



Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type VII de *Mycobacterium abscessus* : leur rôle dans la virulence et la réponse de l'hôte

Marion Lagune

► To cite this version:

Marion Lagune. Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type VII de *Mycobacterium abscessus* : leur rôle dans la virulence et la réponse de l'hôte. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL021 . tel-03675222

HAL Id: tel-03675222

<https://theses.hal.science/tel-03675222>

Submitted on 23 May 2022

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.

Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de
type VII de *Mycobacterium abscessus* :
leur rôle dans la virulence et la réponse de l'hôte

*Proteins secreted by the type VII secretion system of
Mycobacterium abscessus: their role in virulence and host response*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Graduate School : Life Sciences and Health
Réfèrent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Infection et Inflammation**
(Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm),
sous la direction de **Jean-Louis HERRMANN**, PU-PH,
et la co-direction de **Fabienne GIRARD-MISGUICH**, MCU,

Thèse soutenue à Montigny-le-Bretonneux, le 25 mars 2022, par

Marion LAGUNE

Composition du Jury

Guy TRAN VAN NHIEU Dr, UMR7241/U1050 Collège de France	Président
Priscille BRODIN Dr, Institut Pasteur de Lille	Rapportrice & Examinatrice
Estelle MARION Dr, INSERM, Université d'Angers	Rapportrice & Examinatrice
Oana DUMITRESCU MCU-PH, UFR médecine Lyon-Sud	Examinatrice
Laleh MAJLESSI Dr, Institut Pasteur de Paris	Examinatrice
Jean-Louis HERRMANN PU-PH, INSERM U1173, UVSQ	Directeur de thèse

Titre : Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type VII de *Mycobacterium abscessus* : leur rôle dans la virulence et la réponse de l'hôte

Mots clés : Facteurs de virulence, Interaction hôte-pathogène, Système de sécrétion de type VII, Mycobactéries

Résumé : Les mycobactéries possèdent des systèmes de sécrétion de type VII (SST7) aussi nommé ESX. Récemment, notre laboratoire a démontré que le système ESX-4 de *M. abscessus* est un acteur essentiel à sa survie intracellulaire. De plus, la mutation du gène codant pour une protéine structurale de l'ESX-4 entraîne une diminution de la sécrétion de plusieurs protéines dont deux appartenant au locus *esx-4*, EsxU et EsxT. Pour ce projet, nous avons étudié le rôle des protéines EsxU et EsxT chez *M. abscessus*. Nous avons d'abord démontré la localisation de ces protéines chez *M. abscessus*. EsxU et EsxT sont associées avec la membrane bactérienne et sécrétées dans le milieu extérieur. De plus, elles forment un complexe caractéristique des protéines sécrétées par les SST7 des mycobactéries et sont capables *in vitro* d'interagir avec des membranes artificielles pour former des structures semblables à des pores. Dans les macrophages, leur absence n'influence pas le comportement intracellulaire de la souche mutée Δ *esxUT*, mais empêche la rupture de la membrane phagosome, maintenant *M. abscessus* Δ *esxUT* dans un phagosome non acidifié. Enfin, nous identifions un phénotype hypervirulent associé à Δ *esxUT*, caractérisé par une augmentation de la mortalité et de la croissance bactérienne

chez la souris et le poisson zèbre. L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'absence des deux substrats améliore la survie et la persistance de *M. abscessus* dans ces modèles animaux. Nous avons aussi voulu étudier le potentiel immunogène de ces protéines. La réponse lymphocytaire T, vis-à-vis de peptides synthétiques des protéines EsxU et EsxT n'a pas permis d'identifier d'épitopes induisant une réponse T. Ceci suggère qu'EsxU et T ne sont pas immunogènes après inoculation de *M. abscessus* par voie sous-cutanée dans le modèle souris ce qui laisse penser qu'EsxU et EsxT ne représentent pas de bons marqueurs de l'infection. Le sécrétome ainsi qu'une analyse bio-informatique basée sur la recherche de motifs de sécrétion ont permis d'identifier d'autres substrats potentiels de SST7 chez *M. abscessus*. Deux protéines avec un motif proline-glutamate (PE) et proline-glutamate-glutamate (PPE) ont des peptides qui induisent une réponse immunitaire Th1. Néanmoins des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces protéines représentent de bonnes cibles de diagnostic chez les patients et si elles sont capables de discriminer les infections à *M. abscessus* des infections causées par d'autres mycobactéries.

Title : Proteins secreted by the type VII secretion system of *Mycobacterium abscessus*: their role in virulence and host response

Keywords : Virulence factor, Host-pathogen interaction, Type VII secretion system, Mycobacteria

Abstract : Mycobacteria possess type VII secretion systems (T7SS), also known as ESX. Recently, our laboratory has demonstrated that the ESX-4 system of *M. abscessus* is an essential actor in the intracellular survival of *M. abscessus*. Furthermore, mutation of the gene coding for a structural protein of ESX-4 leads to a decrease in the secretion of several proteins, two belonging to the *esx-4* locus, EsxU and EsxT. For this project, we studied the role of EsxU and EsxT proteins in *M. abscessus*. We first demonstrated the localization of these proteins in *M. abscessus*, EsxU and EsxT are associated with the bacterial membrane and are also secreted. Furthermore, EsxU and EsxT form a complex characteristic of proteins secreted by mycobacterial T7SS. EsxU and EsxT proteins are able to interact with artificial membranes to form pore-like structures *in vitro*. In an intramacrophage context, *esxU* and *esxT* absence does not influence the intracellular behaviour of the Δ *esxUT* mutated strain, but prevents the disruption of the phagosomal membrane, keeping *M. abscessus* Δ *esxUT* in an unacidified phagosome. Finally, we identify a hypervirulent phenotype associated with Δ *esxUT* deletion characterized by increased

animal mortality and bacterial growth in mice and zebrafish. All our results suggest that the absence of both substrates improves the survival and persistence of *M. abscessus* in animals. We also wanted to study the immunogenic potential of these proteins. The T cell response to synthetic peptides of the EsxU and EsxT proteins did not identify epitopes that induce a T response. This suggests that EsxU and T are not immunogenic after subcutaneous inoculation of *M. abscessus* in the mouse model suggesting that EsxU and EsxT are not good markers of infection. The secretome and a bioinformatics analysis based on the search for secretion patterns identified other potential substrates of SST7 in *M. abscessus*. Two proteins with a proline-glutamate (PE) and proline-glutamate-glutamate (PPE) motif have peptides that induce a Th1-type immune response. However, further experiments are needed to determine whether these proteins represent good diagnostic targets in patients and whether they are able to discriminate *M. abscessus* infections from infections caused by other mycobacteria.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Dr. Estelle Marion et Dr. Priscille Brodin

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

Dr. Oana Dumitrescu, Dr. Laleh Majlessi et Dr. Guy Tran Van Nhieu

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

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

Pr. Jean-Louis Herrmann et Dr. Fabienne Girard-Misguich

Pour m'avoir fait confiance pour mener ce projet sur ces trois années de thèse enrichissantes. Elles, m'ont permis d'acquérir de nombreuses compétences aussi bien sur le plan scientifique qu'humainement, merci à vous deux d'avoir été présents à chaque étape. Merci aussi pour votre bonne humeur et votre optimisme à toute épreuve.

Aux membres de mon comité de suivi,

Pr. Jean-Luc Mainardi et Dr. Laurent Kremer,

Pour votre disponibilité et vos conseils.

À nos collaborateurs,

L'équipe IRIM de Montpellier

L'équipe du centre national de référence et de l'OMS des mycobactéries de Borstel

L'équipe de l'EMBL d'Hambourg

L'équipe de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée dirigée par Roland Brosch à l'Institut Pasteur de Paris, merci au Pr. Roland Brosch, Alexandre et Fadel.

Un merci tout particulier au Dr Laleh Majlessi, pour sa disponibilité, son aide et ses précieux conseils.

À l'équipe EPIM, aux membres passés et présents,

Audrey, Aurore, Elias, Frédéric, Hamadoun, Nicolas et Vincent, merci pour les moments partagés notamment les deux congrès à Nantes et Angers qui nous auront marqués par les diverses péripéties d'hôtels auxquelles nous avons été confrontés, on aura quand même bien rigolé.

Un merci tout particulier à Aurore Desquesnes et Vincent Le Moigne, pour leur soutien et leur aide dans ce projet.

A Justine et Gwenaël pour leur réactivité, leur gentillesse et leur efficacité.

Aux équipes ATIP avenir, IRIS, LARENNES et LGBC,

Merci à toutes les personnes du 3^{ème} étage de l'UFR Santé Simone Veil où il fait bon vivre et où on sait qu'en cas de besoin, il n'y a qu'à demander on trouvera toujours quelqu'un prêt à nous aider.

Aux teams BDT, ExRunners en reconversion et aux autres doctorants,

À Juliette, Cassie, Marion, Mélanie, Nesrine, Laila, Amel, Marie, Marc, Bibi, Adi, Popo, Gina, Katherine, Doudoune, Hendrick, Elo et Simon

Un immense merci pour la bonne ambiance qui régnait au 3^{ème} étage et pour les souvenirs partagés aussi bien au labo qu'en dehors, au BDT, aux soirées films, aux anniversaires, aux apéros, en week-end en Normandie, pendant la course (même si certaines mauvaises langues diront que j'étais toujours derrière mais c'était pour pouvoir mémoriser chaque instant passé à vos côtés).

Merci aussi à tous les doctorants du 2^{ème} avec lesquels on a pu partager des moments conviviaux durant les apéros après le journal club, j'espère qu'il perdurera.

Merci à Simon, qui au-delà de son amitié m'a beaucoup apporté scientifiquement et je suis sûre que tu seras un très bon encadrant car tu as à cœur le bien-être de tes étudiants.

À Katherine, pour ton sens de la repartie et ton humour toujours au moment inopiné et qui nous laisse sans voix.

À Elo, pour les soirées filles, sa bonne humeur, son humour, parce qu'elle ne fait jamais les choses à moitié elle ne connaît pas la demi-mesure et pour notre passion commune pour les patrouilles nocturnes.

Un merci particulier à Gina, ma colocataire de bureau de ces derniers mois, enfin si on peut encore appeler ce taudis un bureau. On a écopé de la même peine, trois ans ensemble et sans toi cette fin de thèse au coude à coude n'aurait pas eu la même saveur.

À Hamadoun, le sauveur des mouches, merci pour ton amitié et nos débats animés. La suite ne sera pas pareille sans ta présence au quotidien où je savais que je pouvais te trouver à n'importe quel moment pour discuter (ou râler mais toujours avec modération bien sûr).

A mes amis,

Pour les moments passés ensemble qui m'ont permis de sortir la tête du guidon même s'ils n'ont pas été aussi nombreux que je l'aurais souhaité.

A ma famille, les Lagune, les Foucault et à ma belle famille

Une mention spéciale pour Stéphane et Heline pour leur présence durant mes études. Je cherche encore et je continuerai de chercher.

À ma maman, merci d'avoir toujours fait de moi ta priorité quitte à faire passer mes besoins avant les tiens. C'est le moment niaiserie, mais je le pense sincèrement, j'ai la chance de pouvoir dire que j'ai la meilleure des mamans, sans toi je n'aurais pas parcouru tout ce chemin.

À Benoît, pour ton soutien sans faille et ta façon bienveillante de toujours me pousser à tirer le meilleur de moi-même, merci pour ces dix belles années, impatiente de voir ce que nous réserve la suite.

T ABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	7
INDEX DES FIGURES	9
INDEX DES TABLEAUX	11
INTRODUCTION.....	12
Chapitre I : <i>Mycobacterium abscessus</i>, une mycobactérie pathogène opportuniste	12
1. Classification et phylogénie de <i>M. abscessus</i> au sein des mycobactéries	12
2. Les infections causées par <i>M. abscessus</i>.....	18
2.1. La pathogénèse de <i>M. abscessus</i>	18
2.2. <i>M. abscessus</i> et la mucoviscidose	18
2.3. Réservoir et transmission	20
3. Les facteurs de virulence de <i>M. abscessus</i>	22
3.1. Transition S vers R.....	22
3.2. Les gènes non-mycobactériens.....	25
3.3. Les gènes mycobactériens	25
4. Diagnostic, traitement et vaccination face aux infections à <i>M. abscessus</i>	31
4.1. Le diagnostic des infections à <i>M. abscessus</i>	31
4.2. Le traitement des infections à <i>M. abscessus</i>	31
4.3. La vaccination vis-à-vis de <i>M. abscessus</i>	32
5. La réponse immunitaire face aux infections à <i>M. abscessus</i>.....	32
Chapitre II : Les systèmes de sécrétion des mycobactéries.....	34
1. Rôle des systèmes de sécrétion : traverser la paroi atypique des mycobactéries	34
2. Les systèmes de sécrétion non spécifiques des mycobactéries	36
2.1. Les systèmes SecA1 et SecA2	37
2.2. Le système Tat.....	38
3. Les systèmes ESX des mycobactéries	39
3.1. Les systèmes de sécrétion ESX chez <i>M. tuberculosis</i>	39
3.2. Les systèmes de sécrétion ESX des MNT.....	50

OBJECTIFS	65
RESULTATS.....	67
Partie I : Le rôle d'EsxU et EsxT	67
Partie II : Réponse de l'hôte vis-à-vis des substrats du système ESX.....	108
1. Introduction.....	108
2. <i>M. abscessus</i> inoculé par voie sous-cutanée (s. c.) induit une réponse de type Th1 mais n'induit pas de réponse de type Th2	108
3. Les protéines EsxU et EsxT n'induisent pas de réponse T-IFN γ	111
4. L'antigène 85-B induit une réponse T-IFN γ	113
5. Certaines PE/PPE possèdent des épitopes T.....	116
6. La sécrétion de certaines PE/PPE de <i>M. abscessus</i> fait intervenir ESX-4	120
DISCUSSION-PERSPECTIVES	123
MATÉRIELS ET MÉTHODES	136
BIBLIOGRAPHIE	140
ANNEXES	157
Touré et al., <i>Mycobacterium abscessus</i> resists the innate cytotoxic response by surviving granzyme-mediated cell lysis of infected phagocytes	157

A

BBREVIATIONS

43S : *M. abscessus* spp. *massiliense*, souche clinique

AA : Acide aminé

Ag : antigène

BCG : Bacille bilié de Calmette et Guérin

CIPS : *M. abscessus* spp. *abscessus* de morphotype S

CIPR : *M. abscessus* spp. *abscessus* de morphotype R

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

ConA : Concanavaline A

CRP : « cAMP receptor protein »

ESX : « Early antigenic secretion system »

ESCRT : « Endosomal sorting complexes required for transport »

ETZ : « electron translucent zone »

FRET : Transfert d'énergie par résonance de fluorescence

GDND : glycosyl diacylated nonadecyl diol

GPL : Glycopeptidolipides

HK : « Heat-killed »

IFN γ : interféron gamma

IGRA : « Interferon γ release antigen »

i. m. : intra-musculaire

i. v. : intra-vasculaire

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

LN : lipides liés de manière non covalente

MCL : Mycobactérie à croissance lente

MCR : Mycobactéries à croissance rapide

MmpL : Transporteur de lipide « Mycobacterial membrane protein large »

MNT : Mycobactérie non tuberculeuse

MgtC : Transporteur de magnésium

MLST : « Multilocus sequence typing »

ND : Non détecté

NET : « Neutrophil extracellular traps »

NI : Non infecté

PE : Proline-glutamate

PBS : « Phosphate buffer Saline »

PDIM : Phthiocerol dimycocerosates

PLC : Phospholipase C

PGL : glycolipides phénoliques

PPE : Proline-proline-glutamate

PPD : « Purified protein derivative »

PRR : « Pattern recognition receptor »

R : Rugueuse « Rough »

S : Lisse « Smooth »

s.c. : sous-cutanée

SNP : « Single nucleotide polymorphism »

Snt : Surnageant

SPF : « Specific pathogens free »

SST1 à SST9 : Système de sécrétion de type I à IV

SST7 : Système de sécrétion de type VII

Th1 et Th2 : Réponse Lymphocytaire T helper de type 1 et 2

TL : Lysat total

TLR-2 : « Toll-like receptor-2 »

WGS : « Whole genome sequencing »

WT : « Wild-type »

WXG : motif (Tryptophane-X-glycine) des protéines sécrétées par les ESX

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Classification des mycobactéries selon leur virulence et leur temps de croissance (Johansen et al., 2020)	13
Figure 2 : Arbre phylogénétique des mycobactéries obtenu par comparaison des génomes entiers (Tortoli et al., 2017)	15
Figure 3 : Arbre phylogénétique des mycobactéries basé sur la comparaison des protéines conservées adapté de (Gupta et al., 2018).	16
Figure 4 : Changements dans la nomenclature de <i>M. abscessus</i> depuis sa distinction en tant qu'espèce en 1992 (Lee et al., 2015)	17
Figure 5 : Aspect des colonies de <i>M. abscessus</i> de morphotype lisse (S) et rugueux (R) sur gélose (Medjahed et al., 2010).....	23
Figure 6 : Différents phénotypes cellulaires de la forme S et R de <i>M. abscessus</i> phagocytés par des macrophages d'origine humaine (Roux et al., 2016)	24
Figure 7 : Le devenir du mutant $\Delta eccB_4$ dans des macrophages d'origine murine (Laencina et al., 2018).....	27
Figure 8 : Comparaison du locus <i>esx-4</i> de <i>M. tuberculosis</i>, <i>M. marinum</i>, <i>M. avium</i>, <i>M. abscessus</i> et <i>M. smegmatis</i> (réalisé sur Gene Graphics).....	28
Figure 9 : Impact des mutations dans le gène <i>phoPR</i> retrouvées dans les souches issues des clusters sur la survie de <i>M. abscessus</i> dans les cellules, les souris et les fomites. (Bryant et al., 2021).....	30
Figure 10 : L'enveloppe cellulaire des mycobactéries adaptée de (Van Winden et al., 2019b).....	35
Figure 11 : Les différents systèmes de sécrétion retrouvés chez les bactéries à Gram négatif et chez les mycobactéries (Rapisarda et al., 2018)	36
Figure 12 : Rôle d'ESX-2 et 4 de <i>M. tuberculosis</i> dans l'échappement du phagosome (Pajuelo et al., 2021)	42
Figure 13 : Sécrétion de la toxine CpnT à la surface de <i>M. tuberculosis</i> médiée par le système de sécrétion ESX-4 (Pajuelo et al., 2021)	43
Figure 14 : La formation d'un pore par le complexe EsxEF (Tak et al., 2021)	45
Figure 15 : Schéma non exhaustif de la régulation du locus <i>espACD</i>	47
Figure 16 : Réponse IFNγ à la suite de l'inoculation du BCG, CIPR, CIPS ou PBS en s. c. dans des souris BALB/c ou C57BL/6	109

Figure 17 : Réponse IFNγ induite par les peptides synthétiques issus des protéines EsxU et EsxT après primo-infection de souris par la souche CIPS ou ΔesxUT.	112
Figure 18 : Réponse IFNγ induite par les peptides de l'Ag85B (n°99 à 163) après inoculation de la souche CIPS avec comme contrôle des souris non infectées (NI)	115
Figure 19 : Réponse IFNγ induite par les peptides de MAB_0664 et ses paralogues après inoculation de la souche CIPS avec comme contrôle des souris non infectées (NI)	117
Figure 20 : Réponse IFNγ induite par les peptides de MAB_0047 et de ses paralogues après inoculation de la souche CIPS avec comme contrôle des souris non infectées (NI)	118
Figure 21 : Comparaison de la réponse peptidique de MAB_0664 après inoculation avec la souche CIPS ou avec la souche mutée pour ce gène ΔMAB_0664.	119
Figure 22 : Réponse IFNγ des splénocytes issus de souris infectées par la souche CIPS ou la souche mutant ΔeccB₄ vis-à-vis des peptides sélectionnés du fait de leur activité et issus de deux PE/PPE MAB_0664 et MAB_0047 et de l'Ag85.	121
Figure 23 : Alignement de l'Ag 85-B de <i>M. abscessus</i> (MAB_1579), <i>M. tuberculosis</i> (Rv1886c), <i>M. ulcerans</i> (MUL_4793) et <i>M. avium</i> (MAV_5183).	128

I

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes de <i>M. abscessus</i> codants pour des protéines qui possèdent les motifs caractéristiques des substrats des ESX (Laencina, 2017) d'après Wilbert Bitter.	29
Tableau 2 : Le rôle des ESX de <i>M. tuberculosis</i> et de leurs substrats	40
Tableau 3 : Les différentes conditions testées pour identifier des épitopes T des protéines sécrétées EsxU et EsxT	113
Tableau 4 : Réponse peptidique vis-à-vis des peptides des PE/PPE testées	116

INTRODUCTION

Chapitre I : *Mycobacterium abscessus*, une mycobactérie pathogène opportuniste

1. Classification et phylogénie de *M. abscessus* au sein des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles acido-alcoolo résistants appartenant au phylum des *Actinobacteria*, i.e. bactéries dont le génome est caractérisé par un pourcentage en Guanine et Cytosine élevé (Ventura *et al.*, 2007), à l'ordre des *Actinomycetales* et au sous-ordre des *Corynebacterineae* caractérisé par leur résistance aux stress environnementaux, détergents et antibiotiques (Turenne, 2019).

