAAL</b>	Fatty acyl-AMP ligase

<b>FACL</b>	Fatty acyl-CoA ligase
<b>FadD</b>	Fatty acyl degradation
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase
<b>Gap</b>	GPL-associated protein
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GPL</b>	Glycopeptidolipide
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>IL-10</b>	Interleukine-10
<b>KR</b>	B-ketoacyl reductase
<b>KS</b>	B-ketoacyl synthase
<b>LAM</b>	Lipoarabinomannane
<b>LCP (famille)</b>	LytR-CpsA-Psr
<b>Lipo-AT</b>	Acide lipotéichoïque
<b>LM</b>	Lipomannane
<b>Lol</b>	Localisation of lipoproteins
<b>LOS</b>	Lipooligosaccharide
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>Lpt</b>	Lipopopolysaccharide transport pathway
<b>MAC</b>	Complexe <i>M. avium</i>
<b>mAGP</b>	Complexe mycoloyl-arabinogalactane-peptidoglycane
<b>ManLAM</b>	Mannose-lipoarabinomannane
<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily
<b>mmDAG</b>	Monomeromycoloyldiacylglycérol/monomycobacteroyl diacylglycérol
<b>MmpL</b>	Mycobacterial membrane protein large
<b>MmpS</b>	Mycobacterial membrane protein small
<b>MNT</b>	Mycobactérie non tuberculeuse
<b>MR</b>	Récepteur au mannose
<b>MTBC</b>	Complexe <i>M. tuberculosis</i>
<b>Noc (système)</b>	Nucleoid occlusion
<b>NRPS</b>	Peptide synthétase non ribosomique

<b>OMP</b>	Outer Membrane Protein, Protéine en tonneau bêta
<b>Pap</b>	Protéine associée aux Pks
<b>pBpA</b>	<i>p</i> -benzoyl-L-phenylalanine
<b>PGL</b>	Glycolipide phénolique
<b>PIM</b>	Phosphatidyl- <i>myo</i> -inositol mannoside
<b>Pks</b>	Polykétide synthase
<b>P-pant</b>	Phospho-pantéthéine
<b>R (phénotype)</b>	Rough/rugueux
<b>RND</b>	Résistance, Nodulation, Division cellulaire
<b>S (phénotype)</b>	Smooth/lisse
<b>Sap</b>	SL-addressing protein
<b>Sec (système)</b>	General secretion
<b>SL</b>	Sulfolipide
<b>TAG</b>	Triacylglycérol
<b>TAT (système)</b>	Twin-arginine translocation
<b>TE</b>	Thioester
<b>TLR</b>	Récepteur Toll-like
<b>TMM/TDM</b>	Mono/dimycolates de tréhalose
<b>TMP</b>	Monophléate de tréhalose
<b>TPP</b>	Polyphléates de tréhalose
<b>TtfA</b>	TMM transport factor A
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine



# Table des matières

## Introduction

<b>I. Les différentes catégories d'enveloppes bactériennes</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Les enveloppes Gram-négative et Gram-positive</b> .....	<b>3</b>
II.1) Structure des enveloppes Gram-négative et Gram-positive.....	3
II.1.1) La membrane plasmique.....	3
II.1.2) Le peptidoglycane .....	4
II.1.3) Spécificité de l'enveloppe Gram-négative : la membrane externe .....	5
II.1.4) La capsule .....	7
II.2) Assemblage des enveloppes Gram-négative et Gram-positive .....	7
II.2.1) Transport des constituants spécifiques de l'enveloppe Gram-négative .....	8
II.2.2) Transport des constituants spécifiques de l'enveloppe Gram-positive .....	13
<b>III. Les mycobactéries et leur enveloppe</b> .....	<b>15</b>
III.1) Généralités sur les mycobactéries .....	15
III.1.1) Les mycobactéries pathogènes strictes .....	18
III.1.2) Les mycobactéries non tuberculeuses .....	19
III.2) L'enveloppe des mycobactéries .....	21
III.2.1) La membrane plasmique.....	21
III.2.2) La paroi mycobactérienne : le complexe mAGP .....	25
III.2.3) Les lipides extractibles de la mycomembrane .....	28
III.2.4) La capsule.....	35
<b>IV. Biosynthèse des lipides de la mycomembrane</b> .....	<b>37</b>
IV.1) Les loci chromosomiques dédiés à la biosynthèse des lipides de la mycomembrane .....	37
IV.2) Les protéines impliquées dans la biosynthèse des lipides de la mycomembrane.....	39
IV.2.1) Les systèmes FAS .....	39
IV.2.2) Les polykétides synthases .....	41
IV.2.3) Les peptides synthétases non ribosomiques .....	43
IV.2.4) Les protéines FadD.....	43
IV.2.5) Les protéines Pap.....	45

IV.2.6) Les acyltransférases (hors Pap).....	45
<b>V. Le transport des lipides de la mycomembrane .....</b>	<b>49</b>
V.1) Les transporteurs MmpL .....	49
V.1.1) Les MmpL impliqués dans le transport des lipides extractibles .....	49
V.1.2) Structure et mécanisme d'action des MmpL.....	53
V.2) Les autres protéines associées au transport des lipides de la mycomembrane.....	56
V.2.1) Les protéines MmpS .....	56
V.2.2) Les protéines Gap-like.....	57
V.2.3) Les lipoprotéines.....	58
V.2.4) Les protéines partenaires de MmpL3 .....	61
<b>VI. Assemblage de l'enveloppe mycobactérienne au cours du cycle cellulaire .....</b>	<b>62</b>
VI.1) Le cycle cellulaire atypique des mycobactéries .....	62
VI.1.1) Polarité et asymétrie.....	62
VI.1.2) Mécanismes et acteurs de la division cellulaire chez les mycobactéries .....	65
VI.1.3) Mécanismes et acteurs de l'élongation cellulaire chez les mycobactéries .....	69
VI.2) Assemblage de la mycomembrane lors du cycle cellulaire .....	70
VI.2.1) Localisation des protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des constituants de la mycomembrane.....	71
VI.2.2) Dynamique de synthèse et d'export des constituants de la mycomembrane .....	73
VI.3) Les problématiques liées à l'assemblage de la mycomembrane.....	77

## **Projet de recherche : Le modèle TPP pour l'étude de l'export des lipides de la mycomembrane .....**

**83**

## **Etude topologique de la protéine PE, impliquée dans la synthèse finale des TPP**

<b>I. Contexte de l'étude et objectifs.....</b>	<b>87</b>
<b>II. Résultats .....</b>	<b>88</b>
<b>III. Discussion et perspectives .....</b>	<b>109</b>

# **Localisation de l'export des TPP lors du cycle cellulaire chez *M. smegmatis***

<b>I. Contexte de l'étude et objectifs.....</b>	<b>113</b>
<b>II. Résultats .....</b>	<b>114</b>
II.1) Localisation du transporteur MmpL10 dans la membrane plasmique de <i>M. smegmatis</i> au cours du cycle cellulaire .....	114
II.2) Coordination entre la localisation de MmpL10 et certaines protéines impliquées dans le cycle cellulaire .....	118
II.3) Comparaison des localisations de MmpL10 et MmpL3 dans <i>M. smegmatis</i> .....	125
<b>III. Discussion et perspectives .....</b>	<b>128</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>135</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>139</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>163</b>



# Introduction

# Introduction

## I. Les différentes catégories d'enveloppes bactériennes

Il existe plusieurs façons de classifier les bactéries. Les plus anciennes classifications se basent sur des caractères phénotypiques, tels que la morphologie des cellules et leur vitesse de croissance. Avec l'amélioration des techniques, de nouvelles classifications ont été développées, basées sur la comparaison des séquences des sous-unités 16S de l'acide ribonucléique (ARN) ribosomal, ou plus récemment le séquençage des génomes entiers (Schleifer, 2009). Une ancienne méthode reste cependant très utilisée en microbiologie : la coloration de Gram. Développée à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Hans Christian Gram, elle permet de différencier les bactéries selon la structure de leur paroi (Moyes *et al.*, 2009).

Cette technique repose sur l'incubation des bactéries avec du violet de Gentiane suivie d'une décoloration avec un alcool. Les bactéries capables de conserver la coloration dans leur enveloppe apparaissent violettes et sont dites Gram-positives (Figure 1). A l'inverse, les bactéries décolorées par l'action de l'alcool sont dites Gram-négatives. Cette différence traduit une architecture d'enveloppe fondamentalement différente. Les bactéries Gram-positives sont dotées d'une membrane plasmique entourée d'un peptidoglycane très épais tandis que les bactéries Gram-négatives possèdent une membrane plasmique et une membrane externe, séparées par un peptidoglycane de faible épaisseur (Figure 1) (Silhavy *et al.*, 2010). Pour cette raison, elles sont souvent désignées sous le nom de bactéries monodermes et didermes, respectivement.

Il y a cependant quelques exceptions à ce classement bipartite. Les bactéries de la famille des Corynebacterales dont font partie les mycobactéries, sont classées parmi les Gram-positives en raison de l'homologie des séquences de leurs sous-unités 16S de l'ARN ribosomal avec celles des bactéries Gram-positives (Olsen and Woese, 1993). Cependant, elles ne retiennent que très peu la coloration de Gram. Structuralement, leur enveloppe ne contient qu'une mince couche de peptidoglycane et ne contient pas d'acides téichoïques, con-

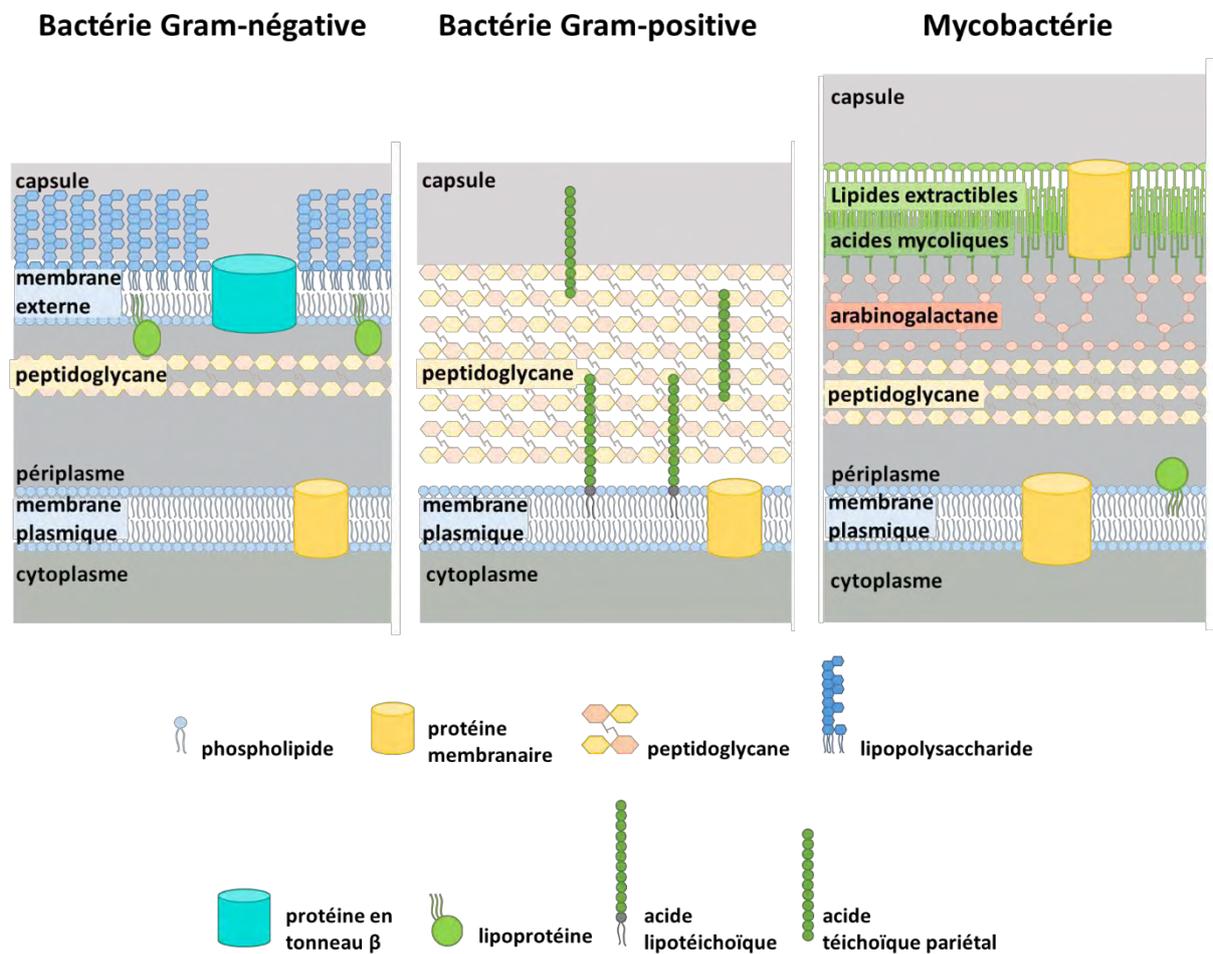


Figure 1 : Structure des enveloppes des bactéries Gram-négatives, Gram-positives et des mycobactéries

Représentation schématique de l'organisation des enveloppes des bactéries Gram-négatives, Gram-positives et des mycobactéries, montrant leurs principaux constituants. Une structure plus détaillée de l'enveloppe mycobactérienne est présentée dans la Figure 5A.

trairement à l'enveloppe des bactéries Gram-positives (Figure 1).

Une analyse phylogénétique réalisée sur la mycobactérie pathogène *Mycobacterium tuberculosis* et sur une dizaine d'espèces bactériennes différentes classe le génome de cette mycobactérie comme étant plus proche du génome des bactéries Gram-négatives que Gram-positives, par comparaison de paires de gènes conservés (Fu and Fu-Liu, 2002). Cette proximité avec les bactéries Gram-négatives est également observable au niveau de la structure de leurs enveloppes, détaillées ci-après. En revanche, les constituants de ces enveloppes diffèrent drastiquement.

L'enveloppe mycobactérienne constitue donc un troisième type d'enveloppe bactérienne (Figure 1). Plutôt que l'utilisation de la coloration de Gram, les mycobactéries et les corynebactéries sont mises en évidence par la coloration de Ziehl-Neelsen, qui consiste à colorer les cellules à la fuchsine puis à les décolorer avec un acide suivi d'un alcool fort (Bishop and Neumann, 1970). Ces bactéries sont appelées acido-alcool résistantes car leur décoloration est impossible du fait de la structure spécifique de leur paroi, très riche en lipides.

## II. Les enveloppes Gram-négative et Gram-positives

### II.1) Structure des enveloppes Gram-négative et Gram-positives

#### II.1.1) La membrane plasmique

Toutes les bactéries possèdent une membrane plasmique qui délimite le cytoplasme (Figure 1). Cette membrane est une bicouche lipidique constituée de phospholipides, dont la nature varie en fonction des espèces (Sohlenkamp and Geiger, 2016). En plus de transduire les signaux provenant de l'environnement jusqu'au cytoplasme, elle contient les machineries

de production d'énergie (chaîne respiratoire), de sécrétion des protéines et de transport des lipides, sucres, métaux et métabolites, les bactéries ne possédant pas d'organelles intracellulaires permettant de compartimenter ces actions.

### II.1.2) Le peptidoglycane

La membrane plasmique est entourée par le peptidoglycane, un polymère formé d'unités répétées du disaccharide N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique liées en  $\beta$ -1,4 (Figure 1). Ces chaînes polysaccharidiques sont reliées entre elles via des chaînes peptidiques fixées sur l'acide N-acétylmuramique. Ces peptides forment une liaison covalente, le plus souvent entre l'acide aminé en position 4 d'un premier peptide et l'acide aminé en position 3 d'un peptide adjacent (liaison « 4-3 ») (Vollmer *et al.*, 2008).

Le peptidoglycane confère sa rigidité à la paroi et contrebalance la pression de turgescence générée par le cytoplasme. Il détermine donc la forme de la bactérie, qui peut fortement varier selon les espèces. De nombreuses bactéries ont une forme de bâtonnet, appelée bacille. C'est le cas notamment de la bactérie Gram-négative *Escherichia coli* et de la bactérie Gram-positif *Bacillus subtilis*. D'autres sont des coques (bactéries des genres *Neisseria* et *Staphylococcus*) ou encore des bâtonnets incurvés (*Vibrio* et *Caulobacter*).

Une des différences fondamentales entre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives est l'épaisseur du peptidoglycane : chez les premières, il mesure environ 10 nm, contre 30 à 100 nm pour les secondes (Silhavy *et al.*, 2010).

Chez les bactéries Gram-positives, le peptidoglycane sert d'ancrage à des glycopolymères spécifiques : les acides téichoïques (AT) (Figure 1). Les acides lipotéichoïques (lipo-AT) sont ancrés à la membrane plasmique par des acides gras tandis que les AT pariétaux sont covalamment liés au peptidoglycane au niveau de l'acide N-acétylmuramique et plus ou moins exposés en surface de la bactérie. Ces derniers représentent jusqu'à 60% de la masse de l'enveloppe. Il existe cinq types de lipo-AT, mais les mieux caractérisés sont les lipo-AT de type I et de type IV (Rohde, 2019). Les lipo-AT de type I sont les plus abondants, constitués d'unités répétées de polyglycérolphosphate et d'une ancre glycolipidique. Les lipo-AT de type

IV sont plus complexes et sont constitués, en plus de l'ancre glycolipidique, d'unités répétées d'un pseudopentasaccharide contenant du galactose modifié, du glucose, du polyribitolphosphate et deux unités de N-acétylgalactosamine (Percy and Gründling, 2014).

La présence des lipo-AT et des AT pariétaux n'est pas strictement requise pour la croissance bactérienne mais la délétion commune des deux groupes est létale. Ces molécules semblent avoir un rôle dans la division cellulaire. En effet, la délétion de la protéine LtaS, impliquée dans la biosynthèse des lipo-AT, génère la filamentation de *B. subtilis*, un phénotype typiquement observé lorsque les cellules ne parviennent pas à se diviser (Percy and Gründling, 2014). La perte des AT pariétaux génère de nombreuses anomalies morphologiques comme un arrondissement des bacilles *B. subtilis* et *Listeria monocytogenes*, soulignant le rôle important de ces molécules pour la localisation et/ou le bon fonctionnement des machineries d'élongation et de division cellulaires (Brown *et al.*, 2013).

Chez les bactéries Gram-négatives, le peptidoglycane est localisé au sein du périplasma, un compartiment hydrophile dense en protéines, délimité par la membrane plasmique d'une part et par la membrane externe d'autre part. Contrairement au cytoplasme, le périplasma est un milieu oxydant qui permet la formation de ponts disulfures au sein des protéines. Il permet de séquestrer les enzymes toxiques pour le cytoplasme. Il contient également les machineries de sécrétion des constituants de la membrane externe (Miller and Salama, 2018). Les bactéries Gram-positives ne possèdent pas à proprement parler de périplasma car elles sont dépourvues de membrane externe qui délimite et isole ce compartiment de l'extérieur de la cellule. En revanche, des observations par microscopie électronique ont montré, comme chez les bactéries Gram-négatives, l'existence d'un espace entre la membrane plasmique et le peptidoglycane (Zuber *et al.*, 2006).

### II.1.3) Spécificité de l'enveloppe Gram-négative : la membrane externe

La membrane externe des bactéries Gram-négatives est une bicouche asymétrique, formée de phospholipides pour le feuillet interne et de glycolipides, principalement de lipopolysaccharides (LPS), pour le feuillet externe (Figure 1) (Silhavy *et al.*, 2010). La

membrane externe est reliée coalement au peptidoglycane via la lipoprotéine Lpp, ou lipoprotéine de Braun. Cette petite protéine, la plus abondante d'*E. coli*, est ancrée au peptidoglycane via son extrémité C-terminale et est attachée à la membrane externe par trois acides gras liés à son extrémité N-terminale. Elle joue un rôle structural important car sa délétion conduit à la formation de bourgeonnements de la membrane externe, en plus d'accroître la susceptibilité des bactéries à divers antibiotiques (Asmar and Collet, 2018).

Le LPS, qui constitue le composant majoritaire du feuillet externe de la membrane externe, est une molécule complexe formée d'une partie hydrophobe (le lipide A), ancrée dans la membrane externe, liée à un polymère d'oligosaccharides pouvant être constitué de plusieurs centaines de résidus (Bertani and Ruiz, 2018). L'ensemble forme un complexe s'étendant bien au-delà de la membrane externe. Le LPS participe au maintien de l'intégrité de la membrane externe et est essentiel chez la plupart des bactéries Gram-négatives. Hydrophobe, il constitue une barrière imperméable au passage de nombreuses molécules toxiques. C'est également une molécule très immunogène du fait de la présence de nombreux oses (Simpson and Trent, 2019).

La membrane externe contient également de nombreuses protéines, principalement des lipoprotéines et des protéines en tonneau bêta (OMP, de l'anglais Outer Membrane Protein). Les lipoprotéines, comme la protéine Lpp présentée précédemment, sont des protéines hydrophiles ancrées à la membrane externe par des acides gras liés à leur extrémité N-terminale. Certaines sont très importantes pour l'assemblage de cette membrane car elles interviennent dans le transport de ses constituants (LPS, lipoprotéines et OMP), au sein des machineries de transport Lpt, Lol et Bam (voir partie II.2). Elles sont impliquées dans la formation de biofilms, la résistance aux antibiotiques et la sécrétion de protéines et polysaccharides nécessaires à la virulence de certaines espèces pathogènes (Narita and Tokuda, 2017). Les OMP sont des protéines transmembranaires, insérées dans la membrane externe. Elles sont constituées de feuillets  $\beta$  enroulés sur eux-mêmes et stabilisés via des liaisons hydrogènes, formant des pores hydrophobes avec un lumen hydrophile. Beaucoup d'entre elles sont des porines et permettent la diffusion passive de petites molécules. La famille de protéines OmpA, par exemple, est abondamment retrouvée dans la membrane externe et joue un rôle structural important en interagissant avec le peptidoglycane via son extrémité C-terminale afin d'empêcher ce dernier d'interagir avec la membrane externe

(Samsudin *et al.*, 2016). Ces protéines sont également des facteurs de virulence majeurs qui permettent l'adhésion de la bactérie aux cellules humaines et animales lors d'une infection (Confer and Ayalew, 2013).

Avec l'émergence de souches pathogènes résistantes aux traitements actuels, beaucoup de recherches se focalisent sur la découverte de nouveaux antibiotiques permettant d'inhiber l'assemblage de cette membrane externe ou capables de déstabiliser sa structure (Alexander *et al.*, 2018; Brown, 2016).

#### II.1.4) La capsule

L'enveloppe des bactéries Gram-négatives et Gram-positives est parfois entourée d'une capsule contenant une grande diversité de polysaccharides (Figure 1). Chez *E. coli* par exemple, certains polysaccharides peuvent contenir jusqu'à 200 résidus, formant une capsule de près de 400 nm d'épaisseur (Willis and Whitfield, 2013). Cette structure n'est pas présente chez toutes les bactéries, en revanche elle est retrouvée chez de nombreux pathogènes pour qui elle est requise pour échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Chez les bactéries Gram-positives, cette capsule forme une couche protectrice contre la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles de l'hôte, en raison des nombreuses charges négatives portées par les AT pariétaux localisés à sa surface (Rohde, 2019). En raison de leur pouvoir immunogène, les composants de la capsule sont utilisés pour le développement de vaccins notamment contre les méningites bactériennes (Bottomley *et al.*, 2012).

#### II.2) Assemblage des enveloppes Gram-négative et Gram-positives

Les constituants de l'enveloppe des bactéries Gram-négatives et Gram-positives sont synthétisés dans le cytoplasme puis transportés à travers la membrane plasmique. Ils sont ensuite pris en charge par des systèmes de transport spécifiques jusqu'à leur destination finale. Pour les bactéries Gram-positives, qui ne possèdent pas de membrane externe, le

transport des constituants de la paroi consiste uniquement à franchir la membrane plasmique. Au contraire, les bactéries Gram-négatives doivent transporter certains constituants de leur enveloppe jusqu'à la membrane externe, en traversant le périplasme hydrophile. Pour les deux types de bactéries, la traversée de la membrane plasmique nécessite un apport d'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) ou par le gradient de protons existant de part et d'autre de la membrane plasmique (force proton-motrice).

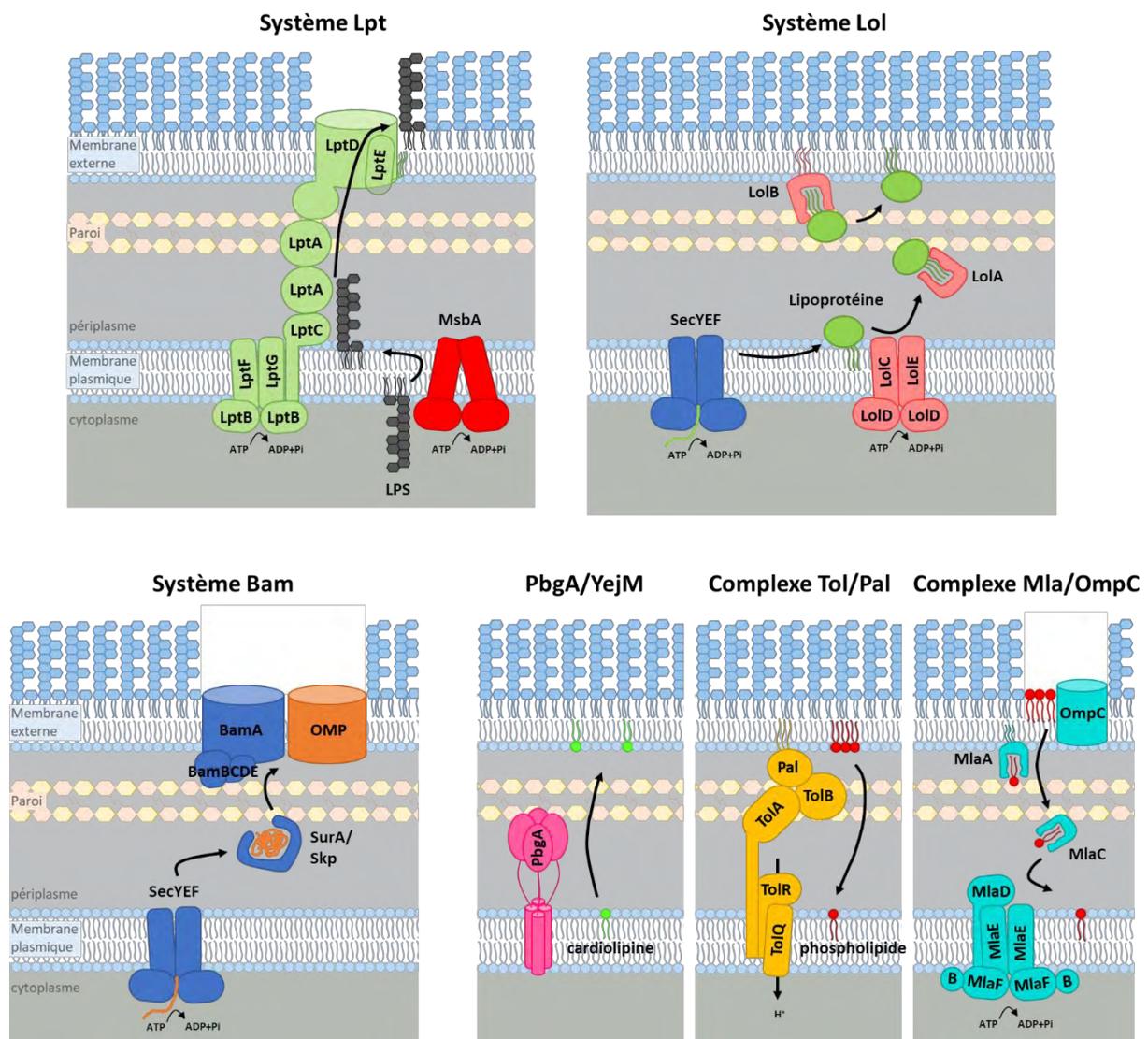
### II.2.1) Transport des constituants spécifiques de l'enveloppe Gram-négative

Les constituants spécifiques de l'enveloppe des bactéries Gram-négatives (LPS, lipoprotéines, OMP et phospholipides) sont transportés jusqu'à la membrane externe par quatre systèmes distincts, d'une grande complexité.

#### Transport du LPS

Le LPS est synthétisé au niveau du feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique. Il est ensuite transporté vers la face périplasmique par le transporteur MsbA, selon un mécanisme de « trap and flip » (Figure 2) (Mi *et al.*, 2017). Cette protéine transmembranaire appartient à la famille des transporteurs ABC, qui utilisent l'ATP comme source d'énergie (Locher, 2016).

Le transport du LPS jusqu'à la membrane externe est ensuite assuré par le système Lpt (de l'anglais LPS transport pathway), la nature hydrophobe du lipide A empêchant sa diffusion passive à travers le périplasme hydrophile. Le système Lpt est formé de sept protéines essentielles (LptB<sub>2</sub>FGCADE) qui forment un pont reliant les membranes plasmique et externe et permettent le transport du LPS de manière unidirectionnelle (Figure 2) (Okuda *et al.*, 2016; Owens *et al.*, 2019). Le LPS est extrait de la membrane plasmique par le transporteur LptB<sub>2</sub>FG qui utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Le lipide est ensuite transféré à la protéine LptC, qui le recueille dans une cavité hydrophobe présente dans son domaine périplasmique (Owens *et al.*, 2019). Ce domaine périplasmique interagit avec la protéine soluble LptA, à qui le LPS est ensuite transféré. Localisée au centre du pont, LptA est la seule



**Figure 2 : Les machineries de transport des constituants de l'enveloppe des bactéries Gram-négatives**

Représentation schématique de l'organisation des systèmes de transport du LPS (système Lpt), des lipoprotéines (système Lol), des OMP (système Bam) et des phospholipides (systèmes PbgA/YejM, Tol/Pal et Mla/OmpC) dans l'enveloppe des bactéries Gram-négatives. Adapté de Shrivastava et Chng, 2019.

protéine à ne pas avoir de domaine transmembranaire qui l'ancre à l'une ou l'autre membrane (Figure 2). Enfin, le LPS est inséré dans la membrane externe par le complexe LptDE (Dong *et al.*, 2014; Freinkman *et al.*, 2012). LptD est une large OMP formant un pore dans la membrane externe et LptE est une lipoprotéine presque entièrement insérée dans le pore de LptD. Le LPS pénètre dans ce canal protéique et atteint finalement le feuillet externe de la membrane externe.

Le transport du LPS est un processus globalement bien caractérisé. Okuda et collaborateurs le comparent au distributeur de bonbon PEZ, où l'hydrolyse successive d'ATP dans le cytoplasme permet de pousser un flux continu de LPS jusqu'à la membrane externe (Okuda *et al.*, 2016).

### Transport des lipoprotéines

Après leur synthèse dans le cytoplasme, les lipoprotéines sont adressées aux systèmes Sec ou TAT de sécrétion des protéines via un peptide signal présent sur leur extrémité N-terminale. Ces systèmes assurent leur transport jusqu'au feuillet périplasmique de la membrane plasmique (Figure 2). Les lipoprotéines sont ensuite maturées par plusieurs enzymes reconnaissant une séquence conservée appelé lipobox (constituée des acides aminés Leu-Ala/Ser-Gly/Ala-Cys) (Lewenza *et al.*, 2006). Un résidu diacylglycérol est ajouté au niveau du résidu cystéine par la protéine Lgt, puis le peptide signal est clivé par la protéine LspA. Chez la plupart des bactéries, un troisième acide gras est ajouté sur la lipoprotéine par la protéine Lnt (Okuda and Tokuda, 2011).

Certaines lipoprotéines sont ensuite transportées jusqu'à la membrane externe par le système Lol (de l'anglais Localisation of lipoproteins), composé des cinq protéines LolABCDE (Figure 2). LolCDE est un transporteur ABC qui permet l'extraction de la lipoprotéine de la membrane plasmique de manière ATP dépendante. La lipoprotéine est ensuite transférée à LolA, qui va traverser le périplasma pour la transférer à son tour à LolB, une lipoprotéine ancrée dans le feuillet interne de la membrane externe (Figure 2). LolB ayant une plus forte affinité pour la lipoprotéine que LolA, ce transfert s'effectue sans apport d'énergie (Taniguchi *et al.*, 2005). Dans la plupart des cas, la lipoprotéine est ensuite insérée dans le feuillet interne

de la membrane externe. Certaines lipoprotéines sont davantage modifiées, comme Lpp qui est covalamment liée au peptidoglycane via son extrémité C-terminale.

### Transport des OMP

Les OMP sont synthétisées dans le cytoplasme puis envoyées au système Sec de sécrétion des protéines via un peptide signal N-terminal, résultant en leur translocation dans le périplasme dans un état non replié (Figure 2). Ces protéines sont ensuite transportées par des chaperonnes périplasmiques jusqu'à la membrane externe, parmi lesquelles SurA est la mieux caractérisée (Vertommen *et al.*, 2009). Sa délétion dans *E. coli* impacte fortement l'intégrité de la membrane externe, qui devient perméable aux détergents. Elle n'est en revanche pas essentielle, car son absence est compensée par d'autres chaperonnes comme Skp (Figure 2) (Sklar *et al.*, 2007). En condition de stress, cette dernière permet de désagréger les protéines en solution pour les diriger vers la membrane externe ou les dégrader et ainsi limiter leur toxicité (G. Li *et al.*, 2018).

Les OMP sont ensuite intégrées dans la membrane externe par le système Bam (de l'anglais  $\beta$ -barrel assembly machine). Ce complexe est composé de BamA, elle-même une OMP et de quatre lipoprotéines (BamBCDE), liées à BamA via son domaine périplasmique (Figure 2). Seules BamA et BamD sont essentielles et conservées chez les bactéries Gram-négatives. Les autres protéines permettent surtout de stabiliser le complexe BamA/D et donc d'augmenter l'efficacité d'intégration des OMP dans la membrane externe (Rigel *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2012). Les OMP s'insèrent spontanément dans la membrane externe en réponse à un changement conformationnel de la protéine BamA qui perturbe l'environnement local de la membrane. Pendant ce processus, le système Bam permet d'empêcher l'agrégation et la dégradation des OMP (Ricci and Silhavy, 2019).

### Transport des phospholipides

Les phospholipides sont les constituants de base des membranes plasmique et externe des bactéries Gram-négatives mais leur transport est encore mal connu. Ils sont synthétisés au niveau de la face cytoplasmique de la membrane plasmique à partir d'acide phosphorique

(Parsons and Rock, 2013). Ils sont ensuite transportés sur le feuillet externe, mais là où les flippases potentiellement impliquées dans ce processus ne sont pas connues.

Les phospholipides qui constituent le feuillet interne de la membrane externe doivent être transportés à travers le périplasma. Ce transport, relativement rapide (de l'ordre de la minute), dépendant non pas de l'hydrolyse de l'ATP mais de la force proton-motrice, reste très peu caractérisé (Shrivastava *et al.*, 2017). A ce jour, seulement un transporteur a été identifié pour le transport de la cardiolipine, PbgA (Figure 2) (Dalebroux *et al.*, 2015).

Contrairement au LPS, le transport des phospholipides est bidirectionnel. Si le transport de la membrane plasmique à la membrane externe (antérograde) est peu caractérisé, le transport inverse (rétrograde) l'est davantage. Ce dernier est assuré par deux complexes protéiques : le complexe Tol-Pal et le système OmpC-Mla. Le complexe Tol-Pal est constitué de sept protéines reliant les membranes plasmique et externe (Figure 2). TolQRA sont trois protéines transmembranaires formant un complexe dans la membrane plasmique et TolB-Pal forment un complexe proche de la membrane externe. Les deux complexes interagissent de façon dépendante de la force proton-motrice (Lloubès *et al.*, 2001). Le complexe Tol-Pal est très conservé chez les bactéries Gram-négatives et permet de maintenir l'intégrité et la stabilité de la membrane externe. Sa délétion dans *E. coli* conduit à un excès de phospholipides dans la membrane externe (Shrivastava *et al.*, 2017). Il est également impliqué dans la constriction de l'enveloppe lors de la division cellulaire (Petiti *et al.*, 2019; Yeh *et al.*, 2010).

Le deuxième système, OmpC-Mla, semble important pour le maintien de l'asymétrie de la membrane externe, plus spécifiquement en enlevant les phospholipides mal localisés. En effet, sa délétion dans *E. coli* conduit à l'accumulation de phospholipides sur le feuillet externe de la membrane externe, ce qui augmente sa perméabilité (Malinverni and Silhavy, 2009). Ce système est composé d'un transporteur ABC dans la membrane plasmique, MlaFEDB, ainsi que de la protéine périplasmique MlaC et du complexe OmpC-MlaA dans la membrane externe (Figure 2) (Shrivastava and Chng, 2019). Le transport du phospholipide du feuillet externe de la membrane externe vers le feuillet périplasmique est assuré par le complexe OmpC-MlaA, notamment via un canal dans la protéine MlaA. Le rôle de la protéine OmpC dans ce transport n'est pour le moment pas connu (Abellón-Ruiz *et al.*, 2017). Le phospholipide est ensuite spontanément transféré à la protéine MlaC par affinité. Enfin, après

interaction de MlaC avec MlaD au sein du complexe MlaFEDB et par hydrolyse de l'ATP, le phospholipide est finalement inséré dans l'un ou l'autre feuillet de la membrane plasmique (Ercan *et al.*, 2019).

Le rôle du système Mla dans le transport rétrograde des phospholipides est soutenu par le fait que la surexpression de l'opéron MlaFEDCB restaure en partie le défaut de transport des phospholipides de la membrane externe à la membrane plasmique dans un mutant du système Tol-Pal. Cependant, certaines études ont, au contraire, suggéré un rôle de ce système dans le transport antérograde des phospholipides. L'analyse de mutants du système Mla de *Acinetobacter baumannii* a montré que ceux-ci avaient moins de glycérophospholipides dans leur membrane externe et plus dans leur membrane plasmique, en comparaison avec la souche sauvage (Kamischke *et al.*, 2019). De plus, une étude du complexe de *E. coli* par des approches biochimiques *in vitro* a mis en évidence un transfert spontané des phospholipides du transporteur MlaFEDB à MlaC (Hughes *et al.*, 2019). Bien que les systèmes de transport des phospholipides aient été identifiés, leurs rôles précis restent donc encore à élucider.

## II.2.2) Transport des constituants spécifiques de l'enveloppe Gram-positive

### Transport des lipo-AT et des AT pariétaux

Le transport des lipo-AT et des AT pariétaux est moins complexe que celui du LPS et des autres constituants de l'enveloppe Gram-négative car il n'implique que le transport à travers la membrane plasmique et l'extraction des AT pariétaux de celle-ci.

Pour les LTA de type I, l'ancre diglucosyl diacylglycérol est transférée sur la face externe de la membrane plasmique par la protéine LtaA, une protéine appartenant à la famille MFS (Major Facilitator Superfamily), un ensemble de transporteurs membranaires qui utilisent la force proton-motrice (Figure 3) (Grundling and Schneewind, 2007). Elle est ensuite rallongée par l'ajout d'unités polyglycérolphosphate jusqu'à former un lipo-AT.

Le transporteur membranaire TacF est requis pour le transport des lipo-AT de type IV, mais son mode d'action précis n'est pas caractérisé (Figure 3) (Damjanovic *et al.*, 2007).

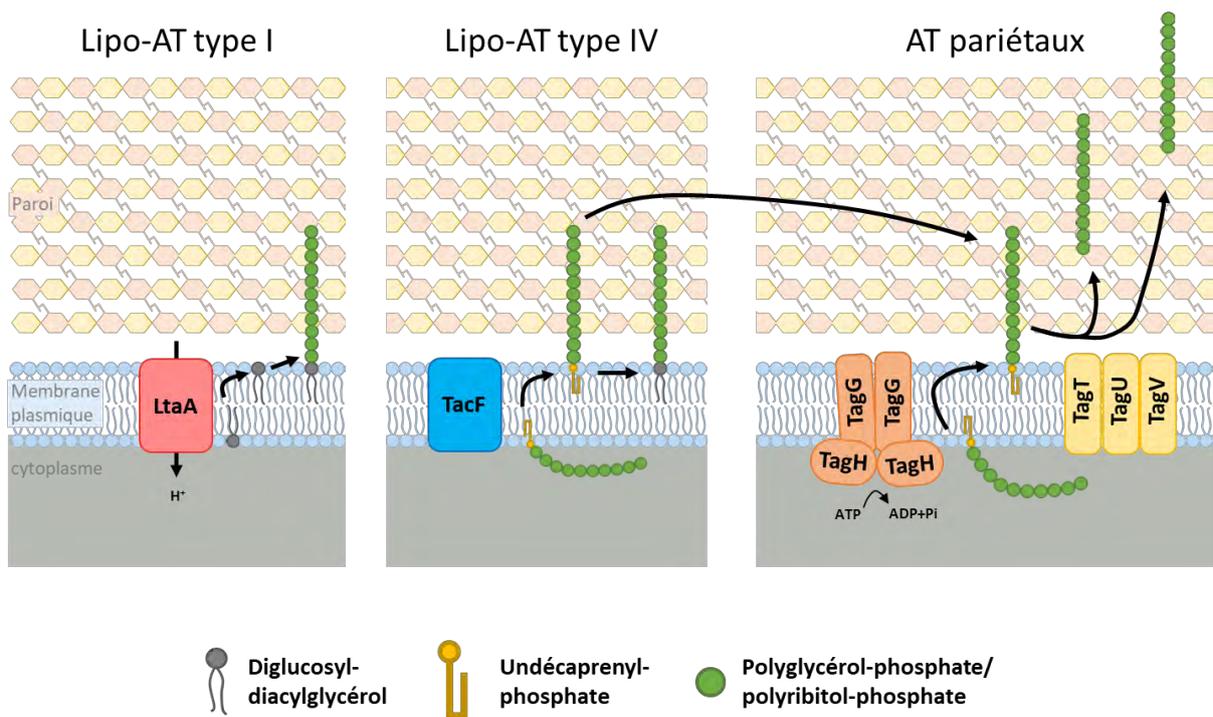


Figure 3 : Les systèmes de transport des acides téichoïques dans l'enveloppe des bactéries Gram-positives

Représentation schématique de l'organisation des systèmes de transport des lipo-AT (type I et IV) et des AT pariétaux dans l'enveloppe des bactéries Gram-positives. Adapté de Touchette et Seeliger, 2017.

Les AT pariétaux sont transportés par le transporteur ABC TagGH pour *B. subtilis* et TarGH pour *S. aureus*, de façon ATP-dépendante (Figure 3) (Lazarevic and Karamata, 1995). Contrairement aux lipo-AT, les AT pariétaux sont ensuite extraits de la membrane plasmique et transférés sur le peptidoglycane. Ce transfert est opéré par les phosphotransférases TagTUV (Figure 3) (Kawai *et al.*, 2011). Ces enzymes appartiennent à la famille de protéines LytR-CpsA-Psr (LCP), également retrouvée chez les Corynebacterales *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum* (Baumgart *et al.*, 2016; Harrison *et al.*, 2016). Dans ces organismes, les protéines LCP permettent l'attachement de l'arabinogalactane sur peptidoglycane, par un processus enzymatique similaire à l'attachement des AT sur le peptidoglycane dans les bactéries Gram-positives. Ces données mettent en avant une certaine conservation de la biogénèse de la paroi entre les mycobactéries et les bactéries Gram-positives.

### III. Les mycobactéries et leur enveloppe

#### III.1) Généralités sur les mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies strictes, asporulés et non mobiles, appartenant à la classe des actinobactéries, dans l'ordre des Corynebacterales et plus précisément dans la famille des Mycobacteriaceae. Récemment, une analyse phylogénétique d'environ 2000 protéines centrales de 150 espèces mycobactériennes a permis de diviser cette famille en cinq genres distincts : *Mycobacterium* (clade *Tuberculosis-Simiae*), *Mycobacteroides* (clade *Abscessus-Cheloniae*), *Mycolicibacillus* (clade *Triviale*), *Mycolicibacter* (clade *Terrae*) et *Mycolicibacterium* (clade *Fortuitum-Vaccae*) (Figure 4) (Gupta *et al.*, 2018). Chaque genre comporte des marqueurs moléculaires (protéines et indels) spécifiques, en plus des marqueurs moléculaires conservés chez toutes les espèces mycobactériennes.

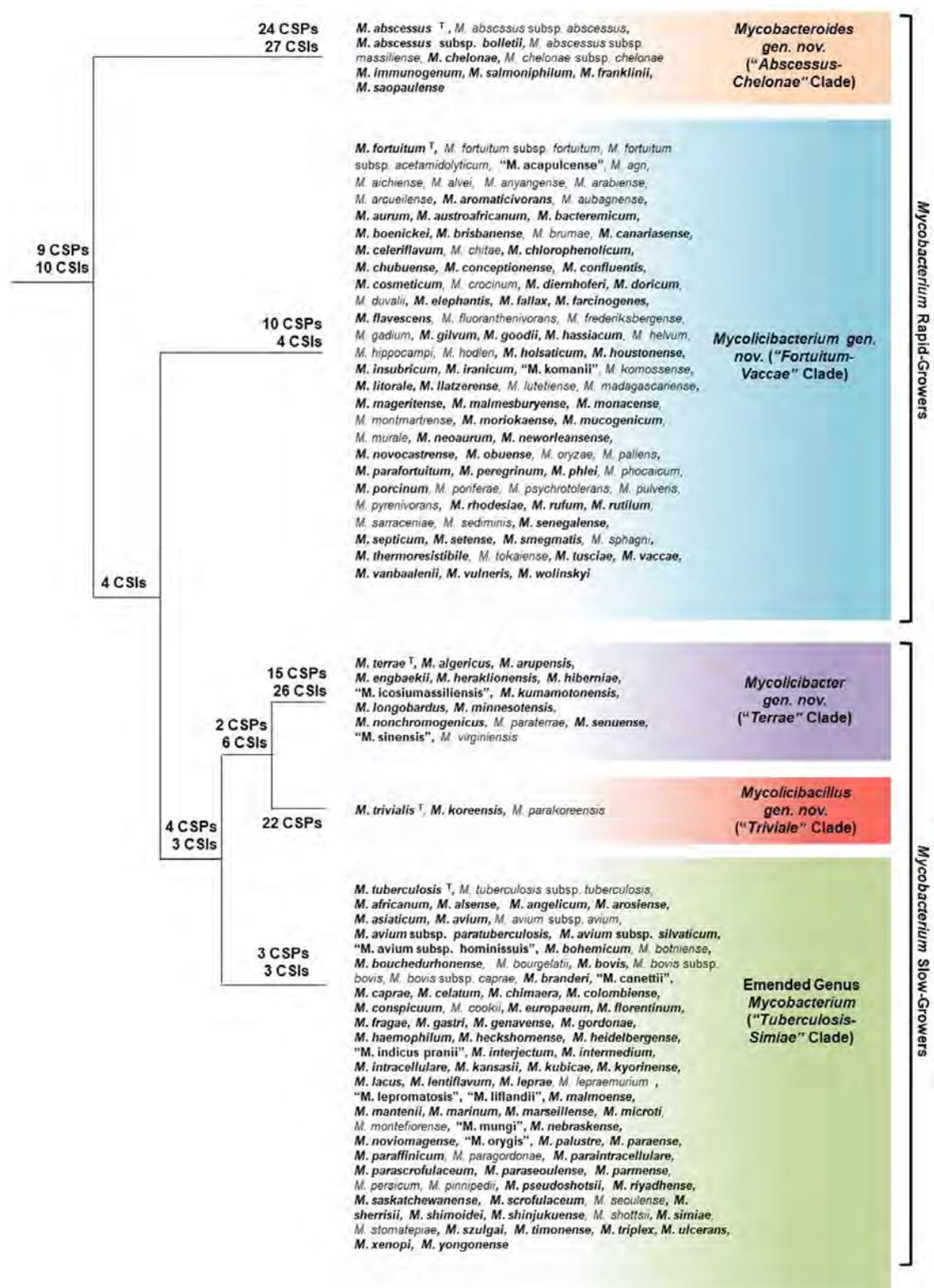


Figure 4 : Classement des espèces mycobactériennes en cinq clades

L'analyse de protéines signatures conservées (CSPs pour conserved signature proteins) et d'indels signatures conservés (CSIs pour conserved signature indels) identifiés pour 150 espèces mycobactériennes, a permis de proposer un classement de ces espèces en cinq clades "*Tuberculosis-Simiae*," "*Terraе*," "*Triviale*," "*Fortuitum-Vaccae*," et "*Abscessus-Cheloniae*" et de proposer de nouveaux noms de genre.

(Suite de la Figure 4)

Les espèces marquées en gras ont été analysées dans l'étude. La lettre <sup>T</sup> suivant un nom d'espèce identifie l'espèce-type de chaque genre. Le classement des autres espèces dont les génomes n'ont pas été séquencés a été effectué par analyse de la séquence 16S de l'ARN ribosomal. Les espèces dont les noms ne sont pas en italique et sont entre guillemets n'ont pas été validées par publication. Adapté de Gupta *et al.*, 2018.

Les 188 espèces de mycobactéries répertoriées à ce jour sont divisées en deux groupes en fonction de leur caractère pathogène. Les pathogènes stricts incluent les bactéries du complexe *M. tuberculosis* (MTBC), un ensemble d'espèces responsables de la tuberculose chez l'Homme et l'animal, ainsi que *Mycobacterium leprae*, responsable de la lèpre. Les mycobactéries restantes sont regroupées au sein des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) un large groupe comprenant des mycobactéries pour la plupart saprophytes mais également des pathogènes opportunistes.

Les MNT sont divisées en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance. Les mycobactéries à croissance lente forment des colonies sur boîte en plus de sept jours, tandis que les mycobactéries à croissance rapide forment des colonies en moins de sept jours. En 1959, Ernest Runyon est le premier à avoir proposé une classification des MNT en quatre catégories basées sur leur production de pigments, où les trois premières catégories regroupent les bactéries à croissance lente et la quatrième, les mycobactéries à croissance rapide (Runyon, 1959). Trente ans plus tard, une nouvelle méthode de classification a été proposée, basée non plus sur des critères phénotypiques mais sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomique 16S (Olsen and Woese, 1993). Cette méthode a permis la classification de la plupart des MNT. Certaines espèces ne pouvant cependant pas être clairement classées par cette méthode, l'utilisation d'autres gènes de ménages comme marqueurs a également été proposée, comme la comparaison des séquences codantes pour les protéines Hsp65 ou RpoB (Kim *et al.*, 2005). Enfin, l'amélioration des techniques de séquençage a permis l'entrée dans une nouvelle ère, avec l'analyse des variations d'un seul nucléotide au sein d'un même gène, le séquençage multi-locus et le séquençage sur génome entier. Ces avancées précisent encore d'avantage la classification des MNT (Fedrizzi *et al.*, 2017).

### III.1.1) Les mycobactéries pathogènes strictes

Les mycobactéries pathogènes strictes n'ont pas de réservoir dans la nature et se multiplient donc seulement par infection d'un hôte. Parmi elles, le complexe MTBC comprend les principales espèces causant la tuberculose humaine et animale, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii* ainsi que *M. bovis* et la souche vaccinale *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) (Orgeur and Brosch, 2018). Ce sont des bacilles à croissance lente dont le temps de doublement est d'environ vingt-quatre heures. Le complexe MTBC semble avoir évolué à partir d'une espèce de mycobactérie environnementale ayant acquis des mutations clés durant l'évolution, lui permettant de devenir un ensemble de pathogènes très efficaces. Le terme « efficace » vient du fait que l'inhalation d'un seul bacille suffit au déclenchement de la pathologie, la tuberculose.

La tuberculose est une maladie très ancienne qui se transmet presque exclusivement par voie aérienne. Elle touche la plupart du temps les voies respiratoires mais peut également se propager à d'autres organes, comme le cerveau. En 2018, la tuberculose a causé plus de 1,2 millions de morts dans le monde, principalement en Afrique et en Asie du Sud-Est. Il est estimé qu'environ un tiers de la population mondiale est porteuse de la bactérie *M. tuberculosis*, en faisant un réservoir très important (World Health Organization, 2019).

Le cycle infectieux du bacille de la tuberculose est bien caractérisé (Ernst, 2012). Lors de l'inhalation d'un bacille, celui-ci atteint le poumon et est phagocyté par les macrophages alvéolaires. Cette primo-infection engendre une tuberculose active dans 10 % des cas, caractérisée par des symptômes tels qu'une toux chronique, des expectorations sanglantes, de la fièvre, des sueurs nocturnes et une perte de poids. Dans 90% des cas, une réponse immunitaire est mise en place et aboutit à la formation d'une structure multicellulaire : le granulome. Cette structure permet de contenir le bacille et d'empêcher sa dissémination, mais rarement de l'éliminer. Cette phase de tuberculose latente, asymptomatique, peut durer plusieurs années. Dans environ 10% des cas, la maladie est réactivée suite à un affaiblissement du système immunitaire, entraînant la rupture du granulome et la prolifération et la dissémination des bactéries et l'infection possible d'un nouvel hôte.

Le traitement de la tuberculose est particulièrement long et nécessite la prise de quatre antibiotiques de première ligne : isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide, pour un taux de guérison d'environ 85% (World Health Organization, 2019). Le nombre de cas de tuberculose résistante à un ou plusieurs de ces antibiotiques est en dramatique expansion. Dans ce cas, des traitements alternatifs plus longs, coûteux et avec des effets secondaires plus importants doivent être mis en place, pour un taux de guérison de seulement 56%. La prévention de la tuberculose passe par la vaccination, avec à ce jour un unique vaccin, développé il y a plus de cent ans : le BCG (pour bacille Calmette-Guérin). Cependant, celui-ci n'offre pas de protection efficace chez l'adulte.

*M. leprae*, l'agent infectieux responsable de la lèpre, est également un pathogène strict, n'ayant que deux réservoirs : l'Homme et le tatou. Ce pathogène est particulièrement difficile à étudier en raison de sa croissance extrêmement lente (temps de doublement d'environ 12-13 jours) et de son incapacité à pousser *in vitro* (Salipante and Hall, 2011). Il a également la particularité d'avoir un très petit génome, d'environ 3.3 Mb contre 4.4 Mb pour *M. tuberculosis*, ainsi qu'un faible nombre de gènes codants pour des protéines (environ 1600 gènes et 1100 pseudogènes pour *M. leprae* contre environ 4000 gènes pour *M. tuberculosis*) (Cole *et al.*, 2001). Pour cela, le génome de *M. leprae* est généralement perçu comme le génome minimal permettant d'assurer la survie et la croissance des mycobactéries.

La lèpre est une maladie transmissible par les voies aériennes, provoquant des lésions cutanées et nerveuses devenant permanentes si non traitées. C'est un problème majeur de santé publique dans 14 pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. Un traitement efficace existe, combinant trois antibiotiques différents sur une durée de six à douze mois, mais le pathogène reste difficile à éliminer en raison de la période d'incubation qui peut durer jusqu'à vingt ans, au cours desquels le porteur asymptomatique peut le transmettre (World Health Organization, 2018).

### III.1.2) Les mycobactéries non tuberculeuses

Les MNT regroupent toutes les mycobactéries n'appartenant pas au MTBC et aux souches de *M. leprae*, soit environ 170 espèces. La plupart d'entre elles sont

environnementales et saprophytes, c'est-à-dire qu'elles ne causent pas de pathologie chez l'Homme. C'est le cas notamment de *Mycolicibacterium smegmatis*, le modèle mycobactérien le plus utilisé en laboratoire, qui a également l'avantage de croître rapidement (temps de génération d'environ trois heures).

D'autres MNT sont, en revanche, des pathogènes opportunistes, capables d'infecter des personnes présentant des prédispositions ou des pathologies avérées (atteintes de mucoviscidose par exemple) ou des personnes immunodéprimées (M.-L. Wu et al., 2018). Ces mycobactéries peuvent causer des pathologies diverses, regroupées au sein du terme mycobactérioses, qui touchent particulièrement les poumons mais aussi les ganglions, la peau, les tissus mous ou encore les os (Koh, 2020). Les cas de mycobactérioses sont en forte augmentation. Aux Etats-Unis par exemple, le nombre de maladies pulmonaires causées par des MNT augmente entre 3 et 8% chaque année depuis la fin des années 90 (Adjemian et al., 2012). Les MNT à l'origine du plus grand nombre d'infections sont celles du complexe *Mycobacterium avium* (MAC, comprenant les espèces *M. avium* et *M. intracellulare*), suivies ensuite par celles du complexe *Mycobacteroides chelonae* (comprenant *M. chelonae* et *M. abscessus*) et *Mycolicibacterium fortuitum* (Brown-Elliott and Wallace, 2002; Fleshner et al., 2016.).

Le traitement des mycobactérioses nécessite au préalable d'identifier la ou les espèces responsables de la maladie. Cette identification peut s'avérer difficile car les MNT sont naturellement présentes dans l'environnement et peuvent générer des résultats positifs sans être à l'origine des symptômes. Les MNT sont isolées à partir d'échantillons du patient (crachats par exemple) et cultivées. Après extraction d'ADN génomique, la ou les espèces sont identifiées par séquençage de marqueurs spécifiques comme le gène 16S de l'ARN ribosomal, qui permet de différencier le complexe MAC des autres MNT, ou les gènes de ménage *hsp65* et *rpoB* (Ryu et al., 2016). Le traitement est ensuite adapté en fonction de la MNT responsable. Le traitement d'infection à *M. abscessus*, par exemple, est particulièrement compliqué, en raison de la résistance intrinsèque de ce pathogène aux antibiotiques (Nessar et al., 2012).

## III.2) L'enveloppe des mycobactéries

Comme mentionné dans la première partie, les mycobactéries se distinguent des bactéries Gram-négatives et Gram-positives par la structure et la composition unique de leur enveloppe. Cette enveloppe est composée d'une membrane plasmique, d'un espace périplasmique et d'une paroi comportant une couche de peptidoglycane, liée covalamment à une couche d'arabinogalactane sur laquelle sont estérifiés les acides mycoliques, des lipides à longues chaînes spécifiques des actinobactéries (Figure 5A). Ces trois molécules forment le complexe mycoloyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP). L'enveloppe comprend également un grand nombre de lipides liés de manière non covalente au reste de l'enveloppe, ainsi qu'une capsule (Figure 5A) (Brennan and Nikaido, 1995).

Le développement des techniques de microscopie électronique et notamment la tomographie cryo-électronique a permis l'observation de l'enveloppe mycobactérienne dans des conditions physiologiques (Figure 5B). Ces études ont apporté des précisions importantes sur l'organisation multicouches de l'enveloppe et ont mis en évidence l'existence d'une membrane externe, en plus de la membrane plasmique (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008). Des analyses biochimiques après fractionnement de l'enveloppe ont permis de mieux définir la composition de cette membrane externe, appelée mycomembrane. Cette dernière est une bicouche lipidique dont le feuillet interne est composé presque exclusivement d'acides mycoliques tandis que le feuillet externe comprend les diverses familles de lipides non covalamment liés au reste de l'enveloppe (Bansal-Mutalik and Nikaido, 2014).