Au sein des mycobactéries, on distingue *Mycobacterium leprae* ainsi que les mycobactéries tuberculeuses (le complexe *Mycobacterium tuberculosis*) des mycobactéries non tuberculeuses (MNT), aussi dites mycobactéries atypiques. Au sein de ces dernières, nous retrouvons environ 200 espèces, majoritairement saprophytes de l'environnement, (du sol et de l'eau), e.g. *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium gordonae* et *Mycobacterium terrae* (Turenne, 2019). Parmi les MNT, il existe seulement deux pathogènes stricts, *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium ulcerans* ainsi que des mycobactéries, pathogènes opportunistes, qui causent des infections chez l'Homme telles que les mycobactéries du complexe *Mycobacterium chelonae-abscessus*, du complexe *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium xenopi* (Johansen *et al.*, 2020) (**Figure 1**). Ces infections causées par ces MNT pathogènes sont désormais un enjeu de santé publique de par l'augmentation de leur prévalence et de la difficulté à les traiter en raison de leur multirésistance aux antibiotiques (Ratnatunga *et al.*, 2020). En effet, dans les pays industrialisés on remarque que la prévalence des infections liées aux MNT ne cesse d'augmenter tandis que celle de la tuberculose diminue (Brode *et al.*, 2014).

Une des premières classifications des mycobactéries fût celle établie par Ernest Runyon (Runyon, 1959). Elle découle d'observations phénotypiques qui ont permis de séparer les MNT en quatre groupes selon leur pigmentation en présence ou en absence de lumière et leur temps de croissance (Runyon, 1959) :

Groupe I : les photochromogènes, les colonies se pigmentent après exposition à la lumière ;

Groupe II : les scotochromogènes, les colonies sont toujours pigmentées ;

Groupe III : les non chromogènes, les colonies ne sont pas pigmentées ;

Groupe IV : les mycobactéries à croissance rapide.

La durée de croissance, mesurée sur milieu gélosé, distingue les mycobactéries à croissance rapide (MCR) du groupe IV dont fait partie *M. abscessus*, pour lesquelles les colonies apparaissent en moins de sept jours, des mycobactéries à croissance lente (MCL) où l'on retrouve les principales mycobactéries pathogènes strictes, pour lesquelles les colonies apparaissent après sept jours de culture (Turenne, 2019) (**Figure 1**).

Non-tuberculous mycobacteria		
Rapidly growing mycobacteria	Slowly growing mycobacteria	
<i>M. chelonae-abscessus</i> complex • <i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> • <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> • <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex <i>M. leprae</i>
<i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>	<i>M. avium</i> complex • <i>M. avium</i> • <i>M. intracellulare</i> • <i>M. chimaera</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i>	
	<i>M. terrae</i> complex <i>M. goodii</i>	

True pathogens
 Opportunistic pathogens
 Saprophytes

Figure 1 : Classification des mycobactéries selon leur virulence et leur temps de croissance (Johansen *et al.*, 2020)

Cette classification basée sur des critères phénotypiques a été confirmée par plusieurs études phylogénomiques. En effet, la comparaison de l'ARN16s, puis la comparaison de gènes conservés, ou plus récemment la comparaison de génomes entiers, ont confirmé la séparation entre les MCR et les MCL. Parmi les MCL on retrouve les mycobactéries pathogènes, *i.e.* le complexe *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. marinum* et *M. ulcerans* ainsi que des mycobactéries pathogènes opportunistes, *i.e.* le complexe *M. avium*, *Mycobacterium simiae* et *Mycobacterium kansasii*. À l'intersection des MCR et

des MCL on retrouve le complexe *M. terrae* (Mignard and Flandrois, 2008; Fedrizzi *et al.*, 2017; Tortoli *et al.*, 2017). Les MCR sont divisées en trois clades majeurs, *Mycobacterium fortuitum*, *M. smegmatis* et le complexe *M. abscessus-chelonae*. De plus, les MCR semblent être ancestrales aux MCL. En effet le complexe *M. chelonae-abscessus* est le cluster possédant le plus de similarité avec l'ancêtre commun du genre *Mycobacterium* (Fedrizzi *et al.*, 2017; Tortoli *et al.*, 2017) **(Figure 2)**.

En 2018, une étude a remis en cause la phylogénie du genre *Mycobacterium* (Gupta *et al.*, 2018). Cette étude basée sur la comparaison des protéines conservées a mis en exergue l'existence de cinq groupes monophylétiques : *Tuberculosis-Simiae*, *Terrae*, *Triviale*, *Fortuitum-Vaccae* et *Abscessus-Chelonae*. Les auteurs ont proposé la conservation du clade *Tuberculosis-Simiae*, au sein du genre *Mycobacterium*, qui comprend les mycobactéries pathogènes, et la création de quatre nouveaux genres regroupant les MNT, *i.e.* *Mycolicibacterium gen. nov.*, *Mycolicibacter gen. nov.*, *Mycolicibacillus gen. nov.* and *Mycobacteroides gen. nov.* pour les quatre clades, *Fortuitum-Vaccae*, *Terrae*, *Triviale*, et *Abscessus-Chelonae*, respectivement **(Figure 3)**. Cette nouvelle nomenclature a été validée dans le journal « International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology » (IJSEM). Le risque majeur de cette nouvelle nomenclature soulevé par la communauté scientifique était le risque d'une confusion dans le domaine clinique lors du diagnostic et du traitement des infections aux MNT (Tortoli *et al.*, 2019). Récemment, une nouvelle étude a démontré que les méthodes déjà utilisées pour définir les limites du genre, *i.e.* le pourcentage de protéines conservées, la moyenne des nucléotides identiques et l'alignement de fraction de génome, confirmaient le maintien des mycobactéries au sein d'un genre unique, le genre *Mycobacterium*, et non la subdivision en cinq clades qui correspondrait davantage à une classification en sous-genre (Meehan *et al.*, 2021).

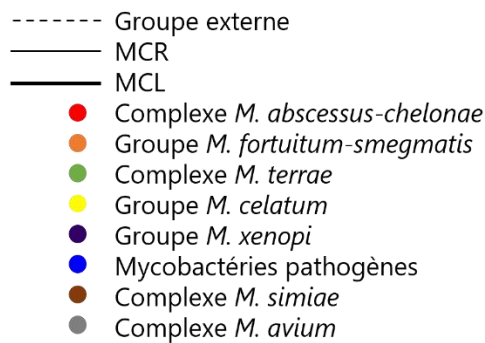


Figure 2 : Arbre phylogénétique des mycobactéries obtenu par comparaison des génomes entiers (Tortoli *et al.*, 2017)

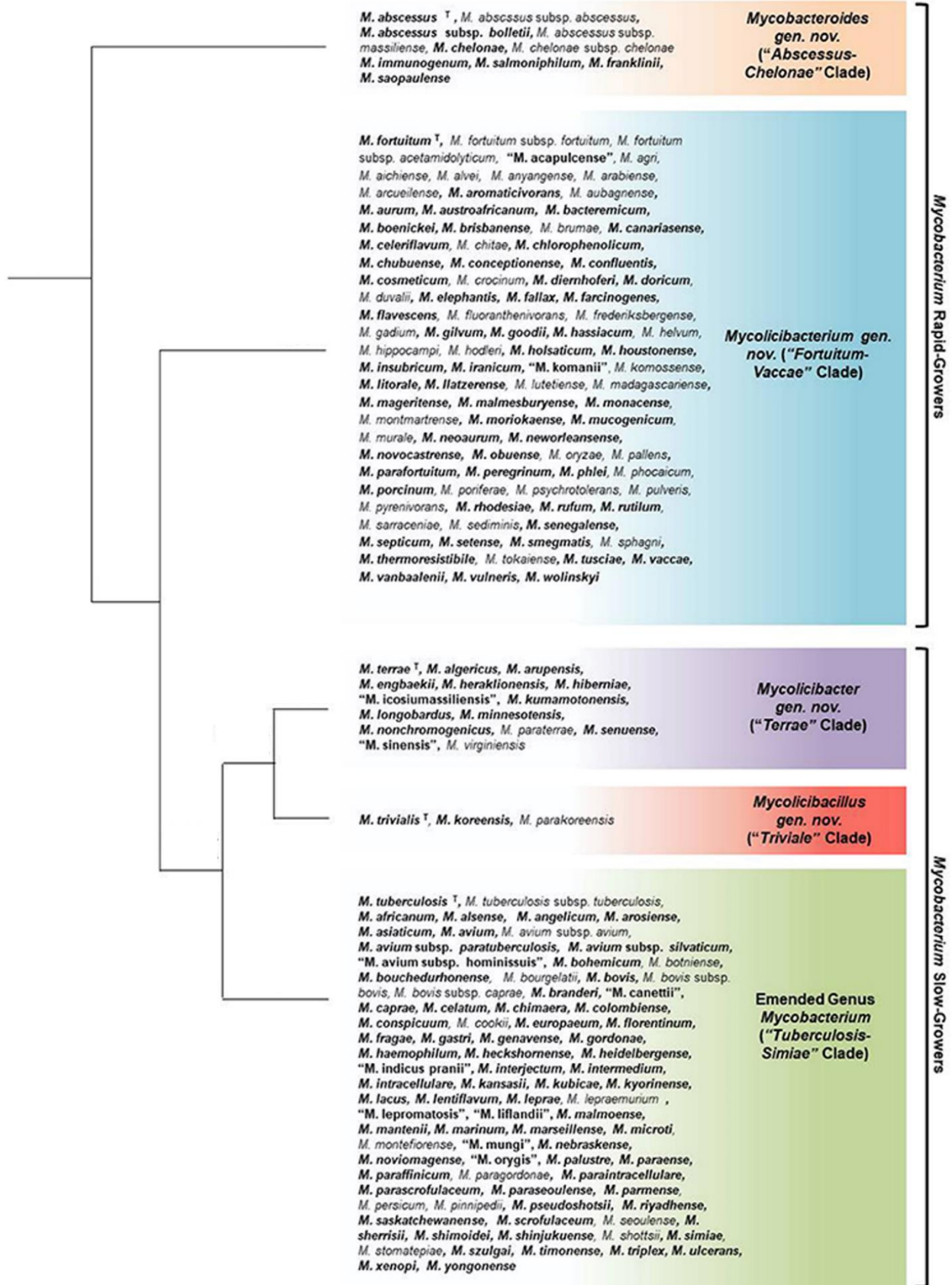


Figure 3 : Arbre phylogénique des mycobactéries basé sur la comparaison des protéines conservées adapté de (Gupta *et al.*, 2018).

Depuis que *M. abscessus* a été isolée pour la première fois en 1953 (Moore and Frerichs, 1953), sa phylogénie a été revue de nombreuses fois (**Figure 4**). En 1972, *M. abscessus* fût classée comme une sous-espèce de *M. chelonae*, puis a été réhabilitée en tant qu'espèce distincte en 1992. *M. bolletii* et *M. massiliense* ont été identifiées comme deux nouvelles espèces proches de *M. abscessus*, puis ont été regroupées comme sous-espèce de *M. abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, distinguable de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (Leao *et al.*, 2011). Les différences génétiques au sein de la sous-espèce *bolletii* (regroupant *M. bolletii* et *M. massiliense*) et la présence d'un gène **erm** (41) (erythromycin ribosomal methylase) chez *M. bolletii* apportant une résistance aux macrolides, qui est absent dans le génome de *M. massiliense* ont conduit à leur division en deux sous-espèces (Nash *et al.*, 2009). Désormais, *M. abscessus* est séparée en trois sous espèces distinctes : *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* ci-après nommées respectivement *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletii* (Tortoli *et al.*, 2016). L'identification des souches de *M. abscessus sensu lato* est rendue délicate si on utilise uniquement le gène **rpoB** seul, dans l'analyse comparative car il y a des transferts horizontaux (notamment de *rpoB*) entre *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletii* (Macheras *et al.*, 2011; Macheras *et al.*, 2014; Sapriel *et al.*, 2016). L'utilisation de la méthode d'analyse multilocus sequence typing (MLST) a permis de pallier l'effet de ces transferts horizontaux et de confirmer l'appartenance à la même espèce *M. abscessus sensu lato* ainsi que de différencier les trois sous espèces *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense*, *M. bolletii* (Macheras *et al.*, 2011; Macheras *et al.*, 2014).

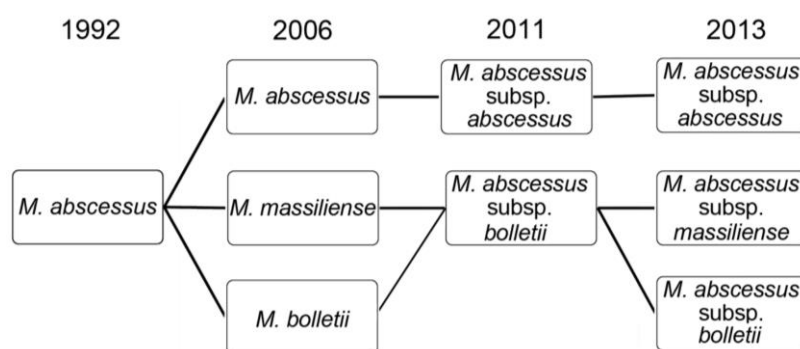


Figure 4 : Changements dans la nomenclature de *M. abscessus* depuis sa distinction en tant qu'espèce en 1992 (Lee *et al.*, 2015)

2. Les infections causées par *M. abscessus*

2.1. La pathogénèse de *M. abscessus*

M. abscessus est capable de causer un large spectre de pathologies telles que des infections pulmonaires, des infections disséminées, ainsi que des infections de la peau, des os (cas rares) et des tissus mous (Griffith *et al.*, 2007). Notamment, *M. abscessus* a été isolée pour la première fois en 1953, à partir d'un abcès localisé au genou chez une jeune fermière (Moore and Frerichs, 1953). Cette mycobactérie produit des lésions cutanéomuqueuses présentant des abcès, d'où elle tire son nom, des nécroses caséeuses, semblables à celles causées par *M. tuberculosis* au niveau pulmonaire (Moore and Frerichs, 1953).

M. abscessus est aussi responsable d'infections nosocomiales, notamment, d'infections extra pulmonaires survenant suite à un acte médical invasif (e.g. chirurgie esthétique...), ou suite à l'utilisation de matériel souillé (e.g. tatouage, acupuncture...) (Griffith *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2015). Ce type d'infection peut donc toucher tous les patients dès lors que *M. abscessus* passe la barrière cutanée (Griffith *et al.*, 2007). *A contrario*, les infections respiratoires à *M. abscessus* touchent des patients avec des pathologies pulmonaires sous-jacentes, telles que des bronchiectasies ou la mucoviscidose (Griffith *et al.* 2007; Catherinot *et al.* 2009) et des patients atteints par des déficiences de certaines voies immunitaires (Casanova and Abel, 2002). Il existe tout de même quelques exceptions pour lesquelles des infections pulmonaires avec des lésions avérées ont été observées chez des patients immunocompétents sans pathologie sous-jacente (Jeong *et al.*, 2004; Varghese *et al.*, 2012). Dans certains cas, l'infection à *M. abscessus* peut être latente pendant plusieurs années. Le patient présente ainsi des cultures positives à *M. abscessus* bien avant que les premiers symptômes cliniques n'apparaissent (Cullen *et al.*, 2000).

2.2. *M. abscessus* et la mucoviscidose

La mucoviscidose est causée par différentes mutations autosomiques récessives dans le gène *cfr* codant un canal épithélial chlore, la mutation la plus fréquente dans le gène *cfr* étant la mutation $\Delta F508$ (Riordan *et al.*, 1989). Ces mutations du gène *cfr* ont des conséquences sur plusieurs organes, au niveau des glandes exocrines chez les patients, avec des atteintes principalement au niveau pulmonaire et gastro-intestinal. Au niveau pulmonaire, elles ont pour conséquence un dysfonctionnement de la sécrétion des ions chlore et une déshydratation des surfaces entraînant la formation d'un

mucus déshydraté et visqueux. Ce qui cause un défaut de clairance muco-ciliaire, une accumulation de mucus et par conséquent, un terrain propice au développement d'infections pulmonaires par des bactéries pathogènes opportunistes (Shteinberg *et al.*, 2021). Chez ces patients, les microorganismes les plus fréquemment associés aux infections pulmonaires sont des bactéries et des champignons que l'on retrouve dans notre environnement, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia complex*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Aspergillus sp*, et les mycobactéries atypiques (Registre français de la mucoviscidose, 2019). Ces dernières sont retrouvées en moyenne chez 10% des patients atteints de la mucoviscidose, les chiffres varient selon les différents pays (Olivier *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2009; Skolnik *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2020). Les MNT les plus fréquemment isolées sont des mycobactéries appartenant aux complexe *M. avium* ainsi qu'au complexe *M. chelonae-abscessus*. De plus, la prévalence de ces infections diffère selon la localisation géographique et la population susceptible. En effet, en Europe on retrouve plus souvent des infections causées par *M. abscessus* tandis qu'en Amérique du Nord, le complexe *M. avium* est plus fréquemment isolé (72 % de *M. avium* versus 16 % *M. abscessus*) (Olivier *et al.*, 2003). En France, des études réalisées sur des patients atteints de mucoviscidose, montre que *M. avium* (2,2 %) est davantage retrouvée chez des patients plus âgés avec une forme moins sévère de mucoviscidose tandis que *M. abscessus* (5,8 %) est retrouvée chez des patients plus jeunes avec une mucoviscidose plus sévère (Roux *et al.* 2009; Catherinot *et al.* 2013). Au sein du genre *M. abscessus*, on retrouve aussi des divergences. Par exemple, dans cette étude en Asie, *M. bolletii* est moins souvent isolée (1,4 %) tandis que *M. massiliense* est plus fréquemment isolée (66,6 %) et *M. abscessus* est intermédiaire (31,9%) (Chew *et al.*, 2021). De plus, plusieurs études montrent que *M. massiliense* présente une meilleure réponse aux traitements antibiotiques comparativement à *M. abscessus* (Zelazny *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2015; Chew *et al.*, 2021), comme indiqué précédemment avec l'absence du gène *erm*, entraînant une résistance aux macrolides.

Les infections à *M. abscessus* représentent un enjeu important chez ces patients atteints par la mucoviscidose car elles sont associées à un déclin rapide des fonctions respiratoires comparativement à d'autres pathogènes fréquemment isolés chez ces patients (Esther *et al.*, 2010; Qvist *et al.*, 2016). De plus, la présence de *M. abscessus* chez ces patients, oblige à un traitement permettant la négativation des échantillons pulmonaires, en préalable à la transplantation pulmonaire. Celle-ci peut être contre-indiquée s'il existe un risque important d'infection aggravée post-transplantation du fait du risque de dissémination systémique de la bactérie chez ces patients

mis sous immunosuppresseurs à l'issue de la greffe (Taylor and Palmer, 2006; Smibert *et al.*, 2016).

On parle de lien mendélien entre la mucoviscidose et les infections à *M. abscessus*. En effet, la mutation *cfr* crée un environnement propice au développement et à la persistance de la mycobactérie mais il s'agit de causes multifactorielles comprenant à la fois des facteurs de l'hôte ainsi que des facteurs de virulence et d'adaptation de *M. abscessus*. Plusieurs modèles d'infection ont été développés dans le but de mieux comprendre ces facteurs de susceptibilité, *e.g.* la souris, le zebrafish, la drosophile, des modèles cellulaires et dernièrement un nouveau modèle amphibien, *Xenopus laevis* (Oh *et al.*, 2013; Bernut *et al.*, 2014; Le Moigne *et al.*, 2015; Roux *et al.*, 2016; Bernut *et al.*, 2017; Le Moigne *et al.*, 2020; Lopez *et al.*, 2021). De plus, il est possible d'étudier les infections à *M. abscessus* dans un contexte de mucoviscidose notamment chez la souris et le zebrafish (Caverly *et al.* 2015; Bernut *et al.* 2020), tandis qu'un modèle mucoviscidose like a été développé dans notre laboratoire chez la drosophile.

2.3. Réservoir et transmission

2.3.1. Le réservoir de *M. abscessus*

Bien que *M. abscessus* soit une des MNT avec une prévalence parmi les plus élevées avec les mycobactéries du complexe MAC, elle reste peu, voire pas du tout isolée à partir d'échantillons environnementaux contrairement à d'autres mycobactéries (Le Dantec *et al.*, 2002; van Ingen *et al.*, 2009). *M. abscessus* n'a été isolée qu'une seule fois dans de l'eau potable en Australie (Thomson *et al.*, 2013). Son réservoir reste inconnu mais le séquençage de son génome a mis en évidence des gènes impliqués dans un mode de vie environnementale et a permis d'identifier des gènes en lien avec une vie intracellulaire (Ripoll *et al.*, 2009). *M. abscessus* contient aussi des gènes retrouvés chez d'autres pathogènes de la mucoviscidose *e.g.* *P. aeruginosa* et *B. cepacia*. L'ensemble de ces données laisse penser que *M. abscessus* vit dans un environnement à l'interface entre l'eau, les sols, les végétaux où l'on retrouve fréquemment les amibes. Ces dernières sont des organismes unicellulaires présents dans l'environnement et sont capables de jouer le rôle de réservoir pour de nombreuses bactéries dont des pathogènes de la mucoviscidose (Shi *et al.*, 2021). Bien que *M. abscessus* n'ait jamais été isolée à partir d'amibes issues de l'environnement contrairement à d'autres MNT (Ovrutsky *et al.*, 2013), *M. abscessus* est capable de survivre et de croître dans les amibes en conditions expérimentales (Drancourt, 2014; Laencina *et al.*, 2018), et a même été isolée grâce à des co-cultures

en amibes des échantillons respiratoires alors que les techniques d'isolement sur boîte de gélose ne donnaient aucune culture positive (Adékambi *et al.*, 2004). L'ensemble de ces observations corroborent l'hypothèse que les amibes pourraient être le réservoir environnemental de *M. abscessus*. Elles représenteraient une niche protectrice favorisant la propagation et la résistance de *M. abscessus* dans l'environnement et participeraient à son évolution grâce à l'acquisition de gènes via les transferts horizontaux avec d'autres bactéries retrouvées dans les amibes (voir Chap I : 3.2), ce qui permettrait à *M. abscessus* d'acquérir son statut de pathogène opportuniste chez l'Homme.

2.3.2. La transmission de *M. abscessus*

Une étude australienne a permis de mettre en évidence un lien entre des souches de *M. abscessus* issues de l'environnement et des souches cliniques issues de patients. Cette étude a démontré qu'il existait une forte similarité entre des souches isolées à partir de patients et des souches provenant de prélèvements d'eau potable (Thomson *et al.*, 2013). Cela suggère que ces souches environnementales présentes dans l'eau potable seraient la source de contamination pour ces patients. A l'inverse, des études de « Whole genome sequencing » (WGS) démontrent une forte identité entre des souches cliniques suggérant qu'il existerait aussi des cas de transmission entre patients (Bryant *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2020). À ce jour, aucune transmission par un contact direct entre patient n'a été démontrée, la transmission interhumaine observée serait vraisemblablement due à une transmission via des fomites ou par aérosol (Bryant *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2016).

L'analyse WGS de souches de *M. abscessus* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose, révèle que les isolats appartiennent soit à des souches issues d'une contamination indépendante via l'environnement (bien que l'isolat n'ait pas été identifié dans l'environnement de ces patients), soit à des souches appartenant à des groupes clonaux qui circulent dans la population des patients atteints de la mucoviscidose et dont la diffusion serait récente, entre 1955 et 1995 (Bryant *et al.*, 2021). De plus, les clones isolés provenant de cluster survivent mieux en cellules et sont plus virulents chez la souris par rapport aux isolats n'appartenant pas à ces groupes clonaux (Bryant *et al.*, 2016). Néanmoins, les auteurs ne précisent pas si les isolats cliniques correspondent à des clones de *M. abscessus* de morphotype lisse (S) ou rugueux (R) ou à un mélange de S et R, sachant que les deux morphotypes n'ont pas la même virulence (voir Chap I :3.1). Cette étude confirme que la source de

contamination par *M. abscessus* se fait via l'environnement mais que depuis une soixantaine d'années des clones ont émergé, via l'acquisition de mutations les rendant plus virulents, et se seraient disséminés dans la population de patient atteints de mucoviscidose à travers les différents continents et notamment dans les centres de traitement. De plus, les mutations identifiées chez ces clones auraient un impact négatif sur leur survie environnementale. Les auteurs postulent que cette contrainte environnementale sur les clones plus virulents de *M. abscessus* pourrait favoriser l'émergence de clones transmissibles de manière directe entre individus à l'instar de l'évolution de *M. tuberculosis* il y a quelques centaines d'années (Bryant *et al.*, 2021).

3. Les facteurs de virulence de *M. abscessus*

3.1. Transition S vers R

M. abscessus possède deux morphotypes différenciables par l'aspect des colonies sur milieu gélosé, la forme S « Smooth » caractérisée par son aspect brillant et lisse et la forme R « Rough » reconnaissable à son aspect rugueux (**Figure 5**). Cette différence phénotypique est associée à la perte des glycopeptidolipides (GPL) à la surface du morphotype R et a pour conséquence une diminution de la mobilité et de la formation de biofilm pour les formes libres de la bactérie (Howard *et al.*, 2006). Une analyse génomique comparative entre différentes souches S et R a démontré la présence d'insertions/délétions (indels) et de single nucleotide polymorphism (SNP) au niveau des gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse (non-ribosomal peptide synthase *msh*) et le transport des **GPL** (mycobacterial membrane protein, *mmpL*) (Pawlik *et al.*, 2013; Bernut *et al.*, 2016b). De plus, une diminution de l'expression des gènes du locus *gpl* a été observée dans le morphotype R (Pawlik *et al.*, 2013). La différence de morphotype est une caractéristique observable chez d'autres mycobactéries comme *M. avium* (Prinzis *et al.*, 1994) et peut faire intervenir d'autres acteurs que les GPL. Par exemple la différence de morphotype dans le cas de *M. kansasii* est due à l'absence de lipooligosaccharides contenant du tréhalose dans le morphotype R (Belisle and Brennan, 1989) tandis que chez *M. vaccae*, cette différence est due à l'absence d'un polyester saturé dans la forme R (Agustí *et al.*, 2008).

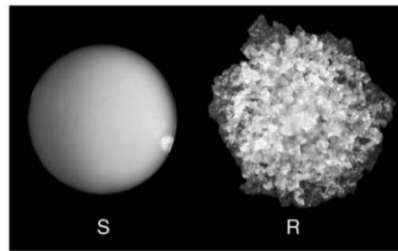


Figure 5 : Aspect des colonies de *M. abscessus* de morphotype lisse (S) et rugueux (R) sur gélose (Medjahed *et al.*, 2010)

Pour les formes intracellulaires, là aussi le comportement des deux morphotypes diffère comme le laboratoire a pu le montrer notamment par des études en microscopie électronique (**Figure 6**) (Roux *et al.*, 2016). Pour la forme S, on observe une seule colonie par phagosome, ainsi qu'une zone translucide « electron translucent zone » (ETZ) autour de la mycobactérie. *M. abscessus* R forme des agrégats, suggérant que les cellules phagocytent plusieurs bactéries à la fois. On remarque ainsi la présence de plusieurs bactéries par phagosome, avec une ETZ très fine entre *M. abscessus* R et la membrane du phagosome. Ce phagosome est ensuite rapidement acidifié, différence majeure avec celui contenant la forme S qui ne l'est pas. De plus, *M. abscessus* R induit plus d'apoptose et d'autophagie dans les cellules par rapport à la forme S (Roux *et al.*, 2016). La forme R induirait la mort des cellules pour rejoindre le milieu extracellulaire dans lequel, elle va se multiplier et former des agrégats appelés « cordes » (Bernut *et al.*, 2014).

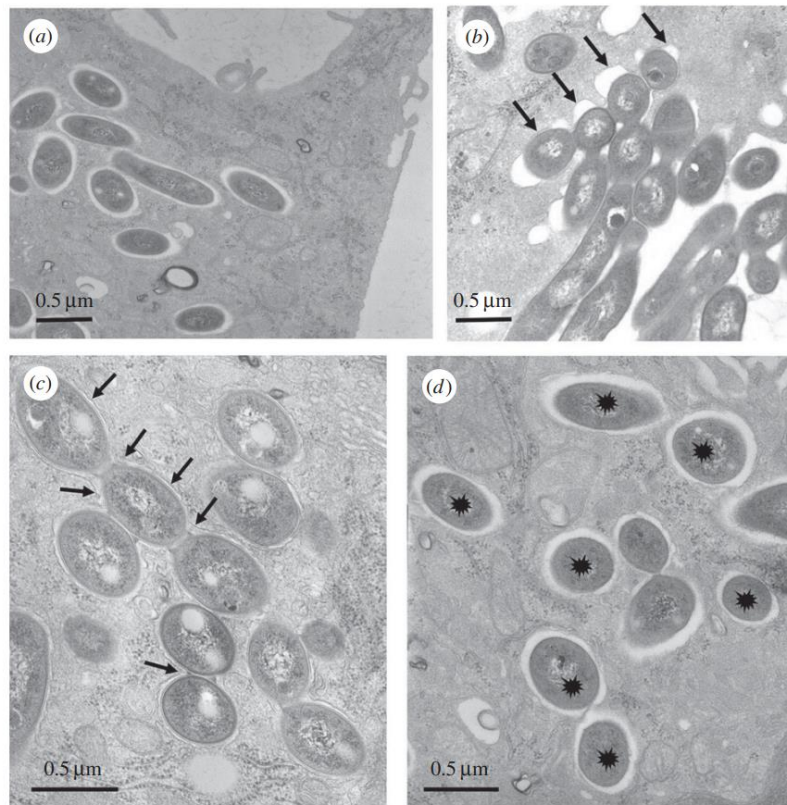


Figure 6 : Différents phénotypes cellulaires de la forme S et R de *M. abscessus* phagocytés par des macrophages d'origine humaine (Roux *et al.*, 2016)

(a) *M. abscessus* S phagocyté, l'ETZ est épaisse.

(b) *M. abscessus* R est phagocyté, on retrouve plusieurs bactéries dans des coupes phagocytaires (indiquées par les flèches).

(c) Plusieurs *M. abscessus* R sont phagocytés et forment des phagosomes sociaux, plusieurs bactéries sont dans un même phagosome (indiqué par les flèches) avec une ETZ fine.

(d) *M. abscessus* S est phagocyté et on retrouve une seule bactérie par phagosome (indiqué par des étoiles).

M. abscessus est capable de passer du morphotype S au morphotype R, cette transition irréversible est observée *in vivo* au cours de l'infection (Catherinot *et al.*, 2007; Jönsson *et al.*, 2007; Catherinot *et al.*, 2009). Le morphotype R est plus souvent associé à des infections pulmonaires plus sévères (Catherinot *et al.*, 2009). Cette hypervirulence par rapport à la souche S a été confirmée dans les différents modèles animaux. En effet, *M. abscessus* de morphotype R est plus virulent dans le modèle murin en comparaison au morphotype S (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2007). De plus, dans le zebrafish, on observe pour la forme R une virulence accrue comparativement à la forme S ainsi que la formation de cordes pouvant expliquer le mode de vie extracellulaire de ce morphotype car ces cordes sont difficilement phagocytées (Bernut *et al.* 2014).

3.2. Les gènes non-mycobactériens

L'analyse du génome de *M. abscessus* a révélé la présence de clusters de gènes acquis par transferts horizontaux. Les gènes codés dans ces clusters ont une forte similarité avec des gènes provenant de bactéries ayant un pourcentage élevé en guanine-cytosine et appartenant aux *Actinobacteria*, *Pseudomonas spp.* et *Burkholderia spp.* (Ripoll *et al.*, 2009). La majorité de ces gènes codent pour des protéines hypothétiques identifiées grâce à leurs homologies avec des protéines de *M. tuberculosis* ou avec d'autres bactéries. Ces gènes sont absents des autres MCR (Ripoll *et al.*, 2009). La fonctionnalité de ces gènes n'a pas été vérifiée chez *M. abscessus* à l'exception des deux gènes *mgtC* et *plc*, pour lesquels les produits ont été caractérisés. Ils codent respectivement un transporteur induit par la carence du milieu en magnésium (**MgtC**) et la phospholipase C (**PLC**). MgtC est impliqué dans la survie et l'adaptation à des environnements pauvres en Mg^{2+} . Chez *M. abscessus*, l'expression de *mgtC* ainsi que de la protéine correspondante est induite dans des milieux avec une faible concentration en Mg^{2+} mais aussi dans les macrophages (Le Moigne *et al.*, 2016). La PLC est une protéine permettant aux pathogènes de s'échapper du phagosome. Sa cytotoxicité a été confirmée sur des macrophages après purification de la protéine recombinante. De manière intéressante, l'expression du gène *plc* n'est induite qu'après co-culture avec les amibes. De plus, cette co-culture augmente la virulence de *M. abscessus* dans la souris comparativement à la souche cultivée en milieu liquide. Ces résultats corrélerent avec l'hypothèse d'une évolution de *M. abscessus* dans un environnement en contact avec les amibes ainsi que d'autres bactéries pathogènes et démontrent que les amibes contribuent à sa virulence (Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

3.3. Les gènes mycobactériens

L'analyse du génome de *M. abscessus* a également permis d'identifier de nombreux gènes hypothétiques retrouvés chez d'autres mycobactéries impliqués dans la vie intracellulaire (Ripoll *et al.*, 2009). Le crible d'une banque de transposon chez *M. abscessus* a notamment permis de mettre en évidence de nombreux gènes impliqués dans la croissance en amibes et en macrophages. Parmi ces gènes, on retrouve le gène codant pour le transporteur de glycolipide, **MmpL8**, qui transporte le glycosyl diacylated nonadecyl diol (**GDND**) (Dubois *et al.*, 2018). Le mutant de cette protéine membranaire, $\Delta mmpL8$, présente dans les cellules un défaut d'adhésion, de croissance et de rupture de la membrane du phagosome. De plus, dans le zebrafish, ce mutant est moins virulent

comparativement à la souche sauvage, ce qui démontre l'importance des lipides dans l'interaction hôte-pathogène.

Le crible de la banque de transposon a aussi permis d'identifier le rôle du **locus *esx-4*** dans la survie intracellulaire. En effet, 12 clones avec un défaut de croissance en amibes et en macrophages ont été retrouvés avec un transposon intégré dans les différents gènes de ce locus (Laencina *et al.*, 2018). Chez les mycobactéries, ces loci sont composés de protéines structurales conservées (**EccB**, **EccC**, **EccD** et **EccE**) et d'une mycosine protéase **MycP**. Chez les mycobactéries il peut exister jusqu'à cinq locus *esx* qui codent pour un système de sécrétion de type VII (SST7) aussi nommé « early antigenic secretion system » (ESX) (voir Chap II 3). *M. abscessus* possède seulement deux loci : *esx-3* et *esx-4* (Dumas *et al.*, 2016). Un mutant du gène *eccB₄*, codant une protéine transmembranaire, impliquée dans l'appareil de sécrétion, a été construit et a démontré l'implication du système de sécrétion ESX-4 dans la rupture de la membrane phagosomale et dans le blocage de l'acidification (**Figure 7**), un phénotype similaire à celui conféré par ESX-1 chez *M. tuberculosis*, impliqué dans sa virulence.

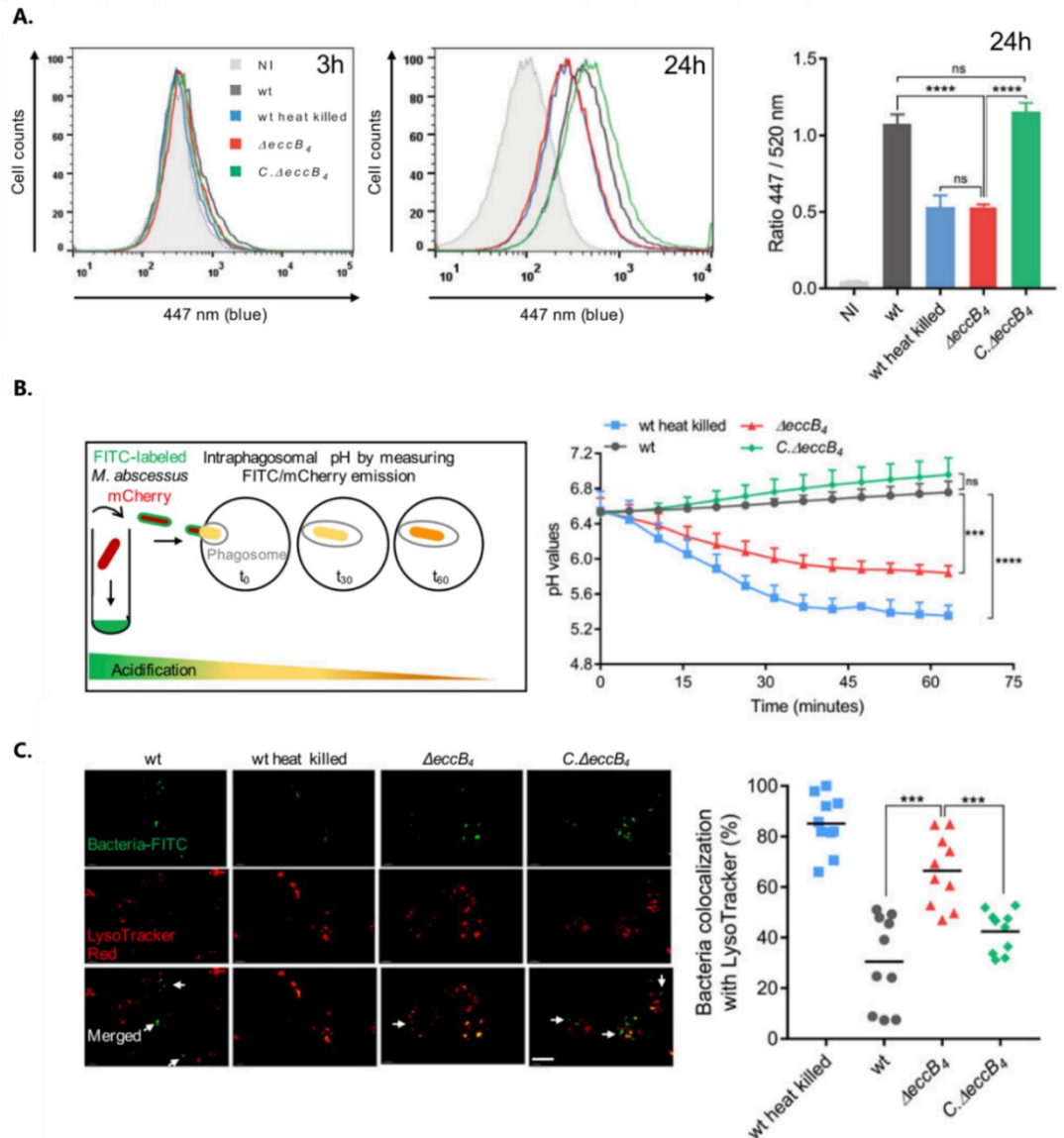


Figure 7 : Le devenir du mutant $\Delta eccB_4$ dans des macrophages d'origine murine (Laencina *et al.*, 2018)

A. À droite : rupture de la membrane du phagosome détectée en cytométrie par transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET), le CCF-4 a un spectre d'émission qui passe du vert au bleu lors de son clivage par la β -lactamase localisée à la surface de *M. abscessus*. Les cellules infectées par la souche inactivée par la chaleur Heat-killed (HK) et le mutant $\Delta eccB_4$ (en rouge) « switchent » moins dans le bleu par rapport à la souche sauvage « wild-type » (WT) (en noir) et la souche complémentée (en vert). **A gauche :** quantification du ratio de la fluorescence moyenne du bleu 447nm et du vert 520 nm.