### III.2.1) La membrane plasmique

Comme pour les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, la membrane plasmique des mycobactéries est une bicouche riche en phospholipides. Sa composition détaillée a été établie chez *M. smegmatis* en séparant la membrane externe du reste de l'enveloppe par incubation avec un détergent, le dioctyl sulfosuccinate, formant des micelles inverses.

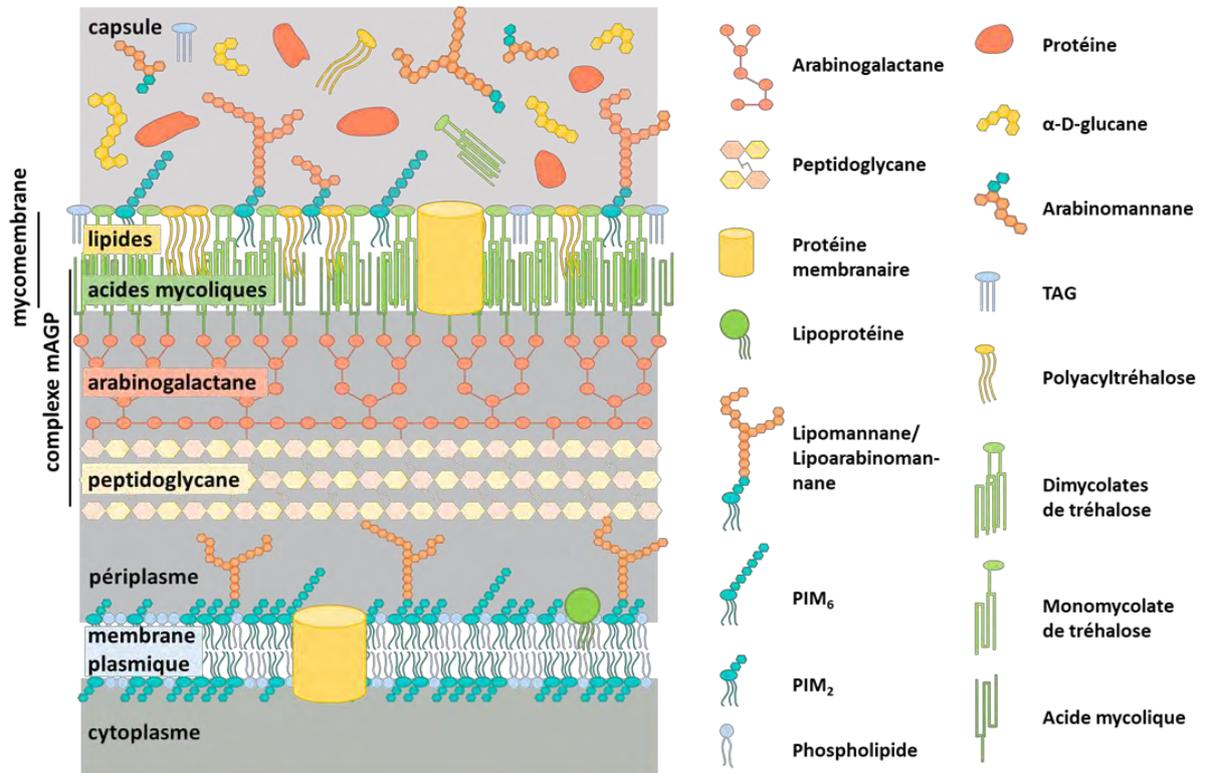
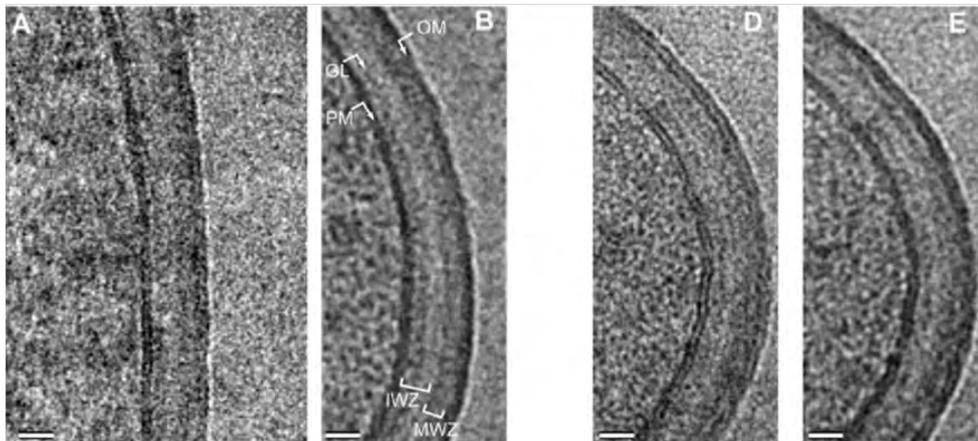
**A****B**

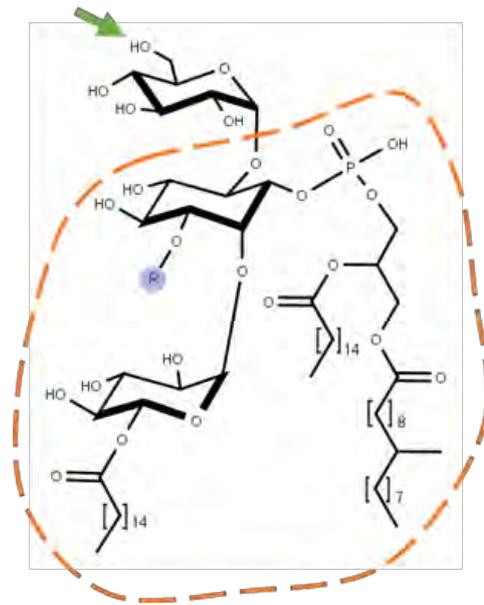
Figure 5 : L'enveloppe mycobactérienne

**A.** Représentation schématique de l'enveloppe mycobactérienne.

**B.** Images de l'enveloppe de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>-155 (A et B) et de *M. bovis* BCG (C et D) observée par cryo-microscopie électronique CEMOVIS (cryo-electron microscopy of vitreous sections). PM : membrane plasmique, GL : couche granuleuse, IWZ : zone pariétale interne, OWZ : zone pariétale externe, OM : membrane externe. Barre d'échelle : 20 nm. Adapté de Zuber, *et al.*, 2008.

L'enveloppe sans membrane externe a ensuite été reprise dans un mélange chloroforme-méthanol-eau pour en extraire les lipides restants (Bansal-Mutalik and Nikaido, 2014). Cette méthode a été validée pour l'extraction de la membrane plasmique de *C. glutamicum*, une bactérie phylogénétiquement proche des mycobactéries (Bansal-Mutalik and Nikaido, 2011). Comme pour les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, la membrane plasmique contient de la cardiolipine, du phosphatidylinositol et de la phosphatidylethanolamine. En revanche, le phospholipide le plus abondant est le diacylphosphatidyl-*myo*-inositol dimannoside (PIM<sub>2</sub>), composé de trois à quatre acides gras, le plus souvent en C16-C19 et d'une tête polaire phospho-inositol décorée de deux mannoses (Figure 6A) (Morita *et al.*, 2004). Le PIM<sub>2</sub> est essentiel à la viabilité de toutes les mycobactéries (Korduláková *et al.*, 2002). Il est le précurseur de nombreux dérivés et notamment du PIM<sub>6</sub> (Figure 6B), contenant six groupements mannoses et retrouvé en faible quantité dans la membrane plasmique, dont l'absence est corrélée avec l'accumulation anormale de vésicules intracellulaires formées de fragments de membrane plasmique (Morita *et al.*, 2006). De façon générale, les PIM sont des phospholipides spécifiques des mycobactéries, importants pour le maintien de l'hydrophobicité de l'enveloppe.

Le PIM<sub>2</sub> est également le précurseur de lipoglycannes : le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM) (Figure 6B). Ces molécules complexes possèdent une ancre lipidique constituée du PIM<sub>2</sub>, liée à une chaîne linéaire de 20 à 25 unités d' $\alpha$ -1,6-mannoses au niveau de l'inositol. En plus cette structure, le LAM est glycosylé au niveau du squelette de mannose par une longue chaîne arabinane. Enfin, cette dernière peut être ramifiée par des résidus mannoses auquel cas le LAM est appelé mannose-lipoarabinomannane (ManLAM) (Angala *et al.*, 2014). La localisation précise de ces molécules dans l'enveloppe est peu connue mais elles semblent retrouvées dans les membranes plasmique et externe. Les nombreux résidus saccharidiques qui constituent les PIM, LM, LAM et ManLAM sont responsables de leurs propriétés fortement antigéniques. Ces molécules participent à la reconnaissance de la bactérie par différents récepteurs sur les cellules phagocytaires et empêchent la maturation du phagosome, un processus nécessaire à l'élimination des microorganismes lors d'une infection (Guerin *et al.*, 2010; Torrelles and Schlesinger, 2010).

**A****PIM<sub>2</sub>**

Ⓡ AcPIM<sub>2</sub> = H  
 Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> = palmitate

**Tête polaire phospho-  
inositol-mannoside**

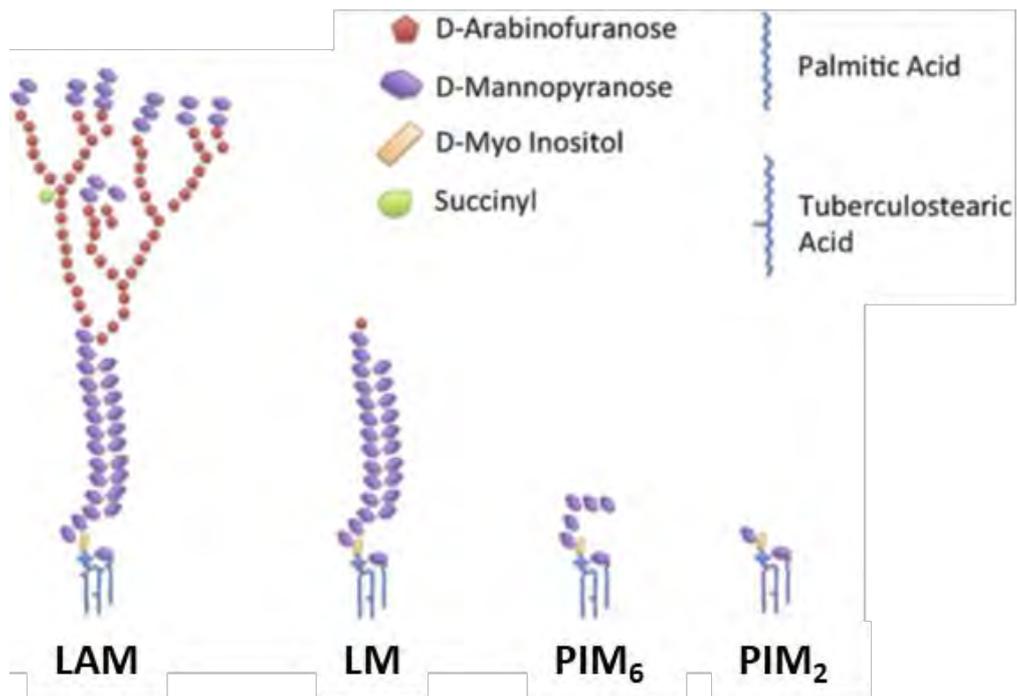
**B**

Figure 6 : Structure du PIM<sub>2</sub>, PIM<sub>6</sub>, LM et LAM

**A.** Structure du PIM<sub>2</sub>. La flèche verte pointe le groupement auquel est lié le polymère de mannose qui constitue le PIM<sub>6</sub>, le LM, le LAM et le ManLAM.

**B.** Représentation schématique du PIM<sub>2</sub>, PIM<sub>6</sub>, LM et du LAM. Adapté de Källenius, *et al.*, 2016.

### III.2.2) La paroi mycobactérienne : le complexe mAGP

La paroi mycobactérienne est composée de couches successives de peptidoglycane, d'arabinogalactane et d'acides mycoliques, reliées par des liaisons covalentes et formant le complexe mAGP (Figure 7).

#### Le peptidoglycane

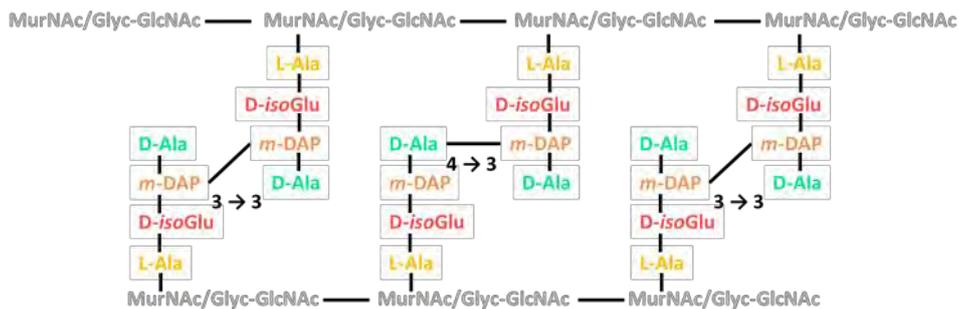
Le peptidoglycane des mycobactéries, comme celui des bactéries Gram-négatives et Gram-positives, est composé d'unités répétées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique liées en  $\beta$ -1,4, reliées par des chaînes latérales peptidiques de nature proches de celles retrouvées chez *E. coli*, avec quelques modifications selon les espèces (Figure 7A) (Pavelka Jr. *et al.*, 2014). En revanche, l'acide muramique peut être N-acétylé ou N-glycolylé, cette dernière modification semblant uniquement retrouvée chez les mycobactéries. Elle semble notamment participer à la résistance des mycobactéries au lysozyme (Raymond *et al.*, 2005).

Une autre caractéristique du peptidoglycane mycobactérien est le taux de liaisons covalentes qui relient les chaînes polysaccharidiques via les peptides, qui est d'environ 70-80 % contre 50 % pour *E. coli* (Daffé and Marrakchi, 2019). Ces liaisons covalentes sont établies entre l'acide aminé en position 4 d'un premier peptide et l'acide aminé en position 3 d'un peptide adjacent (liaison « 4-3 »), classiquement retrouvée chez les bactéries. Chez les mycobactéries, un autre type de liaison (« 3-3 ») est prédominant, à hauteur de plus de 60% du taux de liaison total. Ces liaisons sont catalysées par les L-D transpeptidases, qui sont résistantes à l'action de la plupart des antibiotiques  $\beta$ -lactames (Mainardi *et al.*, 2005).

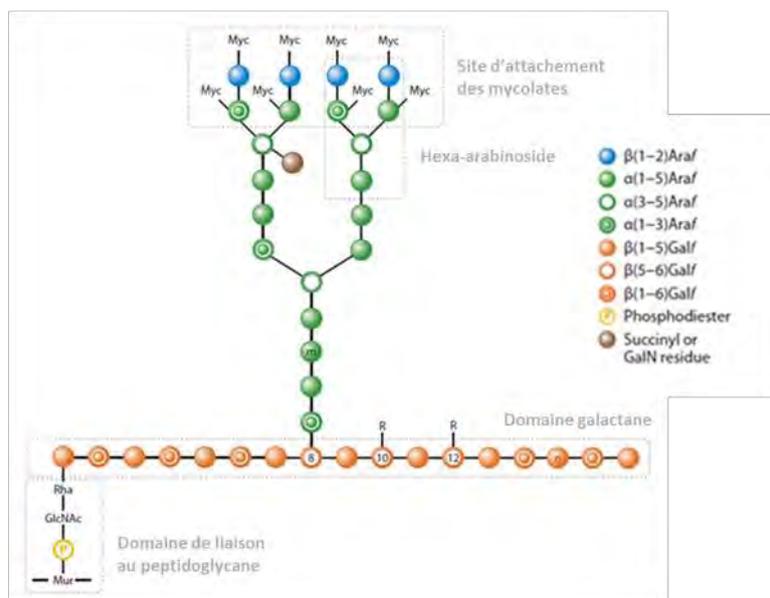
#### L'arabinogalactane

Le peptidoglycane est relié covalement à l'arabinogalactane au niveau de l'acide muramique, via un résidu rhamnose lié à un résidu N-acétylglucosaminosyl-phosphate (Figure 7B). L'arabinogalactane est un hétéropolymère constitué d'une chaîne linéaire de galactane comportant une trentaine de résidus galactofuranoses liés en positions 5 et 6 et de deux chaînes arabinanes d'une trentaine de résidus (Jankute *et al.*, 2015). Chaque chaîne arabinane est subdivisée en deux chaînes arabinanes au niveau d'un résidu 1,3,5- $\alpha$ -D-arabinofuranose

**A**



**B**



**C**

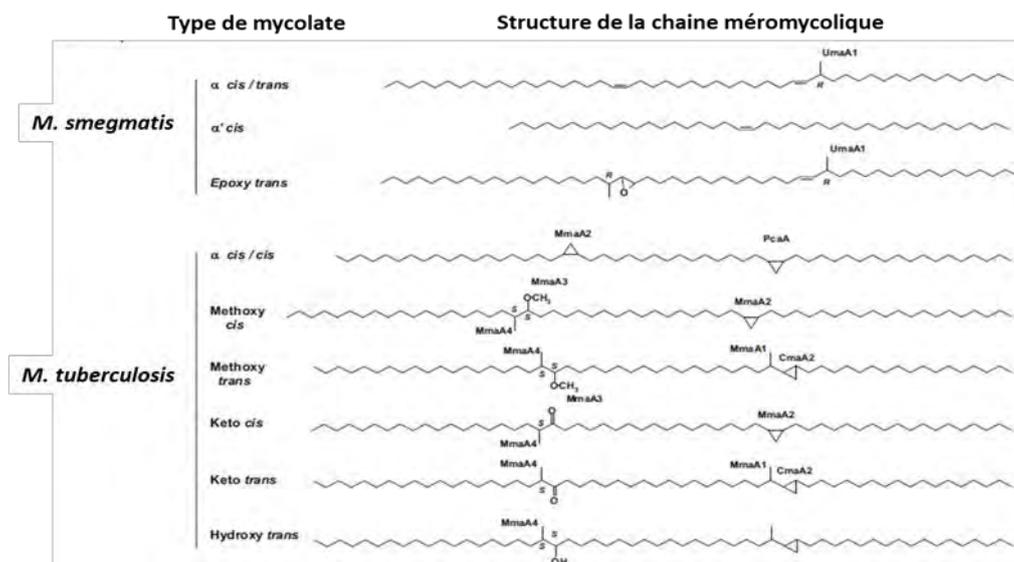
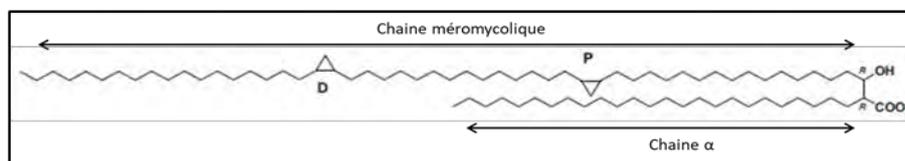


Figure 7 : Structure des constituants du complexe mAGP

A. Représentation schématique de la structure du peptidoglycane.

(Suite de la Figure 7)

Les chaînes d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine (MurNAc/GlcNAc) sont reliées par des peptides (en couleurs) via des liaisons 4-3 et 3-3. Adapté d'Abrahams et Besra, 2018.

**B.** Représentation schématique de la structure de l'arabinogalactane. Adapté de Jankute *et al.*, 2015.

**C.** Structure générale d'un acide mycolique (encadré) et structure des chaînes méromycoliques retrouvées chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*. Adapté de Marrakchi *et al.*, 2014.

(Figure 7B). Les extrémités non réductrices de deux-tiers des arabinoses terminaux sont estérifiées par des acides mycoliques (McNeil *et al.*, 1991). Le 1,3,5- $\alpha$ -D-arabinofuranose central peut également porter un résidu galactosamine ou bien, lorsque la chaîne n'est pas estérifiée par des acides mycoliques, un résidu succinyl ester.

Le rôle de ces modifications n'est pas bien caractérisé, mais il a été proposé que les charges portées par les groupements succinyl ester interagissent avec d'autres groupements sur l'arabinogalactane, permettant de rigidifier sa structure (Bhamidi *et al.*, 2008). La présence de résidus galactosamines dans l'enveloppe de *M. tuberculosis* empêche la maturation des cellules dendritiques et augmente la production d'interleukine 10, une cytokine anti-inflammatoire (Wheat *et al.*, 2015). Ces données suggèrent un rôle de ce motif lors de l'infection, celui-ci étant présent uniquement dans les bactéries à croissance lente, pathogènes et pathogènes opportunistes.

### Les acides mycoliques

Derniers constituants du complexe mAGP, les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes produits spécifiquement par certaines familles d'actinobactéries (dont les mycobactéries et les corynebactéries). Ce sont des molécules  $\alpha$ -ramifiées et  $\beta$ -hydroxylées pouvant contenir jusqu'à 90 atomes de carbone (Figure 7C) (Marrakchi *et al.*, 2014). De par leur longueur de chaîne très importante, les acides mycoliques qui estérifient l'arabinogalactane constituent une barrière imperméable au passage des molécules hydrophobes comme hydrophiles. La chaîne principale est la chaîne méromycolique, qui porte une fonction hydroxyle. Chez les mycobactéries, cette chaîne est constituée d'environ 40 à 60 atomes de carbone, tandis que la chaîne  $\alpha$  en possède 22 à 26.

Des modifications chimiques variables selon les espèces sont présentes sur les positions proximale et distale de la chaîne méromycolique (Figure 7C). Les principaux acides

mycoliques produits par *M. tuberculosis* sont des  $\alpha$ -mycoliques, céto-mycoliques et méthoxy-mycoliques, tandis que *M. smegmatis* produit des acides  $\alpha$ - et époxy-mycoliques (Pawełczyk and Kremer, 2014). Ces modifications chimiques sont importantes pour l'intégrité de l'enveloppe. L'absence d'acides mycoliques oxygénés, par exemple, conduit à une rigidification et une baisse de perméabilité de l'enveloppe de *M. tuberculosis*, associée à une diminution de virulence dans la souris (Dubnau *et al.*, 2002).

Les acides mycoliques forment le feuillet interne de la mycomembrane. Il a été observé par microscopie électronique que cette membrane a la même épaisseur que la membrane plasmique (environ 7 nm), ce qui pose la question de l'agencement des acides mycoliques (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008). En effet, des acides mycoliques complètement allongés formeraient un feuillet membranaire d'au moins 40 nm, incompatible avec les mesures de microscopie. Il a été proposé que ceux-ci soient repliés sur eux-mêmes (Villeneuve *et al.*, 2005), formant une structure compacte où s'intercalent les lipides extractibles du feuillet externe (Zuber *et al.*, 2008).

### III.2.3) Les lipides extractibles de la mycomembrane

Les acides mycoliques du complexe mAGP forment le feuillet interne de la mycomembrane. Le feuillet externe est constitué de nombreux lipides non reliés par des liaisons covalentes au reste de l'enveloppe (Figure 5A). Ils sont dits « extractibles », car pouvant être extraits par l'usage de solvants organiques comme le chloroforme.

Il existe un grand nombre de familles de lipides extractibles, certaines ubiquitaires et nécessaires à la croissance cellulaire et d'autres espèces-spécifiques, pouvant jouer des rôles dans la structuration de l'enveloppe ou dans la protection des mycobactéries lors de stress (Minnikin and Brennan, 2020).

#### Les composés contenant des acides mycoliques

Certains lipides extractibles de la mycomembrane contiennent des acides mycoliques. Les plus abondants sont les mono- et dimycolates de tréhalose (TMM et TDM), essentiels à la

croissance de toutes les mycobactéries. Ce sont des molécules formées d'un tréhalose acylé par un ou deux acides mycoliques en position 6 pour le TMM et 6, 6' pour le TDM. La structure des acides mycoliques est la même que ceux qui estérifient l'arabinogalactane au sein du complexe mAGP (Pawelczyk and Kremer, 2014).

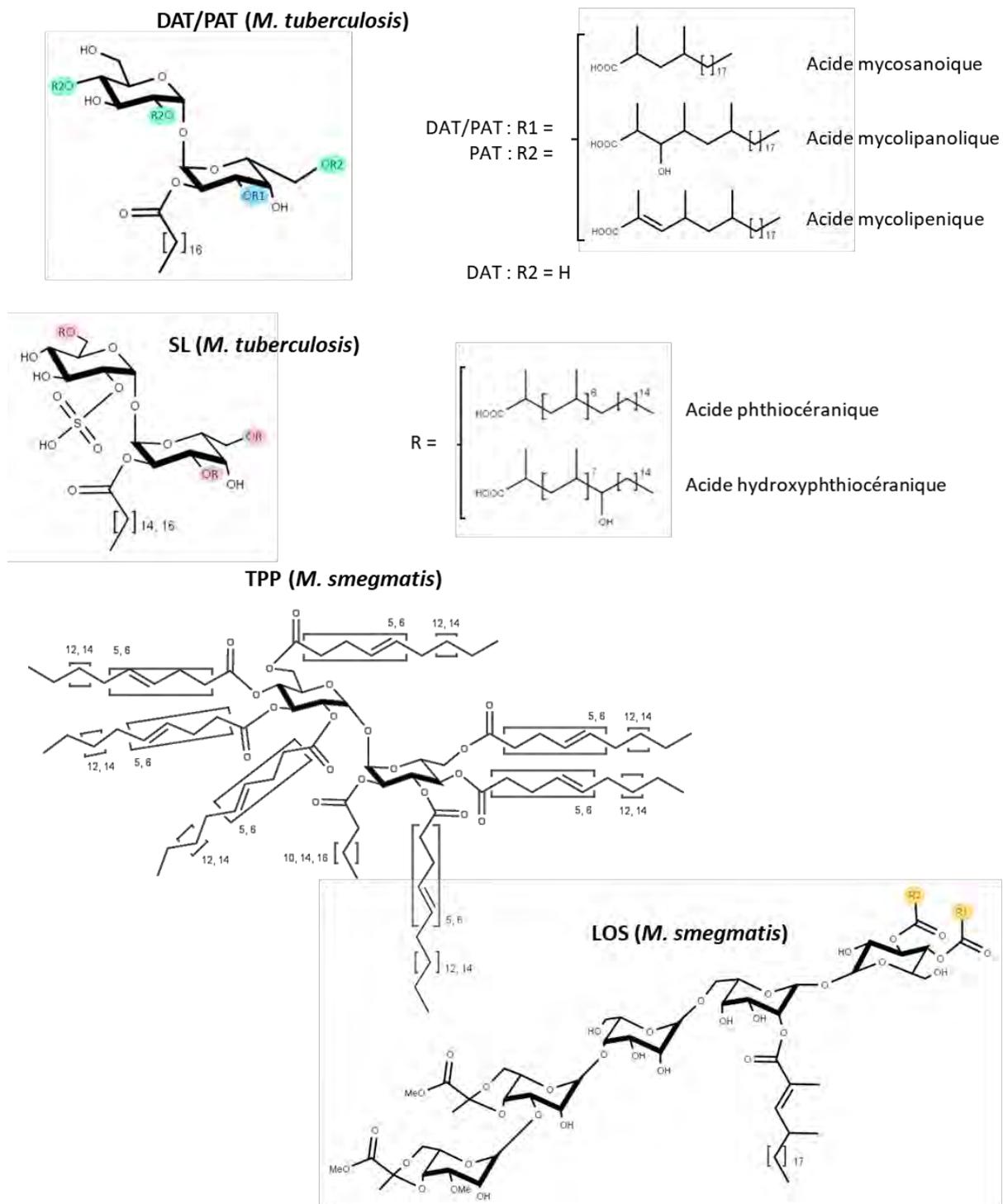
Le TDM est aussi appelé « cord factor » car il est à l'origine du phénotype agrégé en « cordes » du bacille tuberculeux (Bloch *et al.*, 1953). Le TDM joue un rôle très important dans la biologie des mycobactéries et la virulence des souches pathogènes. Des études réalisées sur *M. tuberculosis* ont montré qu'il empêche notamment l'acidification du phagosome (Axelrod *et al.*, 2008; Indrigo *et al.*, 2003). Le TDM est également important pour la formation du granulome, ainsi que pour sa vascularisation (Behling *et al.*, 1993; Walton *et al.*, 2018).

La mycomembrane contient également d'autres lipides composés d'acides mycoliques, bien que moins caractérisés. C'est le cas du monomycoloylglycerol, constitué d'un glycérol acylé par un acide mycolique et produit par *M. tuberculosis* et *M. bovis*, possédant des propriétés immunostimulatrices (Andersen *et al.*, 2009).

Les mono- et dimycoloyl diarabinoglycérols sont formés d'un glycérol lié à un ou deux arabinofuranoses, eux-mêmes estérifiés par des acides mycoliques (Rombouts *et al.*, 2012). Leur structure est identique au motif arabinomycoloyl terminal du mAGP, laissant suggérer que ces molécules pourraient provenir du catabolisme de l'arabinogalactane.

### Les lipides à tréhalose

Outre les TMM et TDM, les mycobactéries produisent d'autres lipides à tréhalose. Les di- et polyacyltréhaloses (DAT et PAT), sont produits par certaines espèces du complexe MTBC. Des formes de DAT et de triacyltréhalose (TAT) ont également été détectées chez *Mycolicibacterium fortuitum* (Gautier *et al.*, 1992). Ces molécules sont composées d'un acide palmitique ou stéarique en position 2 du tréhalose et de combinaisons d'un à quatre acides gras méthylés spécifiques, mycosanoïques (C24), mycolipéniques (C27) et mycolipanoliqes (C27) (Figure 8) (Besra *et al.*, 1992; Minnikin *et al.*, 1985). En absence de DAT/PAT, les bactéries peuvent toujours se multiplier mais elles présentent un phénotype très agrégé, indiquant des modifications de perméabilité au sein de l'enveloppe (Rousseau *et al.*, 2003). *In vitro*, il a été



**Figure 8 : Structure des lipides à tréhalose produits par *M. tuberculosis* et *M. smegmatis***

Structure des DAT/PAT de *M. tuberculosis* : les DAT sont acylés en positions 2 et 3 du tréhalose et les PAT en positions 2, 2', 3, 4' et 6 du tréhalose. Structure des SL de *M. tuberculosis* : l'espèce majoritaire chez *M. tuberculosis*, le SL-1, est acylé en positions 2, 3, 6 et 6' du tréhalose. Structure des TPP de *M. smegmatis*. Adapté de Burbaud *et al.*, 2016. Structure des LOS de *M. smegmatis* : R1 et R2 : acide gras caprylique (C8) ou myristique (C14)/palmitique (C16). Adapté de Bai *et al.*, 2015.

montré que ces lipides inhibent la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines pro-inflammatoires (Lee *et al.*, 2007; Saavedra *et al.*, 2001). Leur rôle dans la pathogénicité du bacille tuberculeux *in vivo* est, en revanche, peu marqué mais ils semblent exacerber l'action d'autres lipides, les dimycosérosates de phthiocérol (décrits ci-après), notamment au niveau du blocage de la maturation du phagosome et de la croissance intracellulaire des bactéries (Passemar *et al.*, 2014).

Les sulfolipides (SL) sont également des lipides à tréhalose, ayant pour particularité la présence d'un groupement sulfate en position 2' du tréhalose. Ce dernier est acylé par un acide palmitique ou stéarique en position 2 et jusqu'à trois acides gras méthylés phthiocéraniques ou hydroxyphthiocéraniques en position 3, 6 et 6' (Figure 8). La forme majoritaire est le SL-1, tétra-acylé (Layre *et al.*, 2011). Les SL ont jusqu'à présent seulement été isolés chez le bacille tuberculeux et chez la souche ancestrale *M. canettii*. *In vitro*, ils sont impliqués dans le blocage de l'acidification du phagosome ainsi que dans la production de cytokines (Brozna *et al.*, 1991). *In vivo*, comme les DAT/PAT, leur présence exacerbe l'effet des dimycosérosates de phthiocérol (Passemar *et al.*, 2014).

Les lipooligosaccharides (LOS) sont constitués d'une molécule de tréhalose acylée par deux acides gras méthylés avec une extension mono- ou oligosaccharidique (Figure 8) (Hunter *et al.*, 1983). Le nombre et la nature des unités saccharidiques sont variables et dépendants de l'espèce mycobactérienne. Ils sont produits par plusieurs espèces, dont le pathogène opportuniste *M. marinum* et *M. canettii* du complexe MTBC (Bai *et al.*, 2015). Ils sont également retrouvés chez *M. smegmatis*, mais pas dans la souche de laboratoire la plus étudiée, mc<sup>2</sup>-155. La perte des LOS, responsable de la transition d'un morphotype lisse (S, de l'anglais smooth) vers un morphotype rugueux (R, rough) semble être un événement clé de l'évolution du bacille tuberculeux d'une souche environnementale vers un pathogène efficace (Boritsch *et al.*, 2016). La présence de nombreux sucres font des LOS des molécules très immunogènes. Ils sont impliqués dans la formation des biofilms, dans la capacité des bactéries à bouger par glissement, ainsi que dans l'infection des macrophages (Ren *et al.*, 2007).

Enfin, les polyphléates de tréhalose (TPP) sont des molécules comprenant un tréhalose acylé par un acide gras simple (C14-C18) et jusqu'à sept acides phléiques, des acides gras polyinsaturés d'environ quarante atomes de carbone (Figure 8). Le nom de ces acides gras provient de l'espèce environnementale *Mycolicibacterium phlei* dans laquelle les TPP ont été

originellement identifiés, il y a presque cinquante ans (Asselineau *et al.*, 1972). Une étude récente a montré que ces lipides sont, en réalité, produits par de nombreuses MNT, y compris le modèle de laboratoire *M. smegmatis* et le pathogène opportuniste *M. abscessus* (Burbaud *et al.*, 2016). Le rôle de ces lipides très hydrophobes, situés en surface de la bactérie mais également dans les couches plus profondes de l'enveloppe, est peu caractérisé. Selon une étude, leur présence est corrélée avec la formation de cordes chez le morphotype R de *M. abscessus*, plus virulent que le morphotype S. En revanche les TPP purifiés ne présentent pas de toxicité envers les macrophages (Llorens-Fons *et al.*, 2017). Des études complémentaires, utilisant des souches déficientes en production de TPP sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ces lipides chez les mycobactéries.

### Les triacylglycérols et dérivés

Les triacylglycérols (TAG) sont des molécules contenant un glycérol acylé par trois acides gras simples. Comme pour les eucaryotes, les TAG servent au stockage de l'énergie de la cellule, une propriété particulièrement importante pour la survie des bacilles en condition d'infection (Maurya *et al.*, 2019). Bien qu'en grande partie présents sous forme de corps d'inclusions dans le cytoplasme, ces lipides sont également retrouvés en quantité non négligeable dans l'enveloppe (Bansal-Mutalik and Nikaido, 2014). Leur rôle précis dans ce compartiment reste encore à élucider.

Le monomeromycoloyl-diacylglycérol (mmDAG), également appelé monomycobacteroyl diacylglycérol, est un triacylglycérol particulier dont un des acides gras simple est remplacé par la chaîne principale d'un acide mycolique (la chaîne méromycolique) (Kremer *et al.*, 2005). Ce lipide est présent en faibles quantités dans l'enveloppe de certaines mycobactéries parmi lesquelles le pathogène *Mycobacterium kansasii* et l'espèce environnementale *M. smegmatis* et pourrait avoir des rôles similaires au triacylglycérol dans le stockage d'énergie. Il est également évoqué que ce lipide pourrait servir de donneur de chaîne méromycolique pour la synthèse des acides mycoliques (Kremer *et al.*, 2005).

### Les dimycosérosates de phthiocérol et dérivés

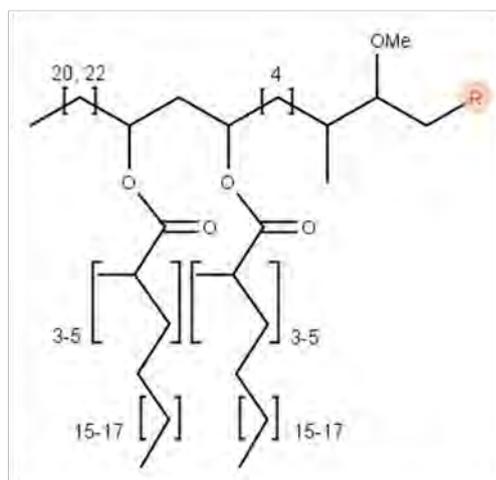
Les dimycosérosates de phthiocérol (DIM) sont composés d'une longue chaîne  $\beta$ -diols appelée chaîne phthiocérol, acylée par deux acides mycosérosiques, des acides gras polyméthylés (Figure 9). Ces molécules très hydrophobes sont produites par un nombre limité de mycobactéries pathogènes à croissance lente, parmi lesquelles *M. tuberculosis*, *M. leprae* et *M. bovis* (Daffe and Laneelle, 1988). Bien que non essentiels, les DIM participent au caractère particulièrement hydrophobe de l'enveloppe de ces mycobactéries (Camacho *et al.*, 2001). Ils sont également fortement impliqués dans leur virulence chez divers modèles animaux dont la souris (Camacho *et al.*, 1999). Dans un modèle d'embryon de zebrafish, les DIM empêchent la reconnaissance de *M. marinum* par les récepteurs Toll-like (TLR) des cellules hôtes, ce qui bloque le recrutement de macrophages microbicides (Cambier *et al.*, 2014). De par leur forme conique, les DIM ont également la capacité de s'insérer dans la membrane du phagosome, causant sa rupture et l'apoptose de la cellule hôte (Augenstreich *et al.*, 2019, 2017).

Les glycolipides phénoliques (PGL) sont produits par les mêmes espèces mycobactériennes que celles qui produisent les DIM. Ils sont constitués de la chaîne  $\beta$ -diols acylée par deux acides mycosérosiques présente chez les DIM mais celle-ci est liée à un noyau phénol glycosylé par un à trois sucres de nature différente selon l'espèce (Figure 9) (Daffé *et al.*, 1987). Le rôle des PGL dans la pathogénicité des mycobactéries est moins marqué que celui des DIM et ils ne sont pas produits par toutes les souches au sein d'une même espèce. Pour certaines souches de *M. tuberculosis* naturellement productrices de PGL comme la souche HN878, ceux-ci sont directement reliés à la virulence de la bactérie *in vivo* (Tsenova *et al.*, 2005). En revanche, aucun gain de virulence n'est observé lorsque ces lipides sont artificiellement exprimés dans la souche H37Rv lors d'infections de souris et de rats (Sinsimer *et al.*, 2008).

### Les glycopeptidolipides

Les glycopeptidolipides (GPL) sont des molécules complexes formées d'un noyau peptido-amino-alcool central : le D-phénylalanine-D-*allo*-thréonine-D-alanine-L-alaninol, acylé par un acide gras à longue chaîne hydroxylé ou méthoxylé (C28-30) (Figure 10). Plusieurs

### DIM



### PGL

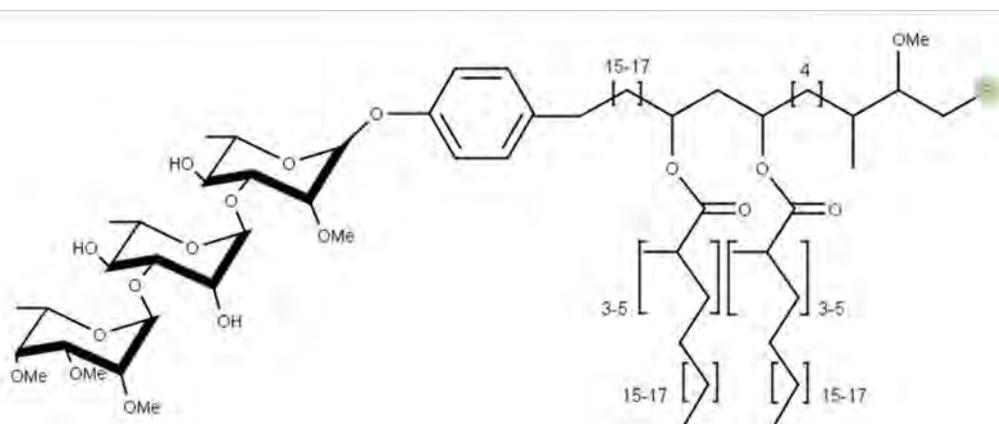


Figure 9 : Structure des DIM et des PGL de *M. tuberculosis*

Structure des DIM. R : CH<sub>3</sub> ou H. Structure des PGL. R : CH<sub>3</sub> ou H. Adapté de Neyrolles et Guilhot, 2011.

unités saccharidiques sont greffées sur ce lipopeptide : un 6-deoxy- $\alpha$ -L-talose est lié à la thréonine et un  $\alpha$ -L-rhamnose est lié à l'alaninol, ces sucres étant O-méthylés ou O-acétylés à diverses positions en fonction des espèces (Brennan and Goren, 1979).

Les GPL sont produits par diverses familles de MNT, y compris *M. smegmatis* et les pathogènes opportunistes *M. abscessus* et *M. avium*. Ils constituent, avec les acides mycoliques, la majorité des lipides présents dans la mycomembrane de ces mycobactéries (Bansal-Mutalik and Nikaido, 2014). Les GPL sont impliqués dans la capacité des bactéries à bouger en glissant, ainsi qu'à faire des biofilms. Ils sont aussi impliqués dans la morphologie des colonies, la perte des GPL étant à l'origine de la transition du morphotype S vers le morphotype R. Ce dernier est caractérisé par une hydrophobicité accrue de l'enveloppe, une forte agrégation et capacité à former des cordes ainsi qu'une plus forte virulence dans les modèles cellulaires et animaux (Catherinot *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2006). Enfin, les GPL stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires et semblent impliqués dans le blocage de l'acidification du phagosome, mais leur rôle précis au cours de l'infection reste encore à élucider (Schorey and Sweet, 2008).

#### III.2.4) La capsule

L'enveloppe mycobactérienne, comme les enveloppes Gram-négative et Gram-positive, est entourée d'une capsule. Cette structure est très labile et son observation dépend des conditions de culture utilisées (absence de détergent et d'agitation). Son observation par microscopie cryo-électronique montre une structure peu dense aux électrons, pouvant atteindre 40 nm d'épaisseur (Figure 11A) (Sani *et al.*, 2010).

La capsule des mycobactéries est constituée majoritairement de polysaccharides et de protéines, en quantités variables. *M. leprae* et *M. avium* constituent des exceptions pour lesquelles d'importantes quantités de glycolipides spécifiques (PGL et GPL) sont retrouvés. Les polysaccharides principaux sont l' $\alpha$ -D-glucane, un homopolymère de glucose de haut poids moléculaire (Figure 11B), le D-arabino-D-mannane (AM), un hétéropolymère de mannose et d'arabinose et un homopolymère de mannose, l' $\alpha$ -D-mannane (Daffé *et al.*, 2014).

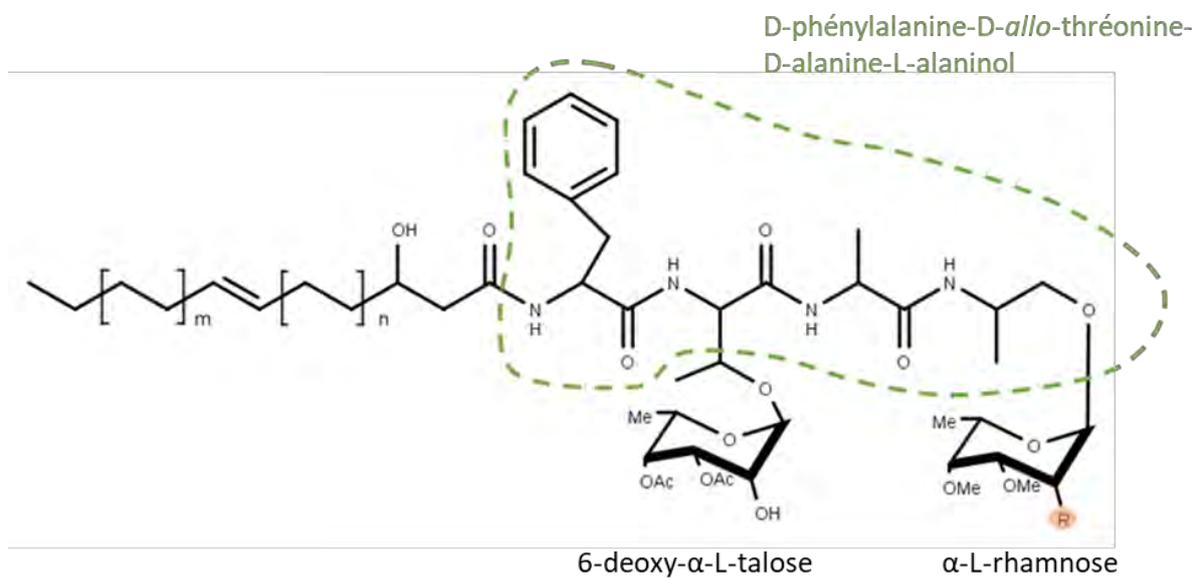


Figure 10 : Structure des GPL de *M. smegmatis*

R : OH, OCH<sub>3</sub> ou O-succinyl, n+m = 28.

La structure du AM est identique à celle du LAM (sans l'ancre lipidique phosphatidyl-*myo*-inositol), suggérant que ces molécules sont synthétisées par les mêmes voies de biosynthèse.

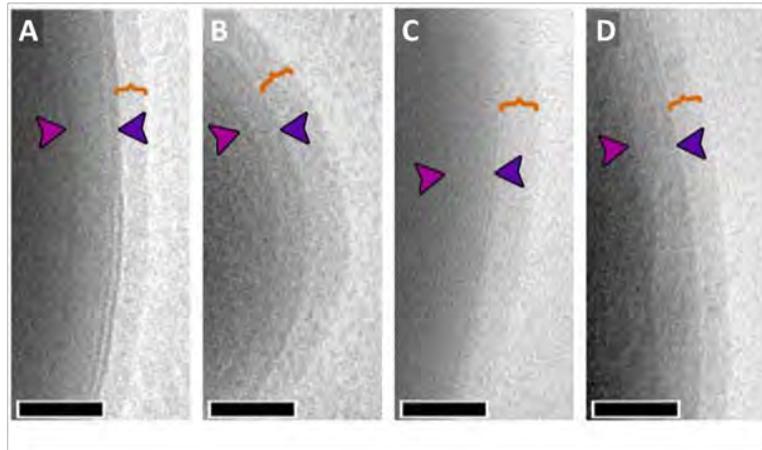
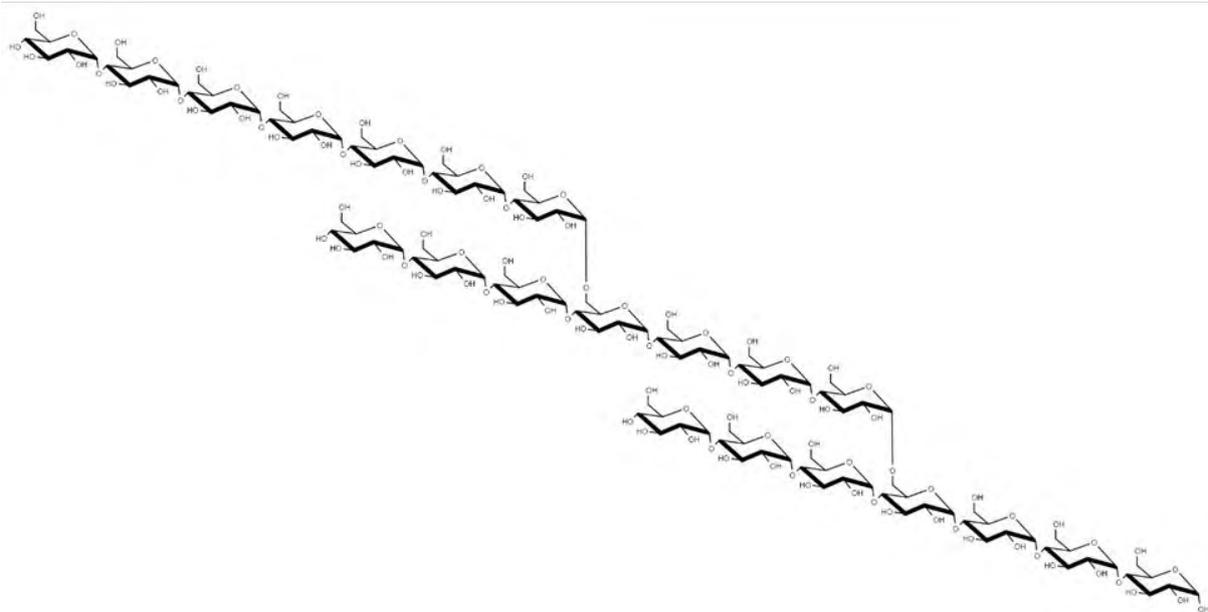
Plusieurs études sur des modèles cellulaires ont mis en évidence le rôle de la capsule dans la pathogénie des mycobactéries. L' $\alpha$ -D-glucane est notamment impliqué dans l'initiation de l'infection, plus particulièrement pour la liaison de la bactérie au macrophage via le récepteur du complément CR3 (Cywes *et al.*, 1997). Cette molécule est également reconnue par le récepteur DC-SIGN présent sur les cellules dendritiques et module la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Geurtsen *et al.*, 2009). Concernant les polysaccharides AM et l' $\alpha$ -D-mannane, il a été suggéré qu'en raison de leur structure très proche du LAM et de leur localisation en surface de l'enveloppe ces molécules aient des effets similaires au LAM (Kalscheuer *et al.*, 2019).

Les protéines contenues dans la capsule sont moins bien connues. Une étude récente sur la capsule de *M. marinum* a mis en évidence que beaucoup d'entre elles sont exportées par le système de sécrétion ESX-I (Sani *et al.*, 2010). Parmi ces protéines, le facteur de virulence ESAT-6 est retrouvé en importante quantité.

## IV. Biosynthèse des lipides de la mycomembrane

### IV.1) Les loci chromosomiques dédiés à la biosynthèse des lipides de la mycomembrane

Les gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport de la plupart des lipides de la mycomembrane sont regroupés au niveau de régions chromosomiques, ou loci, dédiées à la production de chacune des classes de lipides (Figure 12). La délétion individuelle des gènes de

**A****B**

**Figure 11 : La capsule mycobactérienne**

**A.** Images de microscopie électronique de la capsule de *M. smegmatis* (A), *M. tuberculosis* (B), *M. marinum* (C) et *M. bovis* BCG (D), signalée par les parenthèses oranges. Les flèches roses indiquent la présence de la membrane plasmique, les flèches bleues foncées indiquent la présence de la mycomembrane. Barre d'échelle : 100 nm. Adapté de Sani *et al.*, 2010.

**B.** Structure de l' $\alpha$ -D-glucane de *M. tuberculosis*, un polymère constitué de chaînes de glucose liées en  $\alpha$ -1,4 et ramifiées en  $\alpha$ -1,6. Adapté de Kalscheuer *et al.*, 2019.

ces différents loci a permis le décryptage des voies de biosynthèse de ces lipides, par analyse du phénotype des mutants obtenus.

La biosynthèse des principaux constituants de la mycomembrane nécessite l'action concertée de plusieurs familles d'enzymes conservées. Les polykétides synthases (Pks) permettent la synthèse des acides gras entrant dans la composition de ces molécules. Les protéines FadD (fatty acyl degradation) sont impliquées en amont des Pks, dans l'activation de leur substrat. Les Pap (pour protéines associées aux Pks) sont des acyltransférases qui transfèrent les acides gras synthétisés par les Pks sur une molécule acceptrice (comme le tréhalose) pour former le produit final ou un précurseur. Par ailleurs, de nombreuses enzymes supplémentaires, comme des acyltransférases et des glycosyltransférases, interviennent spécifiquement dans la biosynthèse de certains lipides extractibles (Daffé *et al.*, 2014). Les produits finaux ou leurs précurseurs sont ensuite transportés à travers la membrane plasmique par la famille de transporteurs MmpL (pour Mycobacterial membrane protein Large), puis exportés vers la mycomembrane.

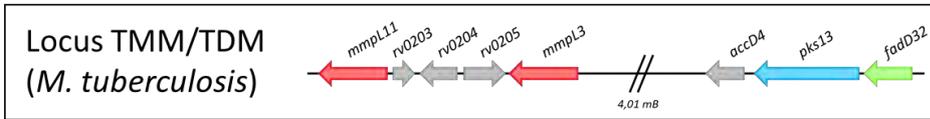
## IV.2) Les protéines impliquées dans la biosynthèse des lipides de la mycomembrane

### IV.2.1) Les systèmes FAS

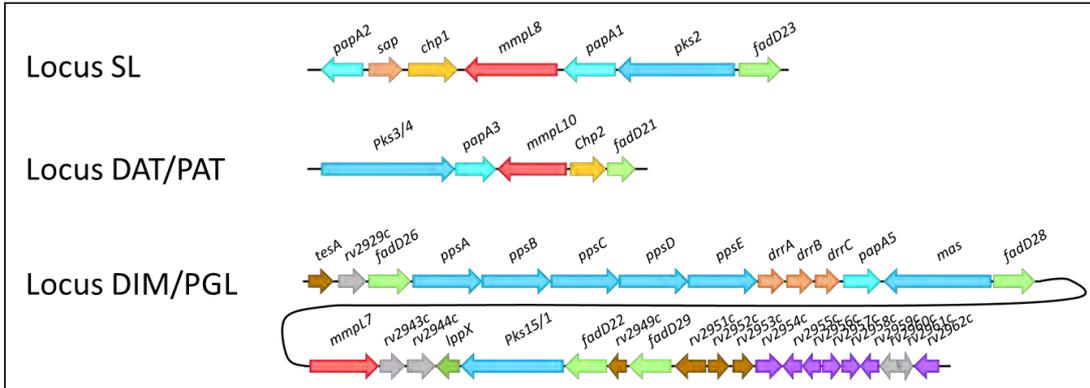
Chez les mycobactéries, la synthèse des acides gras est réalisée par deux systèmes FAS (de l'anglais Fatty Acid Synthase), FAS I et FAS II. FAS I est une enzyme multifonctionnelle permettant la synthèse *de novo* d'acides gras simples en C16-C18 et C24-C26. Le système FAS II est, quant à lui, un complexe multi-enzymes impliqué dans la synthèse de la chaîne méromycolique qui compose les acides mycoliques (Marrakchi *et al.*, 2014).

Les acides gras synthétisés par le système FAS I sont ensuite pris en charge par des Pks pour former, après élongation, les acides gras spécifiques composant chacune des familles de lipides extractibles.

## Ubiquitaire



## *M. tuberculosis*



## *M. smegmatis*

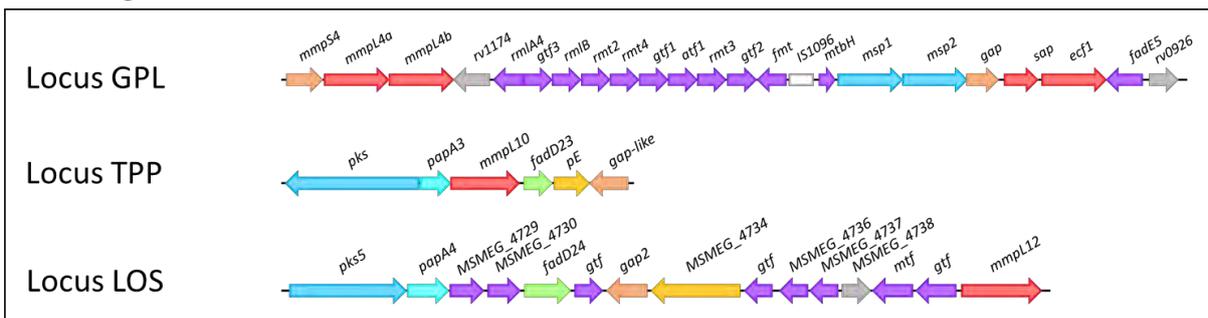


Figure 12 : Les loci chromosomiques associés à la biosynthèse et au transport des lipides extractibles mycobactériens

Représentation des loci chromosomiques liés à la biosynthèse et au transport des lipides extractibles ubiquitaires (TMM/TDM, le locus présenté ici est celui de *M. tuberculosis*), produits par *M. tuberculosis* (SL, DAT/PAT, DIM/PGL) et produits par *M. smegmatis* (GPL, TPP, LOS). Code couleur : vert clair : gène codant pour une FAAL, vert foncé : gène codant pour une lipoprotéine, bleu clair : gène codant pour une transacylase Pap, bleu foncé : gène codant pour une Pks ou Nrps, rose : gène codant pour un transporteur MmpL, orange : gène codant pour une protéine associée au transport, jaune : gène codant pour une acyltransférase, violet : gène codant pour une protéine impliquée dans l'activation, le transfert et la modification des sucres, méthyltransférases, acétyltransférases, pyruvyltransférases, marron : gène codant pour une protéine impliquée dans l'activation et la modification des lipides, blanc : séquence mobile, gris : gène codant pour une protéine de fonction inconnue.

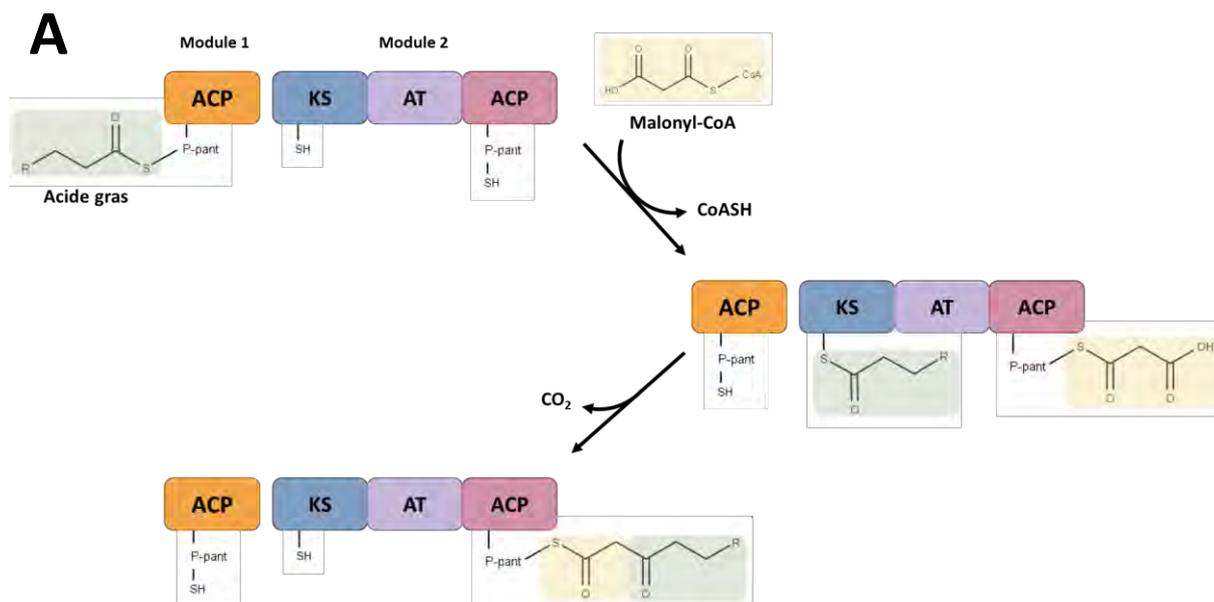
#### IV.2.2) Les polykétides synthases

Les Pks sont des enzymes multifonctionnelles, structurellement et fonctionnellement proches des systèmes FAS. Ces enzymes synthétisent des polykétides, des métabolites secondaires abondamment retrouvés dans le monde vivant, par condensation successive d'unités d' $\alpha$ -carboxyacyl-Coenzyme A (CoA) (Quadri, 2014).

Parmi les trois types de Pks existantes (types I, II et III), seules les Pks de type I sont impliquées dans la synthèse des lipides extractibles chez les mycobactéries (Quadri, 2014). Ces dernières sont constituées d'une chaîne polypeptidique de haut poids moléculaire comportant plusieurs domaines catalytiques regroupés sur un ou plusieurs modules. Ces Pks peuvent être modulaires, c'est-à-dire qu'elles ne réalisent qu'une seule réaction de condensation lors de l'élongation de la chaîne d'acide gras, le produit de la réaction pouvant éventuellement être ensuite transféré sur une autre Pks, ou itératives, c'est-à-dire qu'elles réalisent plusieurs cycles de condensation successifs (Herbst *et al.*, 2018).

Les Pks de type I possèdent trois domaines principaux : le domaine porteur ACP (pour acyl-carrier protein) et les domaines AT (acyltransférase) et KS ( $\beta$ -ketoacyl synthase). Le domaine ACP permet de retenir covalamment la chaîne d'acide gras en cours de synthèse, par l'intermédiaire d'un bras phospho-pantéthéine (P-pant), greffé de façon post-traductionnelle sur l'ACP par une 4'-phosphopantéthéinyl transférase essentielle chez les mycobactéries (Chalut *et al.*, 2006).

Le processus de condensation débute par le chargement d'une unité d'élongation (malonyl-CoA ou méthyl-malonyl-CoA) activée sous forme d'acyl-CoA sur le domaine ACP via le domaine AT (Figure 13A). La chaîne en cours d'élongation présente sur le domaine ACP d'une autre Pks est ensuite transférée sur un résidu cystéine du domaine KS, avant condensation avec l'unité d'élongation et transfert sur le domaine ACP. Le produit de cette réaction est ensuite transféré au domaine KS, afin de libérer le domaine ACP. Une nouvelle unité d'élongation est alors chargée sur ce domaine et le cycle recommence jusqu'à ce que le produit ait atteint sa taille finale (Dutta *et al.*, 2014).



**B**

	Voie de biosynthèse	Pks (s)	Type I ...	Référence
<b>Mtb</b>	Mycolates	Pks13	Itérative	Portevin <i>et al.</i> , 2004
	DAT/PAT	Pks3/4	Itérative	Dubey <i>et al.</i> , 2002
	SL	Pks2	Itérative	Sirakova <i>et al.</i> , 2001
	DIM/PGL	PpsA, B, C, D, E Mas	Modulaires Itérative	Camacho <i>et al.</i> , 2001 Rainwater and Kolattukudy, 1985
	PGL	Pks15/1	Itérative	Constant <i>et al.</i> , 2002
<b>Msmeg</b>	TDM	Pks13	Itérative	Portevin <i>et al.</i> , 2004
	TPP	Pks	Itérative	Burbaud <i>et al.</i> , 2016
	LOS	Pks5	Itérative	Etienne <i>et al.</i> , 2009

**Figure 13 : Les Pks impliquées dans la biosynthèse des lipides de la mycomembrane**

**A.** Réaction de condensation d'une Pks de type I. Un acide gras activé est fixé sur le bras P-pant du domaine ACP d'un premier module de la Pks puis transféré sur le domaine ketoacyl synthase (KS) d'un second module. Le domaine acyltransférase (AT) transfère une unité d'élongation malonyl-CoA sur le bras P-pant du domaine ACP. Cette unité est utilisée pour allonger l'acide gras de deux carbones par une réaction de condensation de Claisen et une décarboxylation. Adapté de Trivedi *et al.*, 2004.

**B.** Les Pks impliquées dans la synthèse des lipides extractibles de la mycomembrane chez *M. tuberculosis* (*Mtb*) et *M. smegmatis* (*Msmeg*).

Certaines Pks contiennent également des domaines dits optionnels, permettant de modifier la structure chimique du polykétide en cours de synthèse. Ainsi, les domaines KR ( $\beta$ -ketoacyl reductase), DH (déhydratase) et ER (enoyl reductase) permettent respectivement de réduire le groupement cétone généré lors de la réaction de condensation en fonction hydroxyle, de former une double liaison par déshydratation et de réduire la double liaison formée par le domaine DH en une simple liaison. Le domaine TE (thioester) permet de libérer le polykétide synthétisé du domaine ACP de la Pks après l'élongation.

De nombreuses Pks sont impliquées dans la synthèse des lipides extractibles chez les mycobactéries (Figure 13B). Le génome de *M. tuberculosis* possède 24 gènes annotés *pks*, dont plus d'une dizaine sont impliqués dans la biosynthèse des lipides extractibles de l'enveloppe (Quadri, 2014). Celui de *M. smegmatis* en contient 5, dont au moins 3 d'entre eux sont impliqués dans la biosynthèse des lipides extractibles (données personnelles).

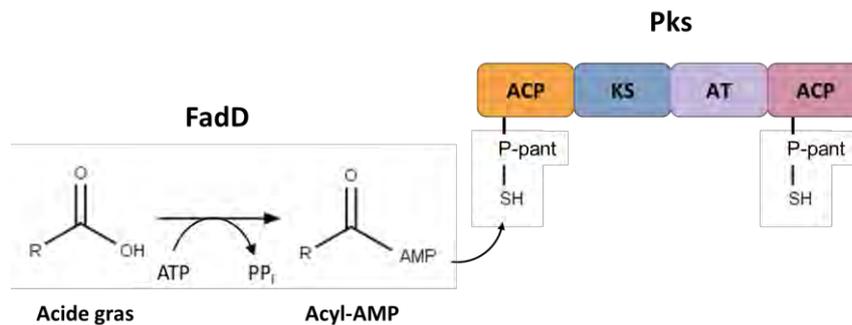
#### IV.2.3) Les peptides synthétases non ribosomiques

Les peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) sont des enzymes permettant la synthèse de peptides, sans ARN messager ni traduction par les ribosomes. Similairement aux Pks, elles sont formées de plusieurs modules et synthétisent le peptide par condensation d'acides aminés. La biosynthèse des GPL implique deux NRPS, Mps1 et Mps2, qui permettent la formation du tripeptide-amino-alcool central (Mukherjee and Chatterji, 2012).

#### IV.2.4) Les protéines FadD

Les protéines FadD permettent l'activation et le transfert des acides gras sur les Pks, avant élongation par ces dernières. Une étude a permis de classer celles-ci en deux groupes : les FAAL (fatty-acyl-CoA ligases) activent le substrat sous forme d'acyl-CoA et les FAAL (fatty-acyl-AMP-ligases) activent l'acide gras sous forme d'acyl-AMP (Figure 14A) (Trivedi *et al.*, 2004). Les protéines FadD participant à la biosynthèse des lipides extractibles appartiennent

**A**



**B**

	Voie de biosynthèse	FadD	Substrat	Pks	Référence
<b>Mtb</b>	Mycolates	FadD32	Acide méromycolique	Pks13	Gavalda <i>et al.</i> , 2009
	DAT/PAT	FadD21	Acide gras banal C16-C18	Pks3/4	Belardinelli <i>et al.</i> , 2014
	SL	FadD23	Acide gras banal C16-C18	Pks2	Lynett and Stokes, 2007
	DIM	FadD26 FadD28	Acide gras C18-C20 Acide gras banal C16-C18	PpsA Mas	Camacho <i>et al.</i> , 2001
	PGL	FadD29 FadD28 FadD22	Acide <i>p</i> -hydroxyphenylalkanoïque Acide gras banal C16-C18 Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	PpsA Mas Pks15/1	Siméone <i>et al.</i> , 2010 Camacho <i>et al.</i> , 2001 He <i>et al.</i> , 2009
<b>Msmeg</b>	TDM	FadD32	Acide méromycolique	Pks13	Gavalda <i>et al.</i> , 2009
	TPP	FadD23	Acide gras banal C16-C18	Pks	Burbaud <i>et al.</i> , 2016
	LOS	FadD24	Acide gras banal C16-C18	Pks5	Etienne <i>et al.</i> , 2009

Figure 14 : Les protéines FadD impliquées dans la biosynthèse des lipides de la mycomembrane

**A.** Mode d'action des enzymes FadD. Adapté de Arora *et al.*, 2009.

**B.** Les FadD impliquées dans la synthèse des lipides de la mycomembrane chez *M. tuberculosis* (*Mtb*) et *M. smegmatis* (*Msmeg*).

à ce second groupe (Figure 14B). Le génome de *M. tuberculosis* contient 36 gènes codant pour de potentielles protéines FadD (Trivedi *et al.*, 2004), dont au moins 8 sont impliquées dans la biosynthèse des lipides de la mycomembrane.

#### IV.2.5) Les protéines Pap

Les protéines Pap sont des acyltransférases qui catalysent le transfert du produit d'une Pks sur une molécule acceptrice (tréhalose, dialcool...) (Figure 15). En effet, chez *M. tuberculosis*, hormis Pks13, impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques et Pks6 dont la fonction reste inconnue, les Pks ne possèdent pas de domaine thioester (TE) permettant de libérer le polykétide synthétisé. Les Pap possèdent le motif HX<sub>3</sub>DX<sub>14</sub>Y caractéristique des acyltransférases de la famille AtfA (Onwueme *et al.*, 2004).

#### IV.2.6) Les acyltransférases (hors Pap)

Des acyltransférases autres que les Pap sont impliquées dans des étapes tardives de la biosynthèse des lipides extractibles et participent à l'élaboration des produits finaux. Parmi ces enzymes, les plus documentées sont les antigènes 85 (85A, 85B et 85C), responsables du transfert des acides mycoliques entre molécules de TMM pour former le TDM ou sur les extrémités non réductrices de l'arabinogalactane pour former le mAGP. Ces protéines abondamment présentes dans l'enveloppe mycobactérienne ne sont pas essentielles individuellement pour la croissance des mycobactéries, mais leur délétion commune est létale. Elles présentent de fortes identités de séquence (65-80%) et des activités partiellement redondantes (Backus *et al.*, 2014). Les antigènes 85A et 85B présentent cependant une meilleure capacité à acyler le TMM que l'antigène 85C, qui lui est plus efficace pour estérifier l'arabinane. Structuralement, ces trois enzymes sont très proches (Anderson *et al.*, 2001; Ronning *et al.*, 2004, 2000). Ce sont des  $\alpha/\beta$ -hydrolases dont l'activité est assurée par une triade catalytique Ser-Glu-His (Figure 16).

	Voie de biosynthèse	Pap	Substrat 1	Substrat 2	Pks associée	Référence
<b>Mtb</b>	DAT/PAT	PapA3	Acide mycolipénique	Tréhalose	Pks3/4	Hatzios et al., 2009
	SL	PapA1 PapA2	Palmitate Acide (hydroxy)- phtiocéranique	Tréhalose	Pks2	Kumar et al., 2007
	DIM/PGL	PapA5	(Phénol)phthiocerol	Acide mycosérosique	PpsABCDE, Mas	Onwueme et al., 2004
<b>Msmeg</b>	TPP	PapA3	Acide phléique	Tréhalose	Pks	Burbaud et al., 2016
	LOS	PapA4	Acide gras polyméthylé	Tréhalose	Pks5	Etienne et al., 2009

Figure 15 : Les protéines Pap impliquées dans la synthèse des lipides extractibles de la mycomembrane chez *M. tuberculosis* (*Mtb*) et *M. smegmatis* (*Msmeg*)

La biosynthèse des SL nécessite également l'action d'une acyltransférase, Chp1. Cette enzyme participe à la synthèse finale du SL principal de *M. tuberculosis*, le SL-1, par transacylation d'acides (hydroxy)phthiocéraniques sur le précurseur diacylé SL<sub>1278</sub> (Seeliger *et al.*, 2012). Chp1 est une enzyme possédant un domaine N-terminal ancré dans la membrane plasmique. Sa partie C-terminale cytosolique contient un domaine  $\alpha/\beta$ -hydrolase et une triade catalytique constituée des acides aminés Ser-Asp-His (Figure 16) (Chalut, 2016).

Chp2 est impliquée dans la biosynthèse des PAT, à partir du précurseur DAT. Comme Chp1, cette enzyme possède un domaine  $\alpha/\beta$ -hydrolase à son extrémité C-terminale (Figure 16). Cette enzyme possède également une séquence signal prédite contenant un domaine N-terminal transmembranaire ainsi qu'un site potentiel de clivage protéolytique, indiquant qu'elle pourrait être sécrétée dans l'enveloppe mycobactérienne (Chalut, 2016). Deux études ont publié des résultats contradictoires quant à sa localisation. Une première étude, après analyse de fractions subcellulaires de *M. smegmatis* exprimant artificiellement Chp2, a détecté la protéine dans le cytosol (Touchette *et al.*, 2015). Ce résultat a été confirmé en mesurant une activité  $\beta$ -galactosidase suite à la production de Chp2 fusionnée à cette enzyme dans *M. smegmatis*, la  $\beta$ -galactosidase étant uniquement active quand elle est localisée dans le cytosol. En utilisant d'autres protéines rapportrices de topologie, une autre étude a, au contraire, montré que le domaine catalytique de Chp2 était localisé dans le compartiment périplasmique de l'enveloppe (Belardinelli *et al.*, 2014).

La protéine PE est impliquée dans la biosynthèse des TPP, plus particulièrement dans le transfert d'acides phléiques sur le précurseur diacylé (Burbaud *et al.*, 2016). Comme Chp2, elle possède une séquence signal prédite en N-terminal ainsi qu'un domaine  $\alpha/\beta$ -hydrolase (Figure 16). Elle partage par ailleurs des identités de séquence notables avec Chp1 (39%) et Chp2 (45%).

Enfin, le locus LOS de *M. smegmatis* présente un gène (*MSMEG\_4734*) codant pour une protéine non caractérisée, également prédite pour posséder un domaine  $\alpha/\beta$ -hydrolase (Figure 16) (Chalut, 2016). Cette protéine pourrait être impliquée dans la production des LOS, bien qu'aucun gène orthologue ne soit retrouvé au niveau du locus LOS chez *M. marinum* et *M. canettii*.

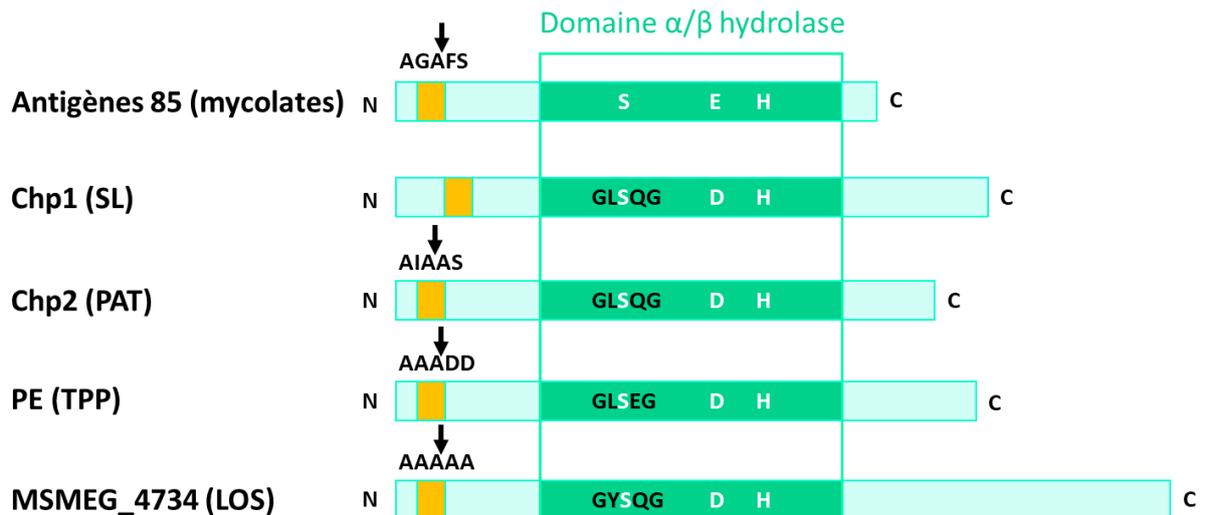


Figure 16 : Représentation schématique des acyltransférases impliquées dans les étapes finales de biosynthèse des mycolates, SL, PAT, TPP et LOS

Chaque protéine possède un domaine  $\alpha/\beta$  hydrolase et une triade catalytique composée des acides aminés sérine (S) - aspartate/glutamate (D/E) – histidine (H). Hormis les antigènes 85 (A, B, C), ces protéines possèdent un motif pentapeptide GXSXGXG/S entourant le résidu sérine. Les domaines transmembranaires prédits sont indiqués en jaune. Pour l'antigène 85, Chp2, PE et la protéine prédite MSMEG\_4737, ces domaines contiennent un site de clivage protéolytique potentiel (indiqué par des flèches). Adapté de Chalut, 2016.

## V. Le transport des lipides de la mycomembrane

Une fois synthétisés dans le cytosol, les lipides extractibles ou leurs précurseurs sont transportés jusqu'à la mycomembrane. Les mécanismes de ce transport sont encore peu caractérisés, mais requièrent l'action d'une famille de transporteur : les MmpL. D'autres protéines, comme des transporteurs ABC et des lipoprotéines, interviennent également dans le transport de certains lipides extractibles.

### V.1) Les transporteurs MmpL

Les transporteurs MmpL sont de larges protéines à douze hélices transmembranaires qui assurent le transport de lipides et de sidérophores à travers la membrane plasmique. Les gènes *mmpL* sont présents chez toutes les mycobactéries et des gènes orthologues sont également retrouvés chez les actinobactéries. La corynebactérie *C. glutamicum* contient par exemple quatre gènes *mmpL*, nommés *cmpL1-4* (Yang *et al.*, 2014). Chez les mycobactéries, le nombre de gènes codant pour des MmpL fonctionnels varie fortement selon l'espèce. Il y en a généralement moins dans les génomes des mycobactéries à croissance lente que dans ceux des mycobactéries à croissance rapide (Melly and Purdy, 2019). Par exemple, le génome minimal de *M. leprae* contient cinq *mmpL* tandis que celui du pathogène opportuniste à croissance rapide *M. abscessus* en contient une trentaine (Viljoen *et al.*, 2017).

#### V.1.1) Les MmpL impliqués dans le transport des lipides extractibles

Excepté pour les MmpL impliqués dans l'export des mycolates (MmpL3 et MmpL11), les gènes *mmpL* impliqués dans le transport des lipides extractibles sont présents au niveau des loci chromosomiques dédiés à la synthèse de ces lipides.

Le génome de *M. tuberculosis* contient douze gènes codant pour des MmpL potentiellement fonctionnels, dont plus de cinq sont directement impliqués dans le transport des lipides extractibles (Chalut, 2016). MmpL3, le transporteur des mycolates, est le seul MmpL à être essentiel chez les mycobactéries (Figure 17A) (Grzegorzewicz *et al.*, 2012). Cette essentialité en fait une cible particulièrement intéressante pour le développement de nouveaux antibiotiques ciblant *M. tuberculosis* mais également les MNT opportunistes comme *M. avium* et *M. abscessus* (Li *et al.*, 2014; W. Li *et al.*, 2018; Williams *et al.*, 2019).

Chez *C. glutamicum*, le transport des TMM par CmpL1 nécessite leur acétylation transitoire par la protéine TmaT, dont un orthologue est retrouvé chez *M. leprae* (Yamaryo-Botte *et al.*, 2015). La méthyltransférase MtrP semble également moduler cette activité de transport indépendamment de TmaT, selon un mécanisme qui reste inconnu (Rainczuk *et al.*, 2020). Chez *M. smegmatis*, le transport des TMM requiert également la présence de la protéine essentielle TtfA et de la protéine codée par le gène *MSMEG\_5308*, cette dernière étant surtout importante en condition de stress membranaire (voir partie V.2.4) (Fay *et al.*, 2019). Le transporteur MmpL11 intervient également dans le transport des mycolates, à travers l'export du mmDAG et des esters de cire (Figure 17A) (Pacheco *et al.*, 2013).

MmpL8 est le transporteur des SL, bien que la nature exacte du substrat transporté reste encore à confirmer. En effet, plusieurs études ont rapporté que le mutant  $\Delta mmpL8$  de *M. tuberculosis* ne produit pas de SL-1 mais accumule intracellulairement un précurseur diacylé, suggérant que ce dernier est le substrat de MmpL8 (Figure 17B) (Converse *et al.*, 2003; Layre *et al.*, 2011). De façon contradictoire, il a été montré par Seeliger et collègues que l'acyltransférase Chp1, responsable de la synthèse du SL-1 final à partir du précurseur diacylé, est localisée du côté cytosolique de la membrane plasmique, suggérant que MmpL8 transporte plutôt le SL-1 final (Seeliger *et al.*, 2012). Une explication de l'absence de SL-1 dans le mutant  $\Delta mmpL8$  pourrait être que l'activité acyltransférase de Chp1 est dépendante de la présence du transporteur à la membrane, mais le mutant  $\Delta mmpL8$  est toujours capable de produire des SL tri-acylés, bien que leur composition soit modifiée par rapport aux SL tri-acylés de la souche sauvage (Layre *et al.*, 2011). D'autres études sont donc nécessaires pour préciser le ou les substrats transportés par MmpL8.

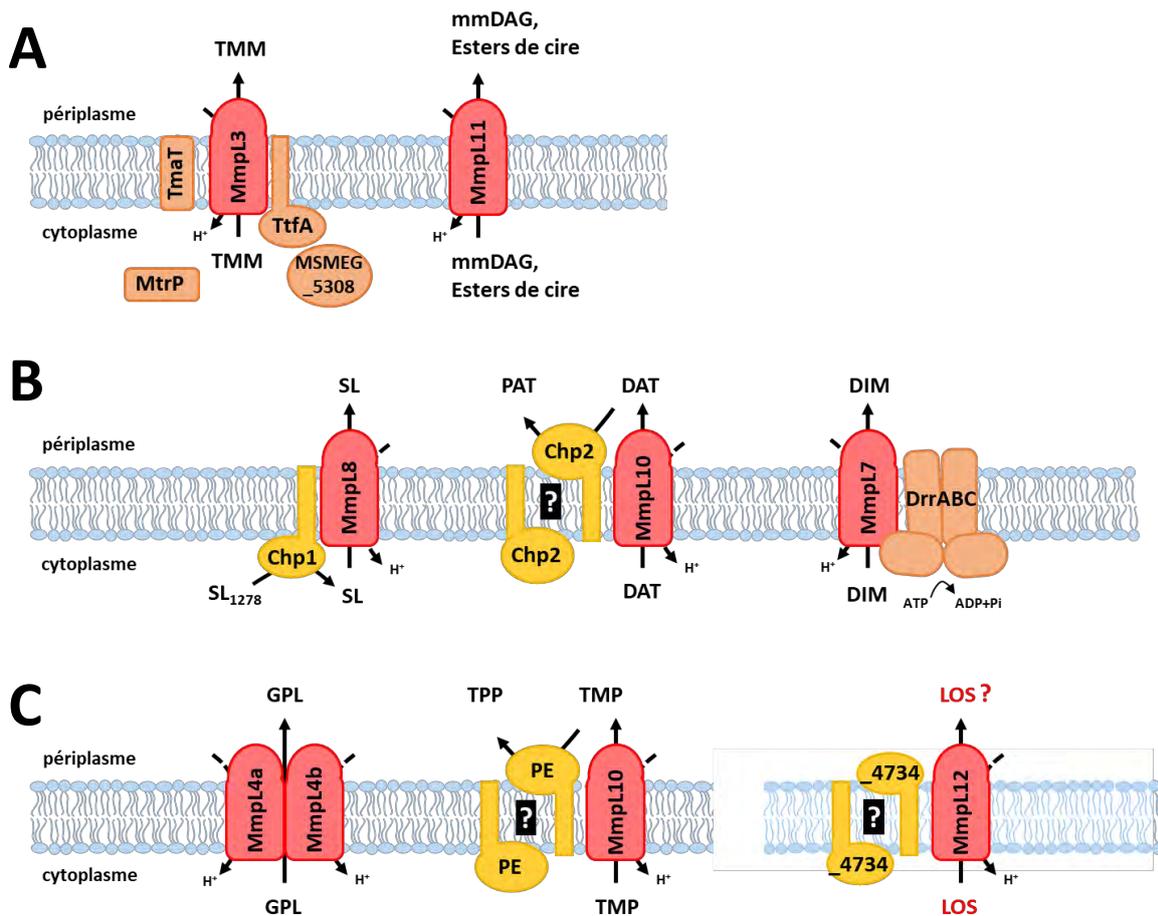


Figure 17 : Les MmpL impliqués dans le transport des lipides extractibles chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*

**A.** Représentation schématique des MmpL impliqués dans le transport des mycolates. Le transport des TMM nécessite la présence de la protéine TtfA. La protéine MSMEG\_5308 n'est pas essentielle pour le transport des TMM par MmpL3 mais pourrait permettre la stabilisation des protéines à la membrane, notamment lors d'un stress. Chez *C. glutamicum*, la protéine TmaT est responsable de l'acétylation transitoire du TMM, nécessaire à son export par l'orthologue de MmpL3. La méthyltransférase MtrP semble également moduler l'efficacité de transport du TMM, mais son mécanisme d'action demeure inconnu.

**B.** Représentation schématique des MmpL impliqués dans le transport des SL, des PAT et des DIM chez *M. tuberculosis*. Dans le cadre de la biosynthèse des PAT, le substrat transporté par MmpL dépend du sens d'orientation de l'acyltransférase Chp2 dans la membrane plasmique qui reste incertaine (points d'interrogations). Le transport des DIM nécessite également l'action du transporteur DrrABC, qui utilise l'ATP comme source d'énergie.

**C.** Représentation schématique des MmpL impliqués dans le transport des GPL, des TPP et hypothétiquement dans le transport des LOS chez *M. smegmatis*. Le transport des GPL nécessite deux MmpL, MmpL4a et MmpL4b. Pour la biosynthèse des TPP, le substrat transporté par MmpL10 dépend de la localisation de l'acyltransférase PE, qui est inconnue (points d'interrogations). Le gène codant pour MmpL12 est présent au niveau du locus LOS mais son implication dans le transport des LOS reste à vérifier expérimentalement. L'orientation de l'acyltransférase hypothétique codée par le gène MSMEG\_4734 est également inconnue.

Le transporteur MmpL10 intervient dans l'export des DAT/PAT. Le mutant  $\Delta mmpL10$  de *M. tuberculosis* présente une accumulation du précurseur DAT dans la bactérie, en accord avec un premier modèle selon lequel le DAT est le substrat du transporteur MmpL10 (Figure 17B) (Belardinelli *et al.*, 2014). Une autre étude a montré que le domaine catalytique de l'acyltransférase Chp2, responsable de la synthèse du PAT final à partir du DAT, est localisé sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (Touchette *et al.*, 2015). Ce résultat suggère que MmpL10 transporte le PAT final, ou bien que la présence du transporteur est requise pour l'activité de Chp2. Là encore, des études complémentaires sont requises pour déterminer la nature des composés transportés par MmpL10.

Enfin, le transporteur MmpL7, est responsable du transport des DIM et des PGL chez *M. tuberculosis* (Figure 17B) (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999). Contrairement aux autres MmpL, il ne comporte pas le résidu aspartate très conservé au niveau de l'hélice transmembranaire X, important pour l'activité proton-motrice (Bernut *et al.*, 2016). De plus, un autre transporteur, DrrABC, qui utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, est également requis pour le transport du DIM à travers la membrane plasmique (Figure 17B). L'absence de ce transporteur, tout comme l'absence de MmpL7, entraîne une accumulation intracellulaire de DIM (Camacho *et al.*, 2001). En conséquence, il a été proposé que le transporteur DrrABC pourrait compenser l'éventuelle perte de fonction liée à l'absence de l'aspartate sur l'hélice X de MmpL7.

Le génome de *M. smegmatis* contient seize gènes *mmpL*, dont au moins cinq sont directement impliqués dans le transport des lipides extractibles (Chalut, 2016). Comme chez *M. tuberculosis*, les transporteurs MmpL3 et MmpL11 de *M. smegmatis* sont impliqués dans le transport des mycolates (Figure 17A) (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2013). Les GPL sont les seuls lipides extractibles dont le transport requiert deux MmpL, MmpL4a et MmpL4b. La délétion des gènes de ces transporteurs dans *M. smegmatis* n'entraîne pas seulement un défaut de transport de ces lipides, mais également de leur synthèse, suggérant un couplage entre biosynthèse et transport (Figure 17C) (Nessar *et al.*, 2011; Recht *et al.*, 2000).

Le gène *mmpL10* est retrouvé au niveau du locus TPP. Son absence dans *M. smegmatis* entraîne l'accumulation intracellulaire du précurseur diacylé des TPP, le monophléate de tréhalose (TMP), suggérant que cette molécule est transportée par MmpL10 (Figure 17C)

(Burbaud *et al.*, 2016). Cependant, une petite quantité de précurseur est également retrouvée en surface du mutant  $\Delta mmpL10$ , suggérant qu'une autre protéine non identifiée pourrait également être impliquée dans le transport de ces lipides.

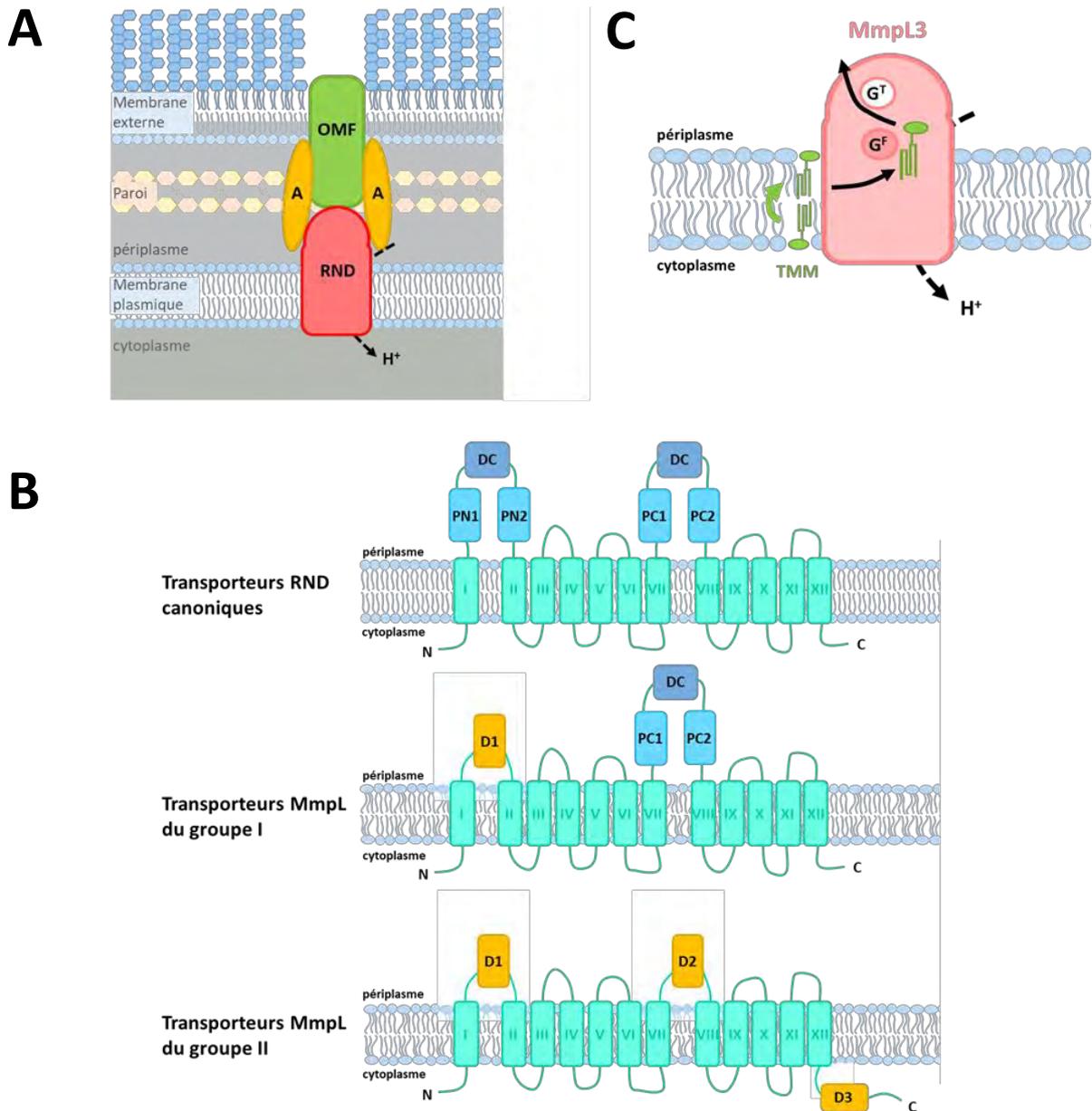
Enfin, le locus LOS de *M. smegmatis* présente également un gène codant pour un MmpL (MmpL12) probablement impliqué dans le transport de ce lipide, mais à ce jour, sa fonction n'est pas caractérisée (Figure 17C) (Etienne *et al.*, 2009; Rombouts *et al.*, 2011).

### V.1.2) Structure et mécanisme d'action des MmpL

Les MmpL font partie des transporteurs RND (pour Résistance, nodulation, division cellulaire), une superfamille retrouvée chez toutes les bactéries mais également chez les archées et les eucaryotes (Nikaido, 2018). Cette superfamille regroupe des protéines transmembranaires utilisant la force proton-motrice pour exporter ou importer une grande variété de composés incluant métaux lourds, lipides, sucres et antibiotiques (Yamaguchi *et al.*, 2015). Les transporteurs RND les mieux caractérisés sont les protéines AcrB et MexB des bactéries Gram-négatives *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Chez ces bactéries, elles forment des complexes tripartites, en association avec une protéine de la membrane externe (AcrA/MexA) et une protéine adaptatrice périplasmique (ToIC/OprM) (Figure 18A). Ces complexes traversent la totalité de l'enveloppe bactérienne, permettant l'efflux des composés directement du cytosol à la surface.

Les protéines RND s'associent en multimères (généralement homo/hétéro-trimères) dans la membrane plasmique. Chaque protéine est formée de deux domaines : un domaine transmembranaire à douze hélices  $\alpha$ , inséré dans la membrane plasmique, ainsi qu'un domaine périplasmique formé de deux larges boucles localisées entre les hélices I-II et VII-VIII (Figure 18B) (Murakami *et al.*, 2002; Sennhauser *et al.*, 2009). Chaque boucle contient deux sous-domaines porteurs, DP1 et DP2 et un domaine DC, en interaction avec la protéine adaptatrice.

Les transporteurs MmpL possèdent la même organisation générale, avec la présence de douze hélices transmembranaires et de deux boucles périplasmiques entre les hélices I-II et VII-VIII. La modélisation de la structure des MmpL de *M. tuberculosis*, par comparaison avec



**Figure 18 : Structure et mécanisme d'action des transporteurs MmpL**

**A.** Structure d'un complexe tripartite classiquement retrouvé chez les bactéries Gram-négatives, contenant un transporteur RND, une protéine de la membrane externe (Outer membrane factor, OMF) et deux protéines adaptatrices (A). Adapté de Yamaguchi *et al.*, 2015.

**B.** Représentation schématique de la topologie des transporteurs RND canoniques, des transporteurs MmpL du groupe I et du groupe II. Pour les transporteurs RND canoniques, les boucles périplasmiques sont composées des sous domaines porteurs PN1, PN2, PC1, PC2 et du domaine DC. Pour les transporteurs MmpL du groupe I, la seconde boucle périplasmique possède la même structure mais la première boucle périplasmique ne contient qu'un sous-domaine porteur D1. Les transporteurs MmpL du groupe II ne contiennent qu'un sous-domaine porteur au niveau de leurs boucles périplasmiques, D1 et D2. Ils contiennent en plus un domaine C-terminal cytosolique D3. Adapté de Chalut, 2016.

**C.** Mécanisme d'action proposé pour le transporteur MmpL3 de *M. smegmatis*.

(Suite de la Figure 18)

Après transport sur le feuillet périplasmique de la membrane plasmique (flèche verte), le TMM pénètre dans le transporteur MmpL3 via l'ouverture frontale ( $G^F$ ) et ressort dans le périplasme par l'ouverture supérieure ( $G^T$ ) (flèches noires). Adapté de Zhang *et al.*, 2019.

les structures des transporteurs RND canoniques, a permis de proposer leur classement en deux groupes phylogénétiques (Chim *et al.*, 2015). Le groupe I regroupe la plupart des MmpL (Figure 18B). Leur structure est similaire aux transporteurs RND les mieux décrits à l'exception de la première boucle périplasmique (entre les hélices I-II), qui comporte deux fois moins d'acides aminés et dont la structure correspond à la structure prédite d'un sous-domaine porteur (D1). Le groupe II comprend les MmpL3 et MmpL11 ainsi que MmpL13, absent chez *M. tuberculosis* mais présent chez *M. bovis* BCG, pour qui les deux boucles périplasmiques sont de taille réduite et ne comportent d'homologie qu'avec le sous-domaine porteur (D1 et D2) (Figure 18B). De plus, ces MmpL possèdent un long domaine C-terminal cytosolique et désordonné (D3). Ce domaine semble nécessaire pour la localisation du transporteur MmpL3 aux pôles des mycobactéries (Carel *et al.*, 2014; Fay *et al.*, 2019).

La récente résolution de la structure cristalline de MmpL3 de *M. smegmatis* par deux équipes de recherche indépendantes a permis de confirmer et d'apporter d'importantes précisions sur l'organisation de ce transporteur dans la membrane plasmique (Su *et al.*, 2019; B. Zhang *et al.*, 2019). Premièrement, les deux sous-domaines porteurs D1 et D2 sont entremêlés et créent une cavité hydrophobe à trois ouvertures : au sommet, à l'avant et à l'arrière. Ces ouvertures sont cernées de résidus hydrophiles, suggérant que le ligand de MmpL3, le TMM, pourrait y être logé. Ces observations ont permis de proposer un mécanisme de transport du TMM par MmpL3 (Figure 18C). Le TMM, situé sur le feuillet externe de la membrane plasmique, pénètre dans le transporteur via l'ouverture frontale ( $G_F$ ) qui est entourée de résidus hydrophiles ayant une forte affinité pour le tréhalose. Le TMM est ensuite libéré via l'ouverture située au sommet du transporteur ( $G_T$ ), celle-ci présentant moins de résidus hydrophiles et donc une affinité plus faible pour le tréhalose.

Ces données structurales ne permettent cependant pas de déterminer si, et comment, le TMM passe du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique. Une étude a proposé que MmpL3 est la flippase qui réalise cette action (Xu *et al.*, 2017). En utilisant un modèle de sphéroblaste de *M. smegmatis*, les auteurs ont montré qu'en inhibant l'activité

proton-motrice de MmpL3, le TMM n'était plus accessible à la digestion par la lipase LysB, car il n'était plus localisé sur le feuillet externe de la membrane plasmique. MmpL3 paraît donc avoir un double rôle, dans la translocation du TMM d'un feuillet à l'autre de la membrane plasmique et dans sa libération dans l'espace périplasmique, ces processus étant potentiellement couplés. Tous deux nécessitent un apport d'énergie qui est, dans le cas des MmpL, généré par le transfert de protons. Ce transfert est assuré par la présence de deux paires tyrosine-aspartate sur les hélices IV et X du transporteur, ces deux hélices se faisant face et constituant le centre du domaine transmembranaire de MmpL3. Ces paires d'acides aminés sont conservées chez toutes les MmpL, hormis MmpL7 chez qui l'aspartate de l'hélice X est remplacée par une proline (Bernut *et al.*, 2016).

Les transporteurs RND sont connus pour s'associer en dimères ou trimères. Par des approches de microscopie électronique et de modélisation, Belardinelli et collègues ont proposé que le transporteur MmpL3, ainsi que le transporteur CmpL1 de *C. glutamicum* forment des homotrimères dans la membrane plasmique (Belardinelli *et al.*, 2016). Cependant, les deux structures indépendantes de MmpL3 obtenues par cristallographie aux rayons X ne montrent aucune organisation multimérique pour ce transporteur (Su *et al.*, 2019; B. Zhang *et al.*, 2019).

## V.2) Les autres protéines associées au transport des lipides de la mycomembrane

### V.2.1) Les protéines MmpS

Les protéines MmpS (pour Mycobacterial membrane protein Small), constituent une famille de protéines dont les gènes sont souvent localisés à proximité des gènes codant pour des MmpL. Ces protéines sont prédites pour posséder un domaine N-terminal en hélice  $\alpha$  transmembranaire et un domaine C-terminal localisé dans le périplasme (Wells *et al.*, 2013).

Le génome de *M. tuberculosis* possède cinq gènes *mmpS* (*mmpS1-5*), dont quatre sont en opéron avec des *mmpL*, mais aucun n'est associé au transport des lipides extractibles.

MmpS1 et MmpS2 n'ont pas de fonction connue tandis que MmpS4 et MmpS5 participent au transport des sidérophores (Wells *et al.*, 2013). Enfin MmpS3, conservé chez toutes les mycobactéries, est impliqué dans le cycle cellulaire (voir partie VI.1.2).

L'unique protéine MmpS dont le rôle dans le transport des lipides extractibles a été montré à ce jour est l'orthologue de MmpS4 chez *M. smegmatis* et *M. abscessus*, qui participe, avec MmpL4a et MmpL4b, au transport des GPL. Son absence empêche la formation de biofilm et le déplacement des bactéries en glissant, caractéristique d'une forte diminution de la quantité de GPL dans l'enveloppe (Deshayes *et al.*, 2010). Seule une partie du peu de GPL produits dans le mutant  $\Delta mmpS4$  de *M. smegmatis* est retrouvée en surface de l'enveloppe, indiquant que MmpS4 module l'efficacité des transporteurs MmpL4a/b. Il a donc été proposé que cette protéine participe à la formation et à la stabilisation d'un mégacomplexe regroupant les protéines nécessaires à la biosynthèse de GPL (Deshayes *et al.*, 2010). La production des orthologues de MmpS4 de *M. abscessus* et *M. tuberculosis* dans le mutant  $\Delta mmpS4$  de *M. smegmatis* restaure la synthèse des GPL, indiquant que leur rôle dans le transport n'est pas spécifique du substrat.

### V.2.2) Les protéines Gap-like

Les protéines « Gap-like » sont des petites protéines à six hélices  $\alpha$  transmembranaires, spécifiquement retrouvées chez les mycobactéries. La première à avoir été caractérisée est la protéine Gap (GPL-addressing protein) de *M. smegmatis*, impliquée dans le transport des GPL (Sondén *et al.*, 2005). En son absence, les GPL sont toujours synthétisés et localisés dans l'enveloppe de *M. smegmatis* mais ils ne sont pratiquement plus retrouvés en surface. Le mécanisme d'action de Gap n'est actuellement pas connu.

Sap (SL-addressing protein) est une protéine impliquée dans le transport des SL chez *M. tuberculosis*, présentant 30% d'identité de séquence avec Gap. Contrairement à cette dernière, Sap n'est pas strictement requise pour la présence des SL en surface mais semble rendre leur transport plus efficace (Seeliger *et al.*, 2012).

Un gène codant pour une protéine « Gap-like » présentant 44% d'identité de séquence avec Sap est également retrouvé au niveau du locus TPP chez *M. smegmatis* et de nombreuses autres espèces mycobactériennes. L'absence de cette protéine ne semble pas avoir d'impact sur le transport des TPP en surface chez *M. smegmatis* (Burbaud *et al.*, 2016).

Enfin, le locus LOS de *M. smegmatis* possède un gène codant pour une protéine appelée Gap2, jouant potentiellement un rôle dans le transport des LOS, mais cette protéine n'a pas fait l'objet d'une caractérisation (Etienne *et al.*, 2009).

### V.2.3) Les lipoprotéines

Plusieurs lipoprotéines ont été décrites pour leur implication dans le transport des lipides extractibles chez les mycobactéries, comme LppX, LprG et récemment LpqN.

La lipoprotéine la mieux caractérisée par rapport au transport des lipides extractibles est LppX, dont le gène est situé au niveau du locus DIM/PGL chez *M. tuberculosis*. Cette protéine est strictement nécessaire pour l'export des DIM en surface de la bactérie, suggérant qu'elle joue un rôle de chaperonne en les prenant en charge lors de leur transfert vers la mycomembrane (Sulzenbacher *et al.*, 2006). La résolution de la structure de LppX par cristallographie montre une protéine globulaire, formée de onze feuillets  $\beta$  et de trois hélices  $\alpha$  formant une cavité hydrophobe qui semble assez grande pour pouvoir y accommoder les DIM (Figure 19) (Sulzenbacher *et al.*, 2006). Bien que des analyses biochimiques supplémentaires soient nécessaires pour confirmer une interaction directe entre les DIM et LppX, cette lipoprotéine est la première à avoir été caractérisée pour son rôle dans le transport d'un lipide extractible au-delà de la membrane plasmique.

De façon intéressante, LppX a un repliement similaire à celui des lipoprotéines LolA et LolB, impliquées dans la machinerie Lol de transport des lipoprotéines dans l'enveloppe des bactéries Gram-négatives (Figure 19). La structure de LppX est également similaire à trois autres lipoprotéines produites par *M. tuberculosis* : LprG, LprA et LprF, les deux dernières n'ayant pas de fonction connue et leurs gènes n'étant à proximité d'aucun gène impliqué dans le transport de lipides (Figure 19) (Touchette and Seeliger, 2017).

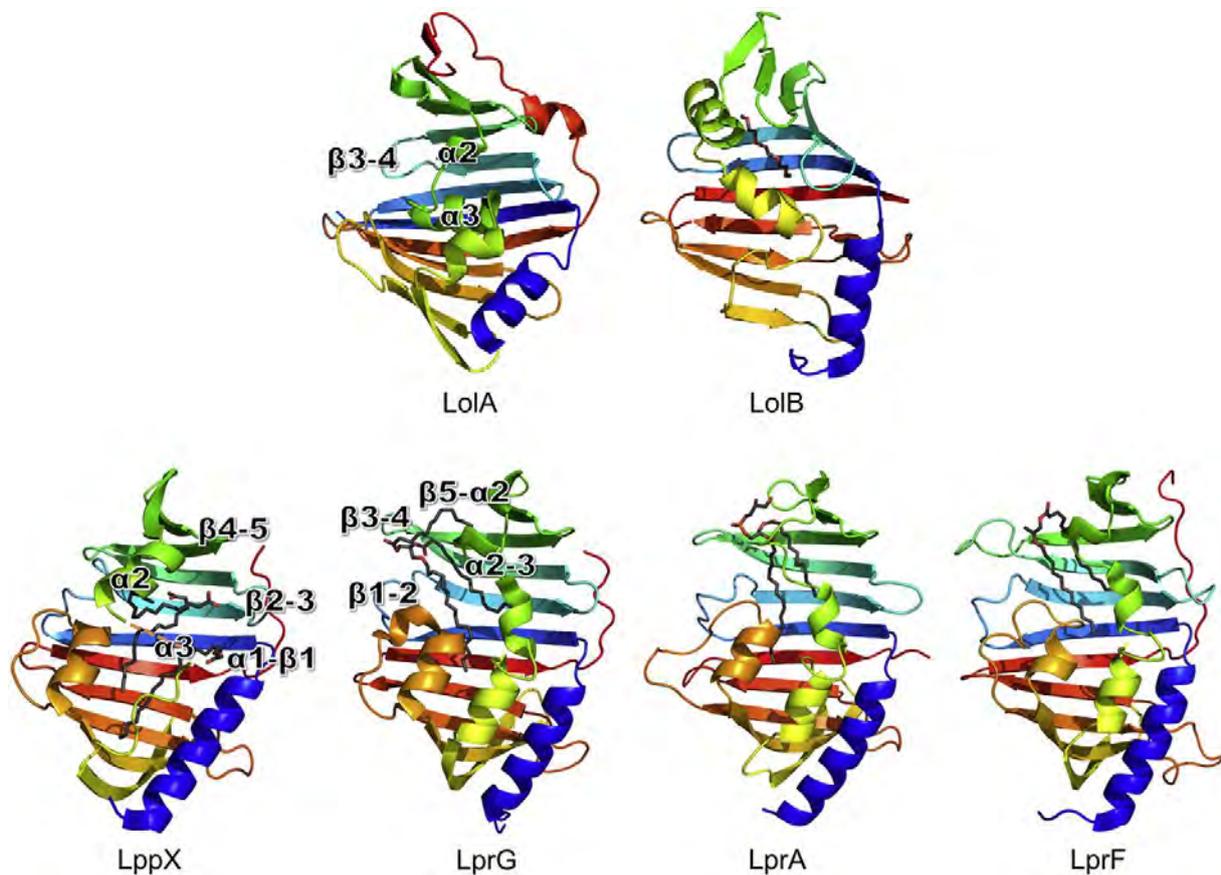


Figure 19 : Structures cristallines des lipoprotéines associées au transport chez les bactéries Gram-négatives et les mycobactéries

Structure de LolA de *E. coli* (PDB ID : 1IWL). Structure de LolB de *E. coli*, co-cristallisée avec une molécule de polyéthylène-glycol (PDB ID : 1IWN). Structure de LppX de *M. tuberculosis*, co-cristallisée avec deux acides linoléiques et un acide docosahéxanoïque (PDB ID : 2BYO). La structure de l'hélice  $\alpha 3$  est non résolue. Structure de LprG de *M. tuberculosis*, co-cristallisée avec un triacylglycérol (PDB ID : 4ZRA). Structure de LprA de *M. tuberculosis*, co-cristallisée avec un phosphatidylglycérol (communication personnelle de J.H.C. Tsai et J.C. Sacchettini). Structure de LprF de *M. tuberculosis*, co-cristallisée avec un diacylglycérol (PDB ID : 4QA8). Adapté de Touchette et Seeliger, 2017.

LprG est retrouvée chez toutes les mycobactéries. Elle participe à l'export des TAG et du LAM dans l'enveloppe, en coopération avec un transporteur dans la membrane plasmique, Rv1410 (Gaur *et al.*, 2014; Hohl *et al.*, 2019). Récemment, Touchette et collègues ont réalisé un criblage biochimique basé sur l'expression de variants de LprG contenant des acides aminés non naturels réactifs aux rayons ultra-violets (pBpA) chez *M. smegmatis*, pour identifier de potentiels partenaires de cette protéine (Touchette *et al.*, 2017). Cette approche a permis de mettre en évidence des interactions entre LprG et plusieurs protéines de l'enveloppe, dont l'antigène 85A. La cavité hydrophobe d'une seule protéine LprG étant trop petite pour accommoder un acide mycolique, les auteurs ont proposé que la lipoprotéine s'associe en homodimère afin de solubiliser le lipide dans l'enveloppe (Touchette *et al.*, 2017). LprG semble interagir avec une large variété de substrats et est primordiale pour l'intégrité de l'enveloppe mycobactérienne, le mutant *M. tuberculosis*  $\Delta lprG$  présentant un important retard de croissance *in vitro* et une forte atténuation de virulence dans la souris (Martinot *et al.*, 2016).

Récemment, un criblage par double hybride bactérien dans *M. smegmatis* a identifié la lipoprotéine LpqN comme interagissant avec la deuxième boucle périplasmique des transporteurs MmpL3 et MmpL11 (Melly *et al.*, 2019). Bien que les auteurs n'aient pas pu confirmer cette interaction en co-purifiant LpqN avec ces transporteurs, ces données suggèrent que cette lipoprotéine pourrait être impliquée dans le transport des mycolates. Cette hypothèse est soutenue par le fait que LpqN co-purifie avec l'antigène 85A lors d'expériences de pull-down sur des milieux de culture filtrés de *M. tuberculosis*. Les auteurs ont également résolu la structure cristalline de cette lipoprotéine liée à des tréhaloses mono-acylés (dodécyl-tréhalose et tréhalose-6-décanoate). La structure de LpqN présente une cavité hydrophobe contenant entièrement la chaîne d'acide gras des différents lipides testés, indiquant que cette lipoprotéine est capable de se lier à des composés de structure proche du TMM. Le mutant *M. tuberculosis*  $\Delta lpqN$  ne présente pas de retard de croissance mais accumule des esters d'acides mycoliques et est impacté dans sa capacité à former des biofilms. Ces résultats indiquent que LpqN n'est pas essentielle pour le transport des mycolates et pourrait avoir un rôle redondant avec d'autres lipoprotéines comme LprG. De plus, aucun orthologue du gène *lpqN* n'est retrouvé chez *M. leprae*. Son rôle précis dans le transport des lipides reste encore à élucider.

#### V.2.4) Les protéines partenaires de MmpL3

Une étude récente a identifié de nouvelles protéines s'associant à MmpL3 pour permettre le transport du TMM. En purifiant par affinité MmpL3 fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP) à partir d'un extrait membranaire de *M. smegmatis*, les auteurs ont co-purifié deux protéines : TtfA (pour TMM transport factor A) et MSMEG\_5308 (Fay *et al.*, 2019).

TtfA est une protéine essentielle pour la croissance de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis*. Similairement à la perte de MmpL3, le mutant  $\Delta ttfA$  de *M. smegmatis* contient peu de TDM et accumule des TMM, indiquant que la protéine TtfA est requise pour le transport des TMM à travers la membrane plasmique. Cette protéine est constituée d'un domaine N-terminal transmembranaire et d'un domaine C-terminal désordonné localisé dans le cytosol. Les 205 premiers acides aminés sont nécessaires pour l'interaction avec MmpL3 et apparaissent conservés chez toutes les mycobactéries. La structure de ce domaine conservé, sans la partie transmembranaire, a été obtenue par cristallographie. Celui-ci ne possède pas de cavité permettant de loger un mycolate, suggérant que son rôle n'est pas physiquement lié au transport du TMM (Ung *et al.*, 2019). De plus, les auteurs n'ont pas pu identifier de potentiel site de liaison à MmpL3. Les deux protéines interagissent peut-être au niveau de leurs domaines transmembranaires, mais cette hypothèse n'a pas été confirmée.

L'autre protéine qui interagit avec MmpL3 est MSMEG\_5308. Sa délétion n'impacte pas la croissance de *M. smegmatis*, démontrant son caractère non essentiel (Fay *et al.*, 2019). En revanche, cette protéine semble importante pour stabiliser le complexe MmpL3-TtfA lors d'un stress membranaire causé par la présence de détergent. L'orthologue de *MSMEG\_5308* chez *M. tuberculosis*, *Rv1057*, code pour une protéine de structure «  $\beta$ -propeller », dont la délétion réduit fortement la croissance du bacille tuberculeux dans les macrophages (Fu *et al.*, 2018). Le mécanisme d'action de cette protéine reste à décrypter, mais elle semble jouer un rôle déterminant lors d'un stress *in vitro* et *in vivo*.

Dans leur étude, Fay et collègues ont utilisé le transporteur des TPP, MmpL10, comme contrôle mais ils n'ont pas identifié de partenaires potentiels de cette protéine (Fay *et al.*, 2019). Cela suggère que le transport des TPP à travers la membrane plasmique ne nécessite

pas de protéine autre que MmpL10, ou que les interactions entre les partenaires sont trop labiles pour être observées dans les conditions de réalisation de l'expérience.

## VI. Assemblage de l'enveloppe mycobactérienne au cours du cycle cellulaire

L'enveloppe mycobactérienne est une structure dynamique constamment remodelée durant la croissance bactérienne. De par le caractère essentiel de cette enveloppe, sa biogénèse est finement régulée, par des mécanismes relativement bien conservés chez l'ensemble des bactéries.

### VI.1) Le cycle cellulaire atypique des mycobactéries

#### VI.1.1) Polarité et asymétrie

Les mycobactéries se distinguent des bacilles modèles *E. coli* (pour les bactéries Gram-négatives) et *B. subtilis* (pour les bactéries Gram-positives) de par leur mode d'élongation polaire. Cette caractéristique a été observée pour la première fois en cultivant les bactéries avec un analogue fluorescent de la vancomycine, un antibiotique qui se lie au peptidoglycane néo-synthétisé. Les auteurs ont observé des modes d'élongations distincts pour différentes bactéries : *B. subtilis*, comme *E. coli*, s'allonge par ajout de peptidoglycane le long de la bactérie tandis que *C. glutamicum*, un organisme phylogénétiquement proche des mycobactéries, incorpore exclusivement le peptidoglycane aux niveaux de ses pôles (Figure 20A) (Daniel and Errington, 2003). Ce mode de croissance atypique est partagé par les actinobactéries du genre *Streptomyces* ainsi que par d'autres types de bactéries comme les

Rhizobiales et les Caulobacterales (Cameron *et al.*, 2015). De nombreuses analyses par microscopie ont également révélé que la croissance polaire des mycobactéries est asymétrique, c'est-à-dire que l'ancien pôle, hérité de la cellule mère lors de la dernière division, s'allonge plus rapidement que le nouveau pôle qui vient d'être formé (Figure 20B). Cette différence provient en partie du fait qu'après division, l'ancien pôle s'allonge continuellement tandis que le pôle nouvellement formé (le nouveau pôle) ne repart pas immédiatement en croissance (Aldridge *et al.*, 2012; Hannebelle *et al.*, 2020; Joyce *et al.*, 2012).

Si ce modèle est repris par de nombreuses études, il ne fait cependant pas consensus. Selon d'autres études, les deux pôles ont une vitesse de croissance identique et la différence de taille entre deux cellules filles résulte du processus de division, qui n'a pas strictement lieu au centre de la cellule (Santi *et al.*, 2013; Wakamoto *et al.*, 2013). De façon intéressante, *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* semblent avoir des modes d'élongations distincts. Botella et collègues ont suivi l'incorporation d'acides aminés fluorescents dans le peptidoglycane au cours de la croissance de ces mycobactéries (Botella *et al.*, 2017). S'ils ont confirmé la croissance asymétrique de *M. smegmatis*, prédominante à l'ancien pôle, ils montrent que *M. tuberculosis* s'allonge préférentiellement à l'ancien pôle pendant une courte période post-division, puis incorpore le peptidoglycane de manière similaire aux deux pôles.