B. À gauche : schéma du principe de l'acidification. Les macrophages sont infectés par des bactéries mCherry et marquées en extracellulaire avec du FITC. Le FITC « switch » du vert vers le jaune en fonction du pH dans le phagosome. **A droite :** Courbe du suivi du pH intraphagosomal en fonction du temps. Les phagosomes contenant *M. abscessus* HK et $\Delta eccB_4$ s'acidifient tandis que la souche WT et la souche complémentée bloquent l'acidification du phagosome.

C. À gauche : macrophages d'origine murine marqués avec le lysotraker et infectés par les souches de *M. abscessus* préalablement mise en contact dans une solution de FITC. **A droite :** co-localisation de *M. abscessus* avec le lysotraker. *M. abscessus* HK et le $\Delta eccB_4$ co-localisent davantage avec le lysotraker que la

souche WT et la souche complétementée.

Le locus ancestral, *esx-4*, était alors considéré précédemment comme non fonctionnel chez les mycobactéries. De plus, dans le complexe *M. abscessus-chelonae*, ce locus possède le gène *eccE*, qui est absent du locus *esx-4* chez toutes les autres mycobactéries, cette singularité pourrait expliquer la fonctionnalité de ce locus chez *M. abscessus* (**Figure 8**).

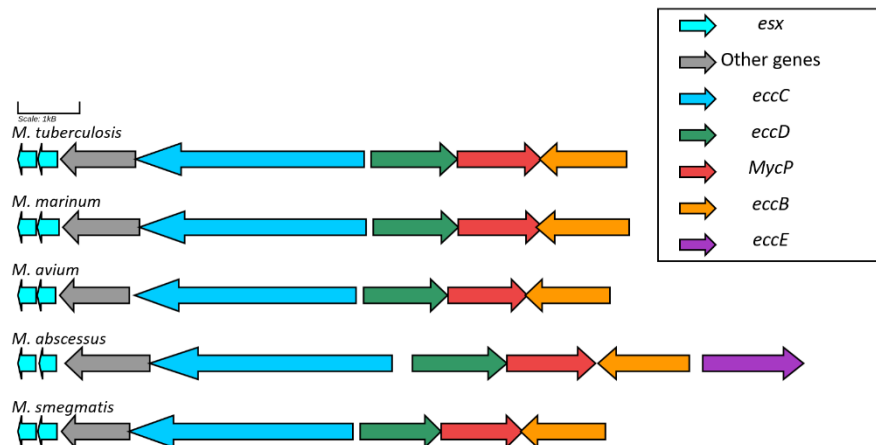


Figure 8 : Comparaison du locus *esx-4* de *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. abscessus* et *M. smegmatis* (réalisé sur Gene Graphics)

Enfin, l'analyse comparative en spectrométrie de masse du surnageant de culture de la souche sauvage et du mutant $\Delta eccB_4$ a permis d'identifier des substrats potentiels du locus *esx-4*, tels que des lipoprotéines et des substrats connus des systèmes ESX, *i.e.* les protéines avec un motif proline-glutamate (**PE**) et proline-proline-glutamate (**PPE**) et appartenant à la famille **WXG100**, petites protéines immunogènes d'environ 100 acides aminés (AA) avec le motif Tryptophane-X-Glycine (WXG). Parmi ces dernières on retrouve une diminution (non significative), chez le mutant $\Delta eccB_4$ comparativement à la souche sauvage, des protéines EsxT et EsxU (52 et 27% respectivement) codées par les gènes *esxU* et *esxT* présents dans le locus *esx-4* (Laencina *et al.*, 2018).

Le **locus *esx-3***, est surtout connu pour son implication dans la capture du zinc et du fer chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Siegrist *et al.*, 2009; Tufariello *et al.*, 2016), ainsi que pour son rôle dans la virulence chez *M. tuberculosis* (Tufariello *et al.*, 2016). Un mutant du locus entier a été obtenu chez *M. abscessus* et a démontré le rôle de ce locus dans la virulence à l'instar de l'ESX-3 de *M. tuberculosis* (Kim *et al.*, 2017). En effet, le mutant est associé à une diminution du nombre de bactéries et une diminution de l'induction de la réponse inflammatoire comparativement à la souche sauvage chez la souris (Kim *et al.*, 2017). Ces résultats restent toutefois à confirmer avec des

expériences de complémentation du mutant qui n'ont pas été réalisées. Néanmoins, la réponse inflammatoire a été restaurée après l'ajout des substrats purifiés, EsxG et EsxH de l'ESX-3, sur les macrophages murins.

Le séquençage du génome de *M. abscessus* a permis d'identifier trois gènes *pe* et six gènes *ppe* (Ripoll *et al.*, 2009), qui sont connus pour coder des protéines sécrétées soit par l'ESX-1 et l'ESX-3 mais surtout majoritairement associées à l'ESX-5 chez *M. tuberculosis* et *M. marinum* (Gey van Pittius *et al.*, 2006). De plus, une analyse bio-informatique basée sur la recherche des motifs caractéristiques des substrats des ESX (WXG, PE, PPE et le motif de sécrétion YxxxD/E) a été réalisées par Wilbert Bitter (non publié) dans le but d'identifier les substrats potentiels des systèmes ESX de *M. abscessus* (Laencina, 2017). Cette analyse a permis de trouver des gènes codants pour des PE, PPE et des protéines Esx (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Gènes de *M. abscessus* codants pour des protéines qui possèdent les motifs caractéristiques des substrats des ESX (Laencina, 2017) d'après Wilbert Bitter.

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

Le crible de la banque de mutants par transposition a été complété par une analyse du transcriptome de *M. abscessus* après co-culture avec des amibes et après l'infection de macrophages. Cette approche a permis d'identifier le rôle de différents gènes de virulence, facteurs de transcription et voies métaboliques impliqués dans cette vie intracellulaire (Dubois *et al.*, 2019). Ce travail a notamment permis de mettre en évidence l'importance du gène **eis2** dans la survie intracellulaire et qui code un gène de résistance précoce à l'action microbicide des macrophages. Dans le cas de *M. abscessus*, il intervient dans la résistance aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Dubois *et al.*, 2019).

De plus, l'analyse WGS de souches cliniques issues de clusters circulants dans la population des patients atteints par la mucoviscidose en comparaison avec des souches isolées n'appartenant pas à ces clusters, a permis d'identifier des mutations impliquées dans l'adaptation à la vie intracellulaire. Ces mutations concernent des gènes jouant un rôle dans la transition S et R, la résistance aux macrolides, la biosynthèse de la paroi ainsi que des gènes avec un impact plus large sur la régulation et l'expression, *i.e.* facteurs de transcription et des gènes permettant de modifier l'ADN. La reproduction de ces mutations *in vitro*, dans le gène **phoPR** montre qu'elles sont associées à une meilleure survie en cellule et une virulence plus importante chez la souris (**Figure 9**). Par ailleurs, ces mutations sont aussi associées à une diminution de la survie de *M. abscessus* dans l'environnement (Bryant *et al.*, 2021).

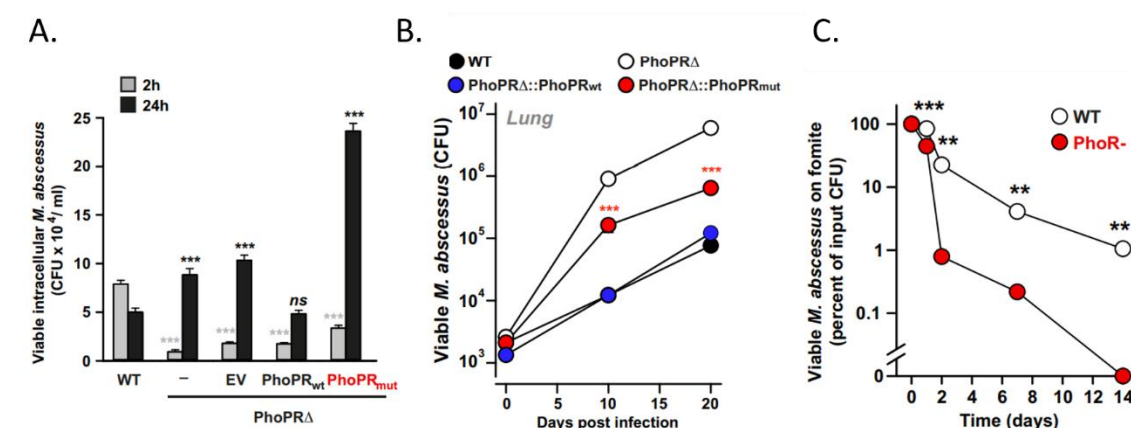


Figure 9 : Impact des mutations dans le gène *phoPR* retrouvées dans les souches issues des clusters sur la survie de *M. abscessus* dans les cellules, les souris et les fomites. (Bryant *et al.*, 2021)

A. Croissance intracellulaire de *M. abscessus* à 2 h et 24 h post infection.

B. Croissance de *M. abscessus* dans le poumon de souris.

C. Viabilité de *M. abscessus* sur des fomites

4. Diagnostic, traitement et vaccination face aux infections à *M. abscessus*

4.1. Le diagnostic des infections à *M. abscessus*

Actuellement, le diagnostic formel des infections à *M. abscessus* repose sur la mise en évidence de la mycobactérie par des techniques microbiologiques (Griffith *et al.*, 2007; To *et al.*, 2020). Des recommandations ont été publiées récemment afin d'aider cliniciens et microbiologistes pour un diagnostic de certitude (Floto *et al.*, 2016; Daley *et al.*, 2020)

De nouvelles approches diagnostics sont développées en recherche et développement. Notamment, le test de détection de l'interféron gamma (IFN γ) produit par les lymphocytes T (LT) suite à la reconnaissance des protéines purifiées de *M. abscessus* (Steindor *et al.*, 2021) et inspiré du test de détection de l'IFN γ chez les patients présentant une suspicion de tuberculose (Andersen *et al.*, 2000). De plus, d'autres tests reposent sur l'analyse de la réponse lymphocytaire B (LB) qui peut être utilisée pour le diagnostic des infections à *M. abscessus*. En effet, la réponse sérologique vis-à-vis de la PLC, décrite précédemment, et de l'extrait « Toll-Like receptor-2 » (TLR2) (extrait lipoprotéique activant la réponse TLR-2) sont des marqueurs sérologiques prometteurs pour un diagnostic des infections à *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2021).

4.2. Le traitement des infections à *M. abscessus*

Le traitement repose principalement sur une multi-antibiothérapie car *M. abscessus* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques (Nash *et al.*, 2009; Ripoll *et al.*, 2009). Il est recommandé de tester *in vitro* la susceptibilité des souches cliniques isolées pour deux antibiotiques majeurs, l'amikacine et la clarithromycine (Daley *et al.*, 2020), seuls antibiotiques pour lesquels est observée une bonne corrélation entre les résultats *in vitro* et l'activité *in vivo* chez les patients. Il est important également d'identifier *M. abscessus* au niveau de la sous-espèce du fait de leur différence de sensibilité vis-à-vis des macrolides (clarithromycine ou azithromycine). Ces antibiotiques de première ligne sont combinés à l'amikacine, céfoxitine ou imipénème administrés par voie parentérale (Daley *et al.*, 2020). Dans le cas d'une infection pulmonaire non curable par antibiothérapie, le traitement antibiotique peut être associé à des chirurgies de résection pulmonaire (Griffith *et al.*, 2007). La durée de traitement varie selon la gravité de l'infection. Les traitements antibiotiques peuvent causer des effets indésirables et une toxicité pour certains patients. Un des éléments clés du « succès » thérapeutique est la sensibilité à la clarithromycine, comme l'ont montré différentes études où le

taux de succès est de plus de 80% lorsque la mycobactérie isolée est *M. massiliense*, et chute à moins de 40% lorsqu'il s'agit de *M. abscessus* (Koh *et al.*, 2017).

Actuellement, différentes voies de recherche sont développées sur l'utilisation d'antibiotiques déjà décrits pour d'autres mycobactéries, comme *M. tuberculosis*, tels que la bedaquiline qui cible l'ATP synthase (Le Moigne *et al.*, 2020) et un dérivé actif du benzimidazole qui cible le transporteur de lipide **MmpL3** (Raynaud *et al.*, 2020).

De plus, de nouvelles voies thérapeutiques font leur apparition. Un exemple est l'administration d'un cocktail de trois phages en association avec une multi-antibiothérapie, décrit pour la première fois en 2019 chez une patiente atteinte de mucoviscidose et présentant une forme grave d'infection disséminée à *M. abscessus* à la suite d'une transplantation pulmonaire. L'ajout du cocktail de phages n'a pas déclenché d'effet secondaire et a été accompagné d'une amélioration des symptômes cliniques sans pour autant négativer les cultures bactériennes (Dedrick *et al.*, 2019).

4.3. La vaccination vis-à-vis de *M. abscessus*

La vaccination est utilisée depuis les années 1920 pour la tuberculose, avec la souche historique dérivée de *Mycobacterium bovis*, le Bacille bilié de Calmette et Guérin (BCG), qui a été atténué après de nombreux passages en culture (Calmette, 1928). Cette souche confère une protection vis-à-vis des infections à *M. tuberculosis*, notamment pour les formes graves comme la forme méningée chez les enfants, et est à ce jour le seul vaccin contre une infection à mycobactérie. Récemment, une étude a démontré que le BCG induirait un effet de protection croisée vis-à-vis des MNT, notamment *M. abscessus* et *M. avium* dans un modèle de co-culture de lymphocytes de patients vaccinés ou non par le BCG et de macrophages autologues infectés ou non par *M. abscessus* ou *M. avium* (Abate *et al.*, 2019). De plus, l'étude des deux protéines de virulence, **MgtC** et **PLC**, a révélé que la vaccination par un plasmide codant les gènes *mgtC* ou *plc* induisait un effet protecteur vis-à-vis d'une infection à *M. abscessus* chez des souris homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ (Le Moigne *et al.*, 2015; Le Moigne *et al.*, 2016).

5. La réponse immunitaire face aux infections à *M. abscessus*

La différence entre les morphotypes S et R ne se limite pas seulement aux différences phénotypiques. Comme indiqué précédemment, la perte des GPL dans le morphotype R a des conséquences sur la

virulence de *M. abscessus*. De plus, S et R semblent activer des voies différentes de la réponse immunitaire chez l'hôte. Notamment, le morphotype R induit une forte réponse pro-inflammatoire via un mécanisme dépendant de la voie **TLR2** dans les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse ainsi que dans les cellules dendritiques (Rhoades *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2011). Dans les macrophages infectés par *M. abscessus*, l'induction de la réponse pro-inflammatoire est induite par l'interaction de TLR-2 avec dectine-1, un autre « Pattern recognition receptor » (PRR) (Shin *et al.*, 2008). L'activation de cette voie fait intervenir une fraction composée de lipoprotéines plus abondante dans le morphotype R que S. La perte des GPL entraîne donc une augmentation de la synthèse de ces lipoprotéines, ligands de TLR2, et de l'accessibilité de ces protéines aux cellules immunitaires de l'hôte modulant ainsi la réponse immunitaire. Cette activation de la voie TLR2 par R et non par S a été confirmée dans des cellules épithéliales respiratoires (Davidson *et al.*, 2011). De plus, l'activation de cette voie semble jouer un rôle important dans la mise en place de la réponse LT helper de type 1 (Th1) chez la souris (Kim *et al.*, 2015). Des souris *tlr2*^{-/-} présentent des défauts dans la production d'IFN γ , TNF- α (Facteur de nécrose tumorale), l'activation des LT, l'infiltration de cellules inflammatoires dans les poumons des souris infectées avec R. L'activation de la voie TLR2 est donc importante pour la mise en place de la réponse adaptative (Kim *et al.*, 2015). En effet, chez la souris les cellules LB et LT sont essentielles pour l'élimination de *M. abscessus* ainsi que la production de TNF- α et d'IFN γ (Rottman *et al.*, 2007). De plus, dans le zebrafish, TNF- α et IL-8 sont importants pour induire le recrutement des macrophages et des neutrophiles au lieu de l'infection, permettant ainsi la formation de granulomes qui contrôlent la dissémination de *M. abscessus*, bien qu'ils maintiennent une infection chronique (Bernut *et al.*, 2016a). En effet, chez l'Homme on retrouve cet environnement riche en neutrophiles lors des infections à *M. abscessus*. Les neutrophiles semblent avoir une action limitée sur la clairance de *M. abscessus* comparativement à d'autres bactéries mais cet environnement riche en neutrophiles semble plutôt promouvoir la formation de biofilm de *M. abscessus* (Malcolm *et al.*, 2013). Les mécanismes des neutrophiles pour éliminer le morphotype S et R diffèrent, S est sensible au mécanisme intracellulaire et aux « Neutrophil extracellular traps » (NET) tandis que la forme R est seulement sensible aux NETs et à un mécanisme extracellulaire non identifié (Malcolm *et al.*, 2018).

Chapitre II : Les systèmes de sécrétion des mycobactéries

1. Rôle des systèmes de sécrétion : traverser la paroi atypique des mycobactéries

La paroi des mycobactéries est composée d'une membrane interne avec une faible fluidité, d'un espace périplasmique dans lequel sont ancrés les lipoglycanes (lipomannane et lipoarabinomannane) (**Figure 10**). Ensuite, on retrouve le peptidoglycane (PG) qui permet de maintenir la forme de la cellule et résister aux pressions osmotiques. Le PG est lié de manière covalente à l'arabinogalactane, lui-même lié covalement avec la monocouche d'acide mycolique. Sur cette dernière on retrouve des lipides libres, tels que le Phthiocerol dimycocerosates (PDIM), des glycolipides phénoliques (PGL) pour les mycobactéries pathogènes strictes, et les GPL pour les MNT. La membrane externe, aussi appelée mycomembrane, est formée par l'interaction de cette monocouche d'acides mycoliques avec les lipides libres (Minnikin *et al.*, 2015). Cette mycomembrane, longtemps suspectée mais jamais observée, a pu être confirmée par cryo-microscopie électronique en 2008 (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008). De plus, cette mycomembrane externe peut être recouverte d'une capsule qui est labile en présence de détergent. La capsule est composée de glycanes, lipides et protéines, elle n'est pas présente chez toutes les mycobactéries mais semble être impliquée dans la virulence des mycobactéries pathogènes. Chez *M. tuberculosis* et *M. marinum*, cette capsule contient des protéines sécrétées par le système de sécrétion ESX-1, acteur majeur de la virulence chez ces mycobactéries (Sani *et al.*, 2010; Raffetseder *et al.*, 2019). La capsule semble aussi intervenir dans l'attachement aux cellules et l'induction de la réponse pro-inflammatoire dans la souche BCG *M. bovis* mais non observé dans la mycobactérie non pathogène *M. smegmatis* (Sani *et al.*, 2010). Ce qui illustre parfaitement l'importance de la paroi des mycobactéries dans l'interaction hôte-pathogène, notamment de par son rôle dans la modulation de la réponse immune chez l'hôte. De plus, la paroi de *M. tuberculosis* est dynamique, ce qui permet ainsi à la mycobactérie de s'adapter à son environnement (Dulberger *et al.*, 2020). Notamment, les variations dans la composition en lipides influent sur le morphotype, la formation de biofilm, la motilité et l'hydrophobicité des mycobactéries (Minnikin *et al.*, 2015). L'hydrophobicité jouant un rôle majeur dans la transmission par les aérosols de certaines mycobactéries, dont *M. tuberculosis* (Minnikin *et al.*, 2015).