Le mode d'élongation polaire pose des problématiques différentes du mode d'élongation latérale canonique. Une différence majeure est que, chez les mycobactéries, le site de division de la cellule mère devient le nouveau pôle des cellules filles et donc un nouveau site d'élongation chez ces dernières. L'alternance de la division et de l'élongation doit donc être particulièrement bien régulée afin d'éviter que ce site ne rentre en croissance avant d'avoir terminé sa division. De par ce mode d'élongation, les mycobactéries héritent de portions d'enveloppe de différentes origines, qui sont spatialement bien définies. Il a ainsi été montré chez *M. smegmatis*, que la cellule qui hérite du nouveau pôle de la cellule mère hérite du peptidoglycane le plus ancien (Aldridge *et al.*, 2012). Ces variations sur l'origine et l'âge du peptidoglycane au sein d'une même cellule, couplées à des vitesses de croissance différentes, confèrent certainement des propriétés particulières aux mycobactéries et participent à l'hétérogénéité de la population bactérienne. Cette hétérogénéité joue un rôle important dans la variabilité de la réponse de la population au stress, par exemple, lors de l'exposition à

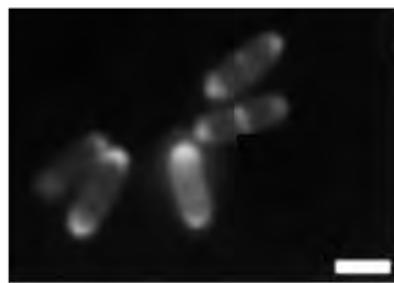
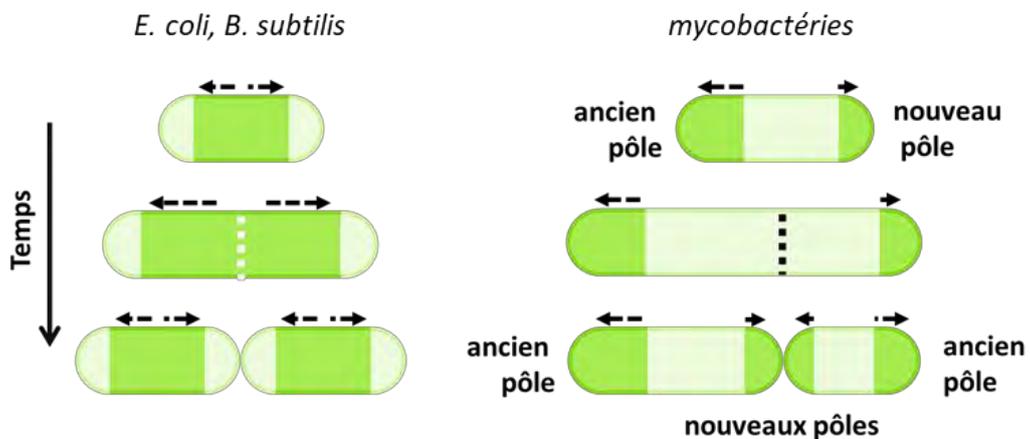
**A***B. subtilis**C. glutamicum***B**

Figure 20 : Le mode de croissance des mycobactéries et des genres apparentés diffère des modèles canoniques

**A.** Observation par microscopie de fluorescence de la croissance de *B. subtilis* et de *C. glutamicum* après incubation avec de la vancomycine fluorescente (zones claires). Barres d'échelles : 2  $\mu\text{m}$ . Adapté de Daniel et Errington, 2003.

**B.** Représentation schématique des modes de croissance des modèles canoniques *E. coli* et *B. subtilis* et des mycobactéries. Les zones foncées et les flèches symbolisent les zones en croissance. Les traits verticaux pointillés matérialisent le site de division.

un antibiotique ou lors d'une infection (Logsdon and Aldridge, 2018). Les mécanismes et acteurs du cycle cellulaire des mycobactéries sont décrits ci-dessous. Cette partie se focalise plus particulièrement sur le devenir du peptidoglycane, ce dernier étant la couche de l'enveloppe dont la régulation de la synthèse est la mieux caractérisée.

### VI.1.2) Mécanismes et acteurs de la division cellulaire chez les mycobactéries

#### Initiation de la division

La division cellulaire est le processus fondamental permettant la formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère. Chez la plupart des bactéries, ce processus est initié par la formation de l'anneau contractile Z, par polymérisation de la GTPase FtsZ aux environs du milieu de la cellule (Figure 21A) (Egan and Vollmer, 2013). FtsZ est une protéine essentielle très conservée chez les bactéries. En son absence, les cellules forment des filaments, caractéristiques de leur incapacité à se diviser.

Le bon positionnement de l'anneau Z est déterminant et donc fortement régulé. Chez *E. coli* et *B. subtilis*, deux systèmes complémentaires veillent à son bon positionnement au centre de la cellule. Le système Noc (Nucleoid occlusion) est constitué de protéines se liant à l'ADN afin d'empêcher FtsZ de polymériser autour du chromosome (Wu and Errington, 2012), tandis que le système Min empêche l'anneau Z de se former aux pôles de la cellule. Chez *B. subtilis*, ce système est composé de MinCDJ, qui inhibent la polymérisation de FtsZ et dont la localisation aux pôles est assurée par DivIVA, une protéine ayant de l'affinité pour les courbures négatives de la membrane (Rowlett and Margolin, 2015).

Les mycobactéries ne possèdent pas de systèmes Noc et Min similaires, indiquant que la localisation du site de division, appelé septum, est régulée par d'autres facteurs. Elles possèdent une protéine homologue de DivIVA, nommée Wag31, mais celle-ci n'est pas impliquée dans l'initiation de la division. En combinant microscopie optique et de force atomique, une étude récente a fait le lien entre la présence de sillons à la surface de *M. smegmatis* et la position du site de division. Le sillon le plus central en particulier, hérité deux

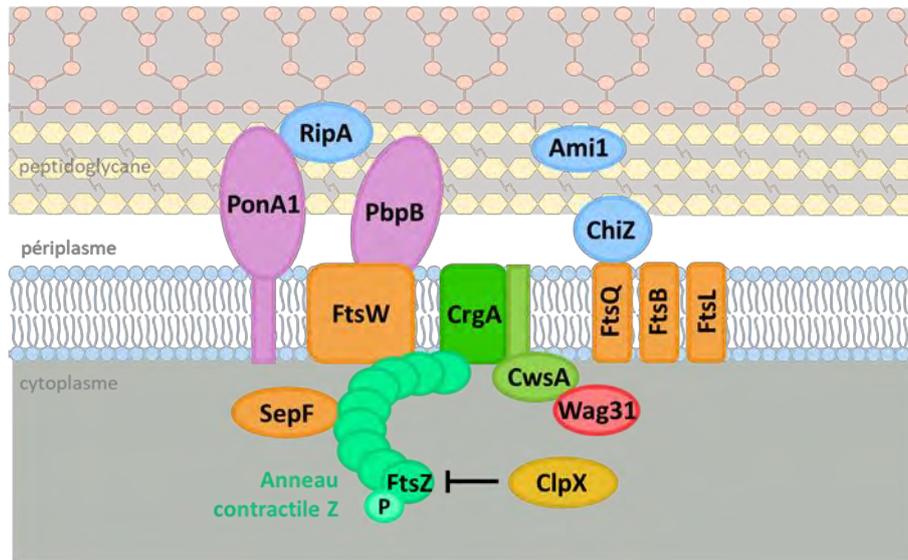
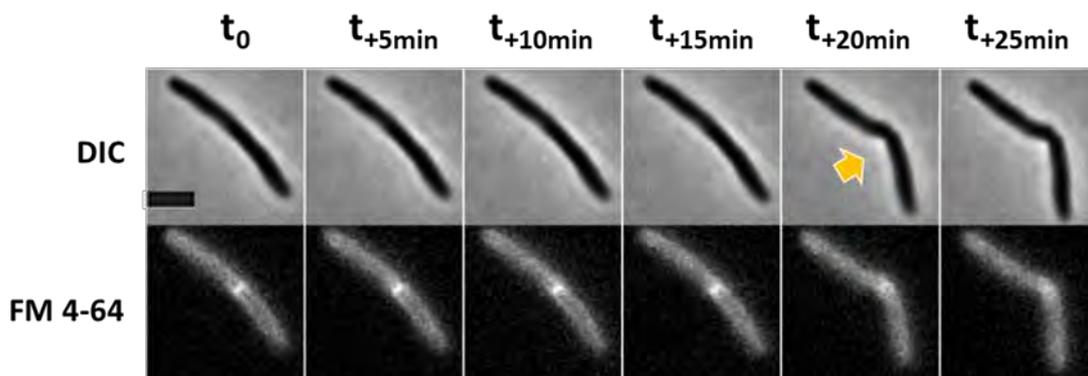
**A****B**

Figure 21 : La division cellulaire chez les mycobactéries

**A.** Représentation schématique de la machinerie de division cellulaire des mycobactéries. Les protéines pour lesquelles une interaction a été démontrée sont représentées en contact sur le schéma. Les protéines oranges sont impliquées dans la stabilisation de l'anneau contractile Z. Les protéines violettes sont des transpeptidases, impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Les protéines bleues sont des hydrolases du peptidoglycane. La protéine ClpX inhibe la polymérisation de FtsZ. La protéine CrgA permet le recrutement de Wag31 en fin de division, par l'intermédiaire de CwsA. Adapté de Kieser et Rubin, 2014.

**B.** La division des mycobactéries est caractérisée par le « V-snapping ». Vidéo-microscopie de cellules de *M. smegmatis* incubées avec le marqueur membranaire FM 4-64 et observées toutes les 5 min sur coussin d'agarose. La flèche jaune pointe le moment de séparation en « V » des cellules filles. DIC : contraste de phase. Barre d'échelle : 2 µm. Adapté de Zhou *et al.*, 2016.

génération plus tôt, correspond au futur site de division et co-localise avec FtsZ (Eskandarian *et al.*, 2017). Les auteurs montrent également que des cellules mutantes ne produisant pas ParB, une protéine nécessaire à la partition du chromosome, se divisent au niveau d'autres sillons, générant des cellules filles ne contenant, pour certaines, pas d'ADN. Les sillons membranaires et la machinerie de partition du chromosome semblent donc gérer la position du septum chez les mycobactéries.

### Le divisome

FtsZ joue un rôle central dans l'initiation de la division. En plus de fournir l'énergie nécessaire à la constriction de la membrane, cette protéine sert de plateforme pour le recrutement de la machinerie de division, également appelée divisome. Les protéines recrutées dans un premier temps vont permettre de stabiliser l'anneau Z et de l'ancrer dans la membrane. Dans les modèles canoniques, de nombreuses protéines interviennent dans ces premières étapes, mais seulement deux de leurs homologues ont été identifiés chez les mycobactéries : SepF et ClpX (Figure 21A). SepF est une protéine stabilisatrice essentielle dont la délétion provoque la filamentation des bactéries, incapables de former un septum (Gola *et al.*, 2015). La chaperonne ClpX contrôle négativement la polymérisation de FtsZ (Dziedzic *et al.*, 2010).

De nombreuses protéines sont ensuite recrutées au sein du divisome, formant un réseau d'interaction complexe. Certaines protéines ont un rôle important dans la stabilisation de l'anneau contractile Z. Chez *E. coli*, il s'agit des protéines FtsA et ZipA qui se lient au domaine C-terminal de FtsZ. Chez les mycobactéries, c'est la protéine essentielle FtsW qui semble jouer ce rôle, avec, entre autres, les protéines transmembranaires FtsL, FtsB et FtsQ (Figure 21A) (K. J. Wu *et al.*, 2018).

Une fois stabilisé, l'anneau Z permet le recrutement d'enzymes chargées de synthétiser le peptidoglycane au septum. Ainsi FtsW sert également d'intermédiaire entre FtsZ et la transpeptidase PbpB, impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane, dont la délétion dans *M. smegmatis* génère des filaments incapables de se diviser (Figure 21A) (Datta *et al.*, 2006). Une étude a suggéré que la peptidoglycane synthase PonA1 est aussi impliquée dans la synthèse du peptidoglycane septal car cette dernière est localisée au septum (Kieser

*et al.*, 2015). Cette hypothèse reste à confirmer, car un mutant  $\Delta$ *ponA1* de *M. smegmatis* présente des anomalies caractéristiques de l'élongation et non de la division (*Kieser et al.*, 2015).

### Séparation des cellules filles

Une fois le peptidoglycane synthétisé au niveau du septum, celui-ci doit être hydrolysé à différents endroits pour générer les deux cellules filles. RipA est l'hydrolase la mieux caractérisée impliquée dans ce processus (Figure 21A). Cette enzyme catalyse le clivage des ponts peptidiques entre certaines chaînes de peptidoglycane. Son absence entraîne la formation de filaments de bactéries incapables de se séparer (*Chao et al.*, 2013). Deux autres hydrolases, ChiZ et Ami1, pourraient également être impliquées dans l'hydrolyse du peptidoglycane septal, mais restent peu caractérisées (*Senzani et al.*, 2017; *Vadrevu et al.*, 2011).

Peu de temps avant la fin de la division, la protéine Wag31, dont le rôle est détaillé ci-après, est recrutée par interaction avec les protéines septales CrgA et CwsA (Figure 21A) (*Plocinski et al.*, 2012). L'arrivée de cette protéine coïncide avec le désassemblage de la machinerie de division au profit du recrutement de la machinerie d'élongation, ou élongasome. S'en suit alors la séparation des deux cellules filles. Chez les modèles *E. coli* et *B. subtilis*, cette séparation est un processus long de plusieurs minutes, fortement régulé par l'action concertée des enzymes septales. La séparation des cellules filles chez les mycobactéries est, à l'inverse, une rupture mécanique très rapide (quelques millisecondes), d'avantage similaire à la division de *S. aureus* (*Zhou et al.*, 2016). Les deux cellules filles adoptent alors une forme de « V » et ne sont plus retenues que par un point de contact (Figure 21B). Ce mode de division s'appelle le « V-snapping ».

Le nouveau pôle ainsi formé ne repart pas immédiatement en croissance. Chez *M. smegmatis*, une étude récente a mis en évidence l'action de la protéine LamA/MmpS3 dans ce retard de croissance. Dans un mutant  $\Delta$ *lamA* de *M. smegmatis*, le nouveau pôle démarre sa croissance légèrement plus tôt que dans la souche sauvage, suggérant que LamA/MmpS3 joue un rôle dans l'asymétrie de croissance entre les deux pôles, en inhibant temporairement la synthèse de l'enveloppe au nouveau pôle (*Rego et al.*, 2017). De façon intéressante, cette

protéine fait partie de la famille MmpS dont certains membres sont impliqués dans la synthèse et le transport des lipides de la mycomembrane (voir partie V.2.1). Son domaine C-terminal probablement périplasmique est caractéristique des membres de cette famille, suggérant une possible implication de cette protéine dans le transport des lipides d'enveloppe. En revanche et contrairement aux autres MmpS, son organisation diffère par la présence d'un domaine N-terminal supplémentaire d'une centaine d'acides aminés et par le fait que le gène codant pour cette protéine n'est pas en opéron avec un gène *mmpL* (Chalut, 2016).

### VI.1.3) Mécanismes et acteurs de l'élongation cellulaire chez les mycobactéries

Chez la plupart des bactéries de forme bacille, l'élongation dépend d'une protéine essentielle, MreB. La perte de cette protéine entraîne l'arrondissement de la cellule et l'arrêt de sa croissance. MreB est l'homologue bactérienne de l'actine des eucaryotes et polymérise sous forme de filaments en présence d'ATP ou de GTP. Ces filaments forment des spirales dans le cytoplasme bactérien, qui servent de plateforme de recrutement de la machinerie d'élongation, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (Shi *et al.*, 2018). De façon surprenante, les mycobactéries et les genres apparentés sont dépourvus de la protéine MreB. Chez ces organismes, la maintenance de la forme en bacille est dépendante de la protéine Wag31. Comme mentionné précédemment, Wag31 est l'homologue de la protéine DivIVA de *B. subtilis*, mais contrairement à cette dernière, elle n'est pas impliquée dans la formation du septum. Le phénotype associé à la perte de Wag31 chez les mycobactéries est comparable au phénotype associé à la perte de MreB chez les modèles canoniques (Baranowski *et al.*, 2019).

Wag31 est une protéine cytoplasmique ancrée à proximité de la membrane plasmique par interaction avec la protéine transmembranaire CwsA (Plocinski *et al.*, 2012). Elle n'a pas d'activité catalytique connue, indiquant que son rôle dans la direction de l'allongement cellulaire consiste probablement à recruter la machinerie de synthèse des différentes couches de l'enveloppe. Elle est ainsi localisée aux deux pôles des mycobactéries et majoritairement à l'ancien pôle, ce dernier ayant une croissance plus rapide que le nouveau pôle (Kang *et al.*, 2008; Meniche *et al.*, 2014). En accord avec son rôle dans la direction de l'élongation, Wag31 co-localise avec diverses protéines impliquées dans la biosynthèse des différentes couches de

l'enveloppe, parmi lesquelles la glycosyltransférase MurG et l'arabinofuranosyltransférase GlfT2, respectivement impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane et de l'arabinogalactane (Meniche *et al.*, 2014). En utilisant la microscopie de fluorescence, Meniche et collègues ont observé que ces protéines n'étaient pas exactement co-localisées mais que Wag31 occupe la région la plus extrême du pôle tandis que les protéines de biosynthèse de la paroi sont localisées dans une région subpolaire (Meniche *et al.*, 2014). Enfin, Wag31 est phosphorylée par les kinases PknA/B ce qui semble réguler positivement l'activité des enzymes de synthèse du peptidoglycane (Jani *et al.*, 2010).

Le phénotype associé à l'expression artificielle de Wag31 doit cependant être interprété avec précaution. Une étude a rapporté que la production de Wag31 fluorescente, suite à l'insertion chromosomique d'un gène codant pour une protéine fluorescente en aval de *wag31*, perturbe sa localisation et qu'elle se retrouve exprimée exclusivement au nouveau pôle (Meniche *et al.*, 2014). La surexpression de Wag31 aboutit également à une distribution intracellulaire aberrante, pouvant fausser les conclusions de certaines études.

Bien que certains aspects fondamentaux du cycle cellulaire soient donc conservés entre les modèles canoniques et mycobactérien, il existe d'importantes différences. En particulier, les mycobactéries doivent synthétiser une enveloppe complexe, formée de la structure unique qu'est la mycomembrane.

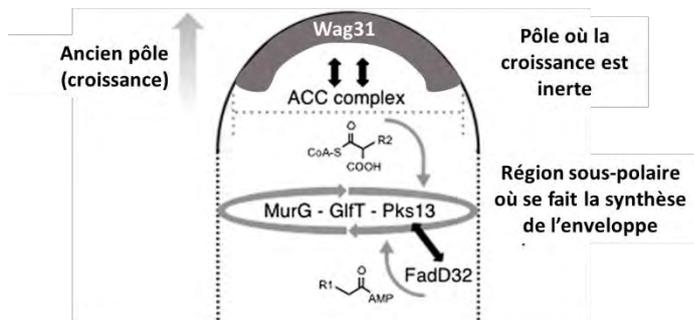
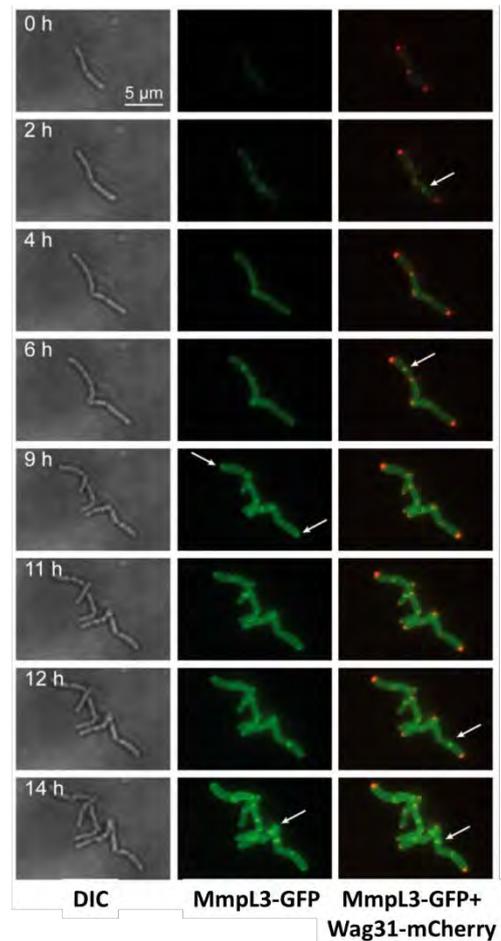
## VI.2) Assemblage de la mycomembrane lors du cycle cellulaire

L'assemblage de la mycomembrane lors du cycle cellulaire des mycobactéries est un processus encore peu caractérisé. Les avancées récentes ont été obtenues par deux types d'approches. La première consiste à exprimer les protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des différents constituants de cette mycomembrane en fusion avec des protéines fluorescentes pour suivre leur localisation dans la bactérie au cours du cycle cellulaire. La seconde vise à analyser directement la dynamique d'assemblage de la mycomembrane, en rendant fluorescents certains de ses constituants par incubation des bactéries avec des précurseurs métaboliques modifiés.

### VI.2.1) Localisation des protéines impliquées dans la biosynthèse et le transport des constituants de la mycomembrane

Comme mentionné précédemment, Wag31 est la protéine qui dirige l'élongation polaire et asymétrique chez les mycobactéries. Cette protéine est présente en majorité à l'ancien pôle, où la croissance est la plus rapide. En plus d'avoir montré la co-localisation de MurG et GlfT2 avec Wag31 aux pôles de *M. smegmatis*, Meniche et collègues ont également montré une co-localisation entre Wag31 et Pks13, une enzyme impliquée dans la synthèse des acides mycoliques (Figure 22A) (Meniche *et al.*, 2014). Des expériences de pull-down ont également mis en évidence une interaction entre Wag31 et certains membres des complexes acétyl-CoA carboxylases (Acc), impliqués dans la synthèse des acides mycoliques (Meniche *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la synthèse des acides mycoliques est spatialement coordonnée à celles du peptidoglycane et de l'arabinogalactane aux pôles des mycobactéries (Figure 22B). Ces résultats sont soutenus par une autre étude montrant une co-localisation entre Wag31 et différentes protéines du système FAS II de synthèse des acides mycoliques, les réductases MabA et InhA et les enzymes condensatrices KasA et KasB (Carel *et al.*, 2014). Ces études ne renseignent cependant pas sur l'éventuelle coordination temporelle entre la synthèse des mycolates et celle du peptidoglycane et de l'arabinogalactane.

De façon intéressante, l'étude de Carel *et al.* montre également que le transporteur des TMM, MmpL3, co-localise avec Wag31 de façon dynamique aux pôles et au septum, lors de la croissance de *M. smegmatis* (Figure 22C). La structure de MmpL3 diffère des autres MmpL par la présence d'un domaine cytoplasmique supplémentaire au niveau de son extrémité C-terminale. La suppression de ce domaine n'impacte pas la croissance de *M. smegmatis*, indiquant que MmpL3 est toujours capable de transporter le TMM. En revanche, son absence entraîne une localisation diffuse du transporteur dans la membrane de *M. smegmatis*, indiquant que celui-ci joue un rôle crucial pour sa localisation aux pôles et au septum (Belardinelli *et al.*, 2019; Carel *et al.*, 2014). Ce résultat suggère que MmpL3 pourrait interagir directement ou non avec Wag31 via son domaine C-terminal. En utilisant une ap-

**A****B****C**

**Figure 22 : Co-localisation entre les enzymes impliquées dans la synthèse et le transport des mycolates, de l'arabinogalactane et du peptidoglycane**

**A.** Co-localisation entre Pks13 fusionnée à la GFP et Wag31 (DivIVA) fusionnée à la RFP au pôle de *M. smegmatis*, observée par microscopie de fluorescence à champ large. Barre d'échelle : 2 µm. Adapté de Meniche *et al.*, 2014.

**B.** Modèle de l'organisation du pôle en croissance chez *M. smegmatis*. Wag31 est localisé à l'extrémité du pôle. Les enzymes MurG, GlfT2 et Pks13, impliquées dans la biosynthèse des différentes couches de l'enveloppe, sont localisées dans la région subpolaire. Les doubles flèches symbolisent les interactions identifiées par co-immunoprécipitation avec certains membres des complexes acyl-CoA carboxylases (ACC) et entre Pks13 et FadD32. Adapté de Meniche *et al.*, 2014.

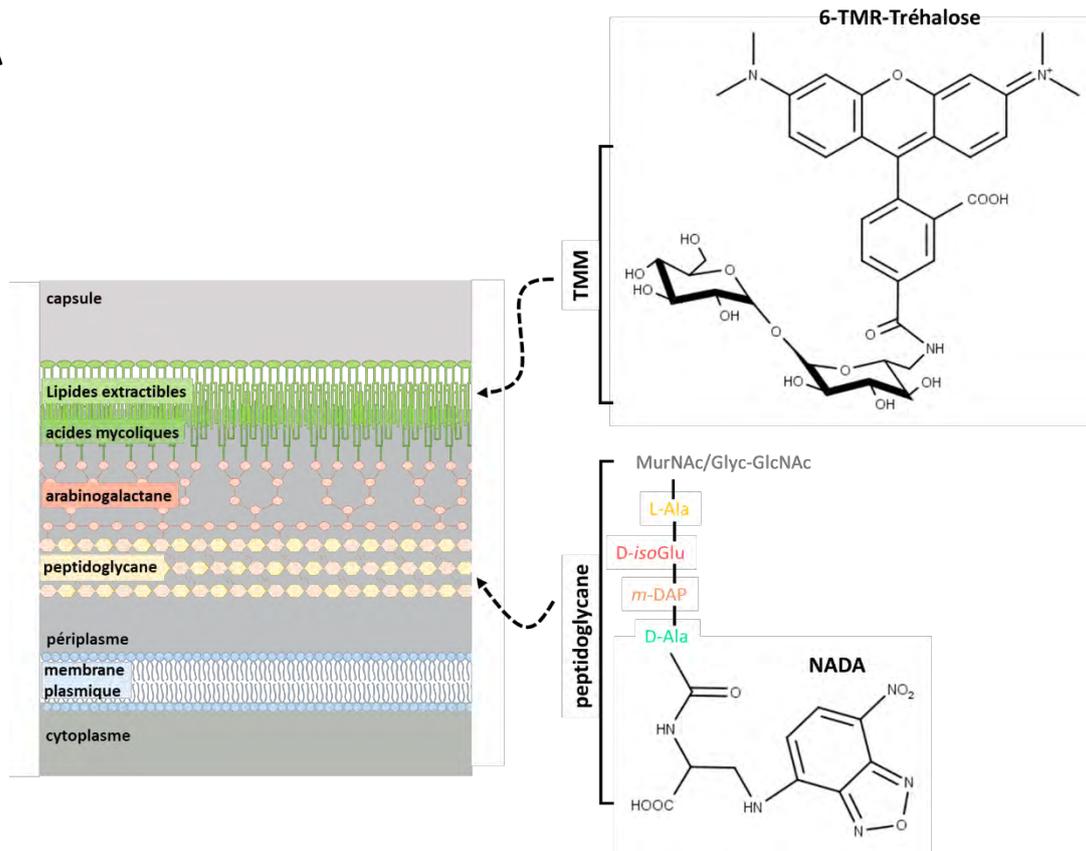
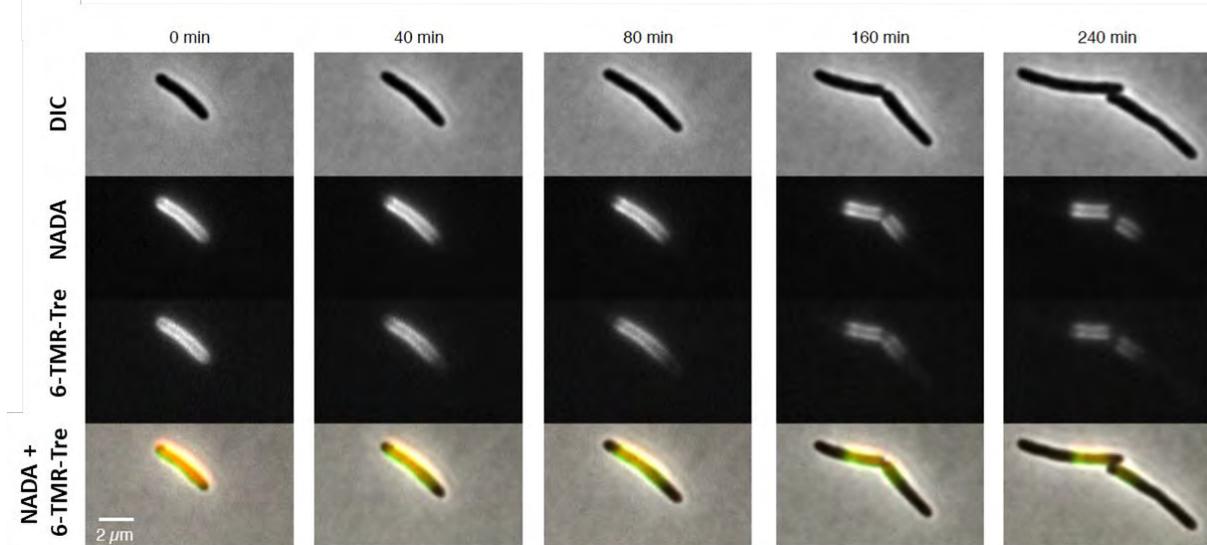
**C.** Co-localisation de MmpL3 et Wag31 aux pôles et au septum de *M. smegmatis*. Vidéo-microscopie d'une souche exprimant les protéines MmpL3-GFP et Wag31-mCherry, observée toutes les 2 heures au microscope à fluorescence champ large. Les flèches montrent la présence de MmpL3 aux pôles et au septum. DIC : contraste de phase. Barre d'échelle : 5 µm. Adapté de Carel *et al.*, 2014.

proche de criblage par double hybride dans *E. coli*, une étude a révélé des interactions entre MmpL3 et plusieurs protéines impliquées dans le cycle cellulaire, dont CrgA (Belardinelli *et al.*, 2019). Comme mentionné plus haut, cette dernière interagit avec Wag31 via la protéine CwsA, formant un complexe nécessaire à la synthèse de la paroi (Plocinski *et al.*, 2012). MmpL3 tronquée de son domaine C-terminal interagit toujours avec CrgA, indiquant que d'autres facteurs encore inconnus contrôlent la localisation du transporteur dans la bactérie.

### VI.2.2) Dynamique de synthèse et d'export des constituants de la mycomembrane

Pour étudier la dynamique d'assemblage de l'enveloppe mycobactérienne au cours de la croissance des mycobactéries, la technique de marquage métabolique est une méthode de choix. Cette technique consiste à incuber les bactéries avec un précurseur métabolique modifié s'intégrant dans les voies de biosynthèse d'intérêts (acides aminés pour le peptidoglycane et tréhalose pour le TMM) (Siegrist *et al.*, 2015). Ce précurseur porte un groupement fluorescent, permettant sa visualisation directe par microscopie de fluorescence, ou un groupement spécifique permettant de greffer un composé fluorescent par réaction chimique pour rendre sa visualisation effective (chimie bioorthogonale). Cette approche a été largement utilisée pour observer le peptidoglycane néo-synthétisé et visualiser l'élongation polaire et asymétrique des mycobactéries (Aldridge *et al.*, 2012; Botella *et al.*, 2017).

Une étude récente a décrit la mise au point de dérivés de tréhalose couplés à un fluorochrome (fluorescéine ou autres) permettant de marquer spécifiquement les TMM présents dans l'enveloppe mycobactérienne (Figure 23A) (Rodriguez-Rivera *et al.*, 2017). Une courte incubation de *M. smegmatis* avec ces dérivés, suivie de lavages, aboutit à un marquage asymétrique des TMM aux pôles, superposable au marquage obtenu pour le peptidoglycane en utilisant des dérivés d'acides aminés fluorescents (Figure 23B). Ce résultat renforce l'hypothèse que la mise en place des mycolates dans l'enveloppe est spatialement coordonnée à celle du peptidoglycane, aux pôles des mycobactéries. Chez d'autres organismes comme la bactérie Gram-négative à croissance unipolaire *Brucella abortus*, une coordination

**A****B**

**Figure 23 : Coordination entre l'assemblage du peptidoglycane et des mycolates dans l'enveloppe mycobactérienne**

**A.** Représentation schématique de l'incorporation du NADA (NBD-D-alanine) dans le peptidoglycane et du 6-TMR-Tréhalose (6-TAMRA-Tréhalose) dans la mycomembrane des mycobactéries.

**B.** Vidéo-microscopie de la croissance de *M. smegmatis* après double incubation avec des dérivés de précurseurs métaboliques du peptidoglycane (NADA) et du TMM (6-TMR-Tre), observée par microscopie de fluorescence à champ large toutes les 40 min. DIC : contraste de phase. Barre d'échelle : 2  m. Adapté de Rodriguez-Rivera *et al.*, 2017.

spatiale est également observée entre la mise en place du peptidoglycane, du LPS et de la protéine transmembranaire Omp25, visualisés à l'aide d'anticorps fluorescents (Vassen *et al.*, 2019). Il en va de même pour la mise en place du peptidoglycane et des acides téichoïques au septum de la bactérie Gram-positif *Streptococcus pneumoniae*, rendus fluorescents par une approche de chimie bioorthogonale (Di Guilmi *et al.*, 2017). En revanche, ces données ne renseignent pas sur la chronologie de ces événements, c'est-à-dire si la mise en place du peptidoglycane et des mycolates se fait simultanément ou bien de manière séquentielle.

Des avancées récentes, chez *C. glutamicum*, ont permis de mieux comprendre la dynamique d'assemblage des différents constituants de l'enveloppe durant la division cellulaire. Pour cela, les auteurs ont utilisé une combinaison de précurseurs métaboliques fluorescents afin d'observer les différentes couches de l'enveloppe au moment de la division (Figure 24A) (Zhou *et al.*, 2019). L'utilisation d'un acide aminé fluorescent (NADA, TDL) permet de visualiser le peptidoglycane. L'utilisation de TMM greffés à un fluorophore (O-TMM-647, O-TMM-DBF) permet la double visualisation des mycolates du complexe mAGP et des TMM. Enfin, l'utilisation de 6-FITC-tréhalose (6-FTre, 6-TMR-Tre) permet de ne visualiser que les TMM. En suivant la localisation de ces trois sondes au sein d'une même cellule de *C. glutamicum* en cours de croissance et de division, les auteurs ont montré que l'enveloppe septale était assemblée séquentiellement (Figure 24B). Le peptidoglycane est d'abord mis en place au septum, suivi de près par les mycolates associés au complexe mAGP. Les mycolates libres sont mis en place plus tardivement, quelques minutes avant la fin de la division caractérisée par le V-snapping (Figure 24B). Des observations plus détaillées de la surface de *C. glutamicum* par microscopie électronique ont conduit à l'observation de sillons dans la zone du septum, au niveau desquels les TMM semblent s'accumuler, peu de temps avant la séparation des cellules filles. L'utilisation des mêmes précurseurs métaboliques sur des cellules de *M. smegmatis* en croissance aboutit à des conclusions similaires bien que les TMM semblent mis en place de manière plus précoce par rapport au V-snapping (Figure 24C) (Zhou *et al.*, 2019). Ces données suggèrent que les mycobactéries pourraient également avoir un mode d'assemblage séquentiel de leur enveloppe au septum durant la division cellulaire.

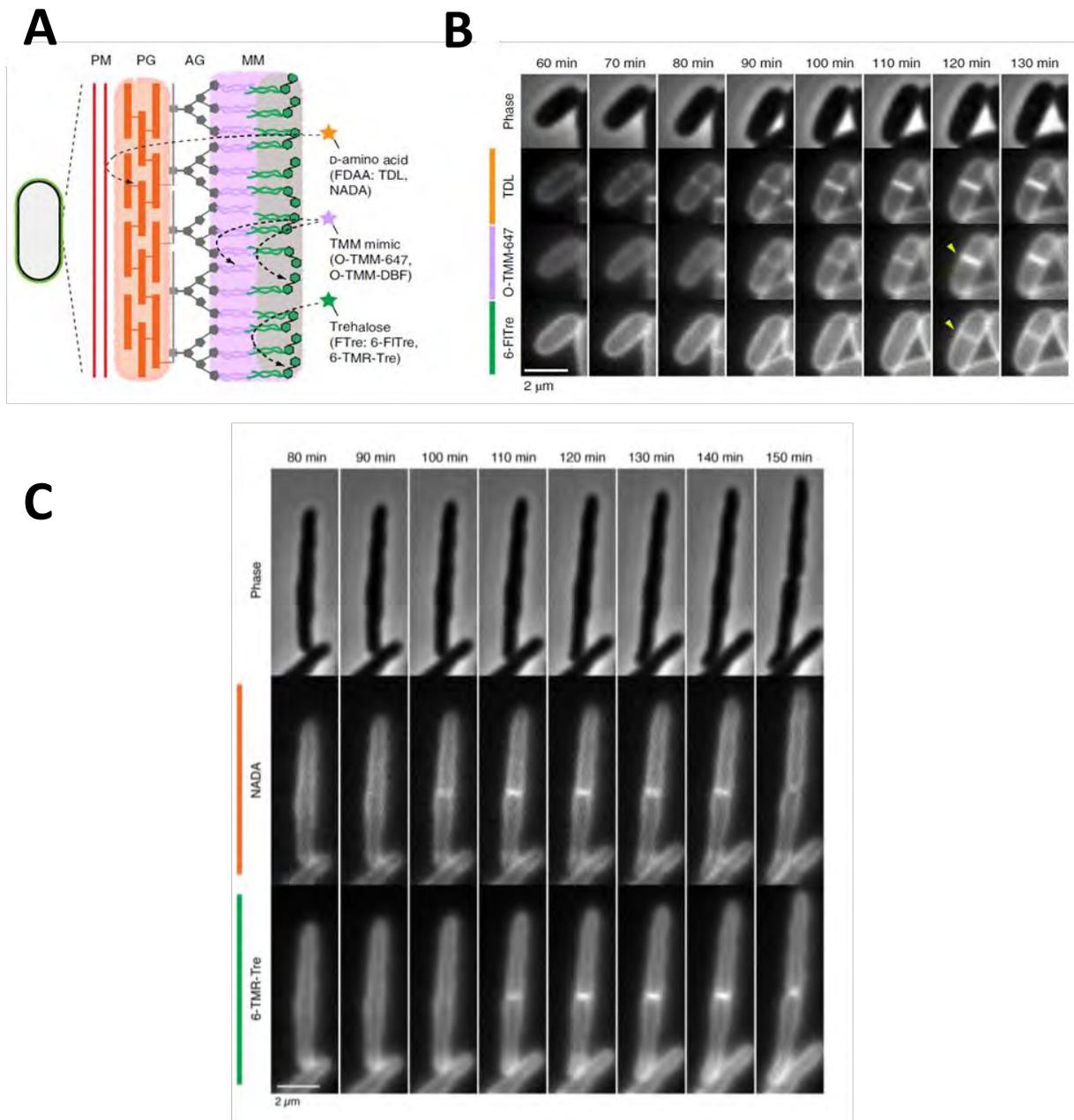


Figure 24 : Assemblage séquentiel du peptidoglycane et des mycolates au septum de *C. glutamicum* et de *M. smegmatis*

**A.** Représentation schématique de l'incorporation des acides aminés modifiés TDL (TAMRA-D-lysine) ou NADA (NBD-D-alanine) dans le peptidoglycane, du dérivé du TMM O-TMM-Alexa Fluor 647 (O-TMM-647) s'incorporant à la fois au sein des mycolates du mAGP et au sein des TMM de la mycomembrane, et des dérivés de tréhalose modifiés 6-Ftre (6-fluoresceine-tréhalose) ou 6-TAMRA-Tréhalose (6-TMR-Tre), s'incorporant au sein des lipides à tréhalose de la mycomembrane.

**B.** Vidéo-microscopie de la croissance de *C. glutamicum* après triple incubation avec un précurseur métabolique du peptidoglycane (TDL), des mycolates présents dans le mAGP et au sein des TMM (O-TMM-647) et des lipides à tréhalose de la mycomembrane (6-FTre), observée par microscopie de fluorescence à champ large toutes les 10 min.

Barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ .

(Suite de la Figure 24)

C. Vidéo-microscopie de la croissance de *M. smegmatis* après double incubation avec un précurseur métabolique du peptidoglycane (NADA) et des lipides à tréhalose de la mycomembrane (6-TMR-Tre), observée par microscopie de fluorescence à champ large toutes les 10 min. Barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ .

Adapté de Zhou *et al.*, 2019.

### VI.3) Les problématiques liées à l'assemblage de la mycomembrane

Les données présentées précédemment suggèrent que la mise en place de la mycomembrane est spatialement coordonnée à celle des autres couches de l'enveloppe, notamment le peptidoglycane, durant la croissance et la division cellulaire des mycobactéries. Ces données restent toutefois préliminaires et les mécanismes sous-jacents, inconnus. De plus, aucune information sur la mise en place des constituants de la mycomembrane, autres que les acides mycoliques, n'est actuellement disponible. Une connaissance plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'assemblage de cette mycomembrane est primordiale pour une meilleure compréhension de la physiologie des mycobactéries.

Les voies de biosynthèse des lipides de la mycomembrane sont relativement bien caractérisées, contrairement à la machinerie moléculaire impliquée dans leur transfert en surface de l'enveloppe (Figure 25). A ce jour, la plupart des gènes impliqués dans le transport de ces lipides ont été identifiés relativement facilement car localisés au niveau des loci chromosomiques dédiés à leur production. C'est notamment le cas pour les gènes codant pour les transporteurs MmpL et pour la lipoprotéine LppX. Ces loci ne contiennent cependant pas d'autres gènes codant pour des protéines susceptibles d'être impliquées dans le transfert des lipides jusqu'à la mycomembrane, rendant plus difficile leur identification par analyse des génomes mycobactériens.

Pour identifier ces protéines, une approche consisterait à rechercher des protéines analogues à celles impliquées dans le transport des constituants des enveloppes des bactéries Gram-négatives et Gram-positives. Ces systèmes incluent en particulier un ou plusieurs trans-

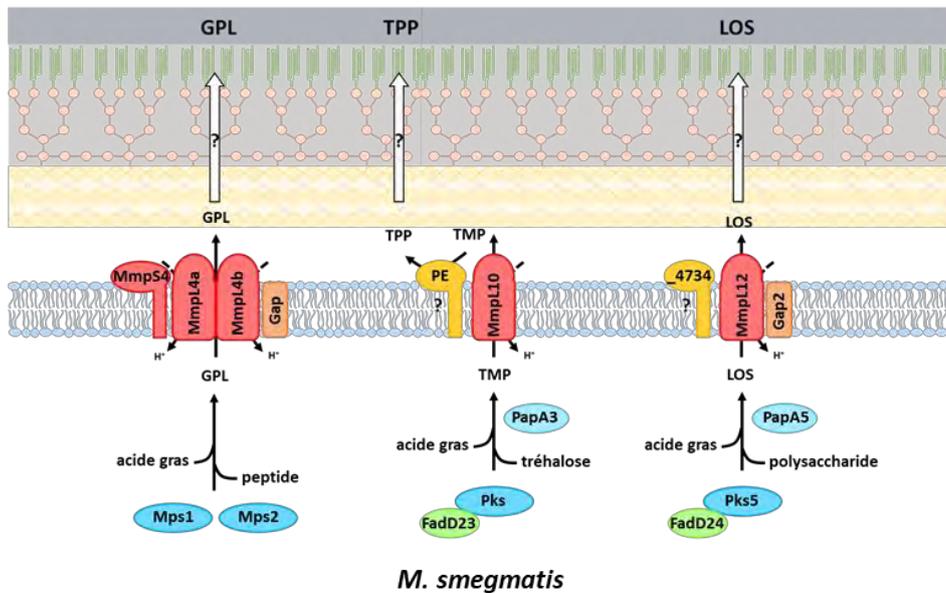
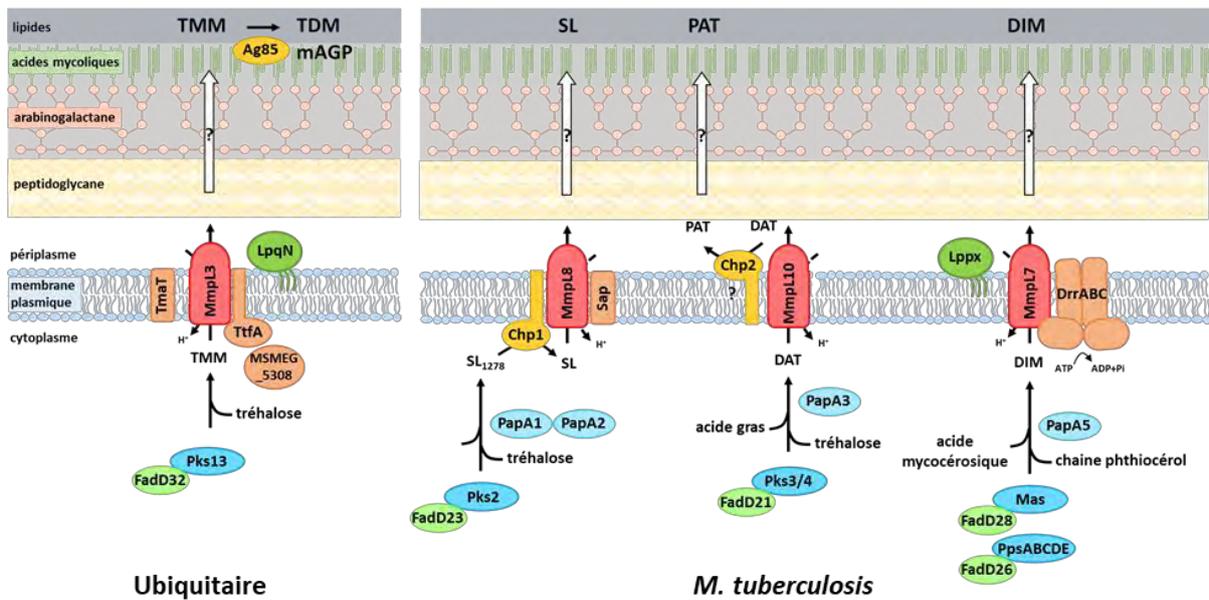


Figure 25 : Représentation schématique de la synthèse et du transport des lipides de la mycomembrane

Les principales protéines impliquées dans la biosynthèse et celles actuellement connues impliquées dans le transport des TDM (présents chez toutes les mycobactéries), des SL, PAT et DIM de *M. tuberculosis* et des GPL, TPP et LOS de *M. smegmatis* sont représentées sur le schéma. Code couleur : vert clair : FadD, vert foncé : lipoprotéine, bleu foncé : Pks et Nrps, bleu clair : Pap, rose : MmpL, orange : protéine membranaire associée au transport, jaune : acyltransférase impliquée dans les étapes de synthèse tardives. Les flèches blanches symbolisent le transport de ces lipides dans les couches supérieures de l'enveloppe mycobactérienne. Les acteurs impliqués dans ce processus restent inconnus.

porteurs ABC, permettant la translocation des composés à travers la membrane plasmique ou leur extraction (voir partie II.2). Les analyses bio-informatiques effectuées par notre groupe de recherche et d'autres sur les génomes mycobactériens et apparentés n'ont, pour le moment, pas permis d'identifier de tels transporteurs.

Par ailleurs, les transporteurs MmpL, impliqués dans l'export des lipides de la mycomembrane à travers la membrane plasmique, font partie de la famille des transporteurs RND. Chez les bactéries Gram-négatives, ces transporteurs s'associent avec des protéines de la membrane externe et des protéines adaptatrices pour former un ensemble de systèmes d'efflux s'organisant en complexes tripartites traversant l'enveloppe (voir partie V.1.2). Chez les mycobactéries, aucune donnée ne permet actuellement de suggérer que les transporteurs MmpL forment de tels complexes dans l'enveloppe.

Les connaissances sur les mécanismes de transfert des lipides entre les membranes plasmique et externe sont encore plus limitées. Plusieurs lipoprotéines impliquées dans le transport des lipides extractibles ont été identifiées, comme LppX et LprG. Leur mode d'action reste toutefois mal compris et aucune lipoprotéine n'a pour l'instant été identifiée dans le cadre du transport des lipides à tréhalose, en particulier des TMM/TDM, les constituants majeurs de la mycomembrane (voir partie V.2.3).

Des approches autres que l'approche comparative pourraient être utilisées pour identifier ces protéines, comme l'utilisation de cribles génétiques et biochimiques. De telles approches ont récemment permis l'identification des lipoprotéines LpqN, LprG et des protéines accessoires de MmpL3, TtfA et MSMEG\_5308 (voir parties V.2.3 et V.2.4).

Une autre question importante concerne la dynamique d'assemblage de la mycomembrane au cours de la croissance des mycobactéries et la coordination entre la mise en place de la mycomembrane et les autres couches de l'enveloppe (peptidoglycane, arabinogalactane). Les outils de marquage métabolique développés ces dernières années ont permis de visualiser en temps réel la synthèse du peptidoglycane et l'export des mycolates dans l'enveloppe des mycobactéries (voir partie VI.2.2). En revanche, la dynamique temporelle d'assemblage de la mycomembrane aux pôles et au septum durant le cycle cellulaire reste encore peu étudiée. De plus, la mise en place des autres lipides de la mycomembrane n'a jamais été étudiée, notamment en raison de l'absence de technique de

marquage métabolique permettant de les visualiser spécifiquement par microscopie à la surface des bactéries.



Projet de recherche :

Le modèle TPP pour l'étude de  
l'export des lipides de  
l'enveloppe mycobactérienne

## Projet de recherche :

# Le modèle TPP pour l'étude de l'export des lipides de l'enveloppe mycobactérienne

Mon projet de thèse avait pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension du transport des lipides de la mycomembrane chez les mycobactéries, dont les problématiques sont énoncées ci-dessus. Pour cela, nous avons pris comme modèle d'étude l'export des TPP chez *M. smegmatis* (Burbaud *et al.*, 2016), un modèle pertinent pour les raisons suivantes. Premièrement, bien que les TPP soient absents de l'enveloppe de *M. tuberculosis*, les protéines impliquées dans leur synthèse et leur transport sont très proches de celles associées à la production d'autres lipides de la mycomembrane du bacille tuberculeux (en particulier des PAT et des SL), suggérant des mécanismes moléculaires d'export globalement conservés. Les résultats obtenus sur l'export des TPP pourront, par la suite, être potentiellement étendus aux autres lipides extractibles produits par les mycobactéries et notamment par *M. tuberculosis*. Deuxièmement, les TPP sont produits par *M. smegmatis*, une mycobactérie à croissance rapide et non pathogène, qui est largement utilisée pour comprendre le métabolisme et la physiologie de base d'autres espèces mycobactériennes, dont *M. tuberculosis*. De nombreux outils génétiques et biochimiques utilisables chez cette bactérie sont disponibles pour répondre aux questions concernant l'export des lipides extractibles, en particulier des approches d'imagerie pour étudier la dynamique des protéines dans les bactéries en croissance. Troisièmement, les TPP ne sont pas des lipides essentiels pour la viabilité de *M. smegmatis*, il est donc possible de manipuler et de modifier les enzymes impliquées dans leur biosynthèse et leur transport, sans perturber la croissance et la viabilité de la bactérie.

La voie de biosynthèse des TPP n'ayant été caractérisée que récemment, certaines étapes restent mal définies (Burbaud *et al.*, 2016). En particulier, le compartiment cellulaire où se fait la synthèse finale du TPP est inconnu. Cette dernière étape est assurée par l'acyltransférase PE, qui catalyse le transfert d'acides phléiques entre précurseurs des TPP, les

TMP. Le premier objectif de la thèse a donc consisté à identifier la localisation subcellulaire de la protéine PE dans *M. smegmatis*.

L'assemblage des différentes couches de l'enveloppe durant la croissance des mycobactéries reste à ce jour peu caractérisée. Le second objectif de la thèse a consisté à étudier la dynamique de mise en place des TPP durant la croissance cellulaire de *M. smegmatis*. Pour cela, nous avons étudié la localisation de MmpL10, l'unique transporteur connu des TPP, dans la membrane plasmique de *M. smegmatis*.

En combinant des approches génétiques, biochimiques et protéomiques, nous avons déterminé que la protéine PE est exportée dans la paroi de *M. smegmatis*, suite au clivage de son peptide signal. Ce clivage est nécessaire à la production des TPP, indiquant que leur synthèse finale a lieu dans les couches supérieures de l'enveloppe. Ces études précisent également la nature des composés qui sont transportés à travers la membrane plasmique par le transporteur MmpL10 puis exportés vers la mycomembrane.

Par microscopie de fluorescence, nous avons observé une localisation dynamique de MmpL10 au nouveau pôle lors de l'élongation cellulaire et au septum lors de la division. Pour aller plus loin, nous avons regardé si cette localisation était régulée par divers acteurs du cycle cellulaire (Wag31 et LamA). Enfin, nous avons comparé la localisation de MmpL10 avec celle de MmpL3, le transporteur des mycolates. Ces deux transporteurs ayant des dynamiques de localisation différentes dans la bactérie, nos données suggèrent que la mise en place des TPP dans l'enveloppe n'est pas ou peu corrélée à celle des mycolates.



Etude topologique de la  
protéine PE, impliquée dans la  
synthèse finale des TPP

# Etude topologique de la protéine PE, impliquée dans la synthèse finale des TPP

## I. Contexte de l'étude et objectifs

Les TPP sont des lipides à tréhalose composés d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes, appelés acides phléiques, du nom de la mycobactérie dans laquelle ils ont été originellement découverts, *M. phlei* (Asselineau *et al.*, 1972). Notre équipe a par la suite montré que ces lipides sont produits par de nombreuses MNT, dont *M. smegmatis* et le pathogène opportuniste *M. abscessus* (Burbaud *et al.*, 2016).

Lors de cette étude, un modèle de la voie de biosynthèse des TPP a été proposé (Burbaud *et al.*, 2016). D'après ce modèle, une Pks synthétise un acide phléique, qui est ensuite greffé sur une molécule de tréhalose par une transacylase nommée PapA3 (Figure 25). Un acide gras banal comme le palmitate est également greffé sur le tréhalose pour former le TMP, le précurseur diacylé du TPP. Le TPP final est synthétisé par transacylation d'acides phléiques entre molécules de TMP, une étape catalysée par l'acyltransférase PE. Les TPP ou leur précurseur sont ensuite transportés à travers la membrane plasmique par le transporteur MmpL10, puis exportés vers la mycomembrane.

Des prédictions de la structure de la protéine PE suggèrent que celle-ci possède un peptide signal et un site de clivage protéolytique à son extrémité N-terminale, ainsi qu'un domaine catalytique situé du côté C-terminal (voir partie IV.2.6) (Chalut, 2016). La localisation subcellulaire du domaine catalytique de PE est inconnue, ce qui soulève des questions sur le compartiment cellulaire dans lequel se déroule la réaction de transacylation et sur la relation entre la synthèse et l'export des TPP. Nous avons donc entrepris de déterminer la localisation de la protéine PE dans *M. smegmatis*, afin de compléter la voie de biosynthèse des TPP et d'identifier leur lieu de synthèse final.

## II. Résultats

Les résultats obtenus ont été publiés dans l'article suivant :

« The final assembly of trehalose polyphleates takes place within the outer layer of the mycobacterial cell envelope ».

Laurie Thouvenel, Gautier Prevot, Laura Chiaradia, Julien Parra, Emmanuelle Mouton-Barbosa, Marie Locard-Paulet, Julien Marcoux, Maryelle Tropis, Odile Burlet-Schiltz, Mamadou Daffé, Christophe Guilhot, Gilles Etienne, and Christian Chalut.

*Journal of Biological Chemistry* 295, 2020. doi : 10.1074/jbc.RA120.013299.

Contribution : L. Thouvenel a réalisé toutes les expériences à l'exception du fractionnement subcellulaire de *M. smegmatis* et des analyses de spectrométrie de masse.

# The final assembly of trehalose polyphleates takes place within the outer layer of the mycobacterial cell envelope

Laurie Thouvenel<sup>1</sup>, Gautier Prevot<sup>1,a</sup>, Laura Chiaradia<sup>1,b</sup>, Julien Parra<sup>1,c</sup>, Emmanuelle Mouton-Barbosa<sup>1</sup>, Marie Locard-Paulet<sup>1,2</sup>, Julien Marcoux<sup>1</sup>, Maryelle Tropis<sup>1</sup>, Odile Burlet-Schiltz<sup>1</sup>, Mamadou Daffé<sup>1</sup>, Christophe Guilhot<sup>1</sup>, Gilles Etienne<sup>1</sup>, and Christian Chalut<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

<sup>2</sup>Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research, University of Copenhagen, Denmark

<sup>a</sup>Present address: Eligo Bioscience, 29 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014, Paris, France

<sup>b</sup>Present address: Centre Hospitalier Territorial Gaston-Bourret, 110, boulevard Joseph-Wamytan - BP J5 - 98 849 Nouméa Cedex, Nouvelle Calédonie

<sup>c</sup>Present address: Evotec, 195 route d'Espagne, 195 Route d'Espagne, 31100 Toulouse, France

\*Corresponding author: Christian Chalut

E-mail: christian.chalut@ipbs.fr

**Running title:** Trehalose polyphleate biosynthesis

**Keywords:** enzyme, acyltransferase, lipid synthesis, lipid transport, membrane biogenesis, *Mycobacterium smegmatis*, protein export, proteomics, subcellular fractionation, trehalose polyphleate, glycolipid

## Abstract

Trehalose polyphleates (TPP) are high-molecular-weight, surface-exposed glycolipids present in a broad range of nontuberculous mycobacteria. These compounds consist of a trehalose core bearing polyunsaturated fatty acyl substituents (called phleic acids) and a straight-chain fatty acid residue, and share a common basic structure with trehalose-based glycolipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*. TPP production starts in the cytosol with the formation of a diacyltrehalose intermediate. An acyltransferase, called PE, subsequently catalyzes the transfer of phleic acids onto diacyltrehalose to form TPP, and an MmpL transporter promotes the export of TPP or its precursor across the plasma membrane. PE is predicted to be an anchored membrane protein, but its topological organization is unknown, raising questions about the subcellular localization of the final stage of TPP biosynthesis and the chemical nature of the substrates that are translocated by the MmpL transporter. Here, using genetic, biochemical, and proteomic approaches, we established that PE of *Mycobacterium smegmatis* is exported to the cell envelope following cleavage of its signal peptide and that this process is required for TPP biosynthesis, indicating that the last step of TPP formation occurs in the outer layers of the mycobacterial cell envelope. These results provide detailed insights into the molecular mechanisms controlling TPP formation and transport to the cell surface, enabling us to propose an updated model of the TPP biosynthetic pathway. Because the molecular mechanisms of glycolipid production are conserved among mycobacteria, these findings obtained with PE from *M. smegmatis* may offer clues to glycolipid formation in *M. tuberculosis*.