La composition particulière de la paroi des mycobactéries lui confère une forte imperméabilité, ce qui nécessite la présence de systèmes pour la captation de nutriments mais aussi pour la sécrétion de protéines effectrices. Chez les mycobactéries, on retrouve quatre systèmes de sécrétion différents, les systèmes Tat, Sec, SecA2 et le système de sécrétion de type VII (SST7) aussi appelé ESX (**Figure 10**).

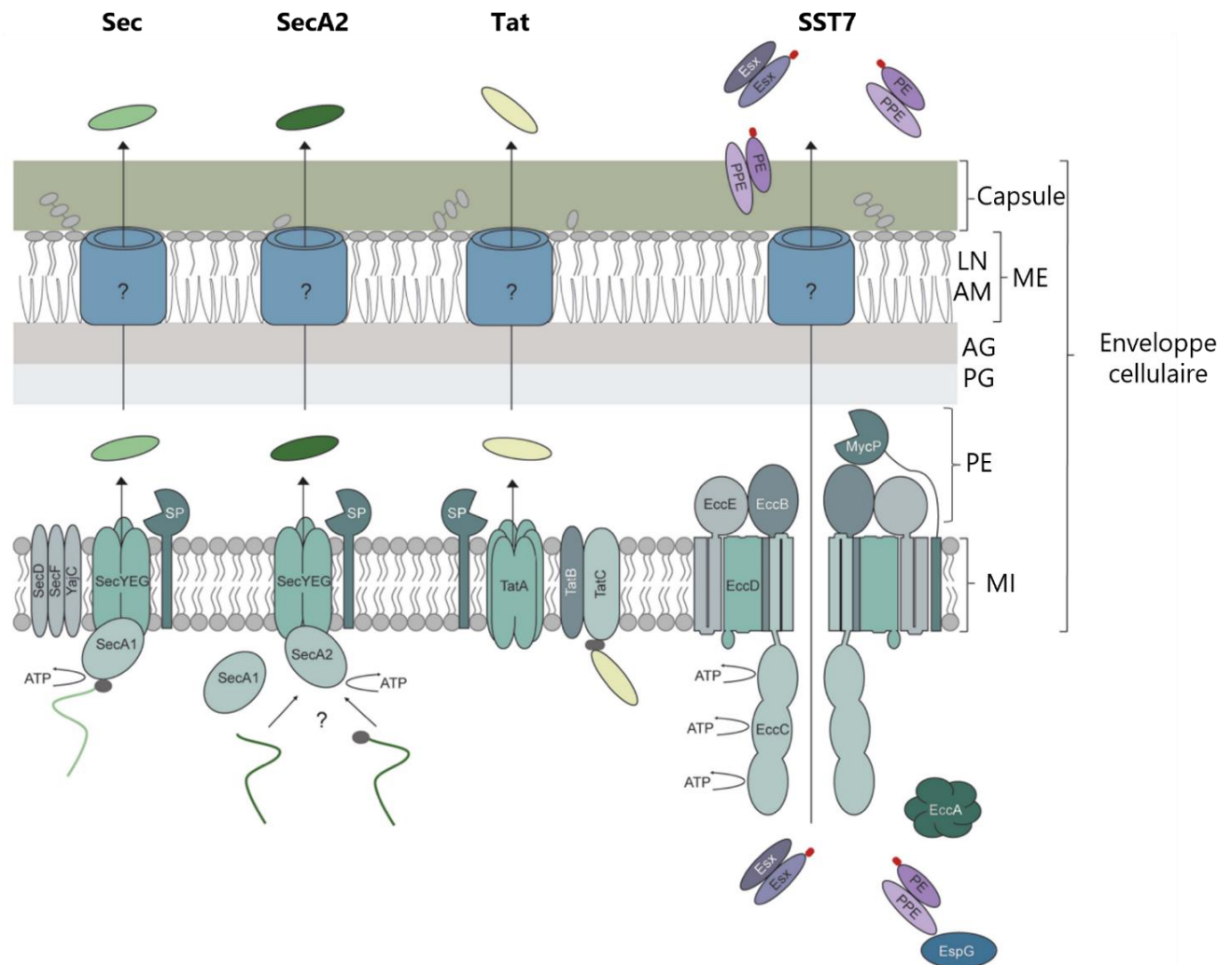


Figure 10 : L'enveloppe cellulaire des mycobactéries adaptée de (Van Winden *et al.*, 2019b)

L'enveloppe cellulaire, ou paroi des mycobactéries, est composée de la membrane interne (MI), d'un espace périplasmique (PE), du peptidoglycane (PG) lié de manière covalente à l'arabinogalactane (AG), lui-même lié aux acides mycoliques (AM) et sur laquelle sont liés des lipides de manières non covalente (LN). LN et AM forment la membrane externe (ME) qui peut être recouverte chez certaines mycobactéries par une capsule. SecA, SecA2, Tat et le système de sécrétion de type VII (SST7) sont ancrés dans la MI. Une fois les substrats sécrétés par les systèmes Sec et Tat, leur séquence signal est clivée par la peptidase signal (SP).

2. Les systèmes de sécrétion non spécifiques des mycobactéries

Chez les bactéries à Gram négatif, il existe des systèmes de sécrétion spécialisés nommés système de sécrétion de type 1 (SST1) à 9 (SST9) pour permettre la sécrétion de substrats à travers la double membrane. Les mycobactéries possèdent quant à elles leur propre SST7.

Ces systèmes de sécrétion peuvent être classés selon différents critères. En effet, on différencie les systèmes de sécrétion capables de traverser à la fois la membrane interne et externe (SST1,2,3,4,6 et 9), de ceux qui traversent seulement la membrane externe (SST5 et 8). Le SST7 des mycobactéries traverse seulement la membrane interne (**Figure 11**).

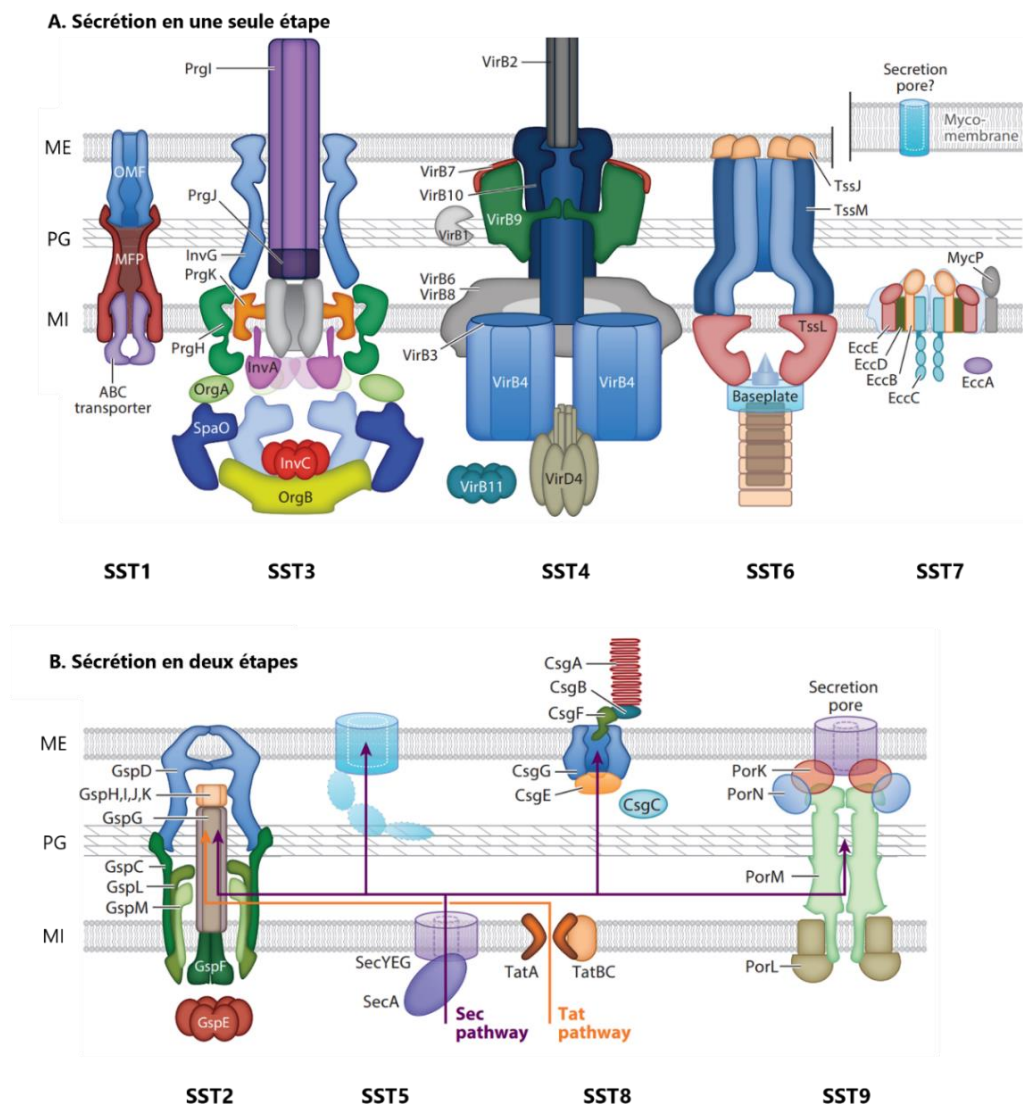


Figure 11 : Les différents systèmes de sécrétion retrouvés chez les bactéries à Gram négatif et chez les mycobactéries (Rapisarda *et al.*, 2018)

A. Les systèmes de sécrétion qui sécrètent leurs substrats en une seule étape à travers la paroi, les systèmes SST1, 3, 4, 6 et 7.

B. les systèmes de sécrétion qui sécrètent leurs substrats en deux étapes à travers la paroi, les systèmes SST2,

5, 8 et 9. Les systèmes protéines Sec et Tat prennent en charge la sécrétion à travers la membrane interne.

Les systèmes de sécrétion sont aussi différenciés selon le nombre d'étapes nécessaire aux substrats pour traverser la paroi. SST1, 3, 4, et 6 sécrètent leurs substrats à travers la membrane interne et externe en une seule fois, tandis que pour SST2, 5, 8 et 9, les substrats sont sécrétés en deux étapes. Le SST7 est présenté ici comme étant un système de sécrétion en une seule étape car le complexe protéique permet la sécrétion des substrats à travers la membrane interne mais le mécanisme de sécrétion à travers la mycomembrane reste inconnu. Dans le cas du mécanisme de sécrétion en deux étapes, les substrats traversent la membrane interne par les systèmes de sécrétions Tat ou Sec, puis sont ensuite pris en charge par le SST2, 5, 8 et 9 pour traverser la membrane externe (Costa *et al.*, 2015; Rapisarda *et al.*, 2018). Les systèmes Tat et Sec sont ainsi conservés chez les bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif et les mycobactéries.

2.1. Les systèmes SecA1 et SecA2

Chez les bactéries, le système Sec semble être impliqué dans la sécrétion de nombreuses protéines qui sont engagées dans différentes fonctions telles que la viabilité (intégrité de la paroi, acquisition de nutriments) ainsi que dans l'interaction hôte-pathogène (sécrétion de facteurs de virulence). Le système Sec est très conservé au sein des bactéries et la compréhension de ce système de sécrétion vient surtout de son étude chez *Escherichia coli* (Van Winden *et al.*, 2019b).

Le système Sec est composé d'un pore central dans la membrane interne formé par les protéines **SecYEG**, de protéines membranaires accessoires essentielles, *i.e.* **SecD** et **SecF**, ainsi que des protéines non essentielles, *i.e.* YajC chez les mycobactéries et qui augmente l'efficacité du transport (**Figure 10**). L'énergie pour la sécrétion des protéines est fournie par la protéine cytosolique **SecA1** qui possède une activité ATPase. Les protéines sont sécrétées sous forme native et reconnues grâce une séquence signal en position N-terminale qui est clivée après sécrétion et qui consiste en une extrémité chargée positivement, puis une hélice hydrophobe et une région polaire contenant le site de clivage. Les lipoprotéines possèdent en plus un motif « lipobox » en position C-terminale de la séquence signal. *A contrario*, dans le cas des protéines membranaires, la sécrétion est couplée à la traduction (van der Woude *et al.*, 2013; Van Winden *et al.*, 2019b). Le mécanisme qui permet la sécrétion de ces protéines à travers la membrane externe reste jusqu'à ce jour inconnu.

Les mycobactéries possèdent un autre homologue de la protéine SecA1 qui compose le système

SecA, nommé **SecA2** (Cole *et al.*, 1998), aussi retrouvé chez quelques Firmicutes (Lenz and Portnoy, 2002; Siboo *et al.*, 2008) et qui contrairement à SecA1 n'est pas essentiel (Braunstein *et al.*, 2003). Le rôle de SecA1 et SecA2 ne semble pas être redondant (Braunstein *et al.*, 2001) bien que SecA1 semble être important pour la sécrétion des protéines par SecA2 (Rigel *et al.*, 2009). Tout comme SecA1, SecA2 possède une activité ATPase qui permet la sécrétion de protéines à travers le pore formé par SecYEG (Hou *et al.*, 2008). La différence qui existe entre la voie de sécrétion SecA1 et SecA2 reste à ce jour inconnue. En effet, les protéines sécrétées par ces systèmes possèdent la séquence signal à l'exception de quelques protéines sécrétées par SecA2, telle que la superoxide dismutase SodA (Braunstein *et al.*, 2003). Contrairement à la voie de sécrétion SecA1, le nombre de protéines sécrétées par SecA2 semble être plus restreint. Chez les mycobactéries, seul un petit nombre de protéines ont été démontrées sécrétées via SecA2, notamment des facteurs de virulence impliqués dans le blocage de la maturation du phagosome (Sullivan *et al.*, 2012), ainsi que des protéines de transport de l'enveloppe telles que les protéines « solute binding proteins » (SBP) et Mce qui permettent d'importer des molécules (sucres, lipides) (Feltcher *et al.*, 2015).

2.2. Le système Tat

Tout comme le système Sec, le système Tat sécrète des protéines destinées à l'enveloppe cellulaire ou totalement sécrétées. De même, le mécanisme de transport à travers la membrane externe reste inconnu. Chez les mycobactéries, le système Tat est semblable à celui que l'on retrouve chez les autres bactéries (Van Winden *et al.*, 2019b). Il est composé de trois protéines membranaires **TatA**, **TatB** et **TatC**. Les substrats possèdent une séquence signal similaire au système Sec et sont reconnus grâce à leur motif Tat contenant deux arginines en N-terminal par le complexe TatBC à la membrane, puis des oligomères de TatA sont recrutés pour permettre la sécrétion des protéines à travers la membrane interne (Alami *et al.*, 2003) (**Figure 10**). L'énergie permettant le transport des substrats provient de la force proton motrice (Bageshwar and Musser, 2007). À la différence du système Sec, Tat permet la sécrétion de protéines totalement conformées (DeLisa *et al.*, 2003)

Chez *M. abscessus*, l'**antigène 85** et la **PLC**, deux protéines de virulence possèdent le signal de sécrétion du système Tat (Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Viljoen *et al.*, 2020).

3. Les systèmes ESX des mycobactéries

Le SST7, présent chez les mycobactéries, est aussi retrouvé chez d'autres *Actinobacteria* tels que *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Gordonia* ainsi que chez des bactéries plus distantes phylogénétiquement appartenant au phylum des *Firmicutes* tels que *Bacillus subtilis*, *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (Gey Van Pittius *et al.*, 2001; Newton-Foot *et al.*, 2016). Bien que l'on retrouve des caractéristiques communes entre les SST7 des *Actinobacteria* (SST7a) et *Firmicutes* (SST7b) leur composition et leur fonctionnement diffèrent par bien des aspects. Les seules protéines conservées entre les deux systèmes sont l'ATPase et les protéines sécrétées de la famille WXG100, des petites protéines d'environ 100 AA avec le motif WXG (Tryptophane-X-Glycine), et à laquelle appartiennent les protéines Esx (Rivera-Calzada *et al.*, 2021).

3.1. Les systèmes de sécrétion ESX chez *M. tuberculosis*

3.1.1. Fonction des ESX

M. tuberculosis possède les cinq systèmes de sécrétion ESX (**Tableau 2**). Le système le plus étudié est **ESX-1**, codé par le locus *esx-1*, qui permet à *M. tuberculosis* de rompre la membrane de son phagosome et d'accéder au cytosol (Houben *et al.*, 2012; Augenreich *et al.*, 2017). C'est un acteur majeur de sa virulence (Hsu *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004; Brodin *et al.*, 2006; Houben *et al.*, 2012). Cette sortie du phagosome est liée à la capacité d'**EsxA** d'interagir et lyser les membranes (de Jonge *et al.*, 2007). Une fois dans le cytosol *M. tuberculosis* peut induire ou bloquer les mécanismes de mort cellulaire, moduler la réponse immune et disséminer vers les cellules voisines par divers mécanismes (Guinn *et al.*, 2004; Simeone *et al.*, 2012; Simeone *et al.*, 2021).

L'**ESX-5** de *M. tuberculosis* est impliqué dans la sécrétion des PE/PPE qui représentent environ 10% des séquences codantes de son génome (Cole *et al.*, 1998). Les protéines sécrétées par ESX-5 semblent être impliquées dans la modulation de la virulence. En effet, la délétion du gène codant pour PPE38 bloque la sécrétion d'un grand nombre de protéines PPE-PE (environ 89) et elle est associée à une augmentation de la virulence de la mycobactérie (Ates *et al.*, 2018). De manière intéressante, des mutations sont retrouvées dans le gène *ppe38* de différentes branches du complexe *M. tuberculosis*. Les auteurs soutiennent l'hypothèse que ces mutations auraient participé à la virulence de ces souches et à leur dissémination mondiale (Ates *et al.*, 2018). Cette modulation de la

virulence pourrait être due (en partie) à une augmentation de la réponse inflammatoire (Gallant *et al.*, 2021).