## Introduction

Mycobacteria are endowed with an unusually thick lipid-rich cell envelope. This structure contains several families of trehalose-containing glycolipids that interact with mycolic acids attached to the arabinogalactan to form an atypical outer membrane called the mycomembrane (1). Among these, the ubiquitous trehalose monomycolates (TMM) and trehalose dimycolates (TDM) are essential for viability (2). This group also includes species-specific glycolipids, such as di- and poly-acyltrehaloses (DAT, PAT) and sulfolipids (SL), which are restricted to the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, or lipooligosaccharides (LOS) that have been isolated from diverse fast- and slow-growing mycobacteria (1). Recently we reported that trehalose polyphleates (TPP), a family of surface-exposed glycolipids originally described in *Mycobacterium phlei*, are widely distributed across mycobacterial species, including *Mycobacterium smegmatis* and the opportunistic pathogens *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium avium* (3-5). TPP consist of octoacylated trehalose bearing seven C36:5 and C40:6 polyunsaturated fatty acids called phleic acids and a C14-C19 fatty acid residue. They share a common basic structure with SL and PAT from *M. tuberculosis* (6). The biological function of TPP in mycobacteria remains enigmatic. A recent study showed that TPP production in *M. abscessus* correlates with clump and cord formation, suggesting a potential role for these molecules in the virulence of this opportunistic human pathogen (7). Formation and export of TPP involve at least four biosynthetic enzymes and an MmpL transporter, namely MmpL10, that are encoded by genes clustered at the TPP locus (5). These proteins display sequence similarities with enzymes required for SL and PAT production, indicating that the TPP pathway can serve as an informative model to describe glycolipid production in *M. tuberculosis*. Biosynthesis of TPP begins in the cytoplasm with the formation of a 2,3-

diacyltrehalose intermediate bearing a C14-C19 fatty acyl group and a phleic acyl substituent. The transacylase enzyme PE encoded by the *MSMEG\_0412* gene (previously referred to as *MSMEI\_0402*), subsequently catalyzes transesterification of phleic acids between diacyltrehalose precursors to generate TPP. Finally, MmpL10 is involved in the translocation of TPP or/and of TPP precursors across the plasma membrane (5,8).

Despite this knowledge, the late stages of the TPP biosynthetic pathway and the relationship between biosynthesis and transport of these compounds to the cell envelope remain elusive. The PE protein is predicted to be a membrane-anchored protein harboring a putative N-terminal signal peptide and a C-terminal  $\alpha/\beta$ -serine hydrolase domain, consistent with its proposed role as an acyltransferase in TPP assembly (Fig. 1) (9,10). Interestingly, Chp1 and Chp2, two membrane-bound acyltransferases, respectively involved in SL and PAT production in *M. tuberculosis*, share overall domain organization with PE (Fig. 1). It has been proposed that these enzymes catalyze the last step of SL and PAT assembly by a mechanism that is tightly coupled to lipid transport across the plasma membrane but the molecular details of this process are not fully understood, partly because the *in vivo* subcellular localization of their catalytic domains remains controversial. Seeliger *et al.* indeed demonstrated that the catalytic domain of Chp1 is located in the cytoplasm (11) but two studies reported contradictory results on the orientation of Chp2, the catalytic domain being either cytoplasmic or periplasmic (12,13). Likewise, the orientation of PE in the plasma membrane and thereby the subcellular location of its catalytic domain, is unknown, raising questions on the cell compartment in which the transacylation step takes place and on the identity of the compounds that are transported by MmpL10. The goal of this study was to shed light on the last step of TPP biosynthesis by investigating the topological organization and subcellular location of the PE protein. Using a

combination of genetic, biochemical and proteomic approaches, we established that PE has a C-terminal periplasmic domain and found that proteolytic cleavage of PE is required for efficient formation of TPP. Based on these data, we present here a refined model of the TPP biosynthesis pathway. This work provides clues for a better understanding of the molecular mechanisms involved in DAT/PAT production in *M. tuberculosis*.

## Results

***The C-terminus of PE is located outside the plasma membrane*** - *In silico* analysis using the SignalP software predicts that PE possesses a putative signal sequence with a AXA signal peptidase I cleavage motif (PE<sub>1-28</sub>, cleavage site between positions 28 and 29: AAA-DD, Fig. 1) (14), it is thus possible that this protein is associated with the plasma membrane, facing either the periplasm or the cytoplasm, or exported to the bacterial cell wall after cleavage of the signal sequence. To discriminate between these possibilities, we first investigated the topological organization of PE in *M. smegmatis*. Plasmids expressing PE fused at the C-terminus with either the green fluorescent protein (GFP) or the alkaline phosphatase (PhoA) (Table S1), were introduced in the wild-type strain of *M. smegmatis* and the GFP and PhoA activities were monitored to determine the subcellular localization of the reporter proteins. GFP exhibits fluorescence only when localized to the cytosolic compartment, whereas PhoA is only active inside the periplasmic space (15,16). Expression of PE-GFP or PE-PhoA in a *M. smegmatis pE* knock-out mutant (PMM229) restored TPP production, indicating that the fusion proteins are correctly folded and display proper subcellular localization in bacteria (Fig. S1). Additional *M. smegmatis* strains producing KatG1, a cytosolic protein, MmpL10, a transmembrane protein with a cytoplasmic C-terminal end or MmpS4, a transmembrane protein with the C-terminal end facing the periplasm, fused to the same topology

reporter proteins were generated to serve as controls in the experiments (16,17). Bacteria producing PE-GFP displayed no increase in average fluorescence when compared to wild-type or control bacteria expressing MmpS4-GFP (Fig. 2A). Conversely, as expected, high fluorescence signals were detected for strains expressing KatG1-GFP or MmpL10-GFP. *M. smegmatis* strains producing the PhoA fusions were first assayed for alkaline phosphatase activity on LB agar plates containing the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP). Production of PE-PhoA resulted in blue colonies after incubation at 37°C, indicative of PhoA activity (Fig. 2B). A similar pattern was observed for the control strain expressing MmpS4-PhoA, whereas no color change was observed for strains expressing either KatG1-PhoA or MmpL10-PhoA. To confirm these data, the PhoA activity of fusion proteins was assessed on cells grown in LB using the chromogenic substrate *p*-nitrophenylphosphate (pNPP). Results obtained were consistent with those obtained on BCIP agar plates: bacteria that express PE-PhoA, as well as those producing MmpS4-PhoA, exhibited high levels of PhoA activity compared to the wild-type strain and control strains expressing KatG1-PhoA or MmpL10-PhoA (Fig. 2B). Collectively, these data indicated that the carboxyl-terminal domain of PE is exposed on the outside of the plasma membrane. In these studies, we also sought to confirm the topology of Chp1 and to resolve the contradictory research findings regarding the topological organization of Chp2, using *M. smegmatis* strains expressing each of these proteins fused to either the GFP or PhoA. Attempts to detect GFP fluorescence or PhoA activity in bacteria producing the Chp1 fusion proteins failed (data not shown). For Chp2, we observed a significant PhoA activity in cells expressing Chp2-PhoA on both solid and liquid media, but no increase in fluorescence in bacteria producing Chp2-GFP, compared to the wild-type or the negative control MmpS4-GFP (Fig. 2A and 2B), thus establishing that like PE, the Chp2 protein has its carboxyl-

terminal domain exposed to the periplasmic space.

***PE is present in the cell wall and secreted into the culture filtrate*** - Our topology studies revealed that the C-terminal domain of PE is located outside of the cytoplasm. To examine whether PE remains attached to the plasma membrane or is released into the bacterial cell-wall, we performed a comprehensive proteomic analysis of the subcellular fractions of *M. smegmatis*. The proteomes of four independent cultures of *M. smegmatis* were split in four subcellular fractions: plasma membrane, culture filtrate (secretome), mycomembrane-containing cell-wall (MMCW) and soluble proteins from cytosol and periplasm. Plasma membrane and MMCW were isolated from the cell lysates by differential ultracentrifugation on sucrose gradient, as described (18). The homogeneity of both membrane fractions has been demonstrated previously, using biochemical markers: arabinose and galactose (arabinogalactan), glucosamine, muramic acid and diaminopimelic acid (peptidoglycan) as markers of MMCW, and NADH oxydase and ATP synthase as markers of the plasma membrane. Only traces of MMCW markers were detected in the plasma membrane fraction, and conversely, very little NADH oxydase activity (3.6% of that measured in the plasma membrane) and no ATP synthase was detected in the MMCW fraction (18).

After concentration on SDS-PAGE, proteins from each fraction were digested in gel using trypsin. Peptides were then extracted from the gel and analyzed in quadruplicate injections by nano Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry (NanoLC-MS/MS) using an Orbitrap Fusion™ Tribrid™ mass spectrometer. MS data were searched against the Uniprot *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 database for protein identification and the quantitative comparison of relative protein abundances was performed using MS1-based label-free quantification. This data set contains 3,510 proteins and their relative quantities in the different fractions.

We first confirmed the presence of proteins of known subcellular localization in the different fractions, and their clustering based on MS signal (supplementary Fig. S2 and Table S2 for the list of marker proteins). The PE protein was not detected in the cytosol nor in the plasma membrane (Fig. 3A). It was detected with a very good sequence coverage in the MMCW (Fig. 3B). Although its signal was less intense, two specific peptides of PE were identified in the culture filtrate (see supplementary Fig. S3 for annotated spectra). Of note, the quantitative data relative to the subcellular specific proteomes generated in this study are available in the supplementary Table S3. These data constitute an informative resource on the subcellular distribution of *M. smegmatis* proteins.

**PE has a cleavable N-terminal signal sequence** - As mentioned, PE possesses a putative signal sequence with a cleavage site. Therefore, we next examined whether the signal sequence is cleaved and whether the mature protein is exported to the MMCW using biochemical approaches. An HA-tagged PE protein (PE-HA) was expressed in the PMM229 mutant ( $\Delta pE$ ) of *M. smegmatis* for estimating its relative molecular weight in cells, based on SDS-PAGE migration and Western blot analysis. Control strains producing either a mutated form of PE (PE<sub>ACS</sub>-HA) in which a stretch of amino acids (A26-D29) surrounding the putative cleavage site has been deleted to interfere with signal peptide removal, or the predicted mature form of PE (mPE-HA, residues 29-383), were used to distinguish between cleaved and uncleaved forms of PE (Fig. 4A). Two protein bands that migrate at positions corresponding to mPE-HA and to the non-cleavable PE<sub>ACS</sub>-HA variant, respectively, were detected in the cell extract of *M. smegmatis* expressing PE-HA, indicating that the PE protein underwent partial cleavage in this strain (Fig. 4A).

To further establish that PE contains a cleavable signal sequence, its N-terminus region with or without the AAA motif and its local peptide environment, was fused to the

mature form of the *E. coli*  $\beta$ -lactamase BlaTEM-1 (mBlaT, residues 24-286), generating fusion proteins PE<sub>1-25</sub>-mBlaT and PE<sub>1-30</sub>-mBlaT (Fig. 4B). BlaTEM-1 has been used before as a reporter for protein export with Sec and Tat substrates (19). PE<sub>1-30</sub>-mBlaT and PE<sub>1-25</sub>-mBlaT were expressed in PMM299, a *M. smegmatis* mutant lacking the major  $\beta$ -lactamase BlaS (see supplementary Fig. S4), and bacteria were tested for susceptibility towards ampicillin using a disk diffusion assay and the broth dilution method for MIC determination. Production of PE<sub>1-30</sub>-mBlaT in PMM299 restored resistance to ampicillin beyond the wild-type level (more than 64-fold and 2-fold increases in MIC relative to the PMM299 mutant and the parent strain, respectively). In contrast, production of PE<sub>1-25</sub>-mBlaT conferred only moderate resistance to ampicillin on both solid and liquid media (2 to 4-fold increase in MIC compared to the PMM299 mutant) (Fig. 4B).

To confirm that the difference we observed between the two proteins reflected a real difference in protein cleavage, we performed Western blot analysis with an anti-BlaTEM-1 antibody on cell lysates prepared from PMM299 expressing either PE<sub>1-30</sub>-mBlaT or PE<sub>1-25</sub>-mBlaT. We found that the two proteins were produced in similar quantities in bacteria (Fig. 4C). In accordance with their calculated molecular weights (CMW), PE<sub>1-25</sub>-mBlaT (CMW 31.8 kDa) migrated as a single band protein with an apparent molecular mass slightly higher than that of the full-length  $\beta$ -lactamase BlaTEM-1 (CMW 31.6 kDa), confirming that the protein was not processed in PMM299 (Fig. 4C). By contrast, two bands of similar intensity were visible for PE<sub>1-30</sub>-mBlaT. Their migration on SDS-PAGE was consistent with the CMW of the full-length unprocessed form of the protein (32.3 kDa) and of the mature form of BlaTEM-1 with an additional DDKL amino acid sequence (DDKL-mBlaT, 29.4 kDa) (Fig. 4C). It can thus be concluded that PE<sub>1-25</sub>-mBlaT remains attached to the plasma membrane due to the lack of signal sequence cleavage, causing a moderate increase in antibiotic resistance,

whereas PE<sub>1-30</sub>-mBlaT undergoes proteolytic processing, leading to mBlaT excretion in the cell envelope and high-level ampicillin resistance. Consistently, expression of BlaTEM-1 proteins with an altered cleavage signal sequence in *E. coli* confers intermediate-level resistance to ampicillin compared to the wild-type form of BlaTEM-1 (20). Altogether, data obtained with the BlaTEM-1 reporter protein, in addition to those obtained with the HA-tagged fusion proteins, confirmed that PE is excreted in the periplasmic compartment or the MMCW of *M. smegmatis* following signal peptide cleavage.

***Cleavage of PE is required for efficient production of TPP*** - We finally explored whether formation of TPP in *M. smegmatis* depends on proteolytic cleavage of PE. Strain PMM229 ( $\Delta pE$ ) expressing either PE-HA or PE $\Delta$ CS-HA (Fig. 4A), as well as the wild-type and the PMM229 mutant strains, were grown to mid-exponential phase. The cellular and surface-exposed lipid fractions were extracted from each strain and separated by thin layer chromatography (TLC). As previously reported, disruption of *pE* impaired TPP production and resulted in accumulation of a relatively polar compound that corresponds to the diacyl trehalose precursor of TPP, in both the cellular and surface compartments (5) (Fig. 5A). Production of PE-HA in PMM229 restored the wild-type phenotype. In this complemented strain, TPP were found in the cellular and surface-exposed lipid fractions and the intermediate product was undetectable in these lipid fractions. By contrast, PMM229 cells expressing the PE $\Delta$ CS-HA protein were defective in TPP production and accumulated the precursor in the cellular and surface compartments. These data demonstrate that the PE $\Delta$ CS-HA protein is unable to catalyze TPP formation, likely because the enzyme is anchored to the plasma membrane and has limited access to its substrate that is mainly located in the outer layers of the cell envelope. We cannot totally rule out that the small deletion present in

PE $\Delta$ CS-HA may affect protein stability. However, amino acid residues surrounding the signal peptidase cleavage motif are located away from the predicted serine hydrolase core domain of PE (residues 90-324) and are probably not required for the correct folding of this domain. Supporting this, it has been shown that the A30-G359 domain of Chp2, which starts 5 residues after the putative AXA cleavage motif (Fig. 1), displays acyltransferase activity *in vitro* (12).

## Discussion

In a previous study, we proposed a model for the biosynthesis of TPP, but some steps of this biosynthetic pathway remain poorly characterized, including the one involving the acyltransferase PE (5). Here, we shed new light on the molecular mechanisms that underlie the latter stages of TPP production in *M. smegmatis*. Based on a series of genetic, biochemical and proteomic approaches, we established that i) the C-terminal domain of PE, and therefore its catalytic domain, resides outside the plasma membrane, ii) PE is cleaved and excreted in the MMCW, iii) proteolytic processing of PE is required for efficient production of TPP in bacteria. These data, in combination with our previous findings, allow us to propose an updated version of the TPP biosynthetic pathway (Fig. 6): the 2,3-diacyltrehalose precursor is synthesized through a series of cytoplasmic steps catalyzed by enzymes encoded by the TPP locus (FadD23, Pks, PapA3) (5) and is translocated across the plasma membrane by the MmpL10 transporter. The intermediate molecule is then exported to the cell surface where PE transacylates phleic acids between precursors to yield TPP. Several lines of evidence support this scenario. First, a *mmpL10* mutant of *M. smegmatis* is completely devoid of TPP, indicating that the transacylase reaction is dependent on the translocation process and likely occurs after this step (5). Second, accumulation of the intermediate product in the surface exposed-lipid fraction of the PMM229 ( $\Delta pE$ ) mutant indicates that this compound is translocated through the plasma membrane by MmpL10 and transferred to the cell surface. Third, we established that only the mature form of PE catalyzes TPP formation, supporting the notion that transacylation takes place in the cell envelope. Presumably, the full-length unprocessed PE protein is unable to perform this

reaction because it has a restricted access to its substrate in the neighborhood of the plasma membrane.

In our Western blot analyses, we observed partial cleavage of PE, likely due to a relative overexpression of the protein in the PMM229 mutant compared to the wild-type expression level. To visualize PE, we indeed used a PMM229 strain in which expression of *pE* was under the control of the strong promoter *pBlaF\** (21) because we failed to detect protein production in cells carrying the *pE* gene under the control of its native promoter. Note that cleavage efficiency observed in our Western blot experiments might be underestimated, due to a possible partial secretion of the processed form of PE, as evidenced by our proteomic studies. These studies, which identified PE in the MMCW but not in the plasma membrane of *M. smegmatis*, lend support to the idea that the protein exists primarily in a mature active form in the bacterium, when produced at physiological levels. BLAST searches in the GenBank database revealed that at least 100 mycobacterial species harbor the TPP locus and can potentially synthesize this family of glycolipids (Table S4). Interestingly, the presence of a predicted N-terminal signal sequence with a conserved AXA motif in the PE orthologs putatively produced by species containing the TPP locus, indicates that secretion of these enzymes is a general process in TPP producers (Table S4).

The basic mechanisms underlying synthesis and export of trehalose-containing lipids are evolutionarily conserved in mycobacteria (8). Notably, it has been shown that two transmembrane acyltransferases, namely Chp1 and Chp2, sharing similar domain organization with PE, participate in SL and PAT assembly in *M. tuberculosis* by catalyzing sequential transesterification between SL precursors and DAT molecules, respectively. Despite similar functions in the formation of trehalose glycolipids, these acyltransferases exhibit strict substrate specificity since Chp1 and Chp2 are not functionally interchangeable for PAT and SL formation (13) and neither of the two enzymes can restore TPP production in the PMM229 mutant of *M. smegmatis* (Fig. 5B).

The C-terminal end of Chp1 was shown to reside in the cytosol, indicating that SL are built-up intracellularly and exported to the cell envelope (11). The orientation of Chp2 in the plasma membrane is controversial since two studies demonstrated opposite orientation (12,13). We

were unable to confirm the topological organization of Chp1 using the reporter proteins GFP and PhoA in *M. smegmatis* because both Chp1-GFP and Chp1-PhoA were found to lack activity (data not shown). To demonstrate the cytosolic localization of the C-terminal domain of Chp1, Seeliger *et al.* (11) used the  $\beta$ -galactosidase reporter instead of the GFP. The absence of fluorescence with the Chp1-GFP fusion in our studies may result from protein misfolding. This hypothesis is nevertheless difficult to test experimentally in *M. smegmatis* because this bacterium does not produce SL and, as mentioned above, Chp1 cannot restore TPP production in a mutant strain lacking PE. Here, we provide evidence that the catalytic domain of Chp2 has a periplasmic localization when expressed in *M. smegmatis*. Although we failed to provide clear evidence that Chp2 is cleaved in this bacterium, the presence of an AXA motif at the end of the signal sequence strongly suggests that the protein might be converted to a mature form that is excreted in the periplasmic space in *M. tuberculosis*. In that situation, the scenario for DAT/PAT production would be similar to that of TPP in *M. smegmatis*: DAT would be synthesized in the cytosol and transferred to the bacterial cell surface to serve as a substrate for Chp2.

Despite significant progress made in understanding the mechanisms of glycolipid formation in mycobacteria, the molecular machinery involved in their transport across the cell envelope remains to be identified. For instance, it is not known whether MmpL10 cooperates with other proteins to promote TPP export. Using a GFP-trap pulldown approach, Fay *et al.* (22) recently identified two transmembrane proteins interacting with the MmpL3 transporter during mycolic acid transport in both *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*, but no protein was found to bind MmpL10 in a parallel control experiment. Recent studies pointed out the role of lipoproteins in the export of several families of lipids in *M. tuberculosis* but, to date, none of them has been shown to be involved in the transport of trehalose-containing glycolipids (23). The location of PE in the cell envelope makes this protein a suitable candidate as a bait for identifying interacting partners putatively involved in TPP transport. Delineation of the basic mechanisms that drive TPP transport in the mycobacterial model organism *M. smegmatis* may serve as a guide to describe export of glycolipids in *M. tuberculosis*.

## Experimental Procedures

**Bacterial strains, growth media and culture conditions** - Plasmids were propagated at 37°C in *E. coli* DH5 $\alpha$  in LB broth or LB agar (Invitrogen) supplemented with either kanamycin (Km) (40  $\mu$ g/mL) or hygromycin (Hyg) (200  $\mu$ g/mL). *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 wild-type and derivatives (Table S5) were grown at 37°C in LB broth or in Middlebrook 7H9 broth (DB Difco) containing ADC (0.2% dextrose, 0.5% BSA fraction V, 0.0003% beef catalase) and 0.05% Tween 80 when necessary and on LB agar. When required, Km and Hyg were used at a concentration of 40  $\mu$ g/mL and 50  $\mu$ g/mL, respectively. For subcellular fractionation and MS analysis, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 was grown in 7H9 Middlebrook broth medium supplemented with 0.2% glycerol (Sigma) at 37°C with shaking at 180 rpm.

**Construction of the *M. smegmatis* blaS-disrupted mutant** - The *M. smegmatis* blaS mutant (PMM299) was constructed by homologous recombination using pWM290, a derivative of the mycobacterial suicide plasmid pJQ200 harboring the counterselectable marker *sacB* (24). Briefly, two DNA fragments encompassing the regions located upstream and downstream of the *blaS* gene (*MSMEG\_2658*) (25) were amplified by PCR from *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 total DNA and inserted, flanking a *res-km-res* resistance cassette, into pWM290. The resulting plasmid (pWMbla) was transferred by electroporation into *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 for allelic exchange and transformants were selected on plates containing Km and sucrose. Several Km- and sucrose-resistant colonies were screened by PCR with different primer combinations. For further details, see supporting information Fig. S4.

**Construction of protein expression vectors** - Plasmids used in this study are indicated in the supplementary Table S1. Details of plasmid constructions are described in supporting information.

**Fluorescence and alkaline phosphatase-based assays for topology determination of PE** - The subcellular location of the C-terminal region of PE was investigated using the topology reporter proteins PhoA and GFP (15,16). To measure the fluorescence intensities of strains expressing the GFP fusion proteins, bacteria were grown in LB containing 0.05% Tween 80 to logarithmic phase. Bacterial concentrations were determined by OD<sub>600</sub> measurements and 500  $\mu$ L of each culture were centrifuged for 1 min at 12,000 rpm. Pellets were resuspended in 500  $\mu$ L of PBS containing 0.05% Tween 80 and 100  $\mu$ L of each bacterial suspension were transferred to 96 well plates in triplicate. Fluorescence intensities were measured using a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech) at excitation and emission wavelengths of 470-15 and 515-20 nm, respectively. PhoA activities of *M. smegmatis* strains producing PhoA fusions were assessed by streaking bacteria on LB agar plates supplemented with 60  $\mu$ g/mL BCIP. Plates were incubated at 37°C for 4 days. PhoA activities were also measured on cells grown in liquid medium using the chromogenic substrate pNPP (NEB). Bacteria were cultivated in LB at 37°C and growth was followed by OD<sub>600</sub> measurements. Bacteria were then washed twice with 1M Tris pH 8.0 containing 0.05% Tween 80 and the OD<sub>600</sub> was adjusted to 2 with this buffer. 200  $\mu$ L of cell suspension were mixed with 1 mL of buffer containing 10 mM of pNPP and 10 mM of MgCl<sub>2</sub> and incubated for 90 min at 37°C in the dark. The reaction was stopped by adding 0.2 mL of 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution (Sigma). Tubes were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm to remove aggregates and 1 mL of supernatant was used to measure absorbance at 405 nm.

**Antimicrobial susceptibility testing** - Ampicillin susceptibilities of *M. smegmatis* strains expressing the BlaTEM fusion proteins were assessed using the disk diffusion method and by MIC measurements. For the disk diffusion assay, cultures were

grown to mid exponential phase ( $OD_{600}$  = 0.3 - 0.5) in 7H9 containing 0.05% Tween 80. Cells were washed once with fresh medium, and resuspended in an equal volume of 7H9. 200  $\mu$ L of cell suspension were mixed with 5 mL of molten top agar (0.6% agar, 0.2% glycerol, v/v) and poured onto 7H11 plates supplemented with OADC. Home-made discs containing 100 or 200  $\mu$ g of ampicillin were placed on top and plates were incubated for 3 days at 37°C. MIC were determined by the broth microdilution method. Cultures were harvested at mid-exponential phase in 7H9 containing 0.05% Tween 80 and the  $OD_{600}$  were adjusted to 0.3 with fresh medium. 10  $\mu$ L of each culture were used to inoculate 1 mL of 7H9 supplemented with 0.05% Tween 80 containing two-fold serially-diluted ampicillin (from 512 to 1  $\mu$ g/mL) in a 24 well-plate (Nunc). Plates were incubated for 3 days at 37°C with shaking at 150 rpm. The MIC corresponds to the lowest concentration of antibiotic inhibiting visible growth of bacteria.

**Detection of proteins in bacteria by Western Blot analyses** - To prepare whole cell lysates of *M. smegmatis*, bacteria were grown in 50 mL of 7H9, collected by centrifugation and resuspended in 500  $\mu$ L of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4). 500  $\mu$ L of 0.1 mm glass beads (Biospec) were added to the cell suspensions and bacteria were subjected to bead beating (Retsch Mixer Mill) for two cycles of 1 min with 2 min on ice in between each cycle. Tubes were centrifuged briefly to pellet beads and collect the supernatant fractions. Alternatively, 100 to 400 mL of bacterial cultures were collected and resuspended in 10 mL of lysis buffer. Cells were lysed by two passages through a French press, at 1,500 bars. For both methods, cell lysates were subjected to centrifugation at 3,000 g for 10 min to remove non-lysed cells. To perform Western Blot analyses, proteins from whole cell lysates were separated by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes (Pall Corporation).

Membranes were incubated in 1X phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 and 10% nonfat dry milk and then incubated for 1 h with either a mouse monoclonal anti-HA antibody (clone HA-7, Sigma, 1/10,000) or a mouse monoclonal anti-BlaTEM-1 antibody (clone MA1-20370, Invitrogen, 1/400) in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% dry milk. Membranes were washed three times for 5 min with PBS containing 0.1% Tween 20 and incubated for 1 h with a HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma) at the dilution 1/3,000 in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% nonfat dry milk. Protein bands were visualized using the EMD Millipore Immobilon enhanced chemiluminescence kit and a ChemiDoc Touch imaging system (Bio-Rad).

**Extraction of mycobacterial lipids and TLC analyses** - Bacteria were cultivated in LB medium at 37°C and recovered by centrifugation (3,000 g, 10 min). Total lipid fractions were extracted from bacterial pellets with chloroform:methanol (1:2) and chloroform:methanol (2:1), washed with water, and dried before analysis. Cellular and surface-exposed lipids were prepared as previously described (5,26). Mycobacterial cell pellets were shaken for 1 min with 10 g glass beads (4-mm diameter) per 2 g (wet weight) cells, and resuspended in distilled water. Extracellular materials were separated from cells by centrifugation (3,000 g, 10 min). Cellular lipid fractions were then extracted from pellets with chloroform:methanol (1:2) and chloroform:methanol (2:1), washed with water, and dried before analysis. Surface-exposed lipids were extracted from supernatants with chloroform and methanol according to the Bligh and Dyer procedure (27). After drying, the organic phases were washed. For TLC analyses equivalent amounts of lipids from each strain were spotted on silica gel G60 plates (20x20 cm, Merck) run in  $CHCl_3/CH_3OH$  (90:10, v/v). The spots were visualized by spraying the

plates with a 0.2% anthrone solution (w/v) in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by heating.

***Bacteria lysis and fractionation on sucrose density gradient for proteomics by MS*** - *M. smegmatis* cells were fractionated as previously described (18). Briefly, exponentially growing bacteria were harvested by centrifugation at 3,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was filtrated through a 0.2 µm sterile Nalgene filter to yield the culture filtrate and proteins were concentrated using a 3,000 Da MWCO vivaspin. The pellet was suspended in lysis buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.4 containing 5 µL benzonase nuclease >250 units/mL (Sigma-Aldrich), 1 mM dithiothreitol, 2 mM AEBSF (Euromedex) and 1 mM EDTA) and bacterial cells were broken by two passages through a French press cell (1,500 bars). Unbroken bacteria were removed by centrifugation (3,000 g for 10 min, twice). The bacterial lysate was then submitted to centrifugation at 10,000 g for 40 min to yield crude MMCW fraction (pellet P10) and S10 supernatant. P10 was suspended in 20 mM Tris HCl, pH 7.4 containing EDTA (1 mM), layered on a sucrose step gradient (from 10% w/w to 60% w/w) then centrifuged for at least 2 h at 100,000 g. The MMCW fraction was recovered between the 30-36 % sucrose cushions interface and washed twice with Tris HCl buffer (10,000 g, 1 h). The S10 supernatant was centrifuged at 27,000 g for 30 min, and the resulting supernatant (S27) was further separated into supernatant (S100 fraction) and pellet (P100 fraction) by centrifugation at 100,000 g for 40 min. S100 yielded the cytosolic fraction. The P100 was suspended in 20 mM Tris HCl, pH 7.4 containing 1 mM EDTA before being layered on a sucrose step gradient (from 10% w/w to 60% w/w) and centrifuged for at least 2 h at 100,000 g. Plasma membranes were recovered at the interface of 20-30 % sucrose cushions and washed twice with Tris HCl buffer (100,000 g, 1 h).

***Protein digestion and nanoLC-MS/MS analysis*** - Subcellular fractions were

analyzed on an Orbitrap Fusion™ Tribrid™ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), as previously described (18), but with slight modifications (see supporting information).

***Bioinformatic MS data analysis*** - The Mascot (Mascot server v2.6.2; <http://www.matrixscience.com>) database search engine was used for peptide and protein identification using automatic decoy database search to calculate a false discovery rate (FDR). MS/MS spectra were compared to the UniProt *M. smegmatis* strain ATCC700084/mc<sup>2</sup>155 database (release June 2017, 12,683 sequences). See supporting information for more details about the data analysis.

**Data availability**

All the R scripts associated to this study are freely available with the Proline export tables on <https://zenodo.org> with the DOI 10.5281/zenodo.3686899. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (28) partner repository with the dataset identifier PXD017602.

**Acknowledgments**

We are grateful to Pr. Claude Gutierrez (IPBS, University of Toulouse) for providing the pPH07 plasmid.

**Funding and additional information**

This study was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale FRM (DEQ20160334879), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the French Ministry of Research with the "Investissement d'Avenir, Infrastructures Nationales en Biologie et Santé" Program (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08). LT is recipient of a fellowship from the Ministry of Teaching and Scientific Research. MLP was supported by the Novo Nordisk Foundation (NNF14CC0001). LC was a fellow of Province-Sud of New Caledonia.

**Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

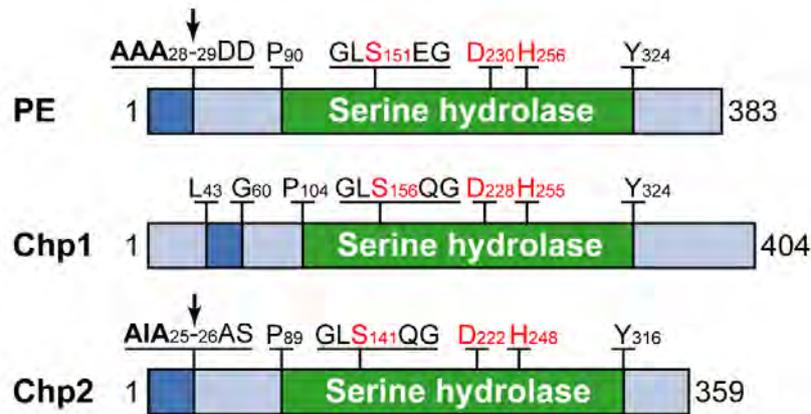
## References

1. Daffe, M., Crick, D. C., and Jackson, M. (2014) Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiol Spectr* **2**, MGM2-0021-2013
2. Daffe, M., and Marrakchi, H. (2019) Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiol Spectr* **7**, GPP3-0027-2018
3. Asselineau, C., Montrozier, H., and Prome, J. C. (1969) [Presence of polyunsaturated acids in bacteria: isolation of hexatriacontapentaene-4,8,12,16,20-oic acid and acid analogs from Mycobacterium phlei lipids]. *Eur J Biochem* **10**, 580-584
4. Asselineau, C. P., Montrozier, H. L., Prome, J. C., Savagnac, A. M., and Welby, M. (1972) [Polyunsaturated glycolipids synthesized by Mycobacterium phlei]. *Eur J Biochem* **28**, 102-109
5. 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
6. Seeliger, J., and Moody, D. B. (2016) Monstrous Mycobacterial Lipids. *Cell Chem Biol* **23**, 207-209
7. Llorens-Fons, M., Perez-Trujillo, M., Julian, E., Brambilla, C., Alcaide, F., Byrd, T. F., and Luquin, M. (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
8. Chalut, C. (2016) MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis* **100**, 32-45
9. Adindla, S., and Guruprasad, L. (2003) Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in Mycobacterium tuberculosis and other genomes. *J Biosci* **28**, 169-179
10. Sultana, R., Tanneeru, K., and Guruprasad, L. (2011) The PE-PPE domain in mycobacterium reveals a serine alpha/beta hydrolase fold and function: an in-silico analysis. *PLoS One* **6**, e16745
11. Seeliger, J. C., Holsclaw, C. M., Schelle, M. W., Botyanszki, Z., Gilmore, S. A., Tully, S. E., Niederweis, M., Cravatt, B. F., Leary, J. A., and Bertozzi, C. R. (2012) Elucidation and chemical modulation of sulfolipid-1 biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* **287**, 7990-8000
12. 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
13. 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**, 201-210
14. Auclair, S. M., Bhanu, M. K., and Kendall, D. A. (2012) Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* **21**, 13-25
15. Wiker, H. G., Wilson, M. A., and Schoolnik, G. K. (2000) Extracytoplasmic proteins of Mycobacterium tuberculosis - mature secreted proteins often start with aspartic acid and proline. *Microbiology* **146** ( Pt 7), 1525-1533
16. Belardinelli, J. M., and Jackson, M. (2017) Green Fluorescent Protein as a protein localization and topological reporter in mycobacteria. *Tuberculosis* **105**, 13-17
17. Deshayes, C., Bach, H., Euphrasie, D., Attarian, R., Coureuil, M., Sougakoff, W., Laval, F., Av-Gay, Y., Daffe, M., Etienne, G., and Reyrat, J. M. (2010) MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in Mycobacterium smegmatis. *Mol Microbiol* **78**, 989-1003

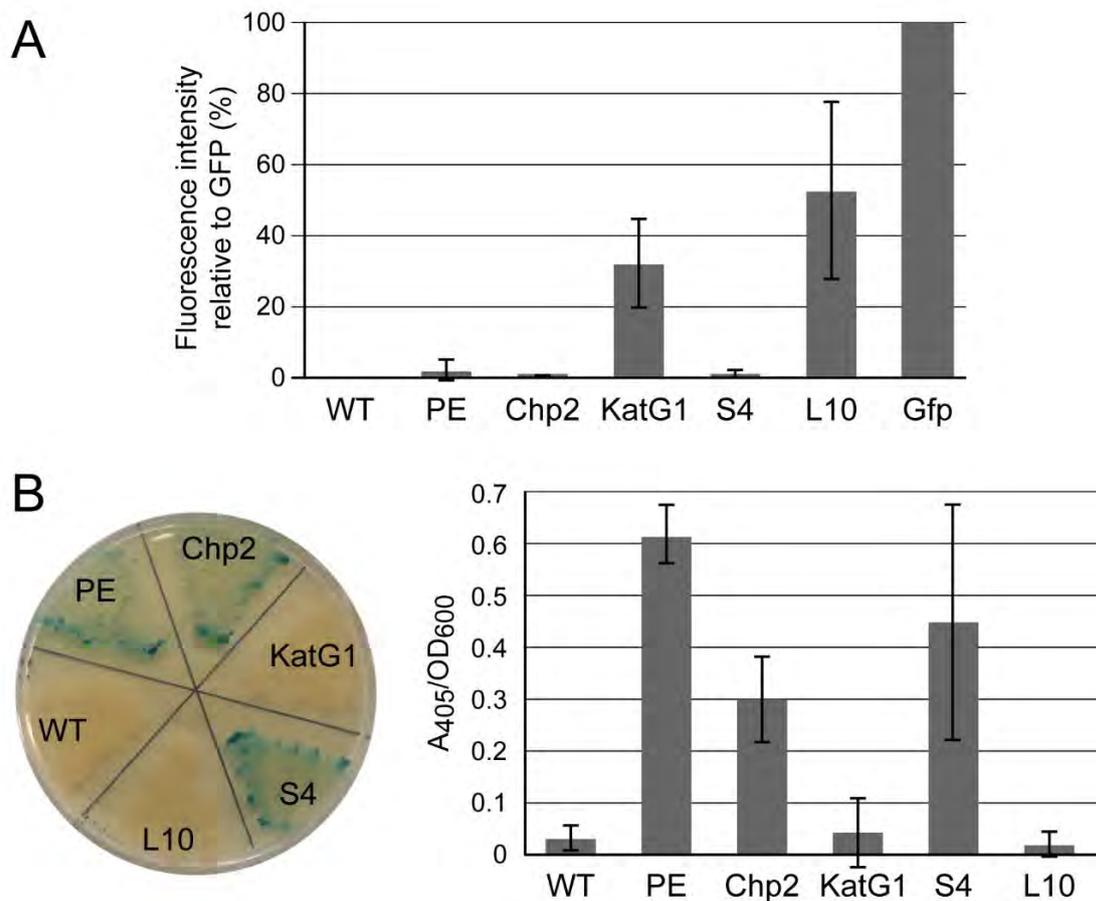
18. Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., Tropis, M., and Daffe, M. (2017) Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep* **7**, 12807
19. McCann, J. R., McDonough, J. A., Pavelka, M. S., and Braunstein, M. (2007) Beta-lactamase can function as a reporter of bacterial protein export during *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells. *Microbiology* **153**, 3350-3359
20. Palzkill, T., Le, Q. Q., Wong, A., and Botstein, D. (1994) Selection of functional signal peptide cleavage sites from a library of random sequences. *J Bacteriol* **176**, 563-568
21. Timm, J., Lim, E. M., and Gicquel, B. (1994) *Escherichia coli*-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to *lacZ*: the pJEM series. *J Bacteriol* **176**, 6749-6753
22. Fay, A., Czudnochowski, N., Rock, J. M., Johnson, J. R., Krogan, N. J., Rosenberg, O., and Glickman, M. S. (2019) Two Accessory Proteins Govern MmpL3 Mycolic Acid Transport in Mycobacteria. *MBio* **10**, e00850-19
23. Touchette, M. H., and Seeliger, J. C. (2017) Transport of outer membrane lipids in mycobacteria. *Biochimica et biophysica acta* **1862**, 1340-1354
24. Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15-21
25. Flores, A. R., Parsons, L. M., and Pavelka, M. S., Jr. (2005) Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology* **151**, 521-532
26. Etienne, G., Malaga, W., Laval, F., Lemassu, A., Guilhot, C., and Daffe, M. (2009) Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in mycobacteria. *J Bacteriol* **191**, 2613-2621
27. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917
28. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Perez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., and Vizcaino, J. A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* **47**, D442-D450
29. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6
30. Ortalo-Magne, A., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G., and Daffe, M. (1996) Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J Bacteriol* **178**, 456-461

### Footnotes

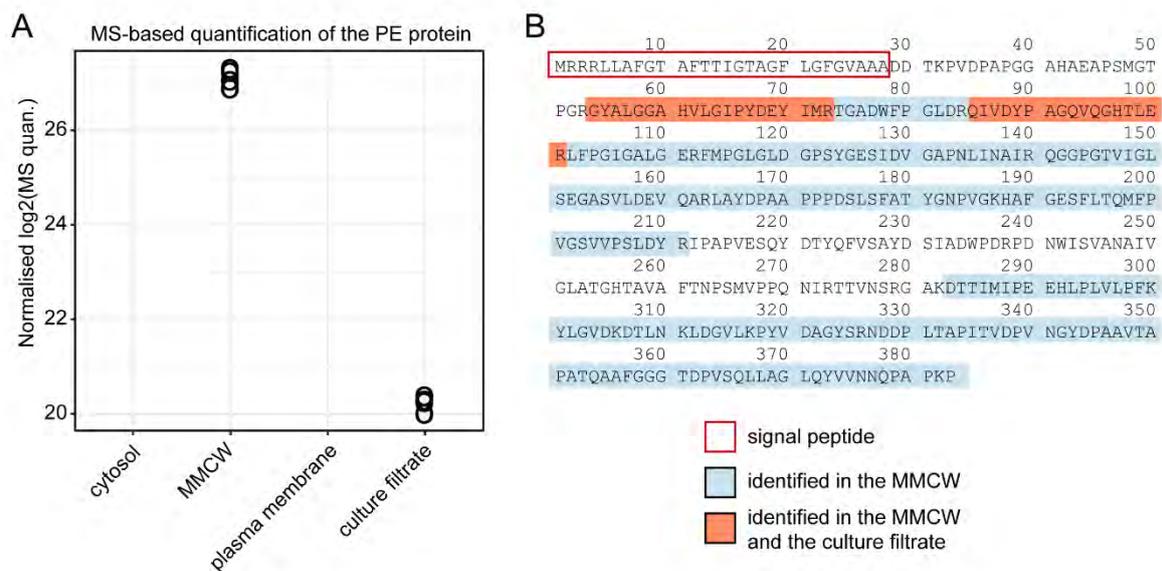
The abbreviations used are: BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; DAT, diacyltrehalose; GFP, green fluorescent protein; MMCW, mycomembrane-containing cell wall; MS, mass spectrometry; pNPP, *p*-nitrophenylphosphate; PhoA, alkaline phosphatase; SL, sulfolipids; TPP, Trehalose polyphosphates.



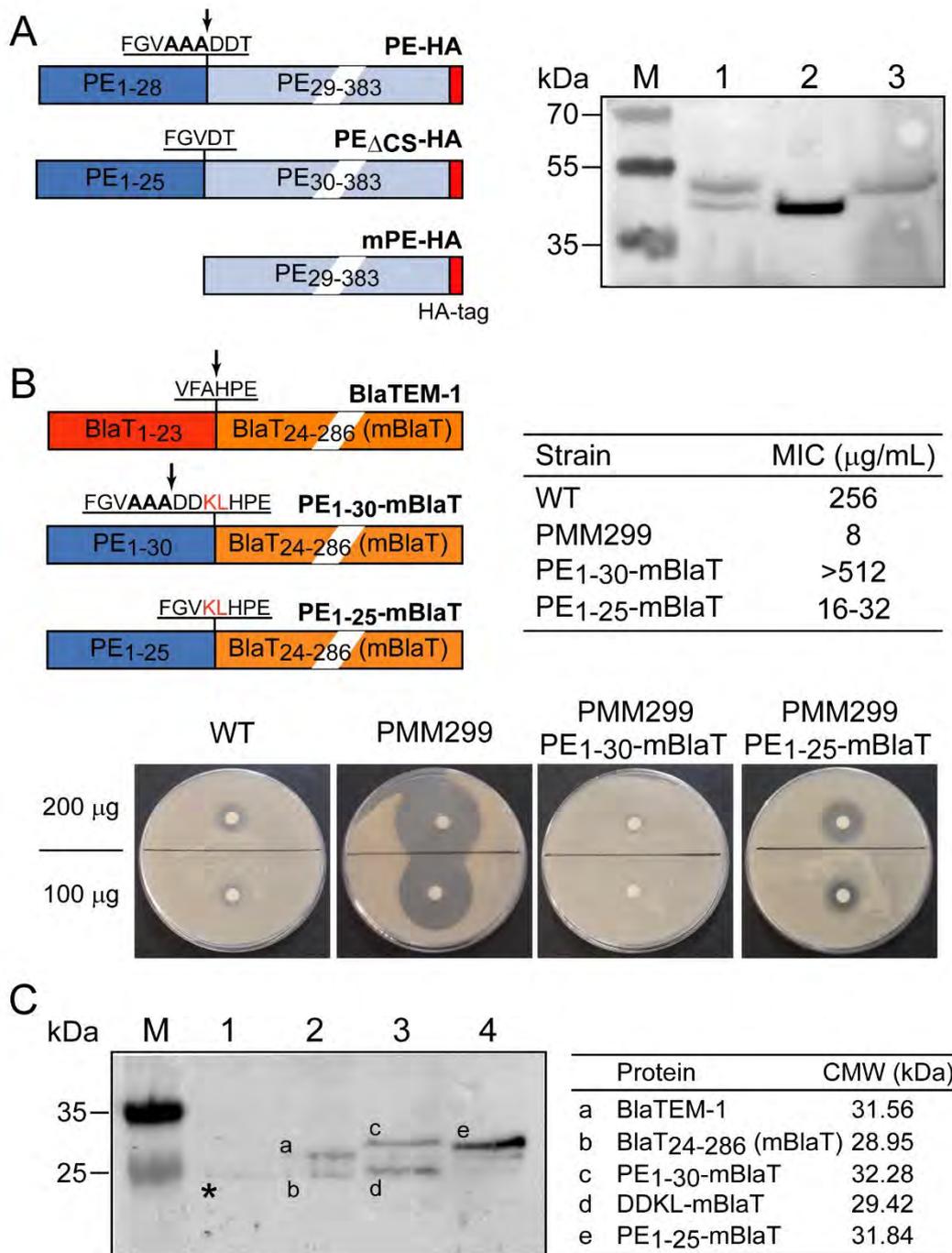
**Figure 1.** Domain organization of PE, Chp1 and Chp2. *In silico* analyses predict that PE (UniProtKB - Q2M5K2, also referenced as “PE family protein” UniProtKB - I7FDB0) and Chp2 (UniProtKB - O50440) possess a putative N-terminal signal peptide (dark blue boxes) with an AXA signal peptidase cleavage motif (bold) (14), whereas Chp1 (UniProtKB - O07801) contains a putative transmembrane helix (dark blue box) with no signal peptide cleavage site. Predicted cleavage sites in PE and Chp2 are indicated (black arrows). The three proteins harbor a conserved C-terminal domain (green boxes). 3D structure modeling of these domains revealed an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold with a SDH catalytic triad (shown in red) and a conserved GxSxG/S pentapeptide motif sequence surrounding the serine residue, characteristic of serine hydrolase proteins (10). Predictions of transmembrane topology and signal peptides were performed using Phobius (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius>) and SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>).



**Figure 2.** Subcellular localization of the C-terminus of PE and Chp2. **(A)** Relative fluorescence intensities of *M. smegmatis* WT and of strains expressing PE, Chp2, KatG1, MmpS4 (S4) or MmpL10 (L10) tagged with the GFP protein at their C-termini. Fluorescence intensity values were normalized to the OD<sub>600</sub> of the cultures and were background corrected by subtracting the fluorescence values of *M. smegmatis* WT. Data are expressed as percentages derived from the mean fluorescence intensity of each strain divided by the mean fluorescence intensity of a *M. smegmatis* strain expressing the GFP. Data shown on the graph are the average relative fluorescence values +/- standard deviations (error bars) measured in triplicate of three independent experiments. **(B)** Phosphatase alkaline activity of *M. smegmatis* WT and strains expressing PE, Chp2, KatG1, MmpS4 (S4) or MmpL10 (L10) fused to PhoA at their C-termini. PhoA activities were tested on LB agar plates containing the chromogenic substrate BCIP (left). Blue colonies are indicative of PhoA activity. The PhoA activity was also evaluated on cells grown in LB using the chromogenic substrate pNPP (right). For each strain, the absorbance at 405 nm was normalized to the OD<sub>600</sub> of the bacterial culture. Data shown on the graph are the average fluorescence values +/- standard deviations (error bars) measured in triplicate of three independent experiments.

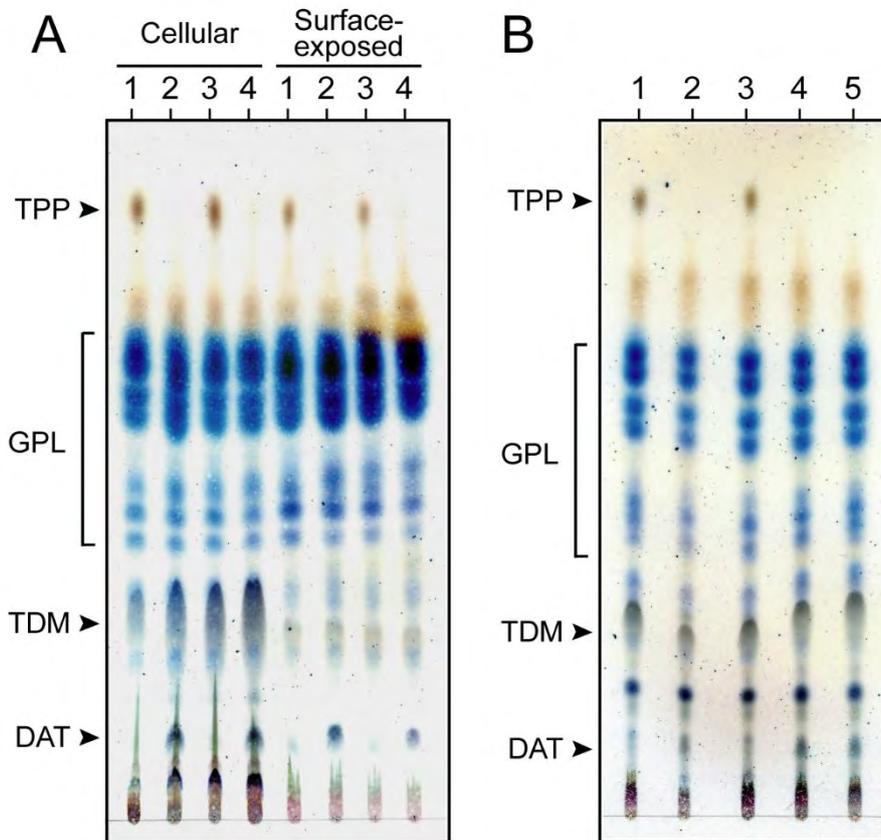


**Figure 3.** PE protein subcellular localization attested by quantitative proteomics. **(A)** Relative quantities of the protein PE (UniProtKB - I7FDB0) in the 4 sub-cellular fractions (4 biological replicates). **(B)** Sequence coverage of the PE protein in the MMCW and culture filtrate. The signal peptide located at PE N-terminal is indicated by a red rectangle (SignalP 5.0 prediction) (29).

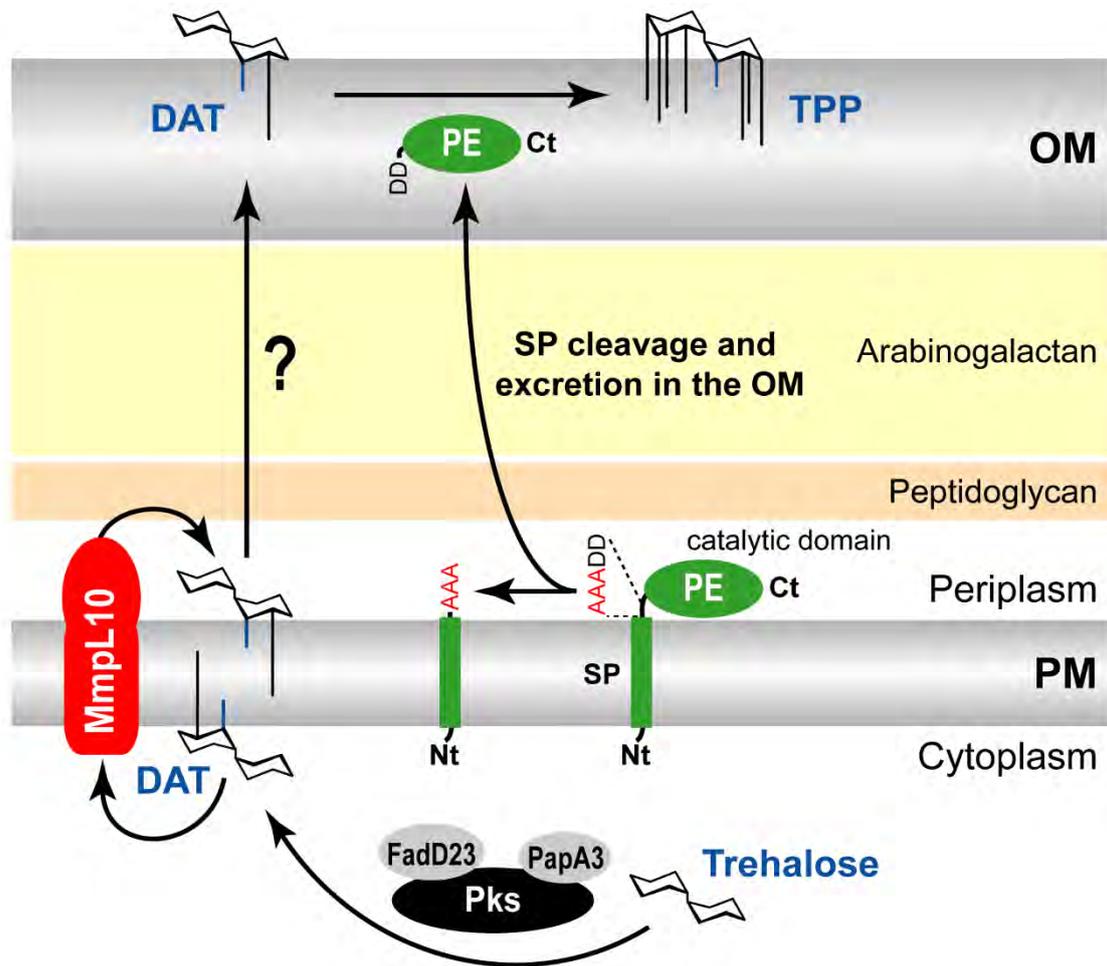


**Figure 4.** Cleavage of PE in *M. smegmatis*. **(A)** Western blot analysis of total cell lysates from PMM299 ( $\Delta pE$ ) expressing PE-HA (1), mPE-HA (2), or PE $\Delta$ CS-HA (3), using an anti-HA antibody and an anti-mouse peroxidase conjugate (right panel). A schematic representation of the HA-fusion proteins expressed in PMM299 is depicted on the left. The signal sequences of PE-HA and PE $\Delta$ CS-HA are represented by dark blue boxes, the region corresponding to the mature PE by a light blue box and the HA tag by a red box. The predicted cleavage site (black arrow) and amino acids encompassing the AAA signal peptidase cleavage motif (shown in bold) in PE-HA are indicated. **(B)** Ampicillin susceptibility of the WT and PMM299 ( $\Delta blaS$ ) mutant strains, and of PMM299 expressing PE<sub>1-30</sub>-mBlaT or PE<sub>1-25</sub>-mBlaT. The MIC values of ampicillin obtained by the broth dilution method are shown in the table. The susceptibility to ampicillin was also evaluated by the disc diffusion method using disks containing 100 or 200

$\mu\text{g}$  of ampicillin (lower panel). A schematic representation of BlaTEM-1 and of PE-BlaTEM-1 fusion proteins is shown (left panel). The signal sequence and the mature form of BlaTEM-1 (mBlaT) are represented by red and orange boxes, respectively. Signal sequences of PE (PE<sub>1-28</sub> / PE<sub>1-25</sub>) fused to mBlaT are represented by dark blue boxes. Cleavage sites in BlaTEM-1 and PE<sub>1-30</sub>-mBlaT are indicated by arrows. The amino acids encompassing the cleavage site in BlaTEM-1 and PE<sub>1-30</sub>-mBlaT or the region connecting the transmembrane domain of PE and mBlaT in PE<sub>1-25</sub>-mBlaT are indicated. KL in red correspond to additional amino acids that were incorporated during the cloning process. (C) Western blot analysis of total cell lysates from the PMM299 mutant (1) and from PMM299 expressing BlaTEM-1 (2), PE<sub>1-30</sub>-mBlaT (3) or PE<sub>1-25</sub>-mBlaT (4), using an anti-BlaTEM-1 antibody and an anti-mouse peroxidase conjugate (left panel). Identities of protein bands detected by Western blot (labelled a to e) and their calculated molecular weights (CMW) based on protein sequences are shown in table. The star indicates a non-specific band detected by the anti-BlaTEM-1 antibody in the PMM299 cell extract.



**Figure 5.** TPP production in PMM229 and in complemented strains expressing the HA-tagged PE variants, Chp1 or Chp2. **(A)** Cellular and surface-exposed lipid extracts from the WT strain (1), the PMM229 mutant strain (2), and from the PMM229 strain expressing either PE-HA (3) or PE $\Delta$ CS-HA (4) and **(B)** total lipids extracted from the WT (1) and PMM229 mutant (2) strains and from the PMM229 strains expressing PE (3), Chp1 (4) or Chp2 (5) were loaded onto TLC plates run in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (90:10, v/v). The spots were visualized by spraying TLC plates with 0.2% (w/v) anthrone in concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by heating. Positions of TPP, diacyltrehalose TPP intermediates (DAT), GPL, and trehalose dimycolate (TDM) are indicated. Note that the absence of trehalose dimycolate in surface-exposed lipid fractions is consistent with previous reports and indicates that lipid fractions were properly prepared (30).



**Figure 6.** Update version of the late stages of the TPP metabolic pathway. Details are provided in the text. C<sub>14</sub>-C<sub>19</sub> fatty acyl groups and phleic acids present in the diacyltrehalose precursor (DAT) and TPP are represent by blue and black lines, respectively. PM: plasma membrane, OM: outer membrane (mycomembrane), SP: signal peptide, Ct: C-terminus, Nt: N-terminus. The AAA signal peptidase cleavage motif of PE is shown in red.

### III. Discussion et perspectives

Dans cette partie de ma thèse, nous avons déterminé que l'acyltransférase PE, impliquée dans la synthèse finale des TPP, est exportée dans la paroi de *M. smegmatis*, suite au clivage de son peptide signal. L'analyse des lipides produits par des souches exprimant la protéine PE sauvage ou une forme mutante ne possédant pas de site de protéolyse (et ne pouvant donc pas être clivée), réalisée à partir de cultures en phase exponentielle de croissance, a montré que le clivage de PE est nécessaire pour la synthèse des TPP. Ces données indiquent qu'en absence de clivage, la protéine PE ne peut pas catalyser la synthèse des TPP car elle n'a probablement pas accès à ces substrats, les TMP, localisés dans les couches supérieures de l'enveloppe. Nous ne pouvons cependant pas exclure que l'absence de maturation de PE empêche celle-ci de se replier correctement de façon post-traductionnelle et inhibe son activité catalytique. En réalisant des analyses identiques sur les souches cultivées en phase stationnaire, nous avons observé une faible production de TPP dans la souche exprimant la forme non clivable de la protéine PE, indiquant que celle-ci est bien fonctionnelle (données personnelles).

L'ensemble de ces résultats apporte des informations nouvelles sur le compartiment cellulaire dans lequel se déroule l'étape finale de synthèse des TPP et sur la nature des molécules transportées par MmpL10. Par extrapolation, ces données pourraient fournir des pistes pour une meilleure définition des voies de biosynthèse des lipides à tréhalose chez *M. tuberculosis*. Par ailleurs, la mise en évidence de la présence de la protéine PE dans l'enveloppe de *M. smegmatis*, où elle pourrait être en contact avec des protéines potentiellement impliquées dans l'export des TPP dans la paroi, ouvre des perspectives pour la recherche d'éventuels partenaires de transport. Des expériences de co-purification, en utilisant PE en fusion avec un tag comme protéine appât, pourraient être réalisées dans le but de rechercher ces protéines.

En accord avec Belardinelli et collègues, nos études sur la topologie de l'acyltransférase Chp2, impliquée dans la biosynthèse des PAT chez *M. tuberculosis*, sont en faveur d'une localisation périplasmique de son domaine catalytique (Belardinelli *et al.*, 2014). Bien que

nous n'ayons pas pu montrer le clivage de cette protéine dans *M. smegmatis*, l'application de la méthodologie employée pour la caractérisation de la protéine PE devrait permettre de confirmer le clivage et l'export de cette protéine et aboutir à une meilleure caractérisation de la voie de biosynthèse des PAT chez le bacille tuberculeux.

Le génome des mycobactéries code pour d'autres acyltransférases à la localisation peu connue. La protéine Rv3802c est une estérase essentielle de *M. tuberculosis* possédant la même organisation que PE, avec une séquence signale prédite du côté N-terminal (Parker *et al.*, 2009). Sa fonction exacte n'est pas connue mais elle pourrait être impliquée dans les étapes extracytoplasmiques de synthèse des mycolates (Meniche *et al.*, 2009). De façon intéressante, la structure de l'orthologue de cette enzyme chez *M. smegmatis*, MSMEG\_6394, a été obtenue par cristallographie et est très proche de la structure prédite de la protéine PE (Crellin *et al.*, 2010, données personnelles). Les méthodologies employées pour déterminer la localisation de PE pourraient être utilisées pour confirmer la localisation de ces protéines d'intérêt clinique et amener des pistes quant à leurs fonctions chez les mycobactéries.



Localisation de l'export  
des TPP lors du cycle cellulaire  
chez *M. smegmatis*

# Localisation de l'export des TPP lors du cycle cellulaire chez *M. smegmatis*

## I. Contexte de l'étude et objectifs

Il existe peu de données sur l'assemblage de l'enveloppe mycobactérienne au cours du cycle cellulaire. Le développement d'outils de marquage métabolique (acides aminés fluorescents) a permis d'étudier la dynamique de mise en place du peptidoglycane chez les mycobactéries lors de leur croissance (Aldridge *et al.*, 2012; Botella *et al.*, 2017). En revanche, la dynamique d'assemblage des lipides extractibles de la mycomembrane est très peu documentée et le peu de données disponibles concerne les TMM/TDM. Ces données indiquent que, tout comme le peptidoglycane, les TMM/TDM sont insérés dans l'enveloppe, aux pôles des mycobactéries et préférentiellement à l'ancien pôle (Carel *et al.*, 2014; Meniche *et al.*, 2014; Rodriguez-Rivera *et al.*, 2017). Des études supplémentaires restent cependant nécessaires pour préciser la chronologie de ces événements.

On ignore actuellement si l'export des autres lipides de la mycomembrane est coordonné dans le temps et dans l'espace avec celui des TMM. Pour tenter de répondre à cette interrogation, nous avons étudié la mise en place des TPP et de leurs précurseurs, les TMP, dans l'enveloppe lors de la croissance de *M. smegmatis*, en suivant la localisation du transporteur MmpL10, impliqué dans le transport des TMP à travers la membrane plasmique (Burbaud *et al.*, 2016). Ces études ont été réalisées en collaboration avec Jérôme Rech dans l'équipe de Dr Jean-Yves Bouet au Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM) de Toulouse.

## II. Résultats

### II.1) Localisation du transporteur MmpL10 dans la membrane plasmique de *M. smegmatis* au cours du cycle cellulaire

Pour suivre la localisation du transporteur MmpL10 chez *M. smegmatis*, nous avons exprimé le transporteur en fusion avec une protéine fluorescente et analysé sa distribution dans la bactérie par microscopie de fluorescence. Ces études ont été réalisées sur des bactéries non fixées, en phase exponentielle de croissance. La localisation statique du transporteur MmpL10 a été observée par simple acquisition (snapshot) au microscope à fluorescence, c'est-à-dire par prise d'images à un temps donné. Sa localisation dynamique a été observée par vidéo-microscopie (time-lapse), par prise d'images à intervalles réguliers (généralement une image toutes les dix minutes pendant 7 à 10 heures) en suivant la croissance bactérienne sur plusieurs générations.

Nous avons choisi de produire le transporteur MmpL10 en fusion avec la protéine mVenus, dérivée de la GFP et émettant une fluorescence de couleur jaune (Balleza *et al.*, 2018). Son utilisation est possible, même exprimée en faible quantité, car *M. smegmatis* n'émet pas d'autofluorescence dans les longueurs d'ondes permettant la visualisation de la mVenus, contrairement à la GFP (données personnelles). De plus, les filtres utilisés pour visualiser les signaux de la mVenus sont compatibles avec les filtres bleu et rouge, permettant d'observer en parallèle jusqu'à trois fluorophores au sein d'une même bactérie. L'expression de MmpL10-mVenus dans la souche *M. smegmatis*  $\Delta mmpL10$  (PMM223) permet de restaurer la synthèse et l'export des TPP à un niveau comparable à la souche sauvage, indiquant que la présence du fluorophore ne perturbe pas le repliement et l'activité de MmpL10 (Figure S5).

Nous avons d'abord optimisé le niveau d'expression de la fusion MmpL10-mVenus dans *M. smegmatis*, dans le but d'obtenir un signal suffisant pour bien visualiser la protéine dans la bactérie tout en restant proche de son niveau d'expression physiologique. Trois souches dérivées de la souche mutante PMM223 produisant la fusion MmpL10-mVenus à des

niveaux d'expression différents ont été construites. Dans la première souche (souche 1), le gène codant pour la protéine mVenus a été inséré sur le chromosome, en aval du gène *mmpL10*, pour permettre une expression de la protéine à un niveau physiologique. Dans la deuxième souche (souche 2), un vecteur intégratif monocopie contenant la fusion *mmpL10-mVenus* sous contrôle du promoteur *mmpL10* natif a été intégré sur le chromosome. Enfin, dans la troisième souche (souche 3), un vecteur intégratif monocopie contenant la fusion *mmpL10-mVenus* sous contrôle du promoteur mycobactérien fort pBlaF\* a été intégré sur le chromosome (Timm *et al.*, 1994).

Les trois souches ont été observées au microscope à fluorescence et la quantité de protéine produite dans chacune d'entre elles a été évaluée par des expériences de Western-Blot (Figure S6). Dans la souche 1, le niveau d'expression de MmpL10-mVenus est insuffisant pour une analyse détaillée de sa localisation. Elle n'a donc pas été choisie pour la suite des expérimentations. La souche 3 permet une bonne visualisation de MmpL10-mVenus, mais la quantité de protéine produite est très supérieure au niveau de production physiologique de la souche 1 (Figure S6). Une production trop importante de la fusion risquant de générer des artefacts (agrégations, interactions non spécifiques avec d'autres protéines) et de fausser les résultats de nos études, nous avons donc finalement choisi d'utiliser la souche 2, dont le niveau d'expression de la fusion MmpL10-mVenus est intermédiaire. L'analyse en Western-Blot d'un extrait protéique de cette souche montre un signal unique correspondant à la protéine MmpL10-mVenus entière, indiquant que la fusion n'est pas dégradée (Figure S6). Dans cette souche, les intensités de fluorescence sont suffisamment élevées pour permettre une analyse détaillée de la localisation de MmpL10 en dépit du photoblanchiment, sans pour autant générer des artefacts liés à la formation d'agrégats, typiquement identifiables aux pôles de la bactérie (Y.-W. Zhang *et al.*, 2019).

Les intensités de fluorescence de la fusion MmpL10-mVenus dans la souche 2 ont été collectées le long des bactéries. Afin de comparer la répartition des signaux de fluorescence entre plusieurs bactéries, il est nécessaire, au préalable, de normaliser leur taille et de les orienter en fonction de la position de l'ancien et du nouveau pôle. Pour cela, nous avons utilisé le fait que *M. smegmatis* s'allonge de manière asymétrique, l'ancien pôle ayant une vitesse de croissance supérieure au nouveau pôle (Aldridge *et al.*, 2012; Botella *et al.*, 2017). Les bactéries ont été incubées avec le marqueur HADA, un acide aminé (D-alanine) lié à un

fluorochrome bleu (le 7-hydroxycoumarin-3-acide carboxylique), qui s'incorpore dans le peptidoglycane en cours de synthèse sans impacter la croissance cellulaire (Kuru *et al.*, 2012). L'ancien pôle est différenciable du nouveau pôle car il incorpore davantage de marqueur HADA et a donc une fluorescence plus marquée (Figure 26A).

Les bactéries ont été incubées avec le marqueur HADA pendant une courte période correspondant à 10% du cycle cellulaire de *M. smegmatis*, puis observées au microscope à fluorescence, après lavage. Pour chaque champ, des images ont été prises pour collecter simultanément les signaux du marqueur HADA et de la fusion MmpL10-mVenus dans les bactéries en phase de croissance. Ces images ont ensuite été traitées en traçant un trait longitudinal reliant l'ancien pôle au nouveau pôle et passant au milieu de chaque bactérie, afin de recueillir les intensités de fluorescence le long de ce trait (Figure 26A). Les données recueillies ont ensuite été traitées informatiquement par un programme Python personnalisé, écrit par Dr Adam O'Reilly (Figure S7), permettant de normaliser la longueur de chaque bactérie en affectant la valeur 0 à l'ancien pôle et 1 au nouveau pôle et de ré-échantillonner les intensités de fluorescence mesurées sur la longueur normalisée des bactéries. Après ce traitement, il est possible de comparer, directement par superposition, le profil de fluorescence de MmpL10-mVenus dans des bactéries de tailles différentes (Figure 26A). Dans ces analyses n'ont pas été incluses les bactéries présentant un septum (ces bactéries étant en phase de division et non de croissance) et les quelques bactéries pour lesquelles le marquage HADA ne permet pas de discriminer l'ancien du nouveau pôle.

Le résultat de ces manipulations, effectuées sur 52 bactéries indépendantes, est présenté sous forme de graphique représentant l'intensité de fluorescence de MmpL10-mVenus en fonction de la taille normalisée des bactéries (Figure 26B). Comme attendu, le marqueur HADA est présent aux deux pôles mais s'accumule majoritairement à l'ancien pôle qui est la zone d'élongation principale chez *M. smegmatis*. La fusion MmpL10-mVenus présente un profil différent, avec des intensités de fluorescence assez constantes le long de la bactérie, hormis au nouveau pôle où elles sont plus intenses. Le transporteur MmpL10 semble donc en partie s'accumuler au nouveau pôle.

Nous avons ensuite suivi la localisation de MmpL10-mVenus dans *M. smegmatis* par vidéo-microscopie sur plusieurs générations (Figure 27). Les images obtenues montrent une

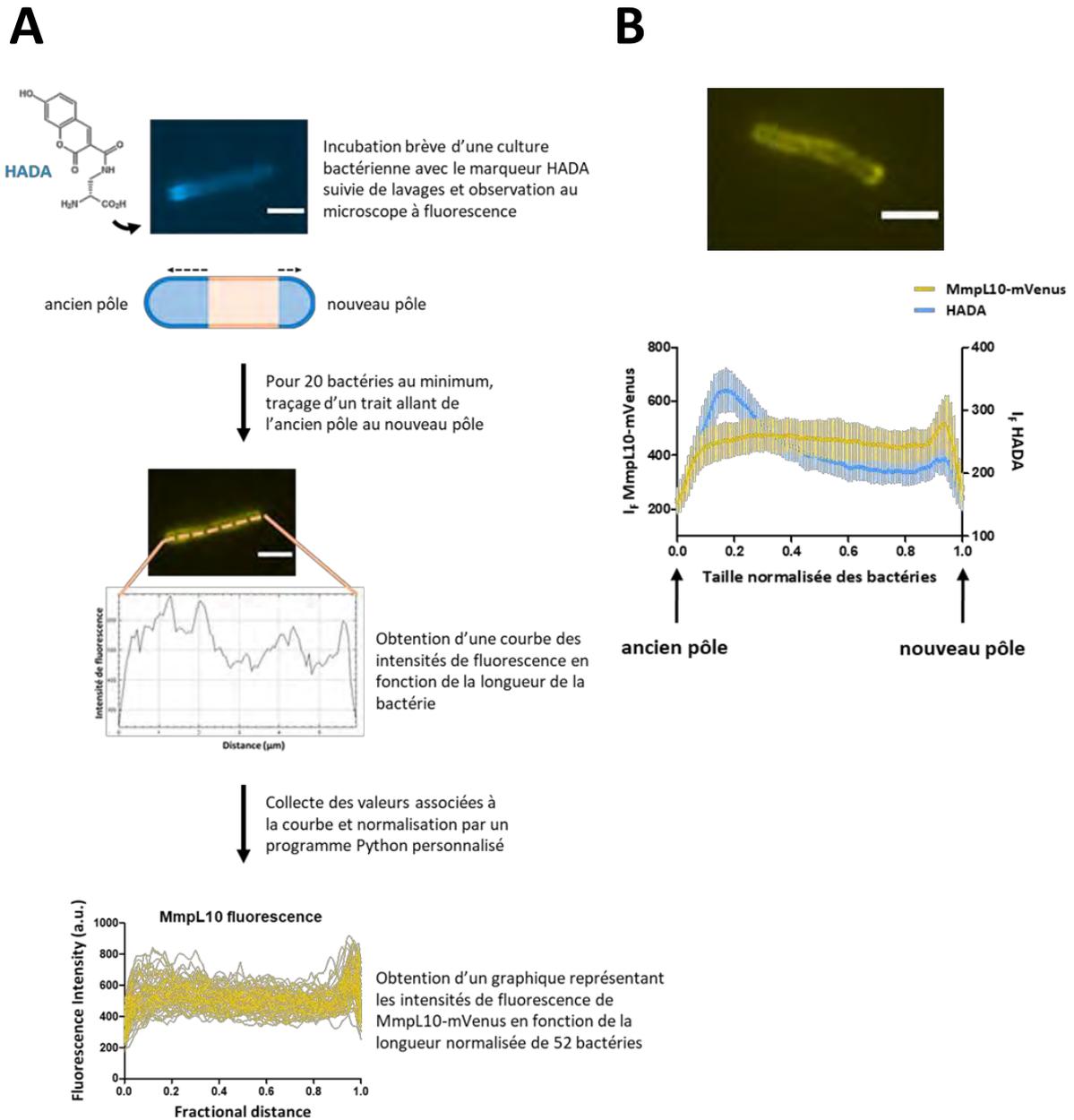


Figure 26 : Le transporteur MmpL10 n'est pas localisé uniformément dans la membrane plasmique de *M. smegmatis*

**A.** Représentation schématique de la méthodologie employée pour analyser la localisation de MmpL10-mVenus dans plusieurs bactéries en parallèle.

**B.** (Haut) Image de microscopie de fluorescence représentative de la localisation de MmpL10-mVenus dans *M. smegmatis*. Barre d'échelle : 2  $\mu$ m. (Bas) Intensités de fluorescence de la fusion MmpL10-mVenus et du marqueur HADA dans *M. smegmatis* en phase d'élongation. Les images dont sont issues ces courbes ont été obtenues par simple acquisition. Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence de MmpL10-mVenus ou du marqueur HADA le long de 52 bactéries. Les zones hachurées représentent les écarts types.

localisation dynamique de la fusion au cours du cycle cellulaire. Durant la phase d'élongation, MmpL10 est progressivement enrichi au nouveau pôle et ce, jusqu'à la division de la bactérie (Figure 27A). Une accumulation transitoire de fluorescence est également observable au centre de la cellule, peu de temps avant la division cellulaire (Figure 27B). Le positionnement de cette fluorescence semble coïncider avec le site de division, suggérant que le transporteur MmpL10 pourrait s'accumuler transitoirement au septum. Ces données préliminaires montrent que la localisation de MmpL10 varie au cours des différentes phases du cycle cellulaire de *M. smegmatis*.

## II.2) Coordination entre la localisation de MmpL10 et certaines protéines impliquées dans le cycle cellulaire

Le transporteur MmpL10 ayant une localisation dynamique durant la croissance de *M. smegmatis*, nous nous sommes demandé si cette localisation était coordonnée avec celle de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, telles que les protéines Wag31 et LamA. La protéine Wag31 joue un rôle fondamental chez les mycobactéries en dirigeant l'élongation cellulaire et est, en conséquence, présente aux deux pôles et particulièrement à l'ancien pôle (Melzer *et al.*, 2018; Meniche *et al.*, 2014). Elle est également retrouvée au septum à la fin de la division, peu de temps avant la séparation des cellules filles (Kieser and Rubin, 2014). Pour suivre simultanément la localisation de MmpL10 et Wag31, nous avons exprimé le transporteur MmpL10 en fusion à la mVenus et la protéine Wag31 en fusion à la protéine fluorescente rouge mCherry dans la souche PMM223. Des extractions lipidiques de cette souche ont permis de vérifier qu'elle produit des TPP à un niveau similaire à la souche sauvage, indiquant que le transporteur MmpL10 est fonctionnel (Figure S5).

Comme précédemment, les bactéries en croissance ont été brièvement incubées avec le marqueur HADA pour permettre leur orientation lors du traitement des données, et observées au microscope par simple acquisition (Figure 28A). Les profils de fluorescence le long des bactéries obtenus pour le marqueur HADA et la fusion MmpL10-mVenus sont similaires à ceux obtenus précédemment. La production de la fusion Wag31-mCherry dans

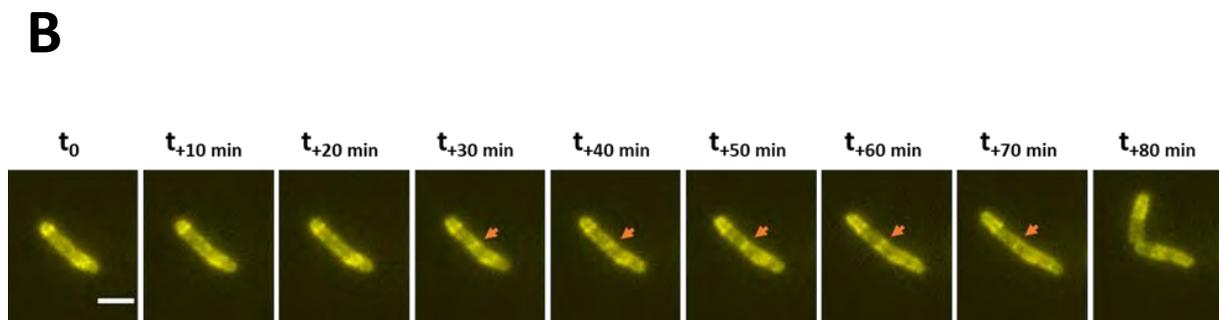
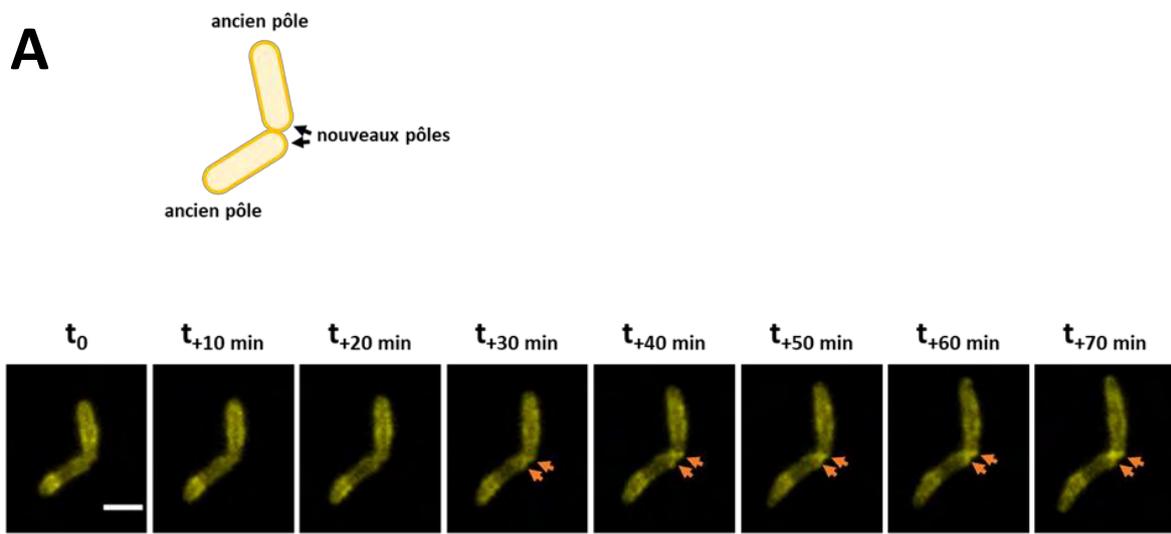


Figure 27 : Le transporteur MmpL10 a une localisation dynamique au cours de la croissance de *M. smegmatis*

**A.** Images de vidéo-microscopie représentatives de la localisation de MmpL10-mVenus au cours de la phase de croissance de *M. smegmatis*. Les flèches oranges représentent les lieux d'accumulation de la fluorescence.

**B.** Images de vidéo-microscopie représentatives de la localisation de MmpL10-mVenus avant division de *M. smegmatis*. Les flèches oranges représentent les lieux d'accumulation de la fluorescence.

Barres d'échelles : 2  $\mu\text{m}$ .

cette souche ne modifie donc pas la localisation du transporteur et ne perturbe pas le mode d'élongation de *M. smegmatis*. La fluorescence de la fusion Wag31-mCherry est très intense aux pôles et particulièrement à l'ancien pôle de *M. smegmatis*, en accord avec les données de la littérature (Meniche *et al.*, 2014). Dans les bactéries en croissance, le transporteur MmpL10 et la protéine Wag31 sont donc uniquement co-localisés au nouveau pôle, MmpL10 étant enrichi au nouveau pôle et Wag31 à l'ancien pôle.

La même souche a ensuite été observée par vidéo-microscopie sur plusieurs générations, afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation dans la dynamique de localisation de MmpL10 et Wag31 durant les différentes phases du cycle cellulaire. Nous voulions également déterminer si la présence du transporteur au centre de la cellule avant division coïncide avec la position du septum. Afin de comparer la fluorescence de plusieurs bactéries, les images obtenues pour chacune d'entre elles ont été classées en trois catégories en fonction des phases du cycle cellulaire. La première catégorie, appelée « division », regroupe les images où la présence du transporteur MmpL10 au centre de la cellule est la plus intense, 20 à 30 min avant division de la cellule. La seconde catégorie, appelée « post-division », contient les images prises au moment de la séparation des cellules filles, caractérisée par une forme de V. Enfin, la troisième catégorie, appelée « croissance », contient les images correspondant à l'élongation des cellules filles (prises cinquante minutes après la séparation en V).

Pour chaque catégorie, un graphique a été obtenu après superposition des courbes des intensités de fluorescence de MmpL10-mVenus et de Wag31-mCherry le long d'environ 12 bactéries (Figure 28B). Pour la catégorie « division », la protéine Wag31 est retrouvée majoritairement à l'ancien pôle et de façon plus minoritaire au nouveau pôle tandis que MmpL10 est enrichi au nouveau pôle. De plus, les deux protéines sont co-localisées au centre de la cellule. Wag31 étant présente au septum à la fin de la division cellulaire (Santi *et al.*, 2013), cela suggère que MmpL10 est localisé au septum durant cette phase. Pour la catégorie « post-division », qui fait le lien entre les phases de division et de croissance cellulaire, les signaux fluorescents de la protéine Wag31 sont présents aux deux pôles de la bactérie avec une accumulation préférentielle à l'ancien pôle (Figure 28B). De façon inattendue, une relocalisation du transporteur MmpL10 est observée. Celui-ci semble peu présent au nouveau pôle des cellules filles malgré son accumulation au septum durant la phase précédente. Lors

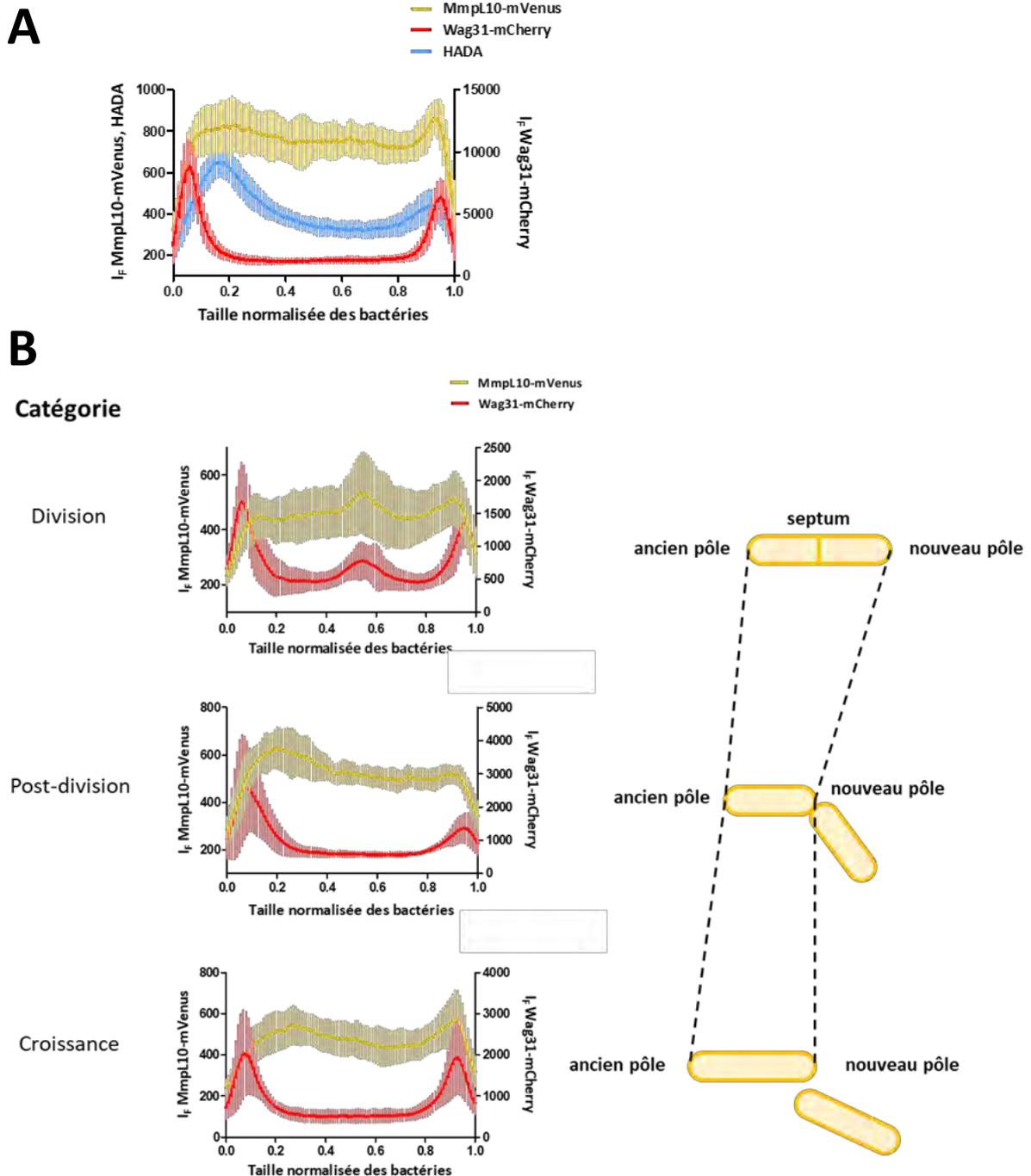


Figure 28 : Les protéines MmpL10 et Wag31 sont peu co-localisées dans *M. smegmatis*

**A.** Intensités de fluorescence des fusions MmpL10-mVenus, Wag31-mCherry et du marqueur HADA dans *M. smegmatis* en phase d'élongation. Les images dont sont issues ces courbes ont été obtenues par simple acquisition. Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence d'une fusion le long de 24 bactéries. Les zones hachurées représentent les écarts types.

**B.** Intensités de fluorescence des fusions MmpL10-mVenus et Wag31-mCherry au cours du cycle cellulaire de *M. smegmatis*, suivi par vidéo-microscopie. Pour chaque catégorie correspondant aux trois phases du cycle cellulaire, chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence d'une fusion le long d'environ 12 bactéries.

(Suite de la Figure 28)

Les zones hachurées représentent les écarts types. Sur le schéma à droite de chaque courbe, les lignes pointillées représentent la zone prise en compte pour la quantification du signal fluorescent.

de la phase de « croissance », la protéine Wag31 est présente aux deux pôles, avec une asymétrie moins marquée que lors de la phase précédente (Figure 28B). Le transporteur MmpL10 s'accumule au nouveau pôle, comme observé précédemment lors de la simple acquisition (Figure 28A). Ces résultats confirment la localisation dynamique du transporteur MmpL10 en fonction des phases du cycle cellulaire. Toutefois, il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre la localisation du transporteur MmpL10 et celle de la protéine Wag31 dans la bactérie.

Une étude récente a montré que la protéine LamA est impliquée dans le maintien de l'asymétrie de croissance entre l'ancien et le nouveau pôle de *M. smegmatis* (Rego *et al.*, 2017). Cette protéine joue un rôle dans la transition entre les phases de division et d'élongation cellulaire en inhibant transitoirement la synthèse de l'enveloppe au nouveau pôle. Dans une souche  $\Delta lamA$  de *M. smegmatis*, la protéine FtsZ (représentant la machinerie de division) disparaît du septum plus précocement que dans la souche sauvage et la protéine Wag31 (représentant la machinerie d'élongation) y est recrutée plus précocement. Compte tenu du rôle de LamA dans la relocalisation des protéines du cycle cellulaire, nous nous sommes demandé si cette protéine pouvait réguler la distribution de MmpL10 dans la bactérie, de façon directe ou indirecte. Pour cela, nous avons comparé les profils de fluorescence de souches *M. smegmatis*  $\Delta lamA$  (fournie par l'équipe de Dr Eric Rubin de l'Université d'Harvard) produisant MmpL10-mVenus seul ou co-exprimé avec Wag31-mCherry, avec les profils de fluorescence de souches sauvages produisant les mêmes combinaisons de protéines.

Des acquisitions simples réalisées sur les souches *M. smegmatis* sauvage et  $\Delta lamA$  en croissance, produisant uniquement la fusion MmpL10-mVenus, montrent une répartition très similaire du transporteur, suggérant que l'absence de LamA n'a pas d'impact sur sa localisation (Figure 29A). De façon surprenante, les profils de fluorescence du marqueur HADA sont également très similaires pour les deux souches. Ces résultats contrastent avec ceux publiés

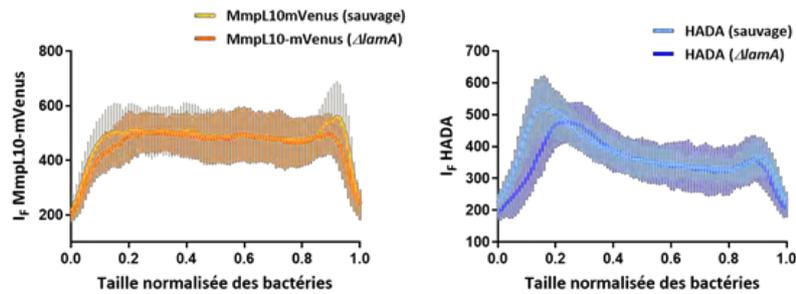
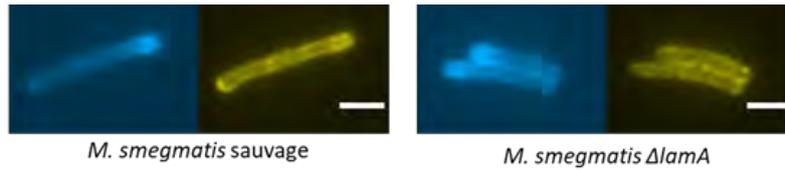
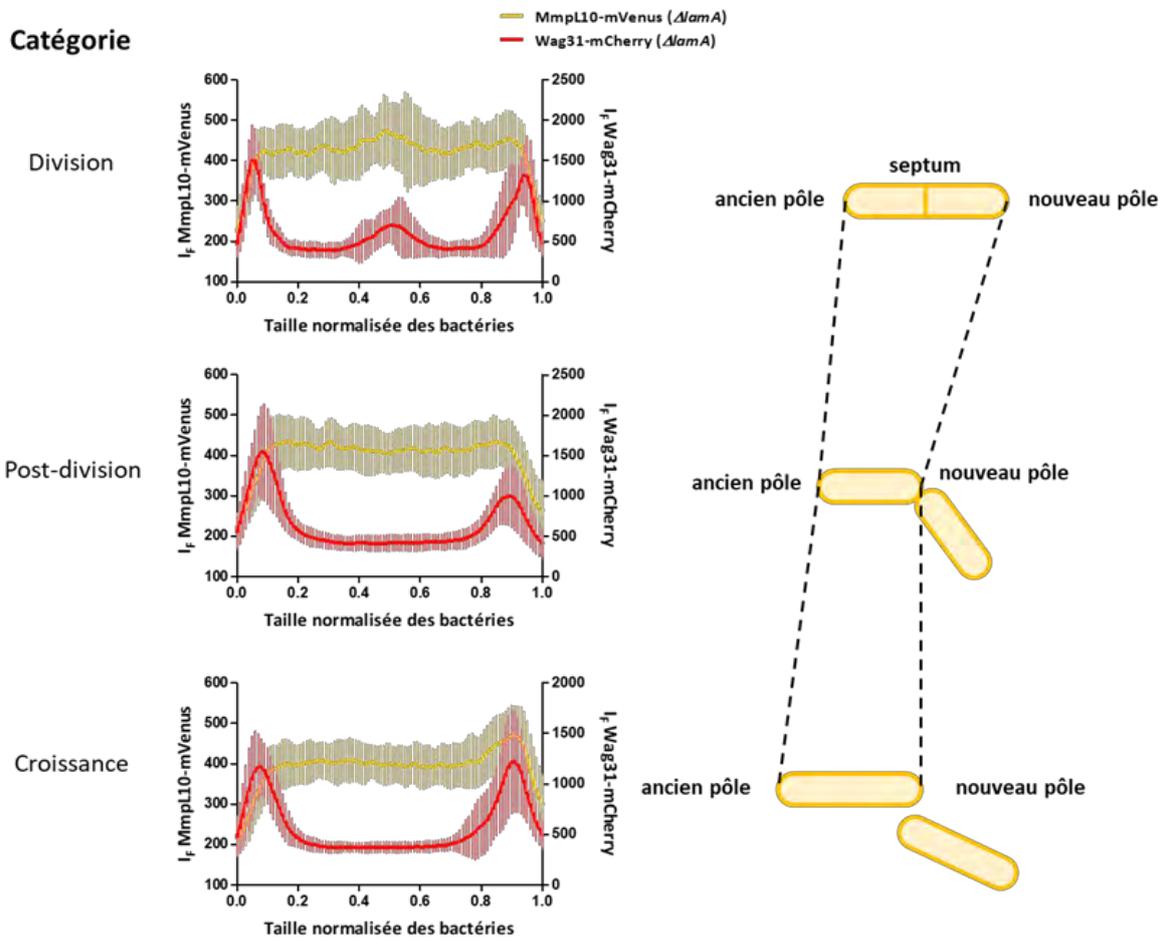
**A****B**

Figure 29 : L'absence de la protéine LamA n'a pas d'impact sur la localisation de MmpL10 dans *M. smegmatis*

**A.** (Haut) Image de microscopie de fluorescence représentative de la localisation de MmpL10-mVenus (droite) et du marqueur HADA (gauche) dans les souches *M. smegmatis* sauvage et  $\Delta lamA$ . Barres d'échelles : 2  $\mu$ m. (Bas) Intensités de fluorescence de la fusion MmpL10-mVenus et du marqueur HADA dans les souches *M. smegmatis* sauvage et  $\Delta lamA$  en phase d'élongation.

(Suite de la Figure 29)

Les images dont sont issues ces courbes ont été obtenues par simple acquisition. Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence d'une fusion le long de 52 bactéries. Les zones hachurées représentent les écarts types.

**B.** Intensités de fluorescence des fusions MmpL10-mVenus et Wag31-mCherry au cours du cycle cellulaire de *M. smegmatis*  $\Delta lamA$ , suivi par vidéo-microscopie. Pour chaque catégorie correspondant aux trois phases du cycle cellulaire, chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence d'une fusion le long d'environ 15 bactéries.

Les zones hachurées représentent les écarts types. Sur le schéma à droite de chaque courbe, les lignes pointillées représentent la zone prise en compte pour la quantification du signal fluorescent.

par Rego et collègues, montrant une vitesse de croissance plus uniforme entre les pôles du mutant  $\Delta lamA$  par rapport à la souche sauvage (Rego *et al.*, 2017).

Nous avons poursuivi nos analyses en suivant la localisation simultanée de MmpL10-mVenus et de Wag31-mCherry dans la souche *M. smegmatis*  $\Delta lamA$  par vidéo-microscopie. Après collecte et traitement des données, les images obtenues ont été classées en trois catégories en fonction des phases du cycle cellulaire précédemment décrites. Pour chaque catégorie d'images, les graphiques représentant les intensités de fluorescence des fusions le long des bactéries (Figure 29B) ont été comparés à ceux obtenus précédemment pour la souche *M. smegmatis* sauvage (Figure 28B). Les signaux correspondants à la fusion Wag31-mCherry présentent un profil identique entre les souches sauvage et  $\Delta lamA$  pour toutes les phases du cycle cellulaire, indiquant que l'absence de LamA ne perturbe pas la localisation de Wag31 dans nos conditions d'observation. Des profils de fluorescence identiques sont également observables pour la fusion MmpL10-mVenus. Lors de la phase « post-division », la répartition du signal fluorescent semble légèrement plus uniforme dans la souche mutante que dans la souche sauvage, pouvant suggérer un effet de LamA sur la localisation de MmpL10 pendant le cycle cellulaire, mais celui-ci est très modeste.

Dans leur ensemble, ces données confirment la localisation dynamique du transporteur MmpL10 au nouveau pôle de *M. smegmatis* lors de l'élongation cellulaire et au septum lors de la division. Par ailleurs, les protéines MmpL10 et Wag31 ont des profils de localisation différents dans la bactérie et s'accumulent préférentiellement à des pôles opposés, suggérant que la localisation de MmpL10 n'est potentiellement pas régulée directement par Wag31. Enfin, bien que la protéine LamA joue un rôle important dans la

transition entre la division et l'élongation cellulaire chez les mycobactéries, très peu d'impact sur la localisation de MmpL10 a été observé en son absence chez *M. smegmatis*.

### II.3) Comparaison des localisations de MmpL10 et MmpL3 dans *M. smegmatis*

Un des objectifs de cette étude était de mettre en évidence un éventuel couplage entre l'export des TPP et l'export des TMM, les constituants principaux de la mycomembrane. Pour cela, nous avons comparé la localisation de MmpL10 avec celle de MmpL3, le transporteur des TMM, au cours du cycle cellulaire de *M. smegmatis*.

La localisation de MmpL3 a été observée en construisant une souche de *M. smegmatis* exprimant le transporteur MmpL3 fusionné à la mVenus. Cette souche a été analysée par simple acquisition en microscopie de fluorescence après incubation avec le marqueur HADA (Figure 30A). Dans les bactéries en croissance, les signaux fluorescents correspondants au marqueur HADA ont un profil habituel, indiquant que la production de MmpL3-mVenus ne modifie pas le mode de croissance de *M. smegmatis*. Les signaux de la fusion MmpL3-mVenus se superposent à ceux du marqueur HADA, au niveau des deux pôles et particulièrement à l'ancien pôle. Cette distribution asymétrique du transporteur MmpL3 est en accord avec les données de la littérature et contraste drastiquement avec celle du transporteur MmpL10 observée précédemment (Carel *et al.*, 2014).

Comme pour MmpL10, nous avons ensuite tenté d'établir une corrélation entre la localisation de MmpL3 et de Wag31, en construisant une souche de *M. smegmatis* produisant ces protéines en fusion avec les protéines mVenus et mCherry, respectivement. Cette souche a été analysée sur plusieurs générations par vidéo-microscopie et comme précédemment, les images obtenues pour chaque bactérie ont été classées en trois catégories (« division », « post-division » et « croissance ») (Figure 30B). Les signaux des deux protéines se superposent tout au long du cycle cellulaire, suggérant qu'elles sont co-localisées dans les bactéries. Lors de la phase de division, ces signaux sont également superposés au centre de la cellule, indiquant que MmpL3 est présent au septum lors de cette phase, et de façon plus

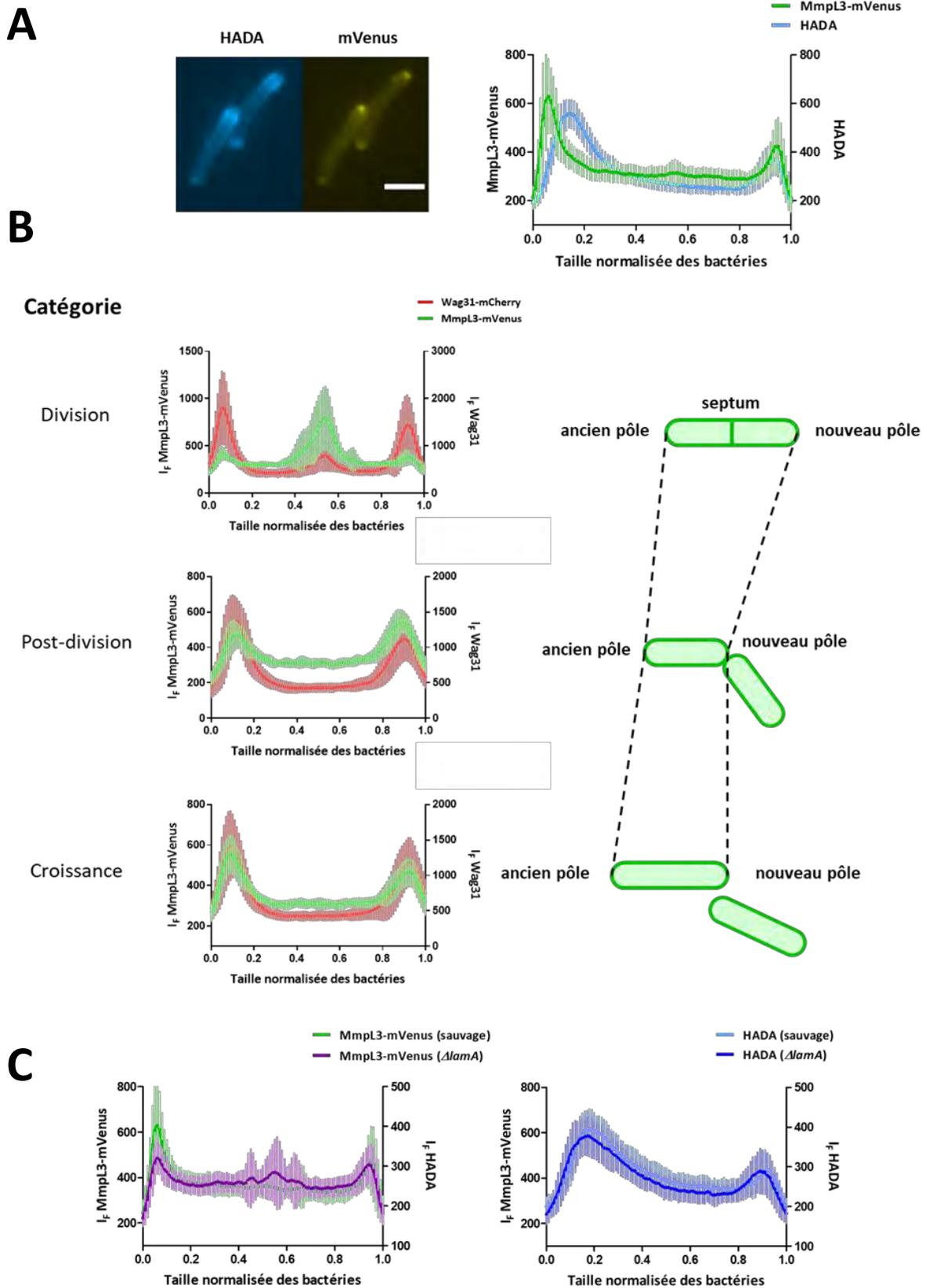


Figure 30 : Localisation de MmpL3 dans la membrane plasmique de *M. smegmatis*

A. (Gauche) Image de microscopie de fluorescence représentative de la localisation de MmpL3-mVenus et du marqueur HADA dans *M. smegmatis*. Barre d'échelle : 2  $\mu$ m.

(Suite de la Figure 30)

(Droite) Intensités de fluorescence de la fusion MmpL3-mVenus et du marqueur HADA dans *M. smegmatis* en phase d'élongation. Les images dont sont issues ces courbes ont été obtenues par simple acquisition. Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence de MmpL10-mVenus ou du marqueur HADA le long de 42 bactéries. Les zones hachurées représentent les écarts types.

**B.** Intensités de fluorescence des fusions MmpL3-mVenus et Wag31-mCherry au cours du cycle cellulaire de *M. smegmatis*, suivi par vidéo-microscopie. Pour chaque catégorie correspondant aux trois phases du cycle cellulaire, chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence d'une fusion le long d'environ 18 bactéries. Les zones hachurées représentent les écarts types. Sur le schéma à droite de chaque courbe, les lignes pointillées représentent la zone prise en compte pour la quantification du signal fluorescent.

**C.** Intensités de fluorescence de la fusion MmpL3-mVenus et du marqueur HADA dans les souches *M. smegmatis* sauvage et  $\Delta lamA$  en phase d'élongation. Les images dont sont issues ces courbes ont été obtenues par simple acquisition. Chaque courbe représente la moyenne des intensités de fluorescence d'une fusion le long de 25 bactéries. Les zones hachurées représentent les écarts types.

marquée que MmpL10. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature quant à la localisation de MmpL3 et Wag31 dans *M. smegmatis* et suggèrent des modes de régulation différents de la localisation de MmpL3 et MmpL10 au cours du cycle cellulaire (Carel *et al.*, 2014).

Enfin, nous avons comparé la localisation de la fusion MmpL3-mVenus dans les souches *M. smegmatis* sauvage et  $\Delta lamA$  (Figure 30C). Similairement à ce qui a été observé précédemment pour la protéine MmpL10-mVenus, le profil de fluorescence du marqueur HADA est identique entre les deux souches. Par ailleurs, la distribution de la fusion MmpL3-mVenus est globalement similaire, bien que les signaux du transporteur semblent légèrement moins intense à l'ancien pôle du mutant  $\Delta lamA$ . Cette observation n'est cependant pas suffisante pour conclure à un impact de LamA sur la localisation de MmpL3.

En résumé, nos travaux montrent pour la première fois la dynamique de localisation d'un transporteur autre que MmpL3 au cours du cycle cellulaire de *M. smegmatis* : le transporteur MmpL10. Les deux transporteurs ont une distribution différente dans la bactérie. Lors de la croissance cellulaire, MmpL3 est localisé aux pôles et plus majoritairement à l'ancien pôle, où sont également retrouvées les autres protéines impliquées dans la mise en place des différentes couches de l'enveloppe, tandis que MmpL10 est localisé de façon relativement uniforme dans la membrane, à l'exception d'une légère accumulation au nouveau pôle. La

seule caractéristique commune est leur localisation au septum lors de la phase de division cellulaire. Les différences observées entre MmpL10 et MmpL3 traduisent des différences dans les mécanismes régulant leur localisation, dont le décryptage nécessite des études supplémentaires.

### III. Discussion et perspectives

L'objectif de cette seconde partie de ma thèse était de comprendre où et à quel moment du cycle cellulaire se fait la mise en place des TMP et des TPP dans l'enveloppe de *M. smegmatis*, à travers l'étude de la localisation du transporteur MmpL10. Nos analyses montrent que celui-ci a une localisation variable en fonction des différentes phases du cycle cellulaire.

L'enrichissement de MmpL10 au nouveau pôle est progressif et commence à partir de la formation des cellules filles et jusqu'à la division suivante. Par ailleurs, le transporteur s'accumule au septum peu de temps avant la division cellulaire, où s'accumule également la protéine Wag31. Cette accumulation suggère une interaction potentielle entre MmpL10 et une ou plusieurs enzymes impliquées dans la formation ou la maturation du septum, qui pourraient recruter le transporteur au moment de la division (Kang *et al.*, 2008; Santi *et al.*, 2013). Cette accumulation de fluorescence pourrait toutefois être due au doublement de la membrane plasmique au septum lors de la division cellulaire. MmpL10 étant une protéine membranaire, l'accumulation observée pourrait simplement traduire la présence du transporteur au niveau de cette double membrane. La disparition brutale du signal du transporteur au nouveau pôle au moment de la séparation des cellules filles est plutôt accord avec cette hypothèse.

Un moyen de vérifier cette dernière serait de cultiver les bactéries coproduisant la fusion MmpL10-mVenus avec une version fluorescente de la protéine MalF de *E. coli*, qui se localise de manière uniforme dans la membrane plasmique et de comparer les ratios

d'intensité de fluorescence de ces deux protéines dans les membranes septale et latérale (Fay et al., 2019).

Le transporteur MmpL3 est l'unique membre de la famille MmpL dont la localisation a été étudiée (Carel *et al.*, 2014). Nos données montrent que celui-ci est principalement présent à l'ancien pôle et a une dynamique de localisation similaire à la protéine Wag31. Cette dynamique est partagée par diverses protéines comme MurG, GlfT2 et Pks13, respectivement impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, de l'arabinogalactane et des mycolates (Melzer *et al.*, 2018; Meniche *et al.*, 2014), dont les localisations coïncident avec la mise en place préférentielle à l'ancien pôle des différentes couches de l'enveloppe (Aldridge *et al.*, 2012; Botella *et al.*, 2017; Rodriguez-Rivera *et al.*, 2017; Swarts *et al.*, 2012). En comparaison, la localisation préférentielle de MmpL10 au nouveau pôle est différente et singulière et suggère que les TPP sont progressivement mis en place au nouveau pôle lors de la croissance de *M. smegmatis*. Bien que spéculative, une hypothèse pourrait être que les TPP n'étant pas essentiels à la construction de l'enveloppe mycobactérienne, leur mise en place est localisée au nouveau pôle pour des raisons d'encombrement spatial, afin de privilégier l'accès à l'ancien pôle aux enzymes ayant des rôles fondamentaux dans la mise en place du peptidoglycane et des mycolates. Il est néanmoins possible que la localisation de MmpL10 ne reflète pas entièrement le lieu de mise en place des TPP dans la bactérie. Pour le vérifier, il serait nécessaire d'observer simultanément la localisation de MmpL10-mVenus et l'export des TPP nouvellement formés dans une même bactérie. Une méthode de chimie bioorthogonale visant à visualiser les TPP par fluorescence est actuellement en cours de développement au laboratoire (voir ci-après).

Plusieurs études ont rapporté que la localisation du transporteur MmpL3 aux pôles de *M. smegmatis* est due à la présence d'un domaine C-terminal cytosolique, absent dans la plupart des autres MmpL (Belardinelli *et al.*, 2019; Carel *et al.*, 2014). Afin de savoir si ce domaine est suffisant pour permettre une localisation polaire, il pourrait être intéressant d'exprimer le transporteur MmpL10 en fusion avec le domaine C-terminal de MmpL3 et d'analyser par microscopie de fluorescence sa localisation dans *M. smegmatis*.

La localisation de MmpL10 étant dynamique, nous nous sommes demandé si elle était contrôlée par certaines protéines régulant le cycle cellulaire, comme la protéine Wag31. Nos données montrent que la localisation du transporteur MmpL10 est peu corrélée avec cette

dernière. En effet, lorsque les bactéries sont en phase d'élongation, Wag31 est majoritairement présente à l'ancien pôle, tandis que le transporteur est majoritairement présent au nouveau pôle. De plus, l'analyse détaillée des vidéo-microscopies a permis d'observer que le transporteur MmpL10 apparaît légèrement plus tôt au septum que la protéine Wag31, indiquant que le recrutement du transporteur au centre de la cellule n'est pas dépendant de la présence de cette protéine. La co-expression de MmpL10-mVenus avec d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, comme FtsZ par exemple, qui marque le début de la division cellulaire, pourrait permettre d'établir plus précisément à quel moment de la division MmpL10 apparaît au septum (Baranowski *et al.*, 2019; Kieser and Rubin, 2014).

Nous avons également analysé la localisation de MmpL10 en absence de la protéine LamA, en partie responsable de la croissance asymétrique de *M. smegmatis* (Rego *et al.*, 2017). Cette protéine appartient à la famille de protéines MmpS, dont la plupart sont impliquées dans l'export de lipides et de sidérophores en interagissant avec certains transporteurs MmpL (Chalut, 2016). Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative sur la distribution de MmpL10, en présence ou absence de LamA. De façon surprenante, nous n'avons pas non plus observé de différence dans l'asymétrie de croissance entre les souches *M. smegmatis* sauvage et  $\Delta lamA$ , contrairement à ce qui a été publié par Rego et collègues. La différence majeure entre notre étude et la leur concerne les conditions expérimentales utilisées pour suivre la croissance des bactéries et les paramètres mesurés. Rego et collègues ont utilisé une sonde succinimidyl ester couplée à un fluorophore (Alexa Fluor 488 succinimidyl ester), afin de marquer l'enveloppe de *M. smegmatis* et mesurer la croissance des pôles lors d'une expérience de pulse-chasse (Rego *et al.*, 2017), tandis que nous avons mesuré l'intensité de fluorescence du marqueur HADA à un temps donné. Il serait nécessaire de réaliser une nouvelle expérience en se plaçant dans leurs conditions expérimentales afin de vérifier si l'hétérogénéité des résultats observés provient du marqueur utilisé (sonde succinimidyl ester *versus* HADA) ou bien d'autres paramètres.

Pour aller plus loin dans l'étude des localisations des transporteurs MmpL10 et MmpL3, il pourrait être intéressant de suivre leur localisation par microscopie de fluorescence dans une souche exposée à différentes molécules perturbant l'assemblage ou l'intégrité de l'enveloppe mycobactérienne, comme l'éthambutol, qui inhibe la synthèse du mAGP. En

rendant les TMM fluorescents de manière spécifique par une approche de marquage métabolique dans *M. smegmatis* et *M. marinum*, une étude récente a montré qu'un traitement avec cet antituberculeux augmente la quantité de TMM en surface de la bactérie mais ne perturbe pas la localisation de leur export (Rodriguez-Rivera *et al.*, 2018). A l'inverse, un traitement avec la molécule SQ109, qui inhibe le transporteur MmpL3, a pour effet de diminuer la localisation polaire des TMM (Rodriguez-Rivera *et al.*, 2018). Il serait intéressant d'étudier l'impact de tels traitements sur la localisation des transporteurs MmpL3 et MmpL10.

Il est important de souligner que dans ces travaux, les versions fluorescentes des transporteurs MmpL ont été exprimées via un vecteur s'intégrant en monocopie sur le chromosome, générant la perte de l'environnement chromosomique physiologique et impactant donc potentiellement la régulation de leur expression. Pour pallier à cet éventuel problème, il faudrait effectuer les mêmes analyses sur des souches dans lesquelles les gènes codant pour les fluorophores ont été fusionnés en aval des gènes *mmpL* d'intérêts, au niveau de leurs loci chromosomiques respectifs. La faible expression de ces gènes de fusion pourrait nécessiter d'utiliser des protéines fluorescentes autre que la mVenus, ayant des brillances plus importantes.

L'ensemble de ces résultats préliminaires, combiné à de nouvelles analyses, devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la localisation particulière du transporteur MmpL10 dans la membrane plasmique de *M. smegmatis*. Le développement de nouvelles approches est également nécessaire pour vérifier que la localisation de MmpL10 correspond bien au lieu d'export des TMP/TPP dans la bactérie. Dans ce but, nous avons tenté de développer une approche de marquage métabolique permettant de visualiser par microscopie de fluorescence les TPP en surface de la bactérie, inspirée des travaux de Swarts et collègues sur le TMM (Swarts *et al.*, 2012). Cette approche consiste à incuber les bactéries avec un tréhalose modifié, comportant deux groupements azotures, en position 6 et 6' (Figure 31). Ce tréhalose pénètre à l'intérieur de la cellule et sert de substrat pour la formation du TMP. Après son transport dans l'enveloppe, les TMP/TPP modifiés peuvent être détectés par réaction avec un alcyne couplé à un fluorochrome. Cette méthode est en cours de développement au laboratoire. La spécificité de marquage des TMP/TPP devra être évaluée en comparant le marquage fluorescent dans une souche de *M. smegmatis* sauvage et une souche déficiente en production des TPP.

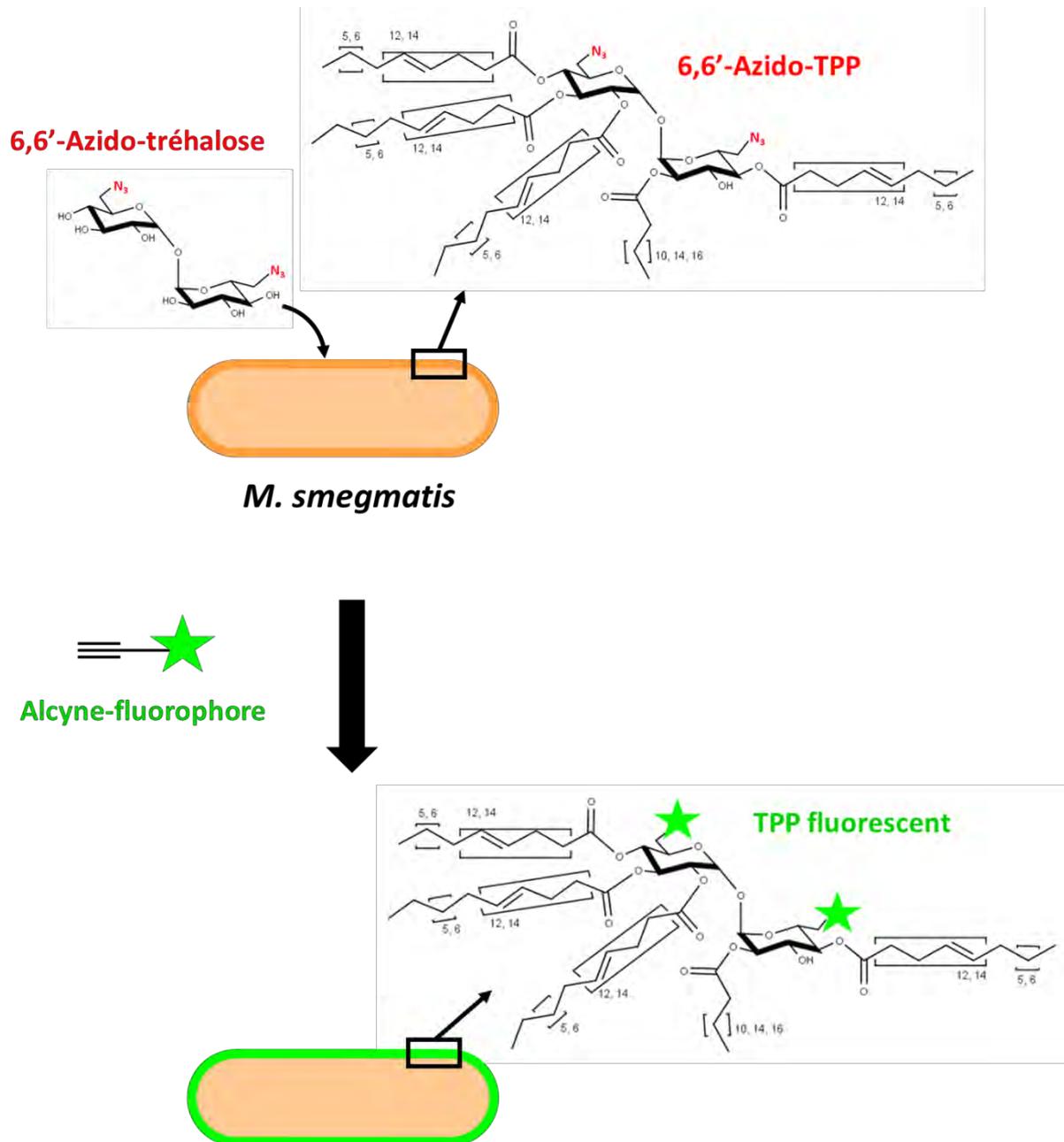


Figure 31 : Représentation schématique de la méthode de marquage des TPP en fluorescence à la surface de *M. smegmatis*

Le 6,6'-azido-tréhalose est incorporé dans les bactéries et métabolisé sous forme de 6,6'-azido-TPP. Après export dans l'enveloppe, les groupements azotures portés par le TPP réagissent avec un alcyne et forment des liaisons covalentes. L'alkyne est couplé à un fluorophore, ce qui permet de visualiser les TPP fluorescents dans l'enveloppe.