Tableau 2 : Le rôle des ESX de *M. tuberculosis* et de leurs substrats

ESX	ESX substrats	Fonctions
ESX-1	EsxA-EsxB	La sécrétion d' EsxA et EsxB joue un rôle dans la virulence (Hsu <i>et al.</i> , 2003; Guinn <i>et al.</i> , 2004). EsxA est impliqué dans la rupture du phagosome (Augenstreich <i>et al.</i> , 2017) et possède une activité lytique sur les liposomes. EsxB semble jouer le rôle de chaperonne d'EsxA (de Jonge <i>et al.</i> , 2007).
	EspACD	EspA et EspC sont co-sécrétées avec EsxA et EsxB (MacGurn <i>et al.</i> , 2005; Fortune <i>et al.</i> , 2005). Le locus <i>espACD</i> est associé à la virulence du locus <i>esx-1</i> . EspC s'oligomérisse et pourrait participer à la sécrétion des substrats à travers la membrane externe (Lou <i>et al.</i> , 2017).
	EspE et EspF	EspF est requis pour la virulence mais pas pour la sécrétion d'EsxA (Bottai <i>et al.</i> , 2011). EspE et EspF sont impliqués dans l'activité hémolytique (Chirakos <i>et al.</i> , 2020).
	EspB	La structure d' EspB très semblable à un pore laisse penser qu'il pourrait servir à la captation d'ADN ou à la sécrétion de substrats (Piton <i>et al.</i> , 2020).
	EspL	EspL semble essentiel à la virulence de l'ESX-1, stabilise le niveau protéique d'EspE, EspH et EspF, interagit avec EspD et contrôle l'expression du facteur de transcription <i>whiB6</i> (Sala <i>et al.</i> , 2018). La résolution de la structure de EspL a permis d'identifier un site de liaison à l'ADN (Tian <i>et al.</i> , 2016).
	EspR	Régule ESX-1 via le locus espACD (Blasco <i>et al.</i> , 2012).
ESX-2		Impliqué dans la rupture de la membrane du phagosome via un mécanisme encore inconnu (Pajuelo <i>et al.</i> , 2021).
ESX-3	EsxG-EsxH PE5-PPE4 PE15-PPE20	ESX-3 est impliqué dans l'acquisition du fer et du zinc (Serafini <i>et al.</i> , 2009; Siegrist <i>et al.</i> , 2009), mais EsxH joue aussi un rôle dans la virulence (Tufariello <i>et al.</i> , 2016). La sécrétion de PE5 , PE15-PPE20 est dépendante de la sécrétion d' EsxH et EsxG (Tufariello <i>et al.</i> , 2016). EsxGH interagit avec un des composés du complexe ESCRT bloquant ainsi la maturation du phagosome (Mehra <i>et al.</i> , 2013).
ESX-4	EsxE-EsxF	Forment un complexe oligomérique qui interagit avec les membranes et permet la formation de pores. EsxE et EsxF sont essentiels à la sécrétion de la toxine CpnT ou TNT (Tak <i>et al.</i> , 2021).
	x	Impliqué dans la rupture de la membrane du phagosome via un mécanisme encore inconnu (Pajuelo <i>et al.</i> , 2021).
	CpnT	CpnT est composée d'un domaine C-terminal qui est impliqué dans l'induction de la nécrose des macrophages infectés par <i>M. tuberculosis</i> tandis que le domaine N-terminal permet la capture de nutriments (Pajuelo <i>et al.</i> , 2021).
ESX-5	LipY	LipY est sécrétée par l'ESX-5 puis son motif PE est hydrolysé et LipY reste localisée à la surface de la bactérie. LipY hydrolyse les lipides extracellulaires (Daleke <i>et al.</i> , 2011).
	PPE38	PPE38 est impliquée dans la sécrétion d'autres PPE et PE. Des mutations du gène codant cette protéine sont associées à une hypervirulence dans des souches cliniques (Ates <i>et al.</i> , 2018).

L'**ESX-3** est lui aussi impliqué dans la virulence bactérienne, mais il reste surtout indispensable à la capture du fer et du zinc via ses différents substrats (Serafini *et al.*, 2009; Siegrist *et al.*, 2009; Tufariello

et al., 2016). Parmi les substrats étudiés (PE5, PPE4, EsxG et EsxH), seul EsxH semble être impliqué à la fois dans la virulence et la capture du fer tandis que les autres substrats semblent seulement être nécessaires à l'acquisition du fer (Tufariello *et al.*, 2016).

Les substrats de l'ESX-3 de *M. tuberculosis* participent au blocage du trafic cellulaire de la cellule hôte, notamment du contenu lysosomal et ainsi inhibent la maturation du phagosome (Mehra *et al.*, 2013). Ce blocage serait dû à l'interaction du complexe EsxGH avec Hrs, un composé clé dans l'assemblage du complexe « Endosomal sorting complexes required for transport » (ESCRT) au niveau des endosomes. Ainsi EsxGH interrompt la fonction du complexe ESCRT et bloque la maturation du phagosome (Mehra *et al.*, 2013).

Jusqu'à très récemment seul les locus *esx-1-3-5* avaient une fonction connue chez *M. tuberculosis*, comparativement à ***esx-4*** et ***esx-2*** dont la fonction était inconnue (Houben *et al.*, 2014; Gröschel *et al.*, 2016). Récemment, le locus *esx-2*, qui n'avait pas de rôle chez l'ensemble des mycobactéries, a pour la première fois été associé à une fonction : ESX-2 ainsi que l'ESX-4 de *M. tuberculosis* seraient impliqués dans la rupture de la membrane du phagosome tout comme ESX-1 (**Figure 12**) (Pajuelo *et al.*, 2021). En présence de digitonine, qui ne perméabilise que la membrane plasmique, les protéines du PPD (dérivé protéique purifié de la tuberculine) de *M. tuberculosis* ne sont pas reconnues par les anticorps anti-PPD lorsque les cellules sont infectées avec les bacilles mutés pour les locus *esx-1*, *esx-2* et *esx-4*. Ces protéines ne sont pas accessibles car la membrane du phagosome reste intègre et le bacille n'a pas accès au cytosol tandis qu'en présence de Triton X-100, toutes les membranes sont lysées et le PPD est alors reconnu par les anticorps.

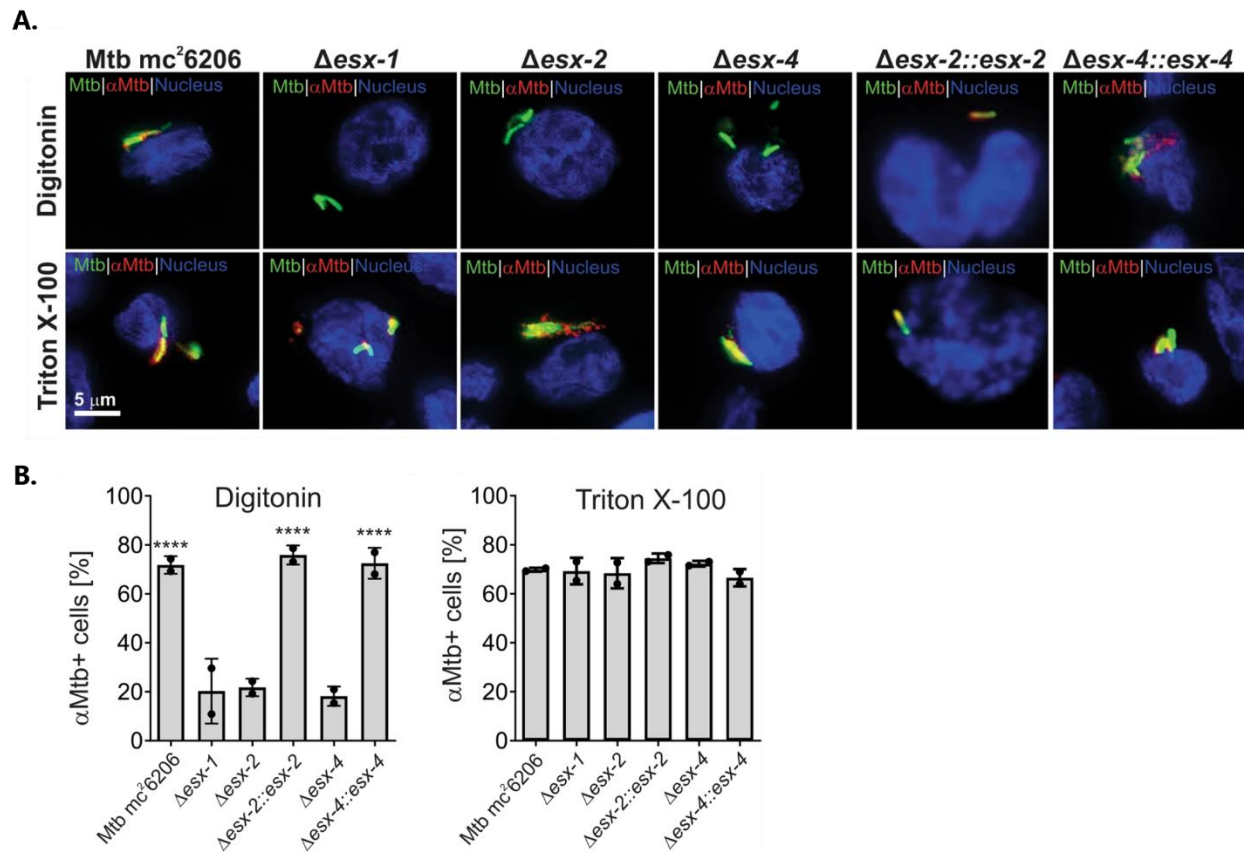


Figure 12 : Rôle d'ESX-2 et 4 de *M. tuberculosis* dans l'échappement du phagosome (Pajuelo et al., 2021)

A. Colocalisation du bacille *M. tuberculosis* en vert avec le PPD en rouge en présence de digitonine qui perméabilise la membrane plasmique des cellules ou de Triton X-100 qui perméabilise toutes les membranes (membrane plasmique et phagosomale). Les noyaux des cellules sont en bleu.

B. Quantification du nombre de cellules dans lesquelles les protéines du PPD sont reconnues par l'antisérum PPD.

Dans le même article, les auteurs ont démontré qu'ESX-4 de *M. tuberculosis* est impliqué dans la sécrétion de la toxine **CpnT** de *M. tuberculosis* à la surface du bacille (**Figure 13**) (Pajuelo et al., 2021). Le système ESX-4 de *M. tuberculosis* semble être fonctionnel bien qu'il soit incomplet du fait de l'absence du gène *eccE₄* (**Figure 8**), codant un des éléments structuraux du complexe de sécrétion. En effet, **EccE** joue un rôle important dans la stabilité des SST7 ainsi que dans leur fonctionnalité. Le système ESX-5 de *M. xenopi* seulement composé de EccB₅, EccC₅ et EccD₅ peut être purifié mais avec une expression plus faible, ce qui indique que ce complexe, en absence d'EccE₅, est moins stable ou que sa formation est affectée (Beckham et al., 2017). De même, la purification du complexe ESX-3 de *M. smegmatis* en l'absence EccE₃ peut-être réalisée avec succès, mais le complexe a tendance à se dissocier. Et ce complexe, composé de EccB₃-EccC₃ et EccD₃, est incapable de sécréter EsxG et EsxH, les substrats de l'ESX-3 (Famelis et al., 2019).

De plus, EccE₁ de *M. tuberculosis* est essentiel pour la stabilité de l'ESX-1 ainsi que la sécrétion de ses substrats (Soler-Arnedo *et al.*, 2020). Des études sur la structure de l'ESX-4 de *M. tuberculosis* sont donc nécessaires pour mieux comprendre comment l'ESX-4 de *M. tuberculosis* peut être stable et sécréter activement des substrats malgré l'absence d'une des protéines clé du core complexe.

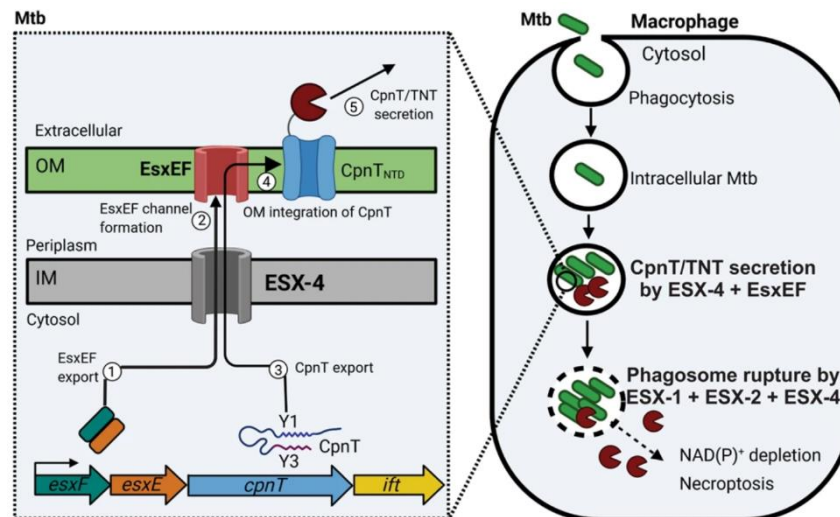


Figure 13 : Sécrétion de la toxine CpnT à la surface de *M. tuberculosis* médiée par le système de sécrétion ESX-4 (Pajuelo *et al.*, 2021)

Le complexe EsxEF est sécrété par l'ESX-4 à travers la membrane interne (1) et forme un pore dans la membrane externe (2). CpnT est sécrété à travers la membrane interne de *M. tuberculosis* par l'ESX-4 et à travers la membrane externe par le pore formé par le complexe EsxEF (3). Le domaine N-terminal de CpnT forme un pore pour la capture des nutriments dans la membrane externe (4) tandis que la toxine TNT est libérée (5) dans le cytosol des cellules lorsque la membrane du phagosome est rompue par l'action de l'ESX-1, 2 et 4.

La toxine CpnT est composée d'un domaine N-terminal qui lui permet la capture de nutriments et un domaine C-terminal, appelé TNT pour « Tuberculosis necrotizing toxin » qui hydrolyse le NAD⁺ une fois dans le cytosol des macrophages infectés et induit une nécrose des cellules infectées par *M. tuberculosis* (Danilchanka *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015). Sa sécrétion dans les cellules est dépendante de l'ESX-1, 2 et 4 probablement du fait de leur rôle dans la rupture du phagosome chez *M. tuberculosis*, permettant ainsi à la toxine d'accéder au cytosol des macrophages infectés (**Figure 13**) (Pajuelo *et al.*, 2021). Cette toxine n'appartient pas aux différentes familles de protéines identifiées jusqu'à présent comme substrats des SST7 mais possède bien le motif de sécrétion YxxxE caractéristique des substrats d'ESX (Pajuelo *et al.*, 2021). CpnT est codée par un locus à l'extérieur des locus *esx*, comprenant son antitoxine et deux gènes *esx*, codant EsxE et EsxF. Ces deux protéines sont requises pour la translocation de CpnT à la surface du bacille ainsi qu'à sa sécrétion dans le cytosol des cellules infectées (**Figure 13**) (Tak *et al.*, 2021). De plus, l'accès d'EsxF à la surface de

M. tuberculosis est aussi dépendante de l'ESX-4 (Pajuelo *et al.*, 2021). De manière intéressante l'étude sur la sécrétion de CpnT chez *M. marinum* révèle que cette toxine est quant à elle sécrétée par l'ESX-5 bien que sa sécrétion soit aussi dépendante de l'ESX-1 et 4. Ce qui confirme encore une fois qu'un même ESX peut être impliqué dans des fonctions différentes chez les mycobactéries et qu'il faut être vigilant lorsque l'on transpose des résultats d'une mycobactérie à une autre.

3.1.2. Passage des substrats à travers la membrane externe

La résolution de la structure de l'ESX-3 de *M. smegmatis* (Famelis *et al.*, 2019; Poweleit *et al.*, 2019) ainsi que de l'ESX-5 de *M. xenopi* (Beckham *et al.*, 2017; Beckham *et al.*, 2020) et de *M. tuberculosis* (Bunduc *et al.*, 2021) révèlent que le core du complexe protéique est ancré dans la membrane interne. Le mécanisme de sécrétion des substrats à travers la membrane externe des mycobactéries reste à ce jour inconnu. Mais, chez *M. tuberculosis*, plusieurs substrats des différents ESX semblent avoir été identifiés dans cette sécrétion à travers la membrane externe. Récemment, la purification d'**EsxE** et **EsxF**, sécrétés par l'ESX-4 de *M. tuberculosis* a révélé que les deux protéines pouvaient former un hétérodimère capable de s'oligomériser en un complexe interagissant avec les lipides membranaires pour former un pore dans la membrane externe, permettant ainsi la sécrétion de CpnT après passage de la membrane interne via l'ESX-4 (**Figure 14**) (Tak *et al.*, 2021).

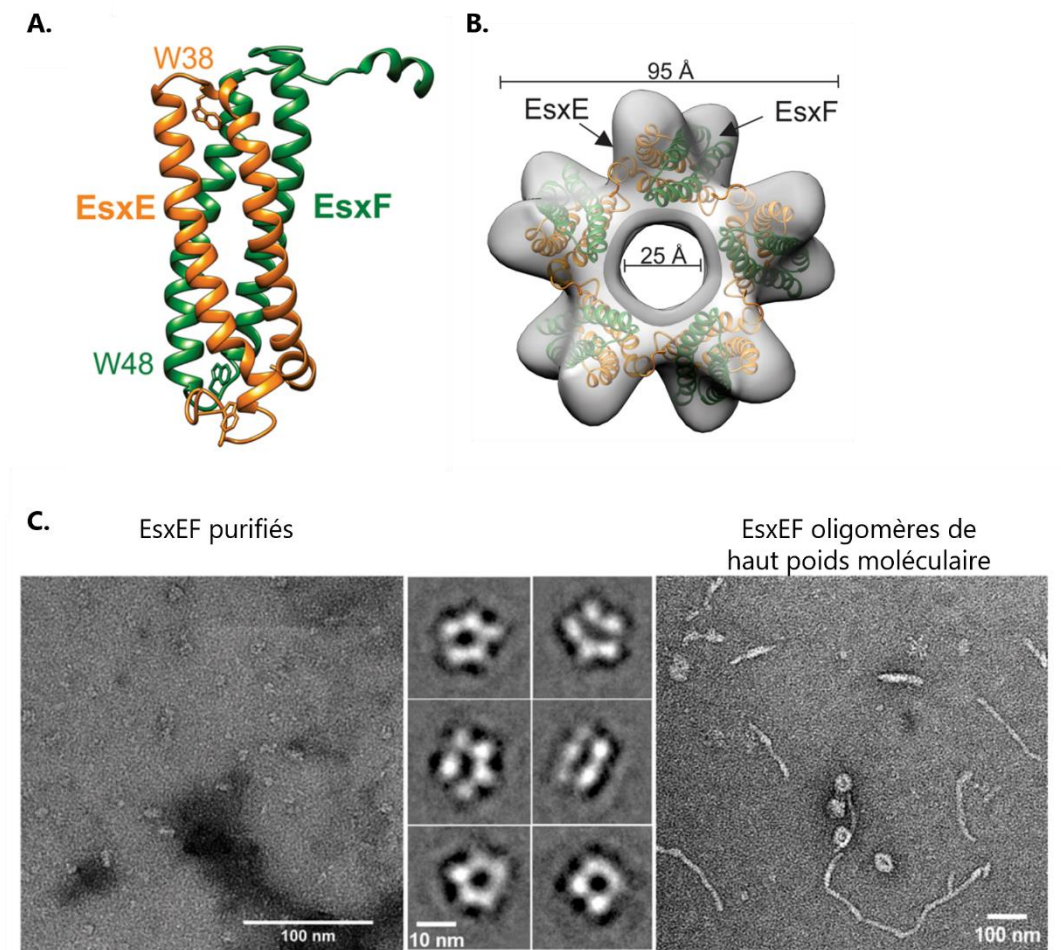


Figure 14 : La formation d'un pore par le complexe EsxEF (Tak *et al.*, 2021)

A. Hétérodimère formé par EsxE et EsxF avec leur motif WXG.

B. Reconstitution de la structure pentamérique d'EsxEF vue du dessous.

C. (A droite et au centre) Microscopie électronique du complexe EsxEF purifié. (A gauche) Microscopie électronique du complexe EsxEF de haut poids moléculaire formant des filaments.

EspC qui est co-sécrété avec EspA et le complexe EsxAB par l'ESX-1 de *M. tuberculosis* (**Tableau 2**) (MacGurn *et al.*, 2005; Fortune *et al.*, 2005), forme lors de la sécrétion un polymère capable de traverser la membrane cellulaire jusqu'à ce qu'un filament soit formé à la surface de la mycobactérie. L'hypothèse émise est qu'EspC formerait un pore permettant aux substrats d'ESX-1 de traverser la membrane externe via un mécanisme similaire au système de sécrétion de SST2, 3 ou 4 et retrouvé chez les bactéries à Gram négatif (Lou *et al.*, 2017). EspC est codé par le locus *espACD* retrouvé seulement chez certaines mycobactéries pathogènes strictes de l'homme et l'animal, et est absent chez de nombreuses mycobactéries saprophytes, ou pathogènes opportunistes, bien que certaines possèdent un locus *esx-1* à l'instar de *M. smegmatis*, une mycobactérie saprophyte. Chez ces

mycobactéries un second substrat d'ESX-1, **EspB**, pourrait également jouer ce rôle. En effet, il a été décrit comme essentiel à la survie intracellulaire chez *M. marinum* (Gao *et al.*, 2004) et à la conjugaison chez *M. smegmatis* (Coros *et al.*, 2008). La structure de EspB de *M. tuberculosis* a été résolue et révèle un domaine C-terminal non structuré ainsi qu'un domaine N-terminal qui forme un pore capable de permettre la sécrétion de substrats en hétérodimère ou le passage d'acides nucléiques (Solomonson *et al.*, 2015; Piton *et al.*, 2020). Récemment, la résolution de la structure d'EspB provenant de différentes mycobactéries a révélé que son oligomérisation serait conservée chez les MCL (*M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. haemophilum*) mais pas chez *M. smegmatis* (Gijsbers *et al.*, 2021).