Nos résultats sur les localisations respectives de MmpL10 et MmpL3 suggèrent un découplage spatial de l'export des TPP et des TMM dans la bactérie. Il serait intéressant d'étudier la localisation d'autres transporteurs MmpL, comme les transporteurs MmpL4a et MmpL4b de *M. smegmatis*, impliqués dans le transport des GPL, afin de déterminer comment les autres lipides de la mycomembrane sont mis en place par rapport aux TMM ou aux TMP/TPP. La localisation de l'orthologue de MmpL10 chez *M. abscessus*, qui possède plus de 75% d'identité de séquence avec MmpL10 de *M. smegmatis*, pourrait également être étudiée, afin de voir si des protéines ayant une fonction identique sont régulées de façon similaire dans des organismes différents.

# Conclusion générale

## Conclusion générale

Les travaux réalisés durant ma thèse avaient pour objectif d'utiliser les TPP comme modèle d'étude afin d'améliorer nos connaissances des mécanismes d'export des lipides extractibles chez les mycobactéries. Dans une première partie, nous avons finalisé la caractérisation de la voie de biosynthèse des TPP et établi que la dernière étape de synthèse de ces composés, catalysée par la protéine PE, a lieu dans la paroi. Dans une seconde partie, nous avons montré que le transporteur des TPP, MmpL10, a un comportement très différent du transporteur MmpL3 des acides mycoliques au cours de la croissance de *M. smegmatis*. Ces données suggèrent pour la première fois que, malgré des similitudes dans les voies de biosynthèse et d'export des TPP et des mycolates, des mécanismes distincts régulent leur transport vers la mycomembrane.

A l'avenir, les TPP pourraient être utilisés pour décrypter les interactions moléculaires entre les différentes protéines impliquées dans la biosynthèse des lipides extractibles et rechercher des partenaires impliqués dans leur transport. Les machineries moléculaires liées à l'export de ces composés restent, en effet, encore énigmatiques et leur caractérisation est essentielle pour une meilleure compréhension de la physiologie des mycobactéries. Des protéines potentiellement impliquées dans l'export des TPP pourraient être recherchées par des cribles génétiques ou biochimiques, en utilisant MmpL10 et PE comme protéines appâts. Les données recueillies pourraient ensuite être étendues à l'export des autres classes de lipides, notamment aux lipides à tréhalose chez *M. tuberculosis*, comme les SL et PAT dont les voies de biosynthèse sont proches des TPP.

La différence de comportement des transporteurs MmpL10 et MmpL3 dans *M. smegmatis* met en évidence des divergences dans la dynamique et les lieux d'export des lipides de l'enveloppe mycobactérienne. Deux scénarios distincts pourraient être envisagés. D'une part, les acides mycoliques pourraient être mis en place aux pôles, de façon coordonnée et finement régulée avec la mise en place des autres constituants essentiels de l'enveloppe. D'autre part, les lipides non essentiels à la viabilité bactérienne pourraient être exportés indépendamment dans l'enveloppe, à des moments précis en fonction des besoins de la

cellule, comme lors d'un stress par exemple. Pour étayer cette hypothèse, il serait à présent intéressant de comparer la dynamique de localisation de MmpL10 et MmpL3 avec celle d'autres transporteurs MmpL, comme par exemple MmpL4a et MmpL4b ainsi que MmpL11 et MmpL12, respectivement impliqués dans le transport des glycopeptidolipides, de dérivés d'acides mycoliques et des lipooligosaccharides. Ces transporteurs sont produits par *M. smegmatis* et leurs localisations pourraient être rapidement étudiées en utilisant la méthodologie développée pendant ma thèse. A défaut de pouvoir visualiser directement l'export de ces lipides à la surface de la bactérie, ces études pourraient apporter d'importantes informations sur la dynamique d'assemblage de la mycomembrane, qui reste pour le moment très largement inconnue.



# Annexe

## Annexe

Cette annexe contient les documents suivants.

### Etude topologique de la protéine PE, impliquée dans la synthèse finale des TPP :

Figures et tableaux supplémentaires de l'article présenté p.89

Supplemental Table S1

Supplemental Table S2

Legend of Supplemental Table S3 (provided in excel format)

Legend of Supplemental Table S4 (provided in excel format)

Supplemental Table S5

Supplemental Figure S1

Supplemental Figure S2

Supplemental Figure S3

Supplemental Figure S4

Supplemental References

### Localisation de l'export des TPP lors du cycle cellulaire chez *M. smegmatis* :

Matériel et méthodes

Figure supplémentaire S5

Figure supplémentaire S6

Figure supplémentaire S7

## Etude topologique de la protéine PE, impliquée dans la synthèse finale des TPP :

**Table S1:** Plasmids used in this study.

Name	Description	Protein encoded	Ref.
pMV361eH	pMV361 derivative containing the <i>pblaF*</i> promoter and a <i>hyg</i> resistance marker	-	(1)
pMIP12e	<i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector containing the <i>pblaF*</i> promoter	-	(4)
pCG211	pMIP12 containing the <i>gfp</i> gene behind the <i>pblaF*</i> promoter	GFP	(2)
pPHO7	pUC18 derivative containing the <i>phoA</i> gene from <i>E. coli</i>	PhoA	(3)
pMVPE	pMV361eH containing <i>pE</i> behind the <i>pblaF*</i> promoter	PE	(1)
pMVChp1	pMV361eH containing <i>chp1</i> from <i>M. tuberculosis</i> behind the <i>pblaF*</i> promoter	Chp1	This study
pMVChp2	pMV361eH containing <i>chp2</i> from <i>M. tuberculosis</i> behind the <i>pblaF*</i> promoter	Chp2	This study
pMVPEGFP	pMV361eH containing <i>pE</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>gfp</i> gene at the 3' end	PE-GFP	This study
pMVChp2GFP	pMV361eH containing <i>chp2</i> from <i>M. tuberculosis</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>gfp</i> gene at the 3' end	Chp2-GFP	This study
pMVKatGGFP	pMV361eH containing <i>katG1</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>gfp</i> gene at the 3' end	KatG1-GFP	This study
pMVL10GFP	pMV361eH containing <i>mmpL10</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>gfp</i> gene at the 3' end	MmpL10-GFP	This study
pMVS4GFP	pMV361eH containing <i>mmpS4</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>gfp</i> gene at the 3' end	MmpS4-GFP	This study
pMIPPEPhoA	pMIP12e containing <i>pE</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>phoA</i> gene at the 3' end	PE-PhoA	This study
pMIPChp2PhoA	pMIP12e containing <i>chp2</i> from <i>M. tuberculosis</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>phoA</i> gene at the 3' end	Chp2-PhoA	This study
pMIPKatGPhoA	pMIP12e containing <i>katG1</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>phoA</i> gene at the 3' end	KatG1-PhoA	This study
pMIPL10PhoA	pMIP12e containing <i>mmpL10</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>phoA</i> gene at the 3' end	MmpL10-PhoA	This study
pMIPS4PhoA	pMIP12e containing <i>mmpS4</i> behind the <i>pblaF*</i> fused to the <i>phoA</i> gene at the 3' end	MmpS4-PhoA	This study
pMVPEHA	pMV361eH containing <i>pE</i> fused to a HA tag coding sequence at the 3' end	PE-HA	This study
pMVPE <sub>mut</sub> HA	pMV361eH containing <i>pE</i> with a deletion (nt 76-87) fused to a HA tag coding sequence at the 3' end	PE <sub>ΔCS</sub> -HA	This study
pMIPPE <sub>tr</sub> HA	pMIP12e containing a truncated <i>pE</i> gene (nt 85-1149) fused to a HA tag coding sequence at the 3' end	mPE-HA	This study

pPEBlaTEM	pMV361eH containing the DNA sequence encoding aa 1-30 of <i>pE</i> fused the mBlaTEM encoding sequence	PE <sub>1-30</sub> -mBlaTEM	This study
pPE <sub>mut</sub> BlaTEM	pMV361eH containing the DNA sequence encoding aa 1-25 of <i>pE</i> fused the mBlaTEM encoding sequence	PE <sub>1-25</sub> -mBlaTEM	This study

**Table S2:** List of protein markers. Proteins reported to be specific of each compartment are given (15 to 18 proteins by compartment), with Uniprot accession number and Uniprot predicted transmembrane domain (TM), Signal Peptide (SP) and subcellular location, when available. “CW”: cell wall; “PM” plasma membrane; “CF”: filtrated medium; “CP”: cytoplasm. Uniprot: <https://www.uniprot.org>

Protein	Function	Compart.	Uniprot			Ref.
			Accession	Topology	Subcellular location	
AcpS	Holo-[acyl-carrier-protein] synthase	CP	A0R1H6		Cytoplasm	
AraA	L-arabinose isomerase	CP	A0QT53		Cytoplasm	
Ku	Non-homologous end joining protein	CP	A0R3S7			(6)
MSMEG_0655	Glucose 1-dehydrogenase, putative	CP	A0QQ76			
MSMEG_1952	DNA helicase	CP	A0QTT0			
MSMEG_4245	3-5 exoribonuclease	CP	A0R034			
MSMEG_5577	Fructokinase	CP	A0R3S4			
MurD	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	CP	A0R018		Cytoplasm	(7)
MurE	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	CP	A0R021		Cytoplasm	(7)
MurF	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	CP	A0R020		Cytoplasm	(7)
RmlC	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	CP	A0QSK5			(8)
RuvA	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase	CP	A0QWH5		Cytoplasm	
RuvB	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase	CP	A0QWH6		Cytoplasm	
SaeA	Putative ESX-1 scaffolding and assembly protein	CP	A0QNH4		Cytoplasm	(9)
SaeB	Putative ESX-1 scaffolding and assembly protein	CP	A0QNH5			(9)
SaeC	Putative ESX-1 scaffolding and assembly protein	CP	A0QNH6		Cytoplasm	(9)
TopoM	Topoisomerase subunit TopoM	CP	A0QPN1			(10)
TopoN	Topoisomerase subunit TopoN	CP	A0QPN2			(10)
CwsA	Cell wall synthesis protein	PM	A0QNF5	1 TM	PM	(11)
DprE2	Decaprenylphosphoryl-2-keto-beta-D-erythro-pentose reductase	PM	A0R610			(12)
FtsW	Cell division protein	PM	A0R017	9 TM	PM	
GlfT1	Galactofuranosyltransferase	PM	A0R5Z2			(13)
LldD1	L-lactate dehydrogenase	PM	I7FY73			
MenG	Demethylmenaquinone methyltransferase	PM	A0QRH1			
MenJ	Menaquinone reductase	PM	A0QRI8			(14)
MSMEG_0032	Cell cycle protein, FtsW/RodA/SpoVE family protein	PM	A0QNG4	11 TM	PM	

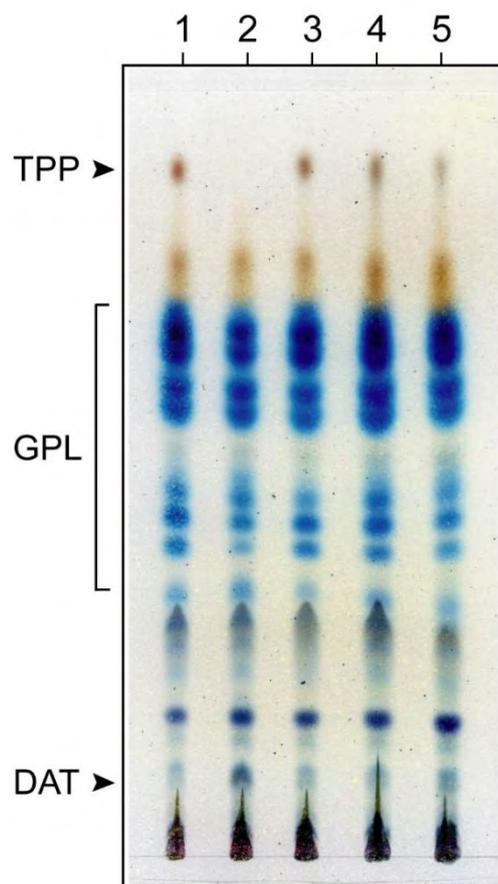
MSMEG_0452	Inner membrane permease YgbN	PM	A0QPM7	12 TM	PM	
MSMEG_1009	Cytochrome p450	PM	A0QR72			(15)
NuoC	NADH-quinone oxidoreductase subunit C	PM	A0QU34		PM	
PimB	GDP-mannose-dependent alpha-(1-6)-PIM mannosyltransferase	PM	A0R043			(15,16)
TatA	Sec-independent protein translocase protein	PM	A0QZ40	1 TM	PM	(17)
TatB	Sec-independent protein translocase protein	PM	A0R2D1	1 TM	PM	(17)
TatC	Sec-independent protein translocase protein	PM	A0QZ39	6 TM	PM	(17)
YajC	Preprotein translocase, YajC subunit	PM	A0QWJ1	1 TM	PM	
MSMEG_0134	Virulence factor Mce family protein	CW	A0QNR2			(15,18)
MSMEG_0135	Virulence factor Mce family protein	CW	A0QNR3			(15,18,19)
MSMEG_0136	Virulence factor Mce family protein	CW	A0QNR4	1 TM	PM	(15,18,19)
MSMEG_0137	Virulence factor Mce family protein	CW	A0QNR5	1 TM	PM	(15,18,19)
MSMEG_0138	Virulence factor Mce family protein	CW	A0QNR6			(15,18,19)
MSMEG_0139	Mce-family protein mce1f	CW	A0QNR7			(15,18,19)
MSMEG_0424	Hsp20/alpha crystallin family protein	CW	A0QPJ9			(20)
MSMEG_5895	Virulence factor Mce family	CW	A0R4N3	1 TM	PM	(15,18,19)
MSMEG_5896	Virulence factor Mce family	CW	A0R4N4			(15,18,19)
MSMEG_5897	Virulence factor Mce family	CW	A0R4N5			(15,18,19)
MSMEG_5898	Virulence factor Mce family	CW	A0R4N6	1 TM	PM	(15,18)
MSMEG_5899	Virulence factor Mce family	CW	A0R4N7			(15,18,19)
MSMEG_5900	Virulence factor Mce family	CW	A0R4N8	1 TM	PM	(15,18,19)
MSMEG_6540	Virulence factor Mce family	CW	A0R6G4	1 TM	PM	(15,18,19)
MspB	Porin MspB	CW	A0QPU4		MM/CW	(15,19,21)
EsxA	ESAT-6-like protein	CF	A0QNJ6		Secreted	(22)
EsxB	ESAT-6-like protein	CF	A0QNJ5		Secreted	(22)
MSMEG_0982	Immunogenic protein	CF	A0QR46			
MSMEG_1051	Immunogenic protein MPB64/MPT64	CF	A0QRB0	SS		(23)
MSMEG_2658	Beta-lactamase	CF	A0QVQ7	SS		
MSMEG_2737	Ppe family protein	CF	A0QVY2	SS		(24)
MSMEG_3543	Soluble secreted antigen MPT53	CF	A0QY58	SS		(25)
MSMEG_3903	Low molecular weight antigen MTB12	CF	A0QZ55	SS		
MSMEG_5412	Immunogenic protein MPT63	CF	A0R3B5	SS		(26)
MSMEG_5617	Immunogenic protein MPT63	CF	A0R3W3	SS	Secreted	(25)
MSMEG_5759	Pe family protein	CF	A0R4A0	SS		(24)
MSMEG_6144	Pe family protein	CF	A0R5C7	SS		(24)
MSMEG_6405	Erp protein	CF	A0R630	SS		(27)
MSMEG_6919	Proline-rich 28 kDa antigen	CF	A0R7H6	SS		(28)
PE35	Uncharacterized PE family protein	CF	A0QNJ3			(24)

**Table S3** (provided in excel format): Proteomic analysis of *M. smegmatis* subcellular fractions. Search results and statistical analysis of the 4 subcellular proteomes of *M. smegmatis*.

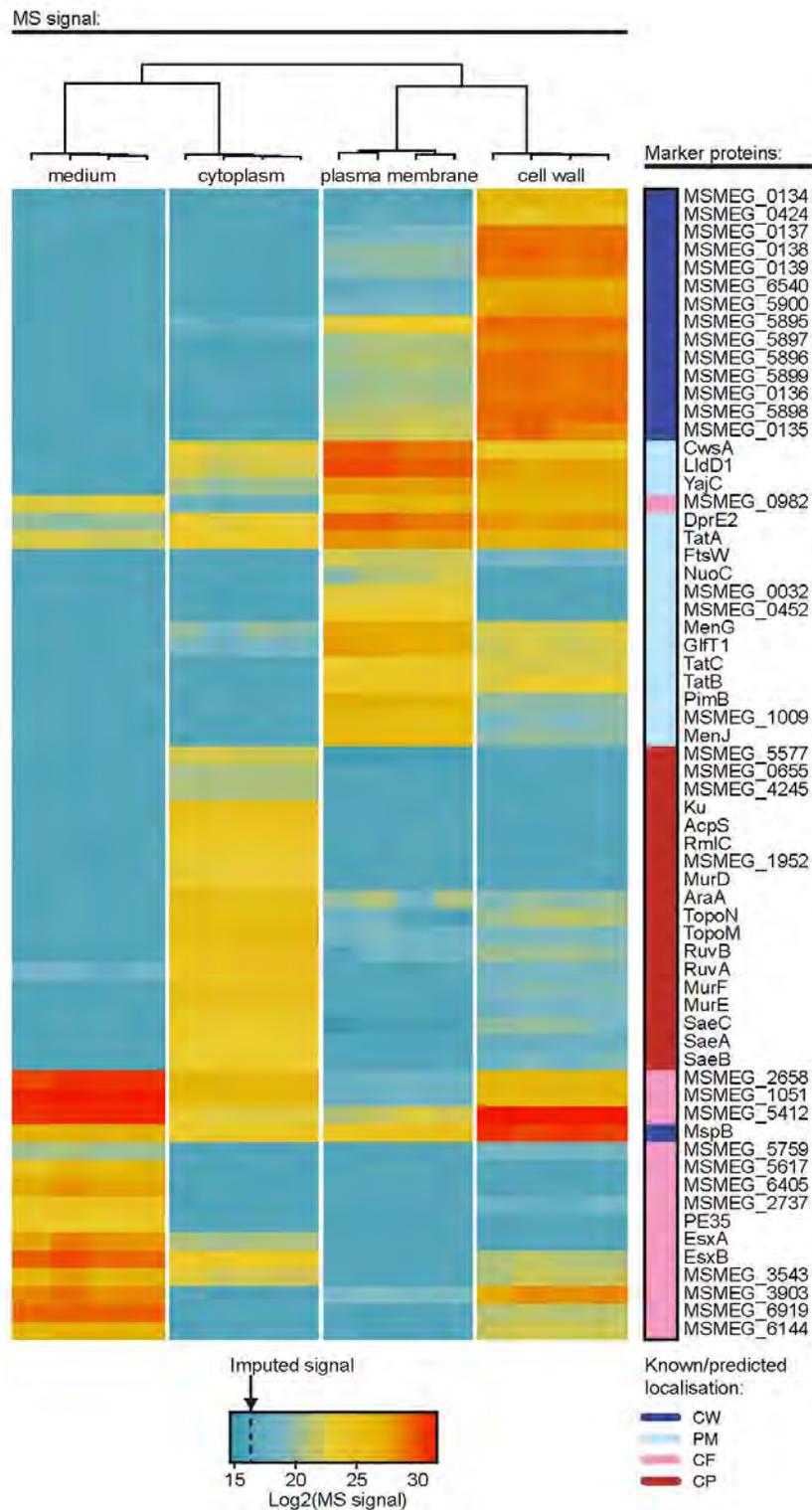
**Table S4** (provided in excel format): Prediction of signal peptides (SP) and their cleavage sites in PE orthologs from various mycobacterial species. Strains listed in the table contain a chromosomal region that displays a similar genetic organization to the TPP locus (*MSMEG\_0408-MSMEG\_0412*) of *M. smegmatis*, indicating that they likely produce TPP. GenPept accession numbers, as well as UniProtKB accession numbers when present in the UniProtKB database, are indicated. SP and cleavage sites were predicted using the SignalP 4.1 software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1>). The first 70 amino acid residues of each protein are shown and signal peptidase cleavage motifs identify by SignalP-4.1 are indicated in red.

**Table S5:** Strains used in this study.

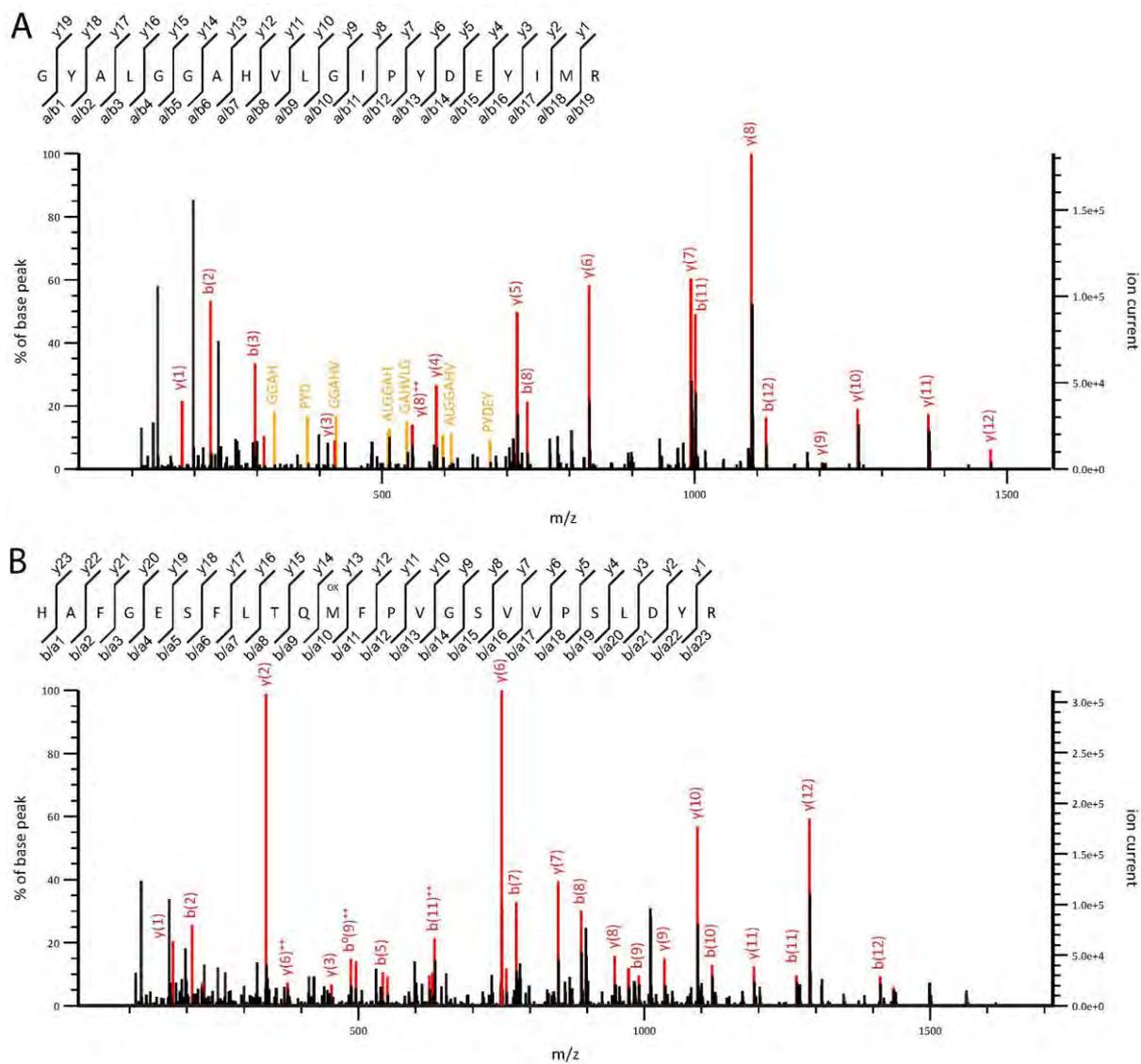
Name	Relevant characteristics	Ref./source
mc <sup>2</sup> 155	<i>M. smegmatis</i> strain mc <sup>2</sup> 155	
PMM229	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 $\Delta pE::res$	(1)
PMM299	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 $\Delta blaS::res-km-res$ , Km <sup>R</sup>	This study



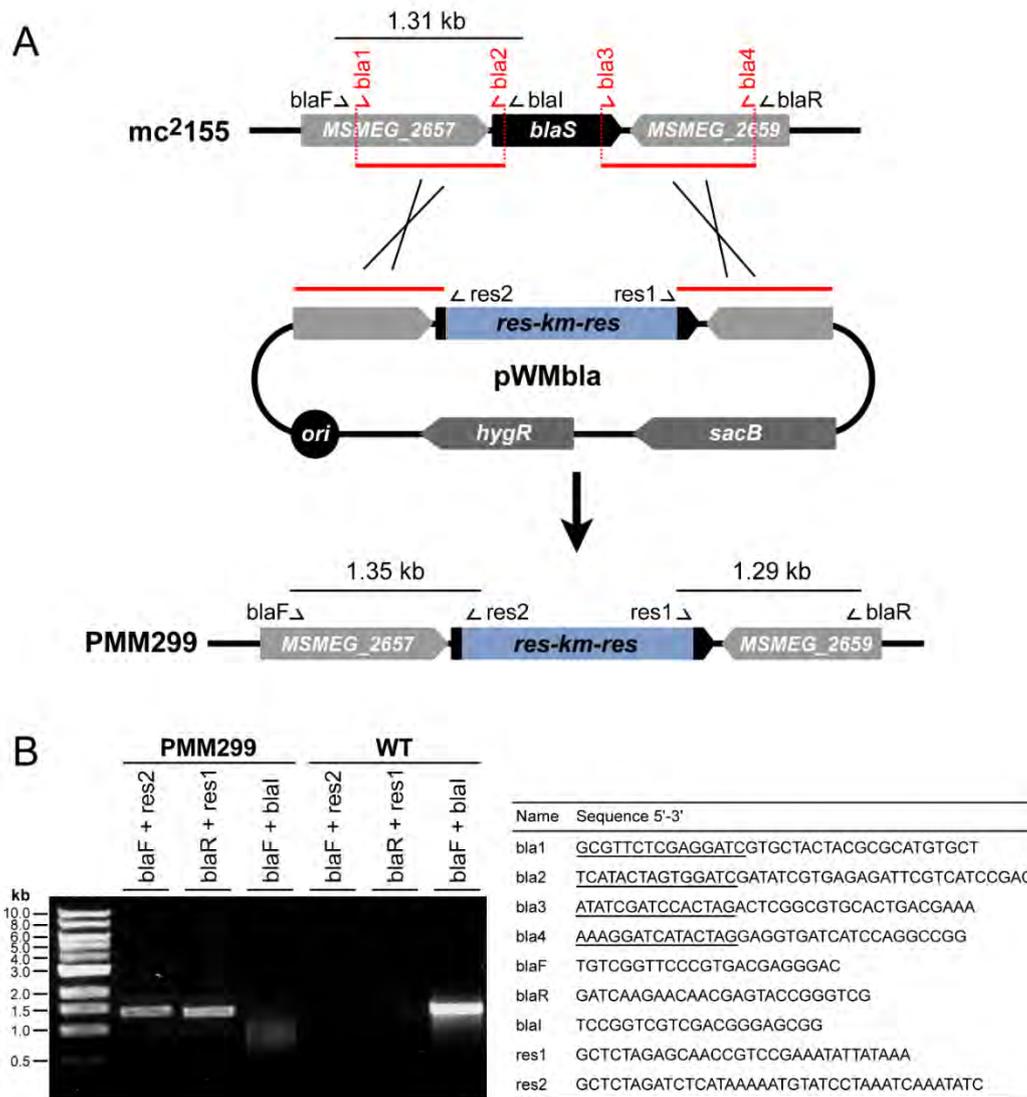
**Figure S1:** TPP production in the PMM229 *M. smegmatis* mutant and in the complemented strains expressing PE fused to the GFP or PhoA. Total lipids extracted from the WT (1) and PMM229 mutant (2) strains and from the PMM229 strains expressing PE (3), PE-GFP (4) or PE-PhoA (5) were dissolved in  $\text{CHCl}_3$ , loaded onto a TLC plate, and run in  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10, v/v). The spots were visualized by spraying the TLC plate with 0.2% (w/v) anthrone in concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , followed by heating. Positions of TPP, diacyltrehalose TPP intermediates (DAT), and GPL are indicated.



**Figure S2: Relative quantities of proteins with known subcellular localization in the proteome of *M. smegmatis*.** Log<sub>2</sub>-transformed normalized MS quantities in the 4 sub-cellular compartments analysed in the study (4 biological replicates) and color coded from blue to red. The missing values were replaced by noise for row and column clustering (hclust R function with method = ward.D2), the corresponding imputed signal is indicated by an arrow in the colour scale. The proteins used as “markers” with known sub-cellular localization are indicated on the right. “CW”: cell wall; “PM” plasma membrane; “CF”: filtrated medium; “CP”: cytoplasm.



**Figure S3:** MSMS spectra of two peptides from PE identified **(A)** in the culture filtrate and **(B)** in the cell wall. b and y fragments are indicated in red and internal fragments in orange.



**Figure S4:** Generation and analysis of the *M. smegmatis*  $\Delta$ *blaS* mutant (PMM299). **(A)** Cloning strategy for the construction of PMM299. Two DNA fragments (depicted by red lines) encompassing the regions located upstream and downstream of the *blaS* gene (*MSMEG\_2658*) were amplified by PCR from *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 total DNA, using pairs of primers bla1/bla2 and bla3/bla4 (red arrows). PCR fragments were cloned, flanking a *res-km-res* resistance cassette, into the BamHI site of the mycobacterial suicide plasmid pWM290, a pJQ200 derivative bearing the counterselectable marker *sacB* and an hygromycin resistance gene (29,30), using the In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio). The resulting plasmid (pWMbla) was transferred by electroporation into *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 for allelic exchange. Transformants were selected on LB agar plates containing Km and sucrose. **(B)** PCR analysis of the PMM299 mutant strain. Several Km- and sucrose-resistant colonies were screened by PCR using combinations of primers located outside of the regions of homology (blaF and blaR) and within the *res-km-res* resistance cassette (res1 and res2) or the deleted region of *blaS* (blaI). One clone giving the corresponding pattern for disruption of *blaS* was selected for further analyses and named PMM299. Positions of primers and the predicted sizes of PCR products are shown above each genetic structure. Primer sequences are shown in the table. Underlined nucleotides indicate the overlapping sequences with the adjacent fragment or vector to be joined by In-Fusion cloning. kb, kilobase.

## Supplemental references

1. 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
2. Astarie-Dequeker, C., Le Guyader, L., Malaga, W., Seaphanh, F. K., Chalut, C., Lopez, A., and Guilhot, C. (2009) Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog* **5**, e1000289
3. Gutierrez, C., and Devedjian, J. C. (1989) A plasmid facilitating in vitro construction of *phoA* gene fusions in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **17**, 3999
4. Le Dantec, C., Winter, N., Gicquel, B., Vincent, V., and Picardeau, M. (2001) Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. *J Bacteriol* **183**, 2157-2164
5. Bouyssie, D., Hesse, A. M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., Gonzalez de Peredo, A., Coute, Y., Dupierris, V., Burel, A., Menetrey, J. P., Kalaitzakis, A., Poisat, J., Romdhani, A., Burlet-Schiltz, O., Cianferani, S., Garin, J., and Bruley, C. (2020) Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**, 3148-3155
6. Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N. C., Zhu, H., Shuman, S., and Glickman, M. S. (2005) Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 304-312
7. Barry, C. E., Crick, D. C., and McNeil, M. R. (2007) Targeting the formation of the cell wall core of *M. tuberculosis*. *Infect Disord Drug Targets* **7**, 182-202
8. Li, W., Xin, Y., McNeil, M. R., and Ma, Y. (2006) *rmlB* and *rmlC* genes are essential for growth of mycobacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 170-178
9. Wirth, S. E., Krywy, J. A., Aldridge, B. B., Fortune, S. M., Fernandez-Suarez, M., Gray, T. A., and Derbyshire, K. M. (2012) Polar assembly and scaffolding proteins of the virulence-associated ESX-1 secretory apparatus in mycobacteria. *Mol Microbiol* **83**, 654-664
10. Jain, P., and Nagaraja, V. (2005) An atypical type II topoisomerase from *Mycobacterium smegmatis* with positive supercoiling activity. *Mol Microbiol* **58**, 1392-1405
11. Plocinski, P., Arora, N., Sarva, K., Blaszczyk, E., Qin, H., Das, N., Plocinska, R., Ziolkiewicz, M., Dziadek, J., Kiran, M., Gorla, P., Cross, T. A., Madiraju, M., and Rajagopalan, M. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination. *J Bacteriol* **194**, 6398-6409
12. Trefzer, C., Skovierova, H., Buroni, S., Bobovska, A., Nenci, S., Molteni, E., Pojer, F., Pasca, M. R., Makarov, V., Cole, S. T., Riccardi, G., Mikusova, K., and Johnsson, K. (2012) Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1. *J Am Chem Soc* **134**, 912-915
13. Belanova, M., Dianiskova, P., Brennan, P. J., Completo, G. C., Rose, N. L., Lowary, T. L., and Mikusova, K. (2008) Galactosyl transferases in mycobacterial cell wall synthesis. *J Bacteriol* **190**, 1141-1145
14. Upadhyay, A., Fontes, F. L., Gonzalez-Juarrero, M., McNeil, M. R., Crans, D. C., Jackson, M., and Crick, D. C. (2015) Partial Saturation of Menaquinone in

- Mycobacterium tuberculosis: Function and Essentiality of a Novel Reductase, MenJ. *ACS Cent Sci* **1**, 292-302
15. Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., Tropis, M., and Daffe, M. (2017) Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep* **7**, 12807
  16. Schaeffer, M. L., Khoo, K. H., Besra, G. S., Chatterjee, D., Brennan, P. J., Belisle, J. T., and Inamine, J. M. (1999) The pimB gene of Mycobacterium tuberculosis encodes a mannosyltransferase involved in lipoarabinomannan biosynthesis. *J Biol Chem* **274**, 31625-31631
  17. Palmer, T., and Stansfeld, P. J. (2020) Targeting of proteins to the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol*
  18. Fenn, K., Wong, C. T., and Darbari, V. C. (2019) Mycobacterium tuberculosis Uses Mce Proteins to Interfere With Host Cell Signaling. *Front Mol Biosci* **6**, 149
  19. Hermann, C., Giddey, A. D., Nel, A. J. M., Soares, N. C., and Blackburn, J. M. (2019) Cell wall enrichment unveils proteomic changes in the cell wall during treatment of Mycobacterium smegmatis with sub-lethal concentrations of rifampicin. *J Proteomics* **191**, 166-179
  20. Abou-Zeid, C., Smith, I., Grange, J. M., Ratliff, T. L., Steele, J., and Rook, G. A. (1988) The secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis and their relationship to those recognized by the available antibodies. *Journal of general microbiology* **134**, 531-538
  21. 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**, 451-464
  22. Simeone, R., Bottai, D., Frigui, W., Majlessi, L., and Brosch, R. (2015) ESX/type VII secretion systems of mycobacteria: Insights into evolution, pathogenicity and protection. *Tuberculosis* **95 Suppl 1**, S150-154
  23. Roche, P. W., Winter, N., Triccas, J. A., Feng, C. G., and Britton, W. J. (1996) Expression of Mycobacterium tuberculosis MPT64 in recombinant Myco. smegmatis: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **103**, 226-232
  24. Ates, L. S. (2020) New insights into the mycobacterial PE and PPE proteins provide a framework for future research. *Mol Microbiol* **113**, 4-21
  25. Manca, C., Lyashchenko, K., Wiker, H. G., Usai, D., Colangeli, R., and Gennaro, M. L. (1997) Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **65**, 16-23
  26. Nagai, S., Wiker, H. G., Harboe, M., and Kinomoto, M. (1991) Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **59**, 372-382
  27. Kocincova, D., Sonden, B., de Mendonca-Lima, L., Gicquel, B., and Reyrat, J. M. (2004) The Erp protein is anchored at the surface by a carboxy-terminal hydrophobic domain and is important for cell-wall structure in Mycobacterium smegmatis. *FEMS microbiology letters* **231**, 191-196
  28. Manca, C., Lyashchenko, K., Colangeli, R., and Gennaro, M. L. (1997) MTC28, a novel 28-kilodalton proline-rich secreted antigen specific for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Infect Immun* **65**, 4951-4957
  29. Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15-21
  30. Malaga, W., Perez, E., and Guilhot, C. (2003) Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS microbiology letters* **219**, 261-268

## Localisation de l'export des TPP lors du cycle cellulaire chez *M. smegmatis* :

### Matériel et Méthodes

#### *Souches et cultures*

Les souches de *M. smegmatis* (Tableau S6) ont été cultivées à 37°C, en milieu liquide LB (Invitrogen) ou 7H9 (Middlebrook) sous agitation supplémenté de 0,05% Tween 80 et en milieu solide LB agar (Invitrogen), en présence ou non d'antibiotiques : hygromycine (50 µg/ml) (Euromedex) et zéocyne (25 µg/ml) (Invitrogen). Les souches de *E.coli* DH5α ont été cultivées à 37°C, en milieu liquide LB sous agitation et en milieu solide LB agar, en présence ou non d'antibiotique : hygromycine (200 µg/ml) et zéocyne (25 µg/ml).

#### *Construction des plasmides (Tableau S7)*

##### *Construction du pNL10mVen*

Le gène *mVenus* a été amplifié par PCR (amorces 17331a : AGAGGTGACCAAGCTTAGTGGAGCGGCCGCTGCAG et 17331b : ACTACGTCGACATCGATGTTAACTCACTTGTACAGCTCG) et cloné à la place de la *gfp* dans le vecteur pMVL10GFP, un vecteur dérivé du pMV361eH et produisant MmpL10 en fusion à la GFP (données personnelles). Le vecteur obtenu a ensuite été digéré par les amorces PacI et NdeI pour libérer le promoteur pBlaF\* et le remplacer par le promoteur *mmpL10* natif, amplifié par PCR sur l'ADN génomique de *M. smegmatis* (amorces 18075d : GAAATCTAGATTAATTAAGCCGTTGTCCTCCCTAGAATC et 18075e : GCTAGCTTACGCATATGACGTGGTCCTCCCAATAATTC).

##### *Construction du pNL10Wag*

Le gène *wag31* et son promoteur ont été amplifiés par PCR sur l'ADN génomique de *M. smegmatis* et clonés en amont du gène *mCherry* dans un vecteur dérivé du pMV361eH (données personnelles). L'ensemble a ensuite été amplifié par PCR (amorces 19318a

Nom de la souche	Caractéristiques	Référence
<i>M. smegmatis</i> sauvage	mc <sup>2</sup> -155	Snapper <i>et al.</i> , 1990
PMM223	<i>M. smegmatis</i> $\Delta$ mmpL10::res	Burbaud <i>et al.</i> , 2016
$\Delta$ lamA	<i>M. smegmatis</i> $\Delta$ lamA::Zeo	Rego <i>et al.</i> , 2017

Tableau S6 : Souches utilisées dans l'étude

Nom du plasmide	Caractéristiques	Plasmide parental	Référence
pMV361eH	Plasmide intégratif, portant le gène de résistance à l'hygromycine et le promoteur pBlaF*	pMV361	Stover <i>et al.</i> , 1991
pNL10mVen	Production de MmpL10-mVenus sous contrôle du promoteur <i>mmpL10</i>	pMV361eH	Cette étude
pNL10Wag	Production de MmpL10-mVenus sous contrôle du promoteur <i>mmpL10</i> et de Wag31-mCherry sous le contrôle du promoteur <i>wag31</i>	pNL10mVen	Cette étude
pNL3mVen	Production de MmpL3-mVenus sous contrôle du promoteur <i>mmpL10</i>	pNL10mVen	Cette étude
pNL3Wag	Production de MmpL3-mVenus sous contrôle du promoteur <i>mmpL10</i> et de Wag31-mCherry sous le contrôle du promoteur <i>wag31</i>	pNL3mVen	Cette étude

Tableau S7 : Plasmides utilisés dans l'étude

AACGGCTTAATTAATCTAGATTCATCGGCATGCAGCTCGC et 19318b GTTCCCGCCAGAAATCTAG-ATTACTTATAGAGCTCGTCCATCC) et cloné par InFusion en XbaI dans le vecteur pNL10mVen linéarisé.

#### *Construction du pNL3mVen*

Le gène *mmpL3* a été amplifié sur l'ADN génomique de *M. smegmatis* (amorces 19170a ATAA CATATGTTGCCTGGTGGGGTCG et 19170b ATAAAAGCTTCAGCCTGCCTTCGCGGCG) et cloné à la place du gène *mmpL10* dans le vecteur pNL10mVen linéarisé par NdeI et HindIII.

#### *Construction du pNL3Wag*

Le gène *wag31-mCherry*, ainsi que le promoteur *wag31* ont été amplifiés par PCR (amorces 19318a et 19318b) comme précédemment et cloné par InFusion en XbaI dans le vecteur pNL3mVen linéarisé.

#### *Préparation des bactéries et analyse en microscopie de fluorescence*

Les bactéries issues d'une préculture ont été inoculées au 1/500<sup>ème</sup> dans du milieu 7H9 frais additionné de Tween 80 et cultivées 12h à 37°C sous agitation jusqu'à une DO d'environ 0,3. Les bactéries ont ensuite été incubées avec 500 µm de HADA (7-hydroxycoumarin acide carboxylique-D-alanine, Bio-Techne) pendant 20 min à 37°C dans le noir, puis lavées en 7H9 additionné de Tween 80. Un volume de 0.6 µl de chaque culture a ensuite été déposé sur une lame contenant une couche d'1% agarose dans du milieu 7H9. Après montage de la lame, les bactéries ont été visualisées avec un microscope à fluorescence à champ large Eclipse TI-E/B avec un objectif à contraste de phase (CFI Plan Apo LBDA 100X oil NA 1.45) et des filtres Semrock CFP (Excitation : 438BP24 ; Miroir dichroïque : 458 ; Emission : 483BP32), YFP (Excitation : 500BP24 ; Miroir dichroïque : 520 ; Emission : 542BP27) et mCherry (Excitation : 562BP40 ; Miroir dichroïque : 593 ; Emission : 641BP75). Les images ont été acquises avec une caméra Andor Neo SCC-02124 avec des illuminations de 20 à 75% de sources Led SpectraX (Lumencor) et des temps d'exposition allant de 200 ms à 1 s. Le logiciel Nis-Elements AR (Nikon) a été utilisé pour la prise d'images.

### *Analyse des images de microscopie*

Les images ont été analysées avec le logiciel Fiji. Chaque bactérie isolée ne présentant pas de septum a été orientée manuellement du pôle à la fluorescence la plus intense au pôle à la fluorescence la moins intense, selon le signal du marqueur HADA. Les données ont été collectées sous forme d'intensités de fluorescence par pixel en fonction de la longueur des bactéries. Pour éliminer la variabilité de taille des bactéries, les données ont été soumises à un script python personnalisé écrit par Dr A. O'Reilly (Figure S7). La taille de chaque bactérie a été normalisée entre 0 et 1 (0 correspondant au pôle le plus fluorescent et 1 au pôle le moins fluorescent). Un ré-échantillonnage a ensuite été effectué sur les valeurs d'intensités de fluorescence afin de les faire correspondre aux tailles normalisées des bactéries. Les valeurs ont ensuite été exportées et mises en forme à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.

### *Western Blot*

Les bactéries *M. smegmatis* ont été collectées par centrifugation et resuspendues dans 500 µl de 50 mM Tris-HCl pH 7.4. Un volume équivalent de billes de verre de 0.1mm (Biospec) ont été ajoutées et les cellules ont été lysées au bead-beater (Bioblock Scientific, Retsch) pendant 2 min à vitesse maximale, entrecoupé de deux minutes d'incubation sur la glace. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation pendant 10 min à 16,000xg et des aliquots de surnageant ont été collectés, mélangés à du tampon de Laemmli 4X (Bio-Rad) et chauffés à 95°C pendant 5 min. Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% coulé à la main (SDS-PAGE). Le marqueur de taille qui a été utilisé est le PageRuler Plus Prestained protein ladder (Thermofisher). Le Western Blot a été réalisé comme suit : après séparation par SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0.2 µm (Pall Corporation) à 150 mA pendant 1h. Les membranes ont ensuite été bloquées dans du PBS – 0.1% Tween 20 – 10% lait en poudre pendant 1 h et incubées 1h avec un anticorps monoclonal de souris anti-eGFP (Thermofisher, dilution 1/1000) dans du PBS – 0.1% Tween 20 – 1% lait. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois dans du PBS – 0.1% Tween 20 et incubées 1h avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la HRP (Sigma) (dilution 1/3000) dans du PBS – 0.1% Tween 20 – 1% lait. Après lavage, les membranes ont été incubées 5 min avec le kit EMD Millipore Immobilon

enhanced chemiluminescence (Fisher Scientific) et révélées avec un système d'imagerie ChemiDoc Touch (Bio-Rad).

*Extraction lipidique et chromatographie sur couche mince*

Les lipides ont été extraits par incubation des bactéries avec un mélange de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2) et  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1) puis lavés et séchés. Les lipides ont ensuite été déposés sur une plaque de silice G60 (Merck), élués dans un mélange de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (90:10, v/v) et révélés par l'action combinée de l'antrone (0.2% dans de l'acide sulfurique concentrée, p/v) et du chauffage.

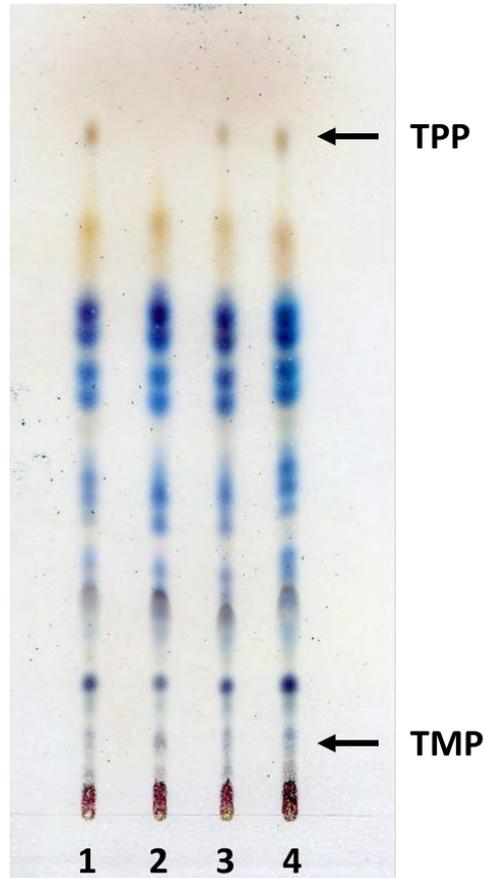


Figure S5 : La fusion MmpL10-mVenus est fonctionnelle dans *M. smegmatis*

Chromatographie sur couche mince des souches *M. smegmatis* sauvage (1), *M. smegmatis*  $\Delta mmpL10$  (PMM223) (2) et PMM223 produisant MmpL10-mVenus seule (PMM223/pNL10mVen) (3) ou co-exprimée avec Wag31-mCherry (PMM223/pNL10Wag) (4). Les extraits lipidiques ont été déposés sur plaque de silice, séparés par un mélange chloroforme/méthanol, 9/1, v/v puis révélés par l'action combinée de l'anthrone et du chauffage.

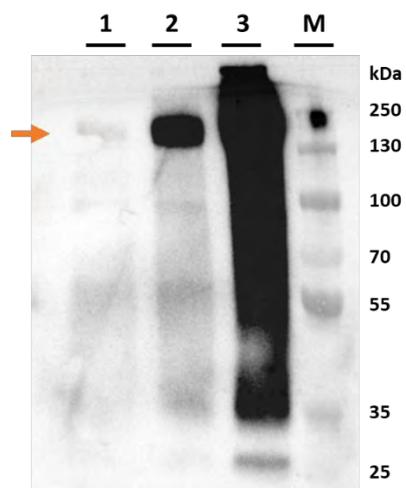


Figure S6 : Evaluation du taux de production de la fusion MmpL10-mVenus par différents systèmes

Analyse par Western-Blot de la production de la fusion MmpL10-mVenus dans la souche 1 (piste 1), la souche 2 (piste 2) et la souche 3 (piste 3), en utilisant un anticorps de souris anti-eGFP et un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase. La flèche symbolise la masse moléculaire attendue pour la fusion (134,3 kDa). M : marqueur de taille, exprimé en kilodaltons (kDa).

```

from pandas import read_excel, concat, DataFrame
from numpy import linspace
from bokeh.plotting import figure, output_file, save
from bokeh.palettes import Colorblind8
from scipy.interpolate import CubicSpline
import argparse

# _____ Import the files _____
def import_and_clean(file_name):
    """
    :param file_name: address of the file eg C:/Users/oreilly/strain.xlsx - must be an excel file
    :return:

    Imports the strain file
    """

    df = read_excel(file_name)

    df.reset_index(inplace=True, drop=True)
    rename_columns(df)
    return df

def rename_columns(df):
    """
    :param df: the dataframe containing the excel file
    :return:

    Renames the columns to xn and yn
    """
    x_cols = df.loc[:, (df.columns.str.startswith('x') | (df.columns.str.startswith('X'))).columns]
    x_replace_dict = {col: 'x{}'.format(val) for col, val in zip(x_cols, range(len(x_cols)))}

    y_cols = df.loc[:, (df.columns.str.startswith('y') | (df.columns.str.startswith('Y'))).columns]
    y_replace_dict = {col: 'y{}'.format(val) for col, val in zip(y_cols, range(len(y_cols)))}

    df.rename(columns=x_replace_dict, inplace=True)
    df.rename(columns=y_replace_dict, inplace=True)
    return

# _____ Normalise _____
def normalise_x_columns(df):
    """
    :param df: DataFrame containing the strain information for all samples
    :return:

    Normalises the x values for all of the data
    """
    x_cols = df.loc[:, (df.columns.str.startswith('x'))].columns
    y_cols = df.loc[:, (df.columns.str.startswith('y'))].columns

    max_values = df.loc[:, x_cols].max()
    df_normalised = df.loc[:, x_cols] / max_values

    df_normalised = concat([df.loc[:, y_cols], df_normalised], axis=1, sort=False)

    return df_normalised

```

**Figure S7 : programme Python personnalisé utilisé pour les quantifications des signaux fluorescents le long des bactéries (1/4)**

Ecrit par Dr A. O'Reilly

```

# _____resample using the cubic spline interpolation_____
# _____https://en.wikiversity.org/wiki/Cubic_Spline_Interpolation_____
"""
:param df: DataFrame containing the strain information for all samples
:param sample_number: in order to extract x0, y0 insert the number 0
:return:
"""
x_col = 'x{}'.format(sample_number)
y_col = 'y{}'.format(sample_number)

sample_df = df.loc[~df[x_col].isnull(), [x_col, y_col]].copy()
return sample_df, x_col, y_col

def generate_raw_resampled_df(num_steps):
    """
    :param num_steps: number of sampling points, in general this should be greater than the number of
    original point
    :return:

    Generates a DataFrame which contains the x values which will be used for all of the resampled strain
    data
    """
    x_points = linspace(0, 1, num_steps + 1)
    resample_df = DataFrame({'x_mid': x_points})
    return resample_df

def generate_cubic_spline(df, x_col, y_col):
    """
    :param df: sample_df
    :param x_col: name of the x_column
    :param y_col: name of the y_column
    :return:

    generates the cubic spline object
    """
    cs = CubicSpline(df[x_col], df[y_col])
    return cs

def generate_resample_df(df, num_steps=100):
    """
    :param df: DataFrame containing the strain information for all samples
    :param num_steps: number of sampling points
    :return:

    resamples all of the samples which are in the DataFrame
    """
    resample_df = generate_raw_resampled_df(num_steps)

    num_samples = int(len(df.columns) / 2)
    for sample in range(num_samples):
        sample_df, x_col, y_col = extract_sample_df(df, sample)
        y_mid_col = '{}_mid'.format(y_col)

        cs = generate_cubic_spline(sample_df, x_col, y_col)

        resample_df[y_mid_col] = cs(resample_df.x_mid)

    return resample_df

```

**Figure S7 : programme Python personnalisé utilisé pour les quantifications des signaux fluorescents le long des bactéries (2/4)**

```

# _____ Generate Mean _____
def calculate_mean(resample_df):
    resample_df['MEAN'] = resample_df.mean(axis=1)
    return

# _____ Write the Results to file _____
for df, file_name in zip(dataframe_list, file_name_list):
    df.to_excel(file_name)
    return

# _____ Generate Image Plots _____
def plot_mean_against_all(total_df, file_name):
    p = figure(plot_width=1000, plot_height=600)

    y_cols = total_df.loc[:, total_df.columns.str.contains('y')].columns
    for col in y_cols:
        p.line(total_df.x_mid, total_df[col], line_width=2, color='blue')

    p.line(total_df.x_mid, total_df.MEAN, line_width=2, color='black', legend='mean')

    output_file(file_name)
    save(p)
    return

def plot_all_means(df_means):
    p = figure(plot_width=1000, plot_height=600)

    mean_cols = df_means.loc[:, df_means.columns != 'x_mid']
    for col, col_num in zip(mean_cols, range(len(mean_cols))):
        p.line(df_means.x_mid, df_means[col], line_width=2, color=Colorblind8[col_num], legend=col)

    output_file("MEANS_COMPARISON.html")
    save(p)
    return

def generate_results_file_name(file_name):
    file_name_output = file_name.replace('.xlsx', '_resampled_and_normalised.xlsx')
    graph_name_output = file_name.replace('.xlsx', '_mean_plot.html')

    sample_name = file_name.split('/')[1]
    sample_name = sample_name.replace('.xlsx', '')
    return file_name_output, graph_name_output, sample_name

if __name__ == '__main__':
    parser = argparse.ArgumentParser(description='Imports the strain files and plots them')
    parser.add_argument('-file_list', nargs='+', help='Path of a file or a folder of files.')
    parser.add_argument('-number_points', default=100, help='Number of points to use for the
resampling')
    args = parser.parse_args()

```

**Figure S7 : programme Python personnalisé utilisé pour les quantifications des signaux fluorescents le long des bactéries (3/4)**

```
means_df = generate_raw_resampled_df(args.number_points)

for file_path in args.file_list:
    results_path, graph_path, sample_name = generate_results_file_name(file_path)

    raw_df = import_and_clean(file_path)
    normalised_df = normalise_x_columns(raw_df)
    results_df = generate_resample_df(normalised_df, num_steps=args.number_points)
    calculate_mean(results_df)

    plot_mean_against_all(results_df, graph_path)

    means_df[sample_name] = results_df.MEAN

    calculate_mean(results_df)
    results_df.to_excel(results_path)

means_df.to_excel('Results_mean.xlsx')
plot_all_means(means_df)
```

Figure S7 : programme Python personnalisé utilisé pour les quantifications des signaux fluorescents le long des bactéries (4/4)



# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Abellón-Ruiz, J., Kaptan, S.S., Baslé, A., Claudi, B., Bumann, D., Kleinekathöfer, U., van den Berg, B., 2017. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Nat. Microbiol.* 2, 1616–1623. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0046-x>
- Abrahams, K.A., Besra, G.S., 2018. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology* 145, 116–133. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002377>
- Adjemian, J., Olivier, K.N., Seitz, A.E., Holland, S.M., Prevots, D.R., 2012. Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease in U.S. Medicare Beneficiaries. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 881–886. <https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2016OC>
- Aldridge, B.B., Fernandez-Suarez, M., Heller, D., Ambravaneswaran, V., Irimia, D., Toner, M., Fortune, S.M., 2012. Asymmetry and Aging of Mycobacterial Cells Lead to Variable Growth and Antibiotic Susceptibility. *Science* 335, 100–104. <https://doi.org/10.1126/science.1216166>
- Alexander, M.K., Miu, A., Oh, A., Reichelt, M., Ho, H., Chalouni, C., Labadie, S., Wang, L., Liang, J., Nickerson, N.N., Hu, H., Yu, L., Du, M., Yan, D., Park, S., Kim, J., Xu, M., Sellers, B.D., Purkey, H.E., Skelton, N.J., Koehler, M.F.T., Payandeh, J., Verma, V., Xu, Y., Koth, C.M., Nishiyama, M., 2018. Disrupting Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Biosynthesis through Inhibition of the Lipopolysaccharide Transporter MsbA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e01142-18, /aac/62/11/e01142-18.atom. <https://doi.org/10.1128/AAC.01142-18>
- Andersen, C.S., Agger, E.M., Rosenkrands, I., Gomes, J.M., Bhowruth, V., Gibson, K.J.C., Petersen, R.V., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Andersen, P., 2009. A Simple Mycobacterial Monomycolated Glycerol Lipid Has Potent Immunostimulatory Activity. *J. Immunol.* 182, 424–432. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.424>
- Anderson, D.H., Harth, G., Horwitz, M.A., Eisenberg, D., 2001. An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the Mycobacterium tuberculosis 30 kDa major secretory protein (antigen 85B), a mycolyl transferase. Edited by I. A. Wilson. *J. Mol. Biol.* 307, 671–681. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4461>
- Angala, S.K., Belardinelli, J.M., Huc-Claustre, E., Wheat, W.H., Jackson, M., 2014. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 361–399. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.925420>
- Asmar, A.T., Collet, J.-F., 2018. Lpp, the Braun lipoprotein, turns 50—major achievements and remaining issues. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny199>