D'autre part, les substrats des ESX seraient impliqués dans la sécrétion à travers la membrane externe et dans la capture de nutriments par la mycobactérie. Chez *M. tuberculosis* des **PE/PPE** localisées dans la membrane externe seraient impliquées dans la capture de nutriments. En effet, PPE51 serait essentielle à la capture de carbone tel que le glycérol, le glucose et le propionamide (Wang *et al.*, 2020). C'est notamment grâce au crible de mutants de *M. tuberculosis* résistants au propionamide que le rôle de PPE51 a pu être mis en évidence. Le mutant de la PE19, qui interagit avec PPE51 présente le même phénotype. D'autres couples de PE/PPE seraient impliqués dans la capture d'autres molécules. PE20-PPE33 et PE19-PPE25 participeraient à la capture du Mg^{2+} et celle du phosphate (Wang *et al.*, 2020). Le phénotype de l'ensemble de ces mutants *pe-ppe* est restauré par la perte de production de PDIM ainsi que par l'expression du gène de la porine *mshA* de *M. smegmatis*, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de la perméabilité membranaire dans ces deux conditions. Les auteurs émettent l'hypothèse que les PE/PPE des MCL auraient évolué pour permettre la captation de nutriments à travers leur mycomembrane fortement imperméable de par la présence de PDIM et l'absence de porines, contrairement aux MCR (Wang *et al.*, 2020).

Chez les autres mycobactéries, à ma connaissance, il n'y a pas pour l'instant de candidats pour la sécrétion des substrats ou la capture de nutriments à travers la membrane externe.

3.1.3. Régulation de l'expression des ESX

La régulation transcriptionnelle

La régulation des ESX est complexe et fait intervenir différents mécanismes. ESX-1 de *M. tuberculosis* est ainsi régulé par différents acteurs tels que CRP « cAMP receptor protein » (Rickman *et al.*, 2005), EspI lorsque le niveau d'ATP cellulaire est faible (Zhang *et al.*, 2014), des systèmes à deux composants *e.g.* MprAB, PhoPR et des « Nucleotide associate proteins » NAP *e.g.* mIHF, Lsr2 et EspR. Ces dernières sont des protéines qui interagissent avec le chromosome et jouent sur la conformation de ce dernier permettant ainsi de réguler l'expression des différentes régions du génome. Une grande partie de la régulation du locus *esx-1* passe par la régulation du locus *espACD* dont les protéines EspA et EspC sont co-sécrétées avec EsxA et EsxB par ESX-1 (MacGurn *et al.*, 2005; Fortune *et al.*, 2005).

Notamment, EspR régule ESX-1 via le locus *espACD* (Hunt *et al.*, 2012) et est lui-même un substrat de l'ESX-1 de *M. tuberculosis*. Sa sécrétion pourrait servir de boucle de rétrocontrôle (Raghavan *et al.*, 2008) (**Figure 15**). Des expériences de ChIP-Seq ont permis de montrer qu'EspR se fixerait sur lui-même ainsi que sur l'ESX-2 et l'ESX-5 (Blasco *et al.*, 2012). mIHF, une autre NAP régulerait fortement ESX-1, notamment le locus *espACD*, ainsi que l'ESX-2 et 5 (Odermatt *et al.*, 2018). L'expression d'*espR* est régulée quant à elle par le système à deux composants PhoPR, lui-même régulé par MprA (Zhang *et al.*, 2018). MprA régule aussi ESX-1 via le gène *espA* du locus *espACD* (Pang *et al.*, 2013).

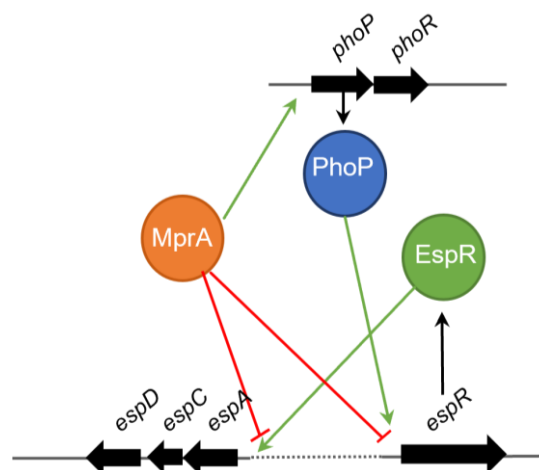


Figure 15 : Schéma non exhaustif de la régulation du locus *espACD*

De plus, PhoPR régule aussi l'expression de WhiB6, un facteur de transcription, régulant lui-même le locus *esx-1* (Solans *et al.*, 2014a). Les gènes *whiB* codent des régulateurs de transcription que l'on retrouve chez les *Actinomycetes*, il en existe sept chez *M. tuberculosis*. De surcroît, d'autres protéines

WhiB interviendrait dans la régulation des ESX. En effet, des composants des systèmes ESX-2 et 4 ont été identifiés comme des cibles potentielles régulées par WhiB5 (Casonato *et al.*, 2012).

Il est important de noter qu'un polymorphisme a été découvert dans la souche H37Rv au niveau du promoteur de *whiB6*, ayant pour conséquence une plus faible sécrétion d'EsxA dans cette souche comparativement à d'autres souches cliniques (Solans *et al.*, 2014a). Ainsi certains polymorphismes au niveau des acteurs du réseau de régulation peuvent avoir des conséquences sur des différences d'expression et de sécrétion des substrats ESX dans différentes souches cliniques. De plus, les conséquences sont pléiotropes car ces acteurs régulent d'autres gènes impliqués dans de nombreuses fonctions. Le système PhoPR régule notamment un autre système de sécrétion via un ARN non codant, le système TAT, impliqué dans la sécrétion de l'Antigène-85 (Solans *et al.*, 2014b).

La régulation de l'expression d'ESX-1 illustre parfaitement la complexité de ce réseau mais aussi la régulation qui peut exister entre les différents ESX (*i.e.* ESX-1,2 et 5 régulés par EspR) d'une même mycobactérie ainsi qu'avec d'autres systèmes de sécrétion (*e.g.* Tat).

Concernant, le locus *esx-4*, le facteur sigma, SigM, régule chez *M. tuberculosis* l'expression d'*esxU* et *esxT* appartenant au locus *esx-4*, *esxE*, et *esxF* identifiés comme substrats d'ESX-4 ainsi que d'autres PE/PPE (Raman *et al.*, 2006). Le locus *esx-3* de *M. tuberculosis* est quant à lui régulé par le régulon répresseur Zur dépendant du zinc ainsi que par le répresseur transcriptionnel IdeR dépendant du fer (Rodriguez *et al.*, 2002; Maciag *et al.*, 2007; Serafini *et al.*, 2009).

Chez *M. abscessus*, la régulation de l'ESX-3 et 4 n'a pas été explorée, mais on retrouve certains acteurs de la régulation des ESX connus chez *M. tuberculosis*. En effet, Lsr2 a été retrouvé plus exprimé dans le morphotype R (Pawlik *et al.*, 2013) et a récemment été caractérisé comme jouant un rôle important dans la virulence de *M. abscessus*, sans qu'aucun lien avec les ESX n'ait été découvert jusqu'à présent (Le Moigne *et al.*, 2019). De plus, lors du crible de la banque de mutants par transposition chez *M. abscessus*, quatre clones présentant un défaut de croissance en amibe et macrophage ont été retrouvés avec un transposon intégré au niveau des gènes *espl* et *sigM* (Laencina, 2017). Cela suggère que ces deux gènes seraient eux aussi impliqués dans la régulation du locus *esx-4* de *M. abscessus* à l'instar de *M. tuberculosis*.

La régulation post-transcriptionnelle

Il existe un second niveau de régulation des ESX, le niveau post-transcriptionnel, grâce à l'activité protéolytique de **MycP**. La protéine MycP est l'un des cinq composants principaux conservés dans les systèmes de sécrétion ESX et appartient à la famille des sérine protéases de type subtilisine. MycP est composée d'un domaine transmembranaire C-terminal, d'un site catalytique exposé dans l'espace périplasmique et d'un propeptide N-terminal (Ohol *et al.*, 2010). Classiquement, le propeptide empêche l'activité protéasique aléatoire et aide au repliement de la protéase pendant la maturation de la protéine. Ensuite, le propeptide est clivé à l'extrémité, ce qui conduit à une protéine active. Le propeptide de MycP diffère des autres protéases de type subtilisine et semble être enroulé autour du site actif (Solomonson *et al.*, 2013). Étonnamment, cette interaction ne bloque pas l'activité de la protéase mais semble stabiliser le site catalytique (Sun *et al.*, 2013; Van Winden *et al.*, 2019a). La structure du site actif diffère entre MycP des différents ESX, ce qui pourrait expliquer la spécificité du substrat de ces protéases (Wagner *et al.*, 2013). MycP₁ est essentielle pour la sécrétion via l'ESX-1 chez *M. tuberculosis* alors que le domaine protéase ne serait pas nécessaire pour la sécrétion correcte des substrats (Ohol *et al.*, 2010). Ces résultats ont été confirmés pour MycP₁ et MycP₅ de *M. marinum* (Van Winden *et al.*, 2016). Le mutant du domaine catalytique de MycP₁ de *M. tuberculosis* induit une augmentation de la sécrétion des substrats d'ESX-1 suggérant un rôle régulateur de MycP₁ par le clivage d'EspB, le seul substrat de MycP₁ décrit à ce jour (Ohol *et al.*, 2010).

3.2. Les systèmes de sécrétion ESX des MNT

Dans le cadre de notre collaboration avec les équipes d'Hambourg (EMBL), de Borstel (CNR des mycobactéries) et de Montpellier (IRIM), nous avons rédigé une revue publiée dans le journal *Microbiology*. Cette revue a pour but de faire un état des lieux de la littérature concernant les ESX chez les MNT. En effet, la majorité des articles et des revues concerne *M. tuberculosis* et *M. marinum*. Nous avons essayé de regrouper la littérature existante et largement diffusée à propos de *M. marinum* avec celle portant sur les autres MNT, tout en mettant en perspective leur virulence avec les ESX qu'elles possèdent.

Conserved and specialized functions of Type VII secretion systems in non-tuberculous mycobacteria

Marion Lagune^{1†}, Cecile Petit^{2†}, Flor Vásquez Sotomayor^{3†}, Matt D. Johansen^{4†,‡}, Kathrine S. H. Beckham², Christina Ritter², Fabienne Girard-Misguich^{1,*}, Matthias Wilmanns^{2,5,*}, Laurent Kremer^{4,6,*}, Florian P. Maurer^{3,7,*} and Jean-Louis Herrmann^{1,8,*}

Abstract

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are a large group of micro-organisms comprising more than 200 individual species. Most NTM are saprophytic organisms and are found mainly in terrestrial and aquatic environments. In recent years, NTM have been increasingly associated with infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals, prompting significant efforts to understand the diverse pathogenic and signalling traits of these emerging pathogens. Since the discovery of Type VII secretion systems (T7SS), there have been significant developments regarding the role of these complex systems in mycobacteria. These specialised systems, also known as Early Antigenic Secretion (ESX) systems, are employed to secrete proteins across the inner membrane. They also play an essential role in virulence, nutrient uptake and conjugation. Our understanding of T7SS in mycobacteria has significantly benefited over the last few years, from the resolution of ESX-3 structure in *Mycobacterium smegmatis*, to ESX-5 structures in *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium tuberculosis*. In addition, ESX-4, considered until recently as a non-functional system in both pathogenic and non-pathogenic mycobacteria, has been proposed to play an important role in the virulence of *Mycobacterium abscessus*; an increasingly recognized opportunistic NTM causing severe lung diseases. These major findings have led to important new insights into the functional mechanisms of these biological systems, their implication in virulence, nutrient acquisitions and cell wall shaping, and will be discussed in this review.

INTRODUCTION

Secretion systems are an essential part of a bacterium's life, allowing it to survive in a niche where all the conditions for growth and multiplication are present. Type VII secretion systems (T7SS) were first described in 2003 [1], although it initially began with the discovery of the deletion region 1 (RD1) [2], thanks to the use of comparative genomics, allowing genomes from pathogenic bacteria to be compared

with those from attenuated or non-pathogenic species. RD1 is absent in the non-virulent *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccine strain and present in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), a strict human pathogen responsible for tuberculosis (TB). Part of RD1 is also missing in *Mycobacterium microti* [3, 4], which is also used as a TB vaccine strain. The 'Type VII' nomenclature was then introduced in 2007 [5].

Received 01 February 2021; Accepted 06 April 2021; Published 05 July 2021

Author affiliations: ¹Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation, 78180, Montigny-Le-Bretonneux, France; ²European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Unit, Notkestraße 85, 22607 Hamburg, Germany; ³National and WHO Supranational Reference Center for Mycobacteria, Research Center Borstel, Leibniz Lung Center, Borstel, Germany; ⁴Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier, France; ⁵University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany; ⁶INSERM, IRIM, 34293 Montpellier, France; ⁷Institute of Medical Microbiology, Virology and Hospital Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁸APHP, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Service de Microbiologie, Garches, France.

***Correspondence:** Fabienne Girard-Misguich, fabienne.misguich@uvsq.fr; Matthias Wilmanns, matthias.wilmanns@embl-hamburg.de; Laurent Kremer, laurent.kremer@irim.cnrs.fr; Florian P. Maurer, fmaurer@fz-borstel.de; Jean-Louis Herrmann, jean-louis.herrmann@aphp.fr

Keywords: type VII secretion system; ESX; pathogenesis; non-tuberculous mycobacteria.

Abbreviations: Cryo-EM, cryo-electron microscopy; DCT, distributive conjugal transfer; DUF, domain of unknown function; Ecc, ESX conserved component; Esp, ESX secretion associated protein; ESX, early antigenic secretion systems; GDND, glycosyl diacylated nonadecyl diol lipid; NTD, N-terminal domain; NTM, non tuberculous mycobacteria; PDIM, phthiocerol dimycoserate; RD1, region of difference 1; RGM, rapidly-growing mycobacteria; SGM, slow-growing mycobacteria; TB, tuberculosis; TMH, transmembrane helix; TPR, tetratricopeptide repeats; T7SS, type VII secretion systems; Ubl, ubiquitin like.

†Present address: Centre for Inflammation, Centenary Institute and University of Technology Sydney, Faculty of Science, Sydney, NSW, Australia.

‡These authors contributed equally to this work

RD1 is a large genetic region encompassing two loci encoding small proteins, termed ESAT-6 and CFP-10 [6], known as important T-cell antigens and included in Interferon-Gamma Released Assays for the diagnosis of TB [7]. Both proteins play an important role in the virulence of *Mtb* [8–10]. Based on specific amino acid signatures within the N- and/or C-terminal domains of ESAT-6 and CFP-10 of the Early Antigenic Secretion-1 (ESX-1) machinery, additional ESX/T7SS have been discovered [11–13].

Type VII secretion systems are not specific to mycobacteria, as they are also found in other bacterial genera, such as the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* [14], where they appear to be simpler than their mycobacterial counterparts, with only one ATPase containing FtsK/SpoIIIE domains and a few secreted substrates [14], hence their designation as Type VIIb secretion systems [5, 15].

Esx loci appear to be involved in bacterial virulence [16], modulation of the host cell's response [17, 18], horizontal gene transfer of long DNA fragments [19], acquisition of nutrients [20–22], or in the maintenance of the bacterial cell wall integrity [23]. It is worth mentioning that these functions are allocated to ESX-1-3-4 and 5 and to date, no roles have been ascribed to ESX-2.

Major advances regarding the structure and function of the *esx* encoding loci, made it possible to elucidate the minimal structural arrangement required to generate a functional T7SS and to highlight the interactions between the different protein subunits composing these complex machineries [24–28]. On the other hand, recent discoveries have implicated a functional role of ESX-4 in the virulence of *Mycobacterium abscessus* (*Mab*) [29], an opportunistic rapidly-growing mycobacterium responsible for severe lung infections, particularly in patients with underlying pulmonary disorders, such as cystic fibrosis [30]. While the ESX systems in *Mtb* have been largely presented in previous reviews focusing mainly on ESX-1, the purpose of this review is to highlight the recent and unexpected findings on ESX systems in non-tuberculous mycobacteria (NTM).

Evolution of *esx* loci in mycobacteria

The presence of ESX/T7SS on the mycobacterial chromosome arises from horizontal gene transfer from *esx* loci present on plasmids, with the exception of the ancestral locus *esx-4* and 'esx-4 like' loci [31, 32]. The acquisition of the five loci, *esx-1* to *esx-5*, represents a major advance in the emergence and evolution of mycobacteria as strictly pathogenic to humans and animals [5, 11, 33, 34]. A comparative 'pan-genome' approach based on all currently available sequenced mycobacterial genomes identified five *esx* phylogenetic groups, confirming this ESX categorization. This underscored the ancestral nature of the *esx-4* locus, together with new *esx-4* like loci, and facilitated the discovery of new loci of unknown function harboured by mycobacterial mega-plasmids [31, 32].

Two phylogenetic studies on ESX reported the occurrence of *esx-4* loci, considered as the ancestral *esx* locus and several *esx-4* like loci, such as an *esx-4* bis locus [31, 32] (Fig. 1). Both studies describe an intact *esx-4* like locus that includes the essential elements for the constitution of the functional T7SS core required for the secretion of the specific substrates and found in *Nocardia* spp, a non-mycobacterial Actinobacterium [31, 32]. Comparatively, *esx-4*, referred to as the ancestral system, contains fewer genes [31, 32]. In fact, the likely scenario is the transfer of ancestral *esx-4*-like loci onto plasmids, which would have undergone major rearrangements leading to the different *esx* loci. These different types of *esx* would have been incorporated into the mycobacterial genomes, resulting in the four loci designated *esx-3*, *esx-1*, *esx-5* and *esx-2* [31, 32]. The acquisition patterns seem to differ between studies, with a first duplication resulting in the generation of *esx-1* [31, 35, 36] or *esx-3* [32], followed by the acquisition of *esx-2* and finally *esx-5* [31, 32, 35] (Fig. 1). Comparatively, *Mab* possess only two ESX (ESX-3 and ESX-4), while *Mycobacterium marinum* (*Mma*) and other strict human and animal pathogenic species, such as *Mtb*, harbour more ESX systems (Table 1).

The substrates secreted by T7SS have also evolved in parallel to the ESX systems, including genes encoding proteins called PE and PPE (discussed in further detail later) [35]. Their identification is facilitated by the presence of signatures within the N and/or C-terminal domains of these proteins. A phylogenetic study of the genes encoding these proteins confirms the evolutionary pathway of *esx* loci, with *esx-1* acquired first, followed by *esx-3*, *esx-2* and *esx-5*. The acquisition of the latter two *esx* loci coincides with the separation between slow- and rapidly-growing mycobacteria (SGM and RGM, respectively). In addition, the acquisition of *esx-5* led to the extensive duplication of *pe* and *ppe* genes throughout the mycobacterial genomes in pathogenic mycobacteria [32, 35]. The relationship between the number of *esx* loci and the growth rate is unknown. ESX acquisition likely contributes to the persistence within a dedicated ecological niche, as observed for *Mma*, a NTM pathogenic to humans and aquatic animals, which possesses four out of five ESX, while also missing ESX-2; the only ESX system so far with an unassigned function (Table 1) [37].