- Asselineau, C.P., Montrozier, H.L., PromE, J.-C., Savagnac, A.M., Welby, M., 1972. Etude d'un glycolipide polyinsature synthetise par *Mycobacterium phlei*. *Eur. J. Biochem.* 28, 102–109. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01889.x>
- Augenstreich, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., Le Chevalier, F., Chalut, C., Malaga, W., Guilhot, C., Brosch, R., Astarie-Dequeker, C., 2017. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell. Microbiol.* 19, e12726. <https://doi.org/10.1111/cmi.12726>
- Augenstreich, J., Haanappel, E., Ferré, G., Czaplicki, G., Jolibois, F., Destainville, N., Guilhot, C., Milon, A., Astarie-Dequeker, C., Chavent, M., 2019. The conical shape of DIM lipids promotes *Mycobacterium tuberculosis* infection of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201910368. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910368116>
- Axelrod, S., Oschkinat, H., Enders, J., Schlegel, B., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H.E., Haas, A., Schaible, U.E., 2008. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell. Microbiol.* 10, 1530–1545. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01147.x>
- Backus, K.M., Dolan, M.A., Barry, C.S., Joe, M., McPhie, P., Boshoff, H.I.M., Lowary, T.L., Davis, B.G., Barry, C.E., 2014. The Three *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85 Isoforms Have Unique Substrates and Activities Determined by Non-active Site Regions. *J. Biol. Chem.* 289, 25041–25053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581579>
- Bai, B., Chu, C., Lowary, T.L., 2015. Lipooligosaccharides from Mycobacteria: Structure, Function, and Synthesis. *Isr. J. Chem.* 55, 360–372. <https://doi.org/10.1002/ijch.201400194>
- Balleza, E., Kim, J.M., Cluzel, P., 2018. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nat. Methods* 15, 47–51. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4509>
- Bansal-Mutalik, R., Nikaido, H., 2014. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4958–4963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403078111>
- Bansal-Mutalik, R., Nikaido, H., 2011. Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 15360–15365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112572108>
- Baranowski, C., Rego, E.H., Rubin, E.J., 2019. The Dream of a Mycobacterium. *Microbiol. Spectr.* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0008-2018>
- Baumgart, M., Schubert, K., Bramkamp, M., Frunzke, J., 2016. Impact of LytR-CpsA-Psr Proteins on Cell Wall Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 198, 3045–3059. <https://doi.org/10.1128/JB.00406-16>

- Behling, C.A., Perez, R.L., Kidd, M.R., Staton Jr, G.W., Hunter, R.R., 1993. Induction of pulmonary granulomas, macrophage procoagulant activity, and tumor necrosis factor-alpha by trehalose glycolipids 11.
- Belardinelli, J.M., Larrouy-Maumus, G., Jones, V., Sorio de Carvalho, L.P., McNeil, M.R., Jackson, M., 2014. Biosynthesis and Translocation of Unsulfated Acyltrehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 289, 27952–27965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581199>
- Belardinelli, J.M., Stevens, C.M., Li, W., Tan, Y.Z., Jones, V., Mancina, F., Zgurskaya, H.I., Jackson, M., 2019. The MmpL3 interactome reveals a complex crosstalk between cell envelope biosynthesis and cell elongation and division in mycobacteria. *Sci. Rep.* 9, 10728. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47159-8>
- Belardinelli, J.M., Yazidi, A., Yang, L., Fabre, L., Li, W., Jacques, B., Angala, S. kumar, Rouiller, I., Zgurskaya, H.I., Sygusch, J., Jackson, M., 2016. Structure–Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect. Dis.* 2, 702–713. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00095>
- Bernut, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., Brosch, R., de Chastellier, C., Herrmann, J.-L., Kremer, L., 2016. Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members: MmpL activity is dependent on a crucial tyrosine. *Mol. Microbiol.* 99, 866–883. <https://doi.org/10.1111/mmi.13283>
- Bertani, B., Ruiz, N., 2018. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* 8. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018>
- Besra, G.S., Bolton, R.C., McNeil, M.R., Ridell, M., Simpson, K.E., Glushka, J., Van Halbeek, H., Brennan, P.J., Minnikin, D.E., 1992. Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 31, 9832–9837. <https://doi.org/10.1021/bi00155a040>
- Bhamidi, S., Scherman, M.S., Rithner, C.D., Prenni, J.E., Chatterjee, D., Khoo, K.-H., McNeil, M.R., 2008. The Identification and Location of Succinyl Residues and the Characterization of the Interior Arabinan Region Allow for a Model of the Complete Primary Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* 283, 12992–13000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800222200>
- Bishop, P.J., Neumann, G., 1970. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 51, 196–206. [https://doi.org/10.1016/0041-3879\(70\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0041-3879(70)90073-5)
- Bloch, H., Sorkin, E., Erlenmeyer, H., 1953. A Toxic Lipid Component of the Tubercle Bacillus (“Cord Factor”)1. *Am. Rev. Tuberc.*
- Boritsch, E.C., Frigui, W., Cascioferro, A., Malaga, W., Etienne, G., Laval, F., Pawlik, A., Le Chevalier, F., Orgeur, M., Ma, L., Bouchier, C., Stinear, T.P., Supply, P., Majlessi, L., Daffé, M., Guilhot, C., Brosch, R., 2016. pks5-recombination-mediated surface

- remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* emergence. *Nat. Microbiol.* 1, 15019. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.19>
- Botella, H., Yang, G., Ouerfelli, O., Ehrt, S., Nathan, C.F., Vaubourgeix, J., 2017. Distinct Spatiotemporal Dynamics of Peptidoglycan Synthesis between *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01183-17>
- Bottomley, M.J., Serruto, D., Sáfadi, M.A.P., Klugman, K.P., 2012. Future challenges in the elimination of bacterial meningitis. *Vaccine* 30, B78–B86. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.099>
- Brennan, P.J., n.d. The Envelope of Mycobacteria 35.
- Brennan, P.J., Goren, M.B., 1979. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the mycobacterium avium.Mycobacterium intracellulare.Mycobacterium scrofulaceum serocomplex. Mycobacterium intracellulare serotype 9. *J. Biol. Chem.* 254, 4205–4211.
- Brown, D.G., 2016. Drug discovery strategies to outer membrane targets in Gram-negative pathogens. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 6320–6331. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.004>
- Brown, S., Santa Maria, J.P., Walker, S., 2013. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 313–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
- Brown-Elliott, B.A., Wallace, R.J., 2002. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 716–746. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.716-746.2002>
- Brozna, J.P., Horan, M., Rademacher, J.M., Pabst, K.M., Pabst, M.J., 1991. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. *Infect. Immun.* 59, 2542–2548. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.8.2542-2548.1991>
- Burbaud, S., Laval, F., Lemassu, A., Daffé, M., Guilhot, C., Chalut, C., 2016. Trehalose Polyphleates Are Produced by a Glycolipid Biosynthetic Pathway Conserved across Phylogenetically Distant Mycobacteria. *Cell Chem. Biol.* 23, 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.013>
- Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Lanéelle, M.-A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffé, M., Guilhot, C., 2001. Analysis of the Phthiocerol Dimycocerosate Locus of *Mycobacterium tuberculosis*: evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J. Biol. Chem.* 276, 19845–19854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100662200>
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., Guilhot, C., 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon

- mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 34, 257–267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01593.x>
- Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B., Cosma, C.L., Ramakrishnan, L., 2014. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505, 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature12799>
- Cameron, T.A., Zupan, J.R., Zambryski, P.C., 2015. The essential features and modes of bacterial polar growth. *Trends Microbiol.* 23, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.003>
- Carel, C., Nukdee, K., Cantaloube, S., Bonne, M., Diagne, C.T., Laval, F., Daffé, M., Zerbib, D., 2014. Mycobacterium tuberculosis Proteins Involved in Mycolic Acid Synthesis and Transport Localize Dynamically to the Old Growing Pole and Septum. *PLoS ONE* 9, e97148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097148>
- Catherinot, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J.-F., Daffe, M., Perronne, C., Soudais, C., Gaillard, J.-L., Rottman, M., 2007. Hypervirulence of a Rough Variant of the Mycobacterium abscessus Type Strain. *Infect. Immun.* 75, 1055–1058. <https://doi.org/10.1128/IAI.00835-06>
- Chalut, C., 2016. MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis* 100, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.06.004>
- Chalut, C., Botella, L., de Sousa-D’Auria, C., Houssin, C., Guilhot, C., 2006. The nonredundant roles of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of Mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 8511–8516. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511129103>
- Chao, M.C., Kieser, K.J., Minami, S., Mavrici, D., Aldridge, B.B., Fortune, S.M., Alber, T., Rubin, E.J., 2013. Protein Complexes and Proteolytic Activation of the Cell Wall Hydrolase RipA Regulate Septal Resolution in Mycobacteria. *PLoS Pathog.* 9, e1003197. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003197>
- Chim, N., Torres, R., Liu, Y., Capri, J., Batot, G., Whitelegge, J.P., Goulding, C.W., 2015. The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from Mycobacterium tuberculosis. *Chem. Biol.* 22, 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.07.013>
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., Barrell, B.G., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007–1011. <https://doi.org/10.1038/35059006>

- Confer, A.W., Ayalew, S., 2013. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet. Microbiol.* 163, 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.019>
- Constant, P., Perez, E., Malaga, W., Lanéelle, M.-A., Saurel, O., Daffé, M., Guilhot, C., 2002. Role of the *pks15/1* Gene in the Biosynthesis of Phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the *pks15 / 1* gene. *J. Biol. Chem.* 277, 38148–38158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206538200>
- Converse, S.E., Mougous, J.D., Leavell, M.D., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., Cox, J.S., 2003. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6121–6126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030024100>
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., Jr, W.R.J., 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice 402, 5.
- Crellin, P.K., Vivian, J.P., Scoble, J., Chow, F.M., West, N.P., Brammananth, R., Proellocks, N.I., Shahine, A., Le Nours, J., Wilce, M.C.J., Britton, W.J., Coppel, R.L., Rossjohn, J., Beddoe, T., 2010. Tetrahydrolipstatin Inhibition, Functional Analyses, and Three-dimensional Structure of a Lipase Essential for Mycobacterial Viability. *J. Biol. Chem.* 285, 30050–30060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150094>
- Cywes, C., Hoppe, H.C., Daffé, M., Ehlers, M.R., 1997. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect. Immun.* 65, 4258–4266. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.10.4258-4266.1997>
- Daffé, M., Crick, D.C., Jackson, M., 2014. Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0021-2013>
- Daffe, M., Lacave, C., Laneelle, M.-A., Laneelle, G., 1987. Structure of the major triglycosyl phenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain Canetti). *Eur. J. Biochem.* 167, 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13317.x>
- Daffe, M., Laneelle, M.A., 1988. Distribution of Phthiocerol Diester, Phenolic Mycosides and Related Compounds in Mycobacteria. *Microbiology* 134, 2049–2055. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-2049>
- Daffé, M., Marrakchi, H., 2019. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. *Microbiol. Spectr.* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>
- Dalebroux, Z.D., Edrozo, M.B., Pfuetzner, R.A., Ressler, S., Kulasekara, B.R., Blanc, M.-P., Miller, S.I., 2015. Delivery of Cardiolipins to the Salmonella Outer Membrane Is Necessary for Survival within Host Tissues and Virulence. *Cell Host Microbe* 17, 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.003>

- Damjanovic, M., Kharat, A.S., Eberhardt, A., Tomasz, A., Vollmer, W., 2007. The Essential *tacF* Gene Is Responsible for the Choline-Dependent Growth Phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189, 7105–7111. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-07>
- Daniel, R.A., Errington, J., 2003. Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell. *Cell* 113, 767–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00421-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00421-5)
- Datta, P., Dasgupta, A., Singh, A.K., Mukherjee, P., Kundu, M., Basu, J., 2006. Interaction between FtsW and penicillin-binding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 62, 1655–1673. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05491.x>
- Deshayes, C., Bach, H., Euphrasie, D., Attarian, R., Coureuil, M., Sougakoff, W., Laval, F., Av-Gay, Y., Daffé, M., Etienne, G., Reyrat, J.-M., 2010. MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*: Glycopeptidolipids biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 78, 989–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07385.x>
- Di Guilmi, A.M., Bonnet, J., Peißert, S., Durmort, C., Gallet, B., Vernet, T., Gisch, N., Wong, Y.-S., 2017. Specific and spatial labeling of choline-containing teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* by click chemistry. *Chem. Commun.* 53, 10572–10575. <https://doi.org/10.1039/C7CC05646J>
- Dong, H., Xiang, Q., Gu, Y., Wang, Z., Paterson, N.G., Stansfeld, P.J., He, C., Zhang, Y., Wang, W., Dong, C., 2014. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* 511, 52–56. <https://doi.org/10.1038/nature13464>
- Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Kolattukudy, P.E., 2002. Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation: *msl3* in TB required for polyacyltrehalose synthesis. *Mol. Microbiol.* 45, 1451–1459. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03119.x>
- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Lanéelle, M.-A., Yu, K., Quémard, A., Smith, I., Daffé, M., 2002. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice: Oxygenated mycolic acids in *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 36, 630–637. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01882.x>
- Dutta, S., Whicher, J.R., Hansen, D.A., Hale, W.A., Chemler, J.A., Congdon, G.R., Narayan, A.R.H., Håkansson, K., Sherman, D.H., Smith, J.L., Skiniotis, G., 2014. Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* 510, 512–517. <https://doi.org/10.1038/nature13423>
- Dziedzic, R., Kiran, M., Plocinski, P., Ziolkiewicz, M., Brzostek, A., Moomey, M., Vadrevu, I.S., Dziadek, J., Madiraju, M., Rajagopalan, M., 2010. *Mycobacterium tuberculosis* ClpX Interacts with FtsZ and Interferes with FtsZ Assembly. *PLoS ONE* 5, e11058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011058>

- Egan, A.J.F., Vollmer, W., 2013. The physiology of bacterial cell division: Bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 8–28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06818.x>
- Ercan, B., Low, W.-Y., Liu, X., Chng, S.-S., 2019. Characterization of Interactions and Phospholipid Transfer between Substrate Binding Proteins of the OmpC-Mla System. *Biochemistry* 58, 114–119. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00897>
- Ernst, J.D., 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 581–591. <https://doi.org/10.1038/nri3259>
- Eskandarian, H.A., Odermatt, P.D., Ven, J.X.Y., Hannebelle, M.T.M., Nievergelt, A.P., Dhar, N., McKinney, J.D., Fantner, G.E., 2017. Division site selection linked to inherited cell surface wave troughs in mycobacteria. *Nat. Microbiol.* 2, 17094. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.94>
- Etienne, G., Malaga, W., Laval, F., Lemassu, A., Guilhot, C., Daffe, M., 2009. Identification of the Polyketide Synthase Involved in the Biosynthesis of the Surface-Exposed Lipooligosaccharides in Mycobacteria. *J. Bacteriol.* 191, 2613–2621. <https://doi.org/10.1128/JB.01235-08>
- Fay, A., Czudnochowski, N., Rock, J.M., Johnson, J.R., Krogan, N.J., Rosenberg, O., Glickman, M.S., 2019. Two Accessory Proteins Govern MmpL3 Mycolic Acid Transport in Mycobacteria. *mBio* 10, e00850-19, [/mbio/10/3/mBio.00850-19.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.00850-19). <https://doi.org/10.1128/mBio.00850-19>
- Fedrizzi, T., Meehan, C.J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Rumpianesi, F., Pecorari, M., Jousson, O., Tortoli, E., Segata, N., 2017. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Sci. Rep.* 7, 45258. <https://doi.org/10.1038/srep45258>
- Fleshner, M., Olivier, K.N., Shaw, P.A., Adjemian, J., Strollo, S., Claypool, R.J., Folio, L., Zelazny, A., Holland, S.M., Prevots, D.R., n.d. Mortality among patients with pulmonary non-tuberculous mycobacteria disease 7.
- Freinkman, E., Okuda, S., Ruiz, N., Kahne, D., 2012. Regulated Assembly of the Transenvelope Protein Complex Required for Lipopolysaccharide Export. *Biochemistry* 51, 4800–4806. <https://doi.org/10.1021/bi300592c>
- Fu, J., Zong, G., Zhang, P., Gu, Y., Cao, G., 2018. Deletion of the  $\beta$ -Propeller Protein Gene Rv1057 Reduces ESAT-6 Secretion and Intracellular Growth of Mycobacterium tuberculosis. *Curr. Microbiol.* 75, 401–409. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1394-8>
- Fu, L.M., Fu-Liu, C.S., 2002. Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis* 82, 85–90. <https://doi.org/10.1054/tube.2002.0328>
- Gaur, R.L., Ren, K., Blumenthal, A., Bhamidi, S., Gibbs, S., Jackson, M., Zare, R.N., Ehrt, S., Ernst, J.D., Banaei, N., 2014. LprG-Mediated Surface Expression of Lipoarabinomannan Is

- Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 10, e1004376. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004376>
- Gautier, N., Marin, L.M.L., Lanéelle, M.-A., Daffé, M., 1992. Structure of mycoside F, a family of trehalose-containing glycolipids of *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 98, 81–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05494.x>
- Gavalda, S., Léger, M., van der Rest, B., Stella, A., Bardou, F., Montrozier, H., Chalut, C., Burlet-Schiltz, O., Marrakchi, H., Daffé, M., Quémard, A., 2009. The Pks13/FadD32 Crosstalk for the Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 284, 19255–19264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006940>
- Geurtsen, J., Chedammi, S., Mesters, J., Cot, M., Driessen, N.N., Sambou, T., Kakutani, R., Ummels, R., Maaskant, J., Takata, H., Baba, O., Terashima, T., Bovin, N., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Nigou, J., Puzo, G., Lemassu, A., Daffé, M., Appelmelk, B.J., 2009. Identification of Mycobacterial  $\alpha$ -Glucan As a Novel Ligand for DC-SIGN: Involvement of Mycobacterial Capsular Polysaccharides in Host Immune Modulation. *J. Immunol.* 183, 5221–5231. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900768>
- Gola, S., Munder, T., Casonato, S., Manganelli, R., Vicente, M., 2015. The essential role of SepF in mycobacterial division: Essential role of SepF in mycobacterial division. *Mol. Microbiol.* 97, 560–576. <https://doi.org/10.1111/mmi.13050>
- Grundling, A., Schneewind, O., 2007. Genes Required for Glycolipid Synthesis and Lipoteichoic Acid Anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 2521–2530. <https://doi.org/10.1128/JB.01683-06>
- Grzegorzewicz, A.E., Pham, H., Gundi, V.A.K.B., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., Jones, V., Gruppo, V., Born, S.E.M., Korduláková, J., Chavadi, S.S., Morisseau, C., Lenaerts, A.J., Lee, R.E., McNeil, M.R., Jackson, M., 2012. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* 8, 334–341. <https://doi.org/10.1038/nchembio.794>
- Guerin, M.E., Korduláková, J., Alzari, P.M., Brennan, P.J., Jackson, M., 2010. Molecular Basis of Phosphatidyl-*myo*-inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 285, 33577–33583. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.168328>
- Gupta, R.S., Lo, B., 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
- Hannebelle, M.T.M., Ven, J.X.Y., Toniolo, C., Eskandarian, H.A., Vuaridel-Thurre, G., McKinney, J.D., Fantner, G.E., 2020. A biphasic growth model for cell pole elongation in mycobacteria. *Nat. Commun.* 11, 452. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14088-z>
- Harrison, J., Lloyd, G., Joe, M., Lowary, T.L., Reynolds, E., Walters-Morgan, H., Bhatt, A., Lovering, A., Besra, G.S., Alderwick, L.J., 2016. Lcp1 Is a Phosphotransferase Responsible for Ligating Arabinogalactan to Peptidoglycan in *Mycobacterium*

*tuberculosis*. mBio 7, e00972-16, /mbio/7/4/e00972-16.atom.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00972-16>

- Hatzios, S.K., Schelle, M.W., Holsclaw, C.M., Behrens, C.R., Botyanszki, Z., Lin, F.L., Carlson, B.L., Kumar, P., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., 2009. PapA3 Is an Acyltransferase Required for Polyacyltrehalose Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 284, 12745–12751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809088200>
- He, W., Soll, C.E., Chavadi, S.S., Zhang, G., Warren, J.D., Quadri, L.E.N., 2009. Cooperation between a Coenzyme A-Independent Stand-Alone Initiation Module and an Iterative Type I Polyketide Synthase during Synthesis of Mycobacterial Phenolic Glycolipids. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16744–16750. <https://doi.org/10.1021/ja904792q>
- Herbst, D.A., Townsend, C.A., Maier, T., 2018. The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Nat. Prod. Rep.* 35, 1046–1069. <https://doi.org/10.1039/C8NP00039E>
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709530105>
- Hohl, M., Remm, S., Eskandarian, H.A., Dal Molin, M., Arnold, F.M., Hürlimann, L.M., Krügel, A., Fantner, G.E., Sander, P., Seeger, M.A., 2019. Increased drug permeability of a stiffened mycobacterial outer membrane in cells lacking MFS transporter Rv1410 and lipoprotein LprG. *Mol. Microbiol.* 111, 1263–1282. <https://doi.org/10.1111/mmi.14220>
- Howard, S.T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., Lyons, C.R., Byrd, T.F., 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* 152, 1581–1590. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28625-0>
- Hughes, G.W., Hall, S.C.L., Laxton, C.S., Sridhar, P., Mahadi, A.H., Hatton, C., Piggot, T.J., Wotherspoon, P.J., Leney, A.C., Ward, D.G., Jamshad, M., Spana, V., Cadby, I.T., Harding, C., Isom, G.L., Bryant, J.A., Parr, R.J., Yakub, Y., Jeeves, M., Huber, D., Henderson, I.R., Clifton, L.A., Lovering, A.L., Knowles, T.J., 2019. Evidence for phospholipid export from the bacterial inner membrane by the Mla ABC transport system. *Nat. Microbiol.* 4, 1692–1705. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0481-y>
- Hunter, S.W., Murphy, R.C., Clay, K., Goren, M.B., Brennan, P.J., 1983. Trehalose-containing lipooligosaccharides. A new class of species-specific antigens from *Mycobacterium*. *J. Biol. Chem.* 258, 10481–10487.
- Indrigo, J., Hunter, R.L., Actor, J.K., 2003. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* 149, 2049–2059. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26226-0>

- Jani, C., Eoh, H., Lee, J., Hamasha, K., Sahana, M., Han, J.-S., Nyayapathy, S., Lee, J.-Y., Suh, J.-W., Lee, S., Rehse, S.J., Crick, D.C., Kang, C.-M., 2010. Regulation of Polar Peptidoglycan Biosynthesis by Wag31 Phosphorylation in Mycobacteria. *BMC Microbiol.* 10, 327. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-327>
- Jankute, M., Cox, J.A.G., Harrison, J., Besra, G.S., 2015. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
- Joyce, G., Williams, K.J., Robb, M., Noens, E., Tizzano, B., Shahrezaei, V., Robertson, B.D., 2012. Cell Division Site Placement and Asymmetric Growth in Mycobacteria. *PLoS ONE* 7, e44582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044582>
- Källenius, G., Correia-Neves, M., Buteme, H., Hamasur, B., Svenson, S.B., 2016. Lipoarabinomannan, and its related glycolipids, induce divergent and opposing immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* depending on structural diversity and experimental variations. *Tuberculosis* 96, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.09.005>
- Kalscheuer, R., Palacios, A., Anso, I., Cifuentes, J., Anguita, J., Jacobs, W.R., Guerin, M.E., Prados-Rosales, R., 2019. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochem. J.* 476, 1995–2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190324>
- Kamischke, C., Fan, J., Bergeron, J., Kulasekara, H.D., Dalebroux, Z.D., Burrell, A., Kollman, J.M., Miller, S.I., 2019. The *Acinetobacter baumannii* Mla system and glycerophospholipid transport to the outer membrane. *eLife* 8, e40171. <https://doi.org/10.7554/eLife.40171>
- Kang, C.-M., Nyayapathy, S., Lee, J.-Y., Suh, J.-W., Husson, R.N., 2008. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 154, 725–735. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014076-0>
- Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R.M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., Heinz, N., Bui, N.K., Hoyland, C.N., Ogasawara, N., Lewis, R.J., Vollmer, W., Daniel, R.A., Errington, J., 2011. A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins: Bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J.* 30, 4931–4941. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.358>
- Kieser, K.J., Boutte, C.C., Kester, J.C., Baer, C.E., Barczak, A.K., Meniche, X., Chao, M.C., Rego, E.H., Sasseti, C.M., Fortune, S.M., Rubin, E.J., 2015. Phosphorylation of the Peptidoglycan Synthase PonA1 Governs the Rate of Polar Elongation in Mycobacteria. *PLOS Pathog.* 11, e1005010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005010>
- Kieser, K.J., Rubin, E.J., 2014. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 550–562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3299>
- Kim, H., Kim, S.-H., Shim, T.-S., Kim, M., Bai, G.-H., Park, Y.-G., Lee, S.-H., Chae, G.-T., Cha, C.-Y., Kook, Y.-H., Kim, B.-J., 2005. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis

- of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1649–1656. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63553-0>
- Koh, W.-J., 2020. Nontuberculous Mycobacteria—Overview. *Microbiol. Spectr.* 7. <https://doi.org/10.1128>
- Korduláková, J., Gilleron, M., Mikušová, K., Puzo, G., Brennan, P.J., Gicquel, B., Jackson, M., 2002. Definition of the First Mannosylation Step in Phosphatidylinositol Mannoside Synthesis: PimA is essential for growth of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 277, 31335–31344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204060200>
- Kremer, L., De Chastellier, C., Dobson, G., Gibson, K.J.C., Bifani, P., Balor, S., Gorvel, J.-P., Locht, C., Minnikin, D.E., Besra, G.S., 2005. Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycolyl-diacylglycerol: Characterization of a mycobacterial monomeromycolyl-diacylglycerol. *Mol. Microbiol.* 57, 1113–1126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04717.x>
- Kumar, P., Schelle, M.W., Jain, M., Lin, F.L., Petzold, C.J., Leavell, M.D., Leary, J.A., Cox, J.S., Bertozzi, C.R., 2007. PapA1 and PapA2 are acyltransferases essential for the biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis virulence factor Sulfolipid-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11221–11226. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611649104>
- Kuru, E., Hughes, H.V., Brown, P.J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., de Pedro, M.A., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M.S., 2012. In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D -Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 12519–12523. <https://doi.org/10.1002/anie.201206749>
- Layre, E., Cala-De Paepe, D., Larrouy-Maumus, G., Vaubourgeix, J., Mundayoor, S., Lindner, B., Puzo, G., Gilleron, M., 2011. Deciphering sulfoglycolipids of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Lipid Res.* 52, 1098–1110. <https://doi.org/10.1194/jlr.M013482>
- Lazarevic, V., Karamata, D., 1995. The tagGH operon of *Bacillus subtilis* 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichoic acids. *Mol. Microbiol.* 16, 345–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02306.x>
- Lee, K.-S., Dubey, V.S., Kolattukudy, P.E., Song, C.-H., Shin, A.-R., Jung, S.-B., Yang, C.-S., Kim, S.-Y., Jo, E.-K., Park, J.-K., Kim, H.-J., 2007. Diacyltrehalose of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits lipopolysaccharide- and mycobacteria-induced proinflammatory cytokine production in human monocytic cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 267, 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00553.x>
- Lewenza, S., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., 2006. Direct Visualization of Red Fluorescent Lipoproteins Indicates Conservation of the Membrane Sorting Rules in the Family Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 188, 3516–3524. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3516-3524.2006>
- Li, G., He, C., Bu, P., Bi, H., Pan, S., Sun, R., Zhao, X.S., 2018. Single-Molecule Detection Reveals Different Roles of Skp and SurA as Chaperones. *ACS Chem. Biol.* 13, 1082–1089. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00097>

- Li, W., Upadhyay, A., Fontes, F.L., North, E.J., Wang, Y., Crans, D.C., Grzegorzewicz, A.E., Jones, V., Franzblau, S.G., Lee, R.E., Crick, D.C., Jackson, M., 2014. Novel Insights into the Mechanism of Inhibition of MmpL3, a Target of Multiple Pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6413–6423. <https://doi.org/10.1128/AAC.03229-14>
- Li, W., Yazidi, A., Pandya, A.N., Hegde, P., Tong, W., Calado Nogueira de Moura, V., North, E.J., Sygusch, J., Jackson, M., 2018. MmpL3 as a Target for the Treatment of Drug-Resistant Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Front. Microbiol.* 9, 1547. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01547>
- Llorens-Fons, M., Pérez-Trujillo, M., Julián, E., Brambilla, C., Alcaide, F., Byrd, T.F., Luquin, M., 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. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01402>
- Llobès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., Journet, L., 2001. The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res. Microbiol.* 152, 523–529. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01226-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01226-8)
- Locher, K.P., 2016. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 487–493. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3216>
- Logsdon, M.M., Aldridge, B.B., 2018. Stable Regulation of Cell Cycle Events in Mycobacteria: Insights From Inherently Heterogeneous Bacterial Populations. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00514>
- Lynett, J., Stokes, R.W., 2007. Selection of transposon mutants of *Mycobacterium tuberculosis* with increased macrophage infectivity identifies fadD23 to be involved in sulfolipid production and association with macrophages. *Microbiology* 153, 3133–3140. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007864-0>
- Mainardi, J.-L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Brouard, J.-P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L., Arthur, M., 2005. A Novel Peptidoglycan Cross-linking Enzyme for a  $\beta$ -Lactam-resistant Transpeptidation Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 38146–38152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507384200>
- Malinverni, J.C., Silhavy, T.J., 2009. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8009–8014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903229106>
- Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A., Daffé, M., 2014. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem. Biol.* 21, 67–85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>
- Martinot, A.J., Farrow, M., Bai, L., Layre, E., Cheng, T.-Y., Tsai, J.H., Iqbal, J., Annand, J.W., Sullivan, Z.A., Hussain, M.M., Sacchetti, J., Moody, D.B., Seeliger, J.C., Rubin, E.J., 2016. Mycobacterial Metabolic Syndrome: LprG and Rv1410 Regulate Triacylglyceride

- Levels, Growth Rate and Virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathog.* 12, e1005351. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005351>
- Maurya, R.K., Bharti, S., Krishnan, M.Y., 2019. Triacylglycerols: Fuelling the Hibernating *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 450. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00450>
- McNeil, M., DaffeSa, M., n.d. Location of the Mycolyl Ester Substituents in the Cell Walls of *Mycobacteria* 7.
- Melly, G., Purdy, G., 2019. MmpL Proteins in Physiology and Pathogenesis of *M. tuberculosis*. *Microorganisms* 7, 70. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030070>
- Melly, G.C., Stokas, H., Dunaj, J.L., Hsu, F.F., Rajavel, M., Su, C.-C., Yu, E.W., Purdy, G.E., 2019. Structural and functional evidence that lipoprotein LpqN supports cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 294, 15711–15723. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008781>
- Melzer, E.S., Sein, C.E., Chambers, J.J., Sloan Siegrist, M., 2018. DivIVA concentrates mycobacterial cell envelope assembly for initiation and stabilization of polar growth. *Cytoskeleton*. <https://doi.org/10.1002/cm.21490>
- Meniche, X., Labarre, C., de Sousa-d'Auria, C., Huc, E., Laval, F., Tropis, M., Bayan, N., Portevin, D., Guilhot, C., Daffé, M., Houssin, C., 2009. Identification of a Stress-Induced Factor of *Corynebacterineae* That Is Involved in the Regulation of the Outer Membrane Lipid Composition. *J. Bacteriol.* 191, 7323–7332. <https://doi.org/10.1128/JB.01042-09>
- Meniche, X., Otten, R., Siegrist, M.S., Baer, C.E., Murphy, K.C., Bertozzi, C.R., Sasseti, C.M., 2014. Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3243–E3251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402158111>
- Mi, W., Li, Y., Yoon, S.H., Ernst, R.K., Walz, T., Liao, M., 2017. Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature* 549, 233–237. <https://doi.org/10.1038/nature23649>
- Miller, S.I., Salama, N.R., 2018. The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLOS Biol.* 16, e2004935. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004935>
- Minnikin, D.E., Brennan, P.J., 2020. Lipids of Clinically Significant *Mycobacteria*, in: Goldfine, H. (Ed.), *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7\\_7-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72473-7_7-1)
- Minnikin, D.E., Dobson, G., Sesardic, D., Ridell, M., 1985. Mycolipenates and Mycolipanulates of Trehalose from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 131, 1369–1374. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-6-1369>

- Morita, Y.S., Patterson, J.H., Billman-Jacobe, H., McCONVILLE, M.J., 2004. Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. *Biochem. J.* 378, 589–597. <https://doi.org/10.1042/bj20031372>
- Morita, Y.S., Sena, C.B.C., Waller, R.F., Kurokawa, K., Sernee, M.F., Nakatani, F., Haites, R.E., Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Maeda, Y., Kinoshita, T., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604214200>
- Moyes, R.B., Reynolds, J., Breakwell, D.P., 2009. Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Curr. Protoc. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- Mukherjee, R., Chatterji, D., 2012. Glycopeptidolipids: Immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope. *IUBMB Life* 64, 215–225. <https://doi.org/10.1002/iub.602>
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Yamaguchi, A., 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB 419, 7.
- Narita, S., Tokuda, H., 2017. Bacterial lipoproteins; biogenesis, sorting and quality control. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 1414–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.009>
- Nessar, R., Cambau, E., Reytrat, J.M., Murray, A., Gicquel, B., 2012. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 810–818. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr578>
- Nessar, R., Reytrat, J.-M., Davidson, L.B., 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046557-0>
- Neyrolles, O., Guilhot, C., 2011. Recent advances in deciphering the contribution of Mycobacterium tuberculosis lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* 91, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.01.002>
- Nikaido, H., 2018. RND transporters in the living world. *Res. Microbiol.* 169, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.001>
- Okuda, S., Sherman, D.J., Silhavy, T.J., Ruiz, N., Kahne, D., 2016. Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 337–345. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.25>
- Okuda, S., Tokuda, H., 2011. Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 239–259. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102859>
- Olsen, G.J., Woese, C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7, 113–123. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.8422957>

- Onwueme, K.C., Ferreras, J.A., Buglino, J., Lima, C.D., Quadri, L.E.N., 2004. Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: Proof of principle with *Mycobacterium tuberculosis* PapA5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4608–4613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306928101>
- Orgeur, M., Brosch, R., 2018. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Curr. Opin. Microbiol.* 41, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.021>
- Owens, T.W., Taylor, R.J., Pahil, K.S., Bertani, B.R., Ruiz, N., Kruse, A.C., Kahne, D., 2019. Structural basis of unidirectional export of lipopolysaccharide to the cell surface. *Nature* 567, 550–553. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1039-0>
- Pacheco, S.A., Hsu, F.-F., Powers, K.M., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473371>
- Parker, S.K., Barkley, R.M., Rino, J.G., Vasil, M.L., 2009. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3802c Encodes a Phospholipase/Thioesterase and Is Inhibited by the Antimycobacterial Agent Tetrahydrolipstatin. *PLoS ONE* 4, e4281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004281>
- Parsons, J.B., Rock, C.O., 2013. Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* 52, 249–276. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
- Passemar, C., Arbués, A., Malaga, W., Mercier, I., Moreau, F., Lepourry, L., Neyrolles, O., Guilhot, C., Astarie-Dequeker, C., 2014. Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions: Functional overlap between mycobacteria envelope lipids. *Cell. Microbiol.* 16, 195–213. <https://doi.org/10.1111/cmi.12214>
- Pavelka Jr., M.S., Mahapatra, S., Crick, D.C., 2014. Genetics of Peptidoglycan Biosynthesis. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0034-2013>
- Pawełczyk, J., Kremer, L., 2014. The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0003-2013>
- Percy, M.G., Gründling, A., 2014. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-112949>
- Petiti, M., Serrano, B., Faure, L., Lloubes, R., Mignot, T., Duché, D., 2019. Tol Energy-Driven Localization of Pal and Anchoring to the Peptidoglycan Promote Outer-Membrane Constriction. *J. Mol. Biol.* 431, 3275–3288. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.039>
- Plocinski, P., Arora, N., Sarva, K., Blaszczyk, E., Qin, H., Das, N., Plocinska, R., Ziolkiewicz, M., Dziadek, J., Kiran, M., Gorla, P., Cross, T.A., Madiraju, M., Rajagopalan, M., 2012. *Mycobacterium tuberculosis* CwsA Interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA

- Complex Is Involved in Peptidoglycan Synthesis and Cell Shape Determination. *J. Bacteriol.* 194, 6398–6409. <https://doi.org/10.1128/JB.01005-12>
- Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffe, M., Guilhot, C., 2004. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 314–319. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305439101>
- Quadri, L.E.N., 2014. Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 179–211. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.896859>
- Rainczuk, A.K., Klatt, S., Yamaryo-Botté, Y., Brammananth, R., McConville, M.J., Coppel, R.L., Crellin, P.K., 2020. MtrP, a putative methyltransferase in Corynebacteria, is required for optimal membrane transport of trehalose mycolates. *J. Biol. Chem.* 295, 6108–6119. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011688>
- Rainwater, D.L., Kolattukudy, P.E., 1985. Fatty acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* Bacillus Calmette-Guérin. Purification and characterization of a novel fatty acid synthase, mycocerosic acid synthase, which elongates n-fatty acyl-CoA with methylmalonyl-CoA. *J. Biol. Chem.* 260, 616–623.
- Raymond, J.B., Mahapatra, S., Crick, D.C., Pavelka, M.S., 2005. Identification of the *namH* Gene, Encoding the Hydroxylase Responsible for the *N*-Glycolylation of the Mycobacterial Peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 280, 326–333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411006200>
- Recht, J., Martínez, A., Torello, S., Kolter, R., 2000. Genetic Analysis of Sliding Motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 182, 4348–4351. <https://doi.org/10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000>
- Rego, E.H., Audette, R.E., Rubin, E.J., 2017. Deletion of a mycobacterial divisome factor collapses single-cell phenotypic heterogeneity. *Nature* 546, 153–157. <https://doi.org/10.1038/nature22361>
- Ren, H., Dover, L.G., Islam, S.T., Alexander, D.C., Chen, J.M., Besra, G.S., Liu, J., 2007. Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Mol. Microbiol.* 63, 1345–1359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05603.x>
- Ricci, D.P., Silhavy, T.J., 2019. Outer Membrane Protein Insertion by the  $\beta$ -barrel Assembly Machine. *EcoSal Plus* 8. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0035-2018>
- Rigel, N.W., Schwalm, J., Ricci, D.P., Silhavy, T.J., 2012. BamE Modulates the *Escherichia coli* Beta-Barrel Assembly Machine Component BamA. *J. Bacteriol.* 194, 1002–1008. <https://doi.org/10.1128/JB.06426-11>

- Rodriguez-Rivera, F.P., Zhou, X., Theriot, J.A., Bertozzi, C.R., 2018. Acute Modulation of Mycobacterial Cell Envelope Biogenesis by Front-Line Tuberculosis Drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 5267–5272. <https://doi.org/10.1002/anie.201712020>
- Rodriguez-Rivera, F.P., Zhou, X., Theriot, J.A., Bertozzi, C.R., 2017. Visualization of mycobacterial membrane dynamics in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 3488–3495. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b12541>
- Rohde, M., 2019. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall 21.
- Rombouts, Y., Alibaud, L., Carrère-Kremer, S., Maes, E., Tokarski, C., Ellass, E., Kremer, L., Guérardel, Y., 2011. Fatty Acyl Chains of *Mycobacterium marinum* Lipooligosaccharides: structure, localization and acylation by papa4 (mmar\_2343) protein. *J. Biol. Chem.* 286, 33678–33688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.273920>
- Rombouts, Y., Brust, B., Ojha, A.K., Maes, E., Coddeville, B., Ellass-Rochard, E., Kremer, L., Guérardel, Y., 2012. Exposure of Mycobacteria to Cell Wall-inhibitory Drugs Decreases Production of Arabinoglycerolipid Related to Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan Metabolism. *J. Biol. Chem.* 287, 11060–11069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327387>
- Ronning, D.R., Klabunde, T., Besra, G.S., Vissa, V.D., Belisle, J.T., Sacchettini, J.C., 2000. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nat. Struct. Biol.* 7, 6.
- Ronning, D.R., Vissa, V., Besra, G.S., Belisle, J.T., Sacchettini, J.C., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85A and 85C Structures Confirm Binding Orientation and Conserved Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* 279, 36771–36777. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400811200>
- Rousseau, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.-C., Kolattukudy, P.E., Gicquel, B., Jackson, M., 2003. Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. *Cell. Microbiol.* 5, 405–415. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00289.x>
- Rowlett, V.W., Margolin, W., 2015. The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00478>
- Runyon, E.H., 1959. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Med. Clin. North Am.* 43, 273–290. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1)
- Ryu, Y.J., Koh, W.-J., Daley, C.L., 2016. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberc. Respir. Dis.* 79, 74. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.74>

- Saavedra, R., Segura, E., Leyva, R., Esparza, L.A., Lopez-Marin, L.M., 2001. Mycobacterial Di-O-Acyl-Trehalose Inhibits Mitogen- and Antigen-Induced Proliferation of Murine T Cells In Vitro. *Clin. Vaccine Immunol.* 8, 1081–1088. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1-91-1088.2001>
- Salipante, S.J., Hall, B.G., 2011. Towards the molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Strategies, successes, and shortcomings. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1505–1513. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.003>
- Samsudin, F., Ortiz-Suarez, M.L., Piggot, T.J., Bond, P.J., Khalid, S., 2016. OmpA: A Flexible Clamp for Bacterial Cell Wall Attachment. *Structure* 24, 2227–2235. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.10.009>
- Sani, M., Houben, E.N.G., Geurtsen, J., Pierson, J., de Punder, K., van Zon, M., Wever, B., Piersma, S.R., Jiménez, C.R., Daffé, M., Appelmelk, B.J., Bitter, W., van der Wel, N., Peters, P.J., 2010. Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins. *PLoS Pathog.* 6, e1000794. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000794>
- Santi, I., Dhar, N., Bousbaine, D., Wakamoto, Y., McKinney, J.D., 2013. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria. *Nat. Commun.* 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3470>
- Schleifer, K.H., 2009. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.09.002>
- Schorey, J.S., Sweet, L., 2008. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* 18, 832–841. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn076>
- Seeliger, J.C., Holsclaw, C.M., Schelle, M.W., Botyanszki, Z., Gilmore, S.A., Tully, S.E., Niederweis, M., Cravatt, B.F., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., 2012. Elucidation and Chemical Modulation of Sulfolipid-1 Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 287, 7990–8000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315473>
- Sennhauser, G., Bukowska, M.A., Briand, C., Grütter, M.G., 2009. Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 389, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.001>
- Senzani, S., Li, D., Bhaskar, A., Ealand, C., Chang, J., Rimal, B., Liu, C., Joon Kim, S., Dhar, N., Kana, B., 2017. An Amidase\_3 domain-containing N-acetylmuramyl-L-alanine amidase is required for mycobacterial cell division. *Sci. Rep.* 7, 1140. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01184-7>
- Shi, H., Bratton, B.P., Gitai, Z., Huang, K.C., 2018. How to Build a Bacterial Cell: MreB as the Foreman of *E. coli* Construction. *Cell* 172, 1294–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.050>

- Shrivastava, R., Chng, S.-S., 2019. Lipid trafficking across the Gram-negative cell envelope. *J. Biol. Chem.* 294, 14175–14184. <https://doi.org/10.1074/jbc.AW119.008139>
- Shrivastava, R., Jiang, X., Chng, S.-S., 2017. Outer membrane lipid homeostasis via retrograde phospholipid transport in *Escherichia coli*: A physiological function for the Tol-Pal complex. *Mol. Microbiol.* 106, 395–408. <https://doi.org/10.1111/mmi.13772>
- Siegrist, M.S., Swarts, B.M., Fox, D.M., Lim, S.A., Bertozzi, C.R., 2015. Illumination of growth, division and secretion by metabolic labeling of the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 184–202. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu012>
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000414–a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Siméone, R., Léger, M., Constant, P., Malaga, W., Marrakchi, H., Daffé, M., Guilhot, C., Chalut, C., 2010. Delineation of the roles of FadD22, FadD26 and FadD29 in the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates and related compounds in *Mycobacterium tuberculosis*: Phthiocerol dimycocerosates in *M. tuberculosis*. *FEBS J.* 277, 2715–2725. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07688.x>
- Simpson, B.W., Trent, M.S., 2019. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 403–416. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>
- Sinsimer, D., Huet, G., Manca, C., Tsenova, L., Koo, M.-S., Kurepina, N., Kana, B., Mathema, B., Marras, S.A.E., Kreiswirth, B.N., Guilhot, C., Kaplan, G., 2008. The Phenolic Glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* Differentially Modulates the Early Host Cytokine Response but Does Not in Itself Confer Hypervirulence. *Infect. Immun.* 76, 3027–3036. <https://doi.org/10.1128/IAI.01663-07>
- Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H., Kolattukudy, P.E., 2001. The *Mycobacterium tuberculosis pks2* Gene Encodes the Synthase for the Hepta- and Octamethyl-branched Fatty Acids Required for Sulfolipid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 16833–16839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011468200>
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D., Silhavy, T.J., 2007. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Amp Dev.* 21, 2473–2484. <https://doi.org/10.1101/gad.1581007>
- Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T., Jr, W.R.J., 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4, 1911–1919. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x>
- Sohlenkamp, C., Geiger, O., 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 133–159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Sondén, B., Kocíncová, D., Deshayes, C., Euphrasie, D., Rhayat, L., Laval, F., Frehel, C., Daffé, M., Etienne, G., Reytrat, J.-M., 2005. Gap, a mycobacterial specific integral membrane

- protein, is required for glycolipid transport to the cell surface: Glycolipid transport in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 58, 426–440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04847.x>
- Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs Jr, W.R., Bloom, B.R., 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351.
- Su, C.-C., Klenotic, P.A., Bolla, J.R., Purdy, G.E., Robinson, C.V., Yu, E.W., 2019. MmpL3 is a lipid transporter that binds trehalose monomycolate and phosphatidylethanolamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 11241–11246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901346116>
- Sulzenbacher, G., Canaan, S., Bordat, Y., Neyrolles, O., Stadthagen, G., Roig-Zamboni, V., Rauzier, J., Maurin, D., Laval, F., Daffé, M., Cambillau, C., Gicquel, B., Bourne, Y., Jackson, M., 2006. LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 25, 1436–1444. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601048>
- Swarts, B.M., Holsclaw, C.M., Jewett, J.C., Alber, M., Fox, D.M., Siegrist, M.S., Leary, J.A., Kalscheuer, R., Bertozzi, C.R., 2012. Probing the Mycobacterial Trehalome with Bioorthogonal Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 16123–16126. <https://doi.org/10.1021/ja3062419>
- Taniguchi, N., Matsuyama, S., Tokuda, H., 2005. Mechanisms Underlying Energy-independent Transfer of Lipoproteins from LolA to LolB, Which Have Similar Unclosed  $\beta$ -Barrel Structures. *J. Biol. Chem.* 280, 34481–34488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507388200>
- Timm, J., Perilli, M.G., Duez, C., Trias, J., Orefici, G., Fattorini, L., Amicosante, G., Oratore, A., Joris, B., Frère, J.M., Pugsley, A.P., Gicquel, B., 1994. Transcription and expression analysis, using *lacZ* and *phoA* gene fusions, of *Mycobacterium fortuitum*  $\beta$ -lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level  $\beta$ -lactamase producer. *Mol. Microbiol.* 12, 491–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01037.x>
- Torrelles, J.B., Schlesinger, L.S., 2010. Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis* 90, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.02.003>
- Touchette, M.H., Holsclaw, C.M., Previti, M.L., Solomon, V.C., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., Seeliger, J.C., 2015. The *rv1184c* Locus Encodes Chp2, an Acyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis* Polyacyltrehalose Lipid Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 197, 201–210. <https://doi.org/10.1128/JB.02015-14>
- Touchette, M.H., Seeliger, J.C., 2017. Transport of outer membrane lipids in mycobacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 1340–1354. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.01.005>
- Touchette, M.H., Van Vlack, E.R., Bai, L., Kim, J., Coggnetta, A.B., Previti, M.L., Backus, K.M., Martin, D.W., Cravatt, B.F., Seeliger, J.C., 2017. A Screen for Protein–Protein

- Interactions in Live Mycobacteria Reveals a Functional Link between the Virulence-Associated Lipid Transporter LprG and the Mycolyltransferase Antigen 85A. *ACS Infect. Dis.* 3, 336–348. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00179>
- Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., Gokhale, R.S., 2004. Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* 428, 441–445. <https://doi.org/10.1038/nature02384>
- Tsenova, L., Ellison, E., Harbacheuski, R., Moreira, A.L., Kurepina, N., Reed, M.B., Mathema, B., Barry III, C.E., Kaplan, G., 2005. Virulence of Selected *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in the Rabbit Model of Meningitis Is Dependent on Phenolic Glycolipid Produced by the Bacilli. *J. Infect. Dis.* 192, 98–106. <https://doi.org/10.1086/430614>
- Ung, K.L., Alsarraf, H.M.A.B., Kremer, L., Blaise, M., 2019. The crystal structure of the mycobacterial trehalose monomycolate transport factor A, TtfA, reveals an atypical fold. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* prot.25863. <https://doi.org/10.1002/prot.25863>
- Vadrevu, I.S., Lofton, H., Sarva, K., Blasczyk, E., Plocinska, R., Chinnaswamy, J., Madiraju, M., Rajagopalan, M., 2011. ChiZ levels modulate cell division process in mycobacteria. *Tuberculosis* 91, S128–S135. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.10.022>
- Vassen, V., Valotteau, C., Feuillie, C., Formosa-Dague, C., Dufrêne, Y.F., De Bolle, X., 2019. Localized incorporation of outer membrane components in the pathogen *Brucella abortus*. *EMBO J.* 38. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100323>
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T.J., Collet, J.-F., 2009. Characterization of the role of the Escherichia coli periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *PROTEOMICS* 9, 2432–2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800794>
- Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., Kremer, L., 2017. The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments: MmpL structure and diversity in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 104, 889–904. <https://doi.org/10.1111/mmi.13675>
- Villeneuve, M., Kawai, M., Kanashima, H., Watanabe, M., Minnikin, D.E., Nakahara, H., 2005. Temperature dependence of the Langmuir monolayer packing of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1715, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.07.005>
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., McKinney, J.D., 2013. Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed Mycobacteria. *Science* 339, 91–95. <https://doi.org/10.1126/science.1229858>
- Walton, E.M., Cronan, M.R., Cambier, C.J., Rossi, A., Marass, M., Foglia, M.D., Brewer, W.J., Poss, K.D., Stainier, D.Y.R., Bertozzi, C.R., Tobin, D.M., 2018. Cyclopropane

- Modification of Trehalose Dimycolate Drives Granuloma Angiogenesis and Mycobacterial Growth through Vegf Signaling. *Cell Host Microbe* 24, 514-525.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.004>
- Webb, C.T., Selkrig, J., Perry, A.J., Noinaj, N., Buchanan, S.K., Lithgow, T., 2012. Dynamic Association of BAM Complex Modules Includes Surface Exposure of the Lipoprotein BamC. *J. Mol. Biol.* 422, 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.05.035>
- Wells, R.M., Jones, C.M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K.S., Sun, P., Wu, F., Tian, C., Niederweis, M., 2013. Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 9, e1003120. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003120>
- Wheat, W.H., Dhouib, R., Angala, S.K., Larrouy-Maumus, G., Dobos, K., Nigou, J., Spencer, J.S., Jackson, M., 2015. The presence of a galactosamine substituent on the arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* abrogates full maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells and increases secretion of IL-10. *Tuberculosis* 95, 476–489. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.04.002>
- Williams, J.T., Haiderer, E.R., Coulson, G.B., Conner, K.N., Ellsworth, E., Chen, C., Alvarez-Cabrera, N., Li, W., Jackson, M., Dick, T., Abramovitch, R.B., 2019. Identification of New MmpL3 Inhibitors by Untargeted and Targeted Mutant Screens Defines MmpL3 Domains with Differential Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, 18.
- Willis, L.M., Whitfield, C., 2013. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr. Res.* 378, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.007>
- World Health Organization, 2019. Global tuberculosis report 2019. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization, 2018. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy.
- Wu, K.J., Zhang, J., Baranowski, C., Leung, V., Rego, E.H., Morita, Y.S., Rubin, E.J., Boutte, C.C., 2018. Characterization of Conserved and Novel Septal Factors in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00649-17>
- Wu, L.J., Errington, J., 2012. Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 8–12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2671>
- Wu, M.-L., Aziz, D.B., Dartois, V., Dick, T., 2018. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discov. Today* 23, 1502–1519. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.04.001>
- Xu, W., Zhang, L., Mai, J., Peng, R., Yang, E., Peng, C., Wang, H., 2014. The Wag31 protein interacts with AccA3 and coordinates cell wall lipid permeability and lipophilic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448, 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.116>

- Xu, Z., Meshcheryakov, V.A., Poce, G., Chng, S.-S., 2017. MmpL3 is the flippase for mycolic acids in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 7993–7998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700062114>
- Yamaguchi, A., Nakashima, R., Sakurai, K., 2015. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00327>
- Yamaryo-Botte, Y., Rainczuk, A.K., Lea-Smith, D.J., Brammananth, R., van der Peet, P.L., Meikle, P., Ralton, J.E., Rupasinghe, T.W.T., Williams, S.J., Coppel, R.L., Crellin, P.K., McConville, M.J., 2015. Acetylation of Trehalose Mycolates Is Required for Efficient MmpL-Mediated Membrane Transport in *Corynebacterineae*. *ACS Chem. Biol.* 10, 734–746. <https://doi.org/10.1021/cb5007689>
- Yang, L., Lu, S., Belardinelli, J., Huc-Claustre, E., Jones, V., Jackson, M., Zgurskaya, H.I., 2014. RND transporters protect *Corynebacterium glutamicum* from antibiotics by assembling the outer membrane. *MicrobiologyOpen* 3, 484–496. <https://doi.org/10.1002/mbo3.182>
- Yeh, Y.-C., Comolli, L.R., Downing, K.H., Shapiro, L., McAdams, H.H., 2010. The Caulobacter Tol-Pal Complex Is Essential for Outer Membrane Integrity and the Positioning of a Polar Localization Factor. *J. Bacteriol.* 192, 4847–4858. <https://doi.org/10.1128/JB.00607-10>
- Zhang, B., Li, J., Yang, Xiaolin, Wu, L., Zhang, J., Yang, Y., Zhao, Y., Zhang, L., Yang, Xiuna, Yang, Xiaobao, Cheng, X., Liu, Z., Jiang, B., Jiang, H., Guddat, L.W., Yang, H., Rao, Z., 2019. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell* 176, 636-648.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.003>
- Zhang, Y.-W., Zhu, J.-H., Wang, Z.-Q., Wu, Y., Meng, X., Zheng, X., Javid, B., 2019. HspX promotes the polar localization of mycobacterial protein aggregates. *Sci. Rep.* 9, 14571. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51132-w>
- Zhou, X., Halladin, D.K., Theriot, J.A., 2016. Fast Mechanically Driven Daughter Cell Separation Is Widespread in *Actinobacteria*. *mBio* 7, e00952-16, [/mbio/7/4/e00952-16.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.00952-16). <https://doi.org/10.1128/mBio.00952-16>
- Zhou, X., Rodriguez-Rivera, F.P., Lim, H.C., Bell, J.C., Bernhardt, T.G., Bertozzi, C.R., Theriot, J.A., 2019. Sequential assembly of the septal cell envelope prior to V snapping in *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Chem. Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0206-1>
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., Daffe, M., 2008. Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. *J. Bacteriol.* 190, 5672–5680. <https://doi.org/10.1128/JB.01919-07>
- Zuber, B., Haenni, M., Ribeiro, T., Minnig, K., Lopes, F., Moreillon, P., Dubochet, J., 2006. Granular Layer in the Periplasmic Space of Gram-Positive Bacteria and Fine Structures of *Enterococcus gallinarum* and *Streptococcus gordonii* Septa Revealed by Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections. *J. Bacteriol.* 188, 6652–6660. <https://doi.org/10.1128/JB.00391-06>

# Résumé

L'enveloppe des mycobactéries se distingue des enveloppes des bactéries Gram-négatives et Gram-positives par sa structure complexe particulièrement hydrophobe. Elle contient notamment une membrane externe appelée mycomembrane, composée d'acides gras à longues chaînes, les acides mycoliques et de lipides complexes non covalamment liés au reste de l'enveloppe. La plupart de ces molécules jouent un rôle très important dans la structuration de l'enveloppe, la formation des biofilms ou la virulence des souches pathogènes.

Les lipides de la mycomembrane sont synthétisés dans le cytoplasme. Leurs voies de biosynthèse sont largement caractérisées, contrairement aux mécanismes impliqués dans leur transport vers la surface de l'enveloppe ainsi que leur dynamique d'export au cours du cycle cellulaire. Les mycobactéries ont un mode d'élongation polaire atypique où l'ancien pôle, hérité de la cellule mère lors de la division précédente, s'allonge plus rapidement que le nouveau pôle. Quelques données suggèrent l'existence d'un couplage entre la mise en place du peptidoglycane et des acides mycoliques aux pôles des mycobactéries, mais elles restent limitées et il n'existe aucune information sur la mise en place des autres lipides. L'étude de ces mécanismes est importante pour une meilleure compréhension de la physiologie des mycobactéries.

L'objectif de cette thèse était d'étudier les mécanismes d'export des lipides de la mycomembrane, en utilisant comme modèle d'étude une famille de lipides non essentiels, les polyphléates de tréhalose (TPP), chez *Mycobacterium smegmatis*. En utilisant une combinaison d'approches génétique, biochimique et protéomique, nous avons établi que l'étape finale de synthèse des TPP, catalysée par l'acyltransférase PE, a lieu dans la paroi de *M. smegmatis*, après clivage et export de PE. Ces travaux ont permis de proposer un modèle plus détaillé de la voie de biosynthèse des TPP et de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'export de ces composés.

Dans une seconde partie, nous avons étudié la dynamique d'export des TPP dans l'enveloppe de *M. smegmatis* au cours du cycle cellulaire, en suivant la localisation du transporteur dédié au transport de ces molécules à travers la membrane plasmique (MmpL10), par microscopie de fluorescence. Les données recueillies montrent une localisation dynamique avec une accumulation préférentielle du transporteur au nouveau pôle de la bactérie. Cette localisation diffère de celle du transporteur des acides mycoliques (MmpL3), qui est principalement retrouvé à l'ancien pôle de *M. smegmatis*. Ces données soulignent des différences dans la dynamique de mise en place des acides mycoliques et des TPP au cours de la croissance des mycobactéries.