Structural overview of the Type VII secretion machinery

Each *esx* locus encodes components required for the targeted transfer of folded heterodimeric substrates from the cytoplasm across the mycobacterial cell envelope. These components include membrane proteins that form the secretion machinery, soluble components and secretory proteins [34, 38]. The conserved membrane proteins encoded by the *esx* loci are EccB (ESX Conserved Component), EccC, EccD, EccE and MycP, which are found through all the ESX systems, with the exception of EccE that is absent in the ESX-4 system of most mycobacterial species, with the notable exception of *Mab* [29]. Here, we will present an overview of the structural

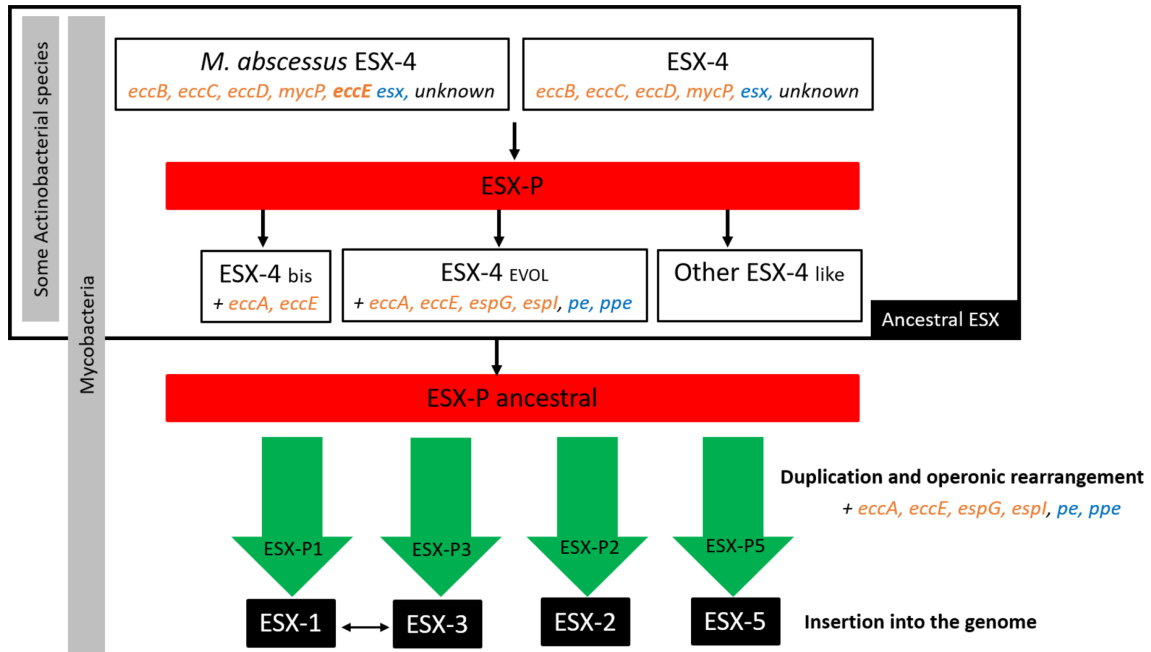


Fig. 1. Evolution of ESX systems (based on Newton *et al.*, 2016 [32] and Dumas *et al.*, 2016 [31]) ESX-4 and ESX-4 like are the ancestral ESX. ESX-4 like are the intermediate between ESX-4 and the other ESX duplications. ESX evolution is plasmid-mediated and leads to the insertion of ESX in mycobacterial genome with first ESX-1 or ESX-3 insertion, then ESX-2 and ESX-5 in slow growing mycobacteria.

and functional data relating to the individual components and how they assemble to form the T7SS complex.

T7SS subunits EccB, EccC, EccD, EccE and MycP

EccB is composed of a short cytosolic domain, a single trans-membrane helix (TMH) and a large periplasmic domain. A structure of the periplasmic domain of EccB revealed a structure consisting of a central domain flanked by two repeat domains [39]. Interestingly, EccB has homology with the phage lysin PlyCB, that acts on bacterial cell walls indicating a role in peptidoglycan binding in the mycobacterial cell envelope [39].

EccC belongs to the superfamily of FtsK/SpoIIIE AAA+ATPases and is composed of two TMH connected by a domain of unknown function (DUF), followed by three consecutive ATPase domains [40]. Of note is the division of *eccC* from the *esx-1* locus into two genes producing EccCa₁ and EccCb₁ which form a stable complex [1]. The hydrolysis of ATP by EccC is responsible for driving the secretion of substrates across the membrane. In particular, the ATPase activity of the first ATPase domains is crucial for substrate secretion [22]. The C-terminal ATPase domain and the linker between the first and second ATPase domain is considered as receptor for the secreted substrates [40, 41]. Perhaps key to the function of EccC is its intrinsic flexibility, which presumably enables the T7SS to accommodate a wide range of substrates [24, 40].

EccD is composed of a small N-terminal cytosolic ubiquitin like (Ubl) domain followed by an integral membrane region consisting of 11 TMH [39]. These helices have been shown to

form a dimer around a central cavity [25]. The role of EccD as a scaffold protein became apparent following the characterization of the T7SS, described in further detail below.

EccE is composed of two TMH, a linker made of a single stalk helix and a cytosolic domain made of a nine-stranded antiparallel β -sheet surrounded by six helices [25, 26]. EccE is found in all ESX systems apart from the ESX-4 where it is noticeably absent, with the exception for the *Mab* ESX-4 secretion complex. The presence of EccE is presumably responsible for producing an active secretion system in *Mab* implying that EccE is crucial for the overall function and stability of the T7SS [29].

MycP or mycosin, is a subtilisin-like membrane anchored protease, present in the periplasm. MycP is composed of an N-terminal Sec secretory signal sequence, followed by a putative propeptide sequence, and a catalytic domain that is linked to a single TMH proposed to anchor MycP to the inner membrane [42–44]. The X-ray structures of the catalytic domain of *Mycobacterium thermoresistibile* MycP₁, *Mycobacterium smegmatis* (Msm)-MycP₁, and of Msm-MycP₃ revealed a seven-stranded-parallel β -sheet core surrounded by eight α -helices [45–47]. The catalytic domain of MycP displays three proline- or glycine-rich loops that mediate MycP:MycP interactions. These loops decorate the protease active site making a deep binding pocket that is highly substrate specific and highly variable between homologues [46, 48]. So far, only one target, ESX secretion associated protein B (EspB), has been identified as a MycP1 substrate and hence the significance of this

Table 1. The different ESX systems found in mycobacteria (table based on Newton et al., 2016 [32]; Dumas et al., 2016 [31]; Ummels et al., 2014 [104]; Everall et al., 2017 [109]; Kim et al., 2019 [110]). Black circle=chromosomal ESX; Black square, ancestral ESX-2 that contains all of the ESX-2 components and precedes both the ESX-2 and ESX-5 systems; black triangle, ESX-4 lacking EccE₄

	Species	ESX-1	ESX-2	ESX-3	ESX-4	ESX-5	espACD	Plasmid-encoded ESX	Pathogenicity
RGM	<i>M. abscessus</i> complex								opportunistic
	<i>M. abscessus</i> ATCC 19977			●	●				opportunistic
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>			●	●			pMBOL plasmid 2	opportunistic
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>			●	●			pMAB02	opportunistic
	<i>M. neoaurum</i>	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. gilvum</i>	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. vaccae</i> ATCC 25954	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. vanbaalenii</i>	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. thermoresistibile</i>	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. chubuense</i>	●			▲			pMYCCH.01 pMYCCH.02	saprophyte
	<i>M. fortuitum</i>	●		●	▲				opportunistic
	<i>M. smegmatis</i>	●		●	▲			pMYCSM01 to pMYCSM03	saprophyte
	<i>M. sp.</i> JLS	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. phlei</i>	●		●	▲				saprophyte
	<i>M. rhodesiae</i>	●		●	▲				opportunistic
SGM	<i>M. tusciae</i> JS617	●	■	●	▲				saprophyte
	<i>M. terrae</i> complex								opportunistic
	<i>M. sinense</i> JDM601		●	●	▲	●			opportunistic
	<i>M. xenopi</i>		●	●	▲	●			opportunistic
	<i>M. avium</i> complex								opportunistic
	<i>M. avium</i>		●	●	▲	●		pRAW-like pMAH135	opportunistic
	<i>M. intracellulare</i>		●	●	▲	●			opportunistic
	<i>M. colombiense</i>		●	●	▲	●			opportunistic
	<i>M. yongonense</i> 05-1390		●	●	▲			pMyong1	opportunistic
	<i>M. indicus pranii</i>		●	●	▲	●			saprophyte
	<i>M. sp.</i> MOTT36Y		●	●	▲	●			opportunistic
	<i>M. paragordona</i>	●	●	●	▲	●		pMpg-1 and 2	saprophyte
	<i>M. kansasii</i>	●	●	●	▲	●	✓	pMK12478	opportunistic
	<i>M. ulcerans</i>			●	▲	●			pathogen
	<i>M. marinum</i>	●		●	▲	●	✓	pRAW	pathogen

proteolytic activity in other ESX systems remains unknown [45, 46, 48, 49].

ESX pore assembly

Recent studies on *Msm* ESX-3, *Mycobacterium xenopi* (*Mxe*) ESX-5 and *Mtb* ESX-5 have provided in-depth insights into the structural features of the membrane embedded secretion machineries built by the conserved membrane components EccB, EccC, EccD and EccE [24–28]. In addition, MycP, which appears to only transiently associate with the different ESX systems when being reconstituted, is present in the recent

structure of the *Mtb* ESX-5 system [27]. Common to all these structures is a three-layered overall organization, including a cytosolic segment, a TM segment and a periplasmic segment. While most of the TM segment and TM-proximal regions at the cytosolic face are relatively rigid and thus could be visualized at high resolution, the distal part of the cytosolic segment and the periplasmic segment tend to be more flexible.

Two *Msm* ESX-3 cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures revealed the dimeric arrangement of two identical protomeric units built by the four conserved subunits EccB,

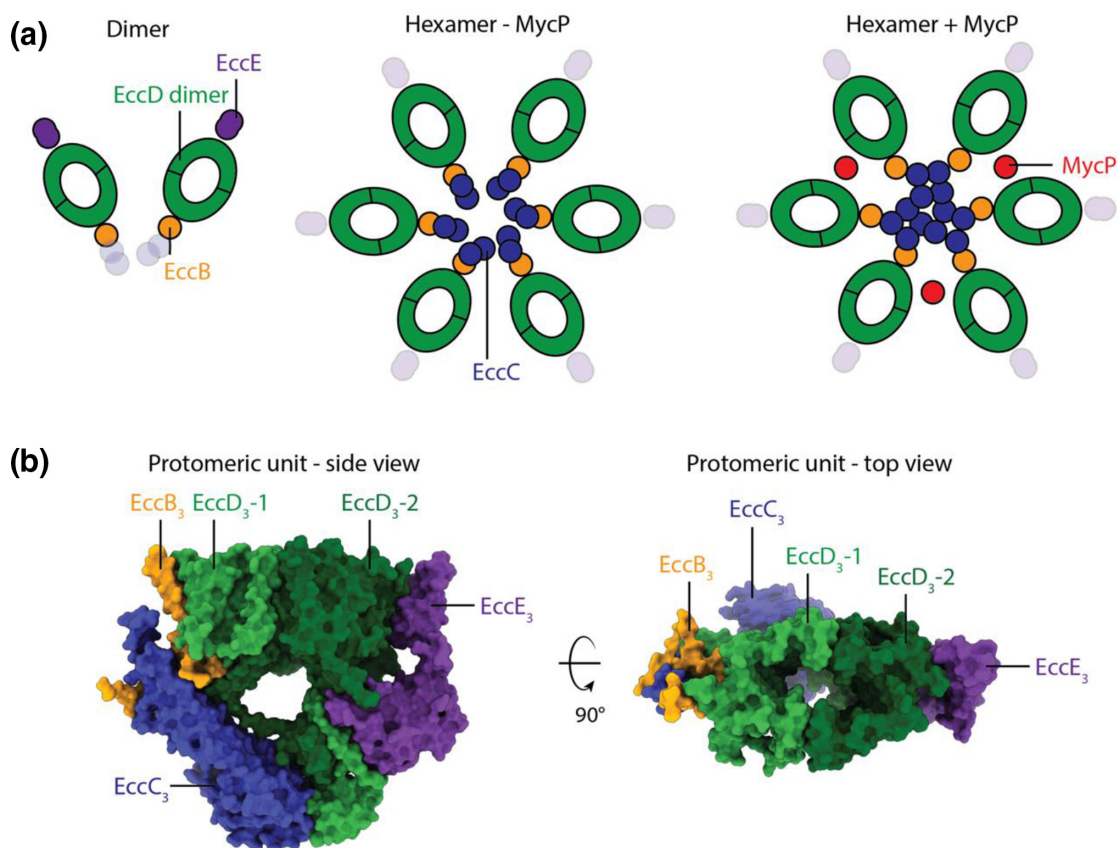


Fig. 2. Architecture of the T7SS. (a) Schematic arrangement of the conserved components EccB (orange), EccC (blue), EccD (green), EccE (purple) and MycP (red) within the membrane for the dimeric ESX-3 (Poweleit et al., 2019 [26] Famelis et al., 2019 [25]) and each of the two solved hexameric structures of ESX-5 (Beckham et al., 2020 [28]; Bunduc et al., 2020 [27]). Low resolution information is indicated by reduced opacity. As the structures on a protomeric level share high similarity, it seems plausible that a common T7SS architecture exists. (b) Side and top view of the protomeric unit of ESX-3 (6SGX), shown in surface representation.

EccC, EccD and EccE in a 1:1:2:1 stoichiometry [25, 26] (Fig. 2a, b). These results were surprising, as they contradicted the nature of EccC as its homologue FtsK belongs to a family of hexameric ATPases and are in contrast with a previous low-resolution structure of *Mxe* ESX-5, that revealed a hexamer with a central pore [24]. Thus, both structures are considered as building blocks of a complete hexameric ESX-3 assembly.

In contrast, the recent ESX-5 structures from *Mtb* and *Mxe* both display a hexameric arrangement, built by six protomeric units similar to those in the dimeric ESX-3 structures [27, 28] (Fig. 2a). The similarity of the ESX-3 and ESX-5 structures from different mycobacterial species suggests that despite their diverse roles (see below) the ESX systems share a common architecture even across different mycobacterial species. Common to all ESX structures characterised to date, the TM segment includes an asymmetric EccD dimer central to the protomeric unit that forms a pore-like structure on its own. This pore has an approximate size of 2×4 nm a diameter and would, thus, be large enough to translocate folded substrates across the membrane, such as Esx, Esp and PE/PPE proteins (Fig. 2a). The absence of the central pore in the

dimeric assemblies led to the speculation that the EccD pore could have such a function [25, 26]. However, in most of the cryo-EM maps available at present, extra density within this cavity was observed that has been attributed to lipids plugging the cavity [26–28]. In addition, the two EccD subunits in each protomeric unit act as a scaffold, by interacting with EccB and EccE [25–28]. Given its distal location within the TM segment, it is not surprising that the EccE TMHs are considerably more flexible or even invisible in present structural data of ESX TM complexes [25–28].

The EccB TMH, together with the N-terminal cytosolic helix of EccB form an L-shape, as the N-terminal helix is positioned parallel to the membrane. This parallel helix forms electrostatic interactions with the EccC stalk domain that connects the EccC TMHs to the cytosolic DUF domain. In the cytosol, the DUF and stalk domain are encompassed by EccD. The stalk domain interacts with a loop originating from TMH 6 and 7 from EccD-1 and the cytoplasmic linker of EccD-2 that links the EccD-2 UBI domain with the TM domain. The DUF domain is surrounded by a dimer formed by the two UBI domains. On the opposite side of the two

Ubl domains, the cytoplasmic domain of EccE (Fig. 2b) is situated.

New insights into possible conformations of EccC came from the *Mtb* ESX-5 structures, where low resolution density allowed approximate fitting of the three consecutive EccC ATPase domains [27], suggesting two possible conformations, e.g. contracted toward the cytosol and extended along the membrane. Additionally, the conformation of the central secretion pore differs substantially between *Mtb* and *Mxe* ESX-5, thus possibly representing different states in the secretion process. Remarkably, the pore in the *Mxe* ESX-5 complex is considerably more dynamic than most other parts of the TM segment, suggestive of a high level of structural dynamics required for pore opening. In addition, while the *Mxe* ESX-5 structure shows an extended cleft at the periplasmic face of the pore, formed by a dimer of trimers by the periplasmic EccB domains, the periplasmic EccB domains of the *Mtb* structure are locked into a trimer of dimers conformation by three MycP protease domains, that plug the pore (Fig. 2a, b) [27, 28].

In summary, although the very recent high-resolution structures of two related complete ESX complexes considerably advance our knowledge about the overall architecture of mycobacterial T7SS, many mechanistic questions still remain unresolved. Comparison of the structures provides first clues into level of structure dynamics required for ESX substrate gating, recognition, translocation, release and associated regulation of translocation activity through an opened secretion pore. The precise role of loosely associated MycP remains a major open question, especially as to how its structural and functional roles as a protease may be inter-connected. Overall, the present structural data indicate that diversity in ESX architecture may be dominated by different conformational states that range from an inactive closed state to an active, secretion-competent open state, rather than by differences originating from different ESX members and species. However, the present data are still too limited to draw definite conclusions on factors that lead to NTM diversity in different ESX machineries.

The ESX substrates and cytosolic components

ESAT-6 and CFP-10, also designated EsxA and EsxB, were the first canonical Type VII secreted proteins described in *Mtb*. This family is characterized by their helix-turn-helix structure and a WxG motif located within the helix-turn-helix structure, and are comprised on average, 100 amino-acids [50]. The second family of ESX substrates is represented by PE and PPE proteins, characterized by the presence of Pro-Glu (PE) or Pro-Pro-Glu (PPE) motifs at the N-terminus, comprising 110 and 180 amino-acids, respectively [35]. A key element is the polycistronic organization of the different T7SS substrates, and often their co-transcription. These proteins form an anti-parallel heterodimeric four-helix bundle complex shown to be secreted fully folded [51]. Another key feature of T7SS substrates is the presence of a YxxxD/E motif at the C-terminus, as a secretion signal required to target T7SS,

and to modulate binding and activity of the key ATPase EccC [50, 52, 53]. The high degree of conservation of these motifs within the T7SSs' substrates indicates that they play an essential role by targeted T7SS secretion.

PE and PPE proteins represent a highly heterogeneous group of proteins with diverse biological functions, modifications in the C-terminal domain due to acquisition of repetitive elements leading to the formation of PE-PGRS and four subfamilies within the PPE proteins, occurring at specific milestones in the evolution of mycobacteria, most notably the acquisition of ESX-5 in SGM [35]. Strikingly, the largest number of these PE and PPE proteins are found in strictly pathogenic mycobacteria such as *Mma* representing almost 10% of its coding capacity, or *Mycobacterium ulcerans* (*Mul*) comprising 21 and 121 genes (including pseudogenes) encoding PE and PE-PGRS proteins, respectively. In contrast, only ten genes encoding PE proteins and no genes encoding PE-PGRS proteins are found in *Mycobacterium avium* (*Mav*) [54]. Similarly, 81 genes (including pseudogenes) coding for PPE proteins are present in *Mul* or *Mma* versus 37 in *Mav* [35]. Correlatively, only three PE and six PPE proteins were reported in the opportunistic pathogen *Mab* [55]. EspG seems a key 'chaperone' for the secretion of PE and PPE proteins based on studies showing that the EspG₅ or EspG₁ binding domain controls PE and PPE secretion by directing the ESX specific substrates to the corresponding ESX complex [53, 56–58]. Regarding EspG, this cytosolic protein is conserved in all ESX systems with the exception of ESX-4 and acts as a molecular chaperone for PE and PPE proteins [59]. Structures of EspG have been solved either alone or in complex with PE/PPE proteins [59, 60].

Esp, are active members of the ESX-1 machinery and represent the third family of ESX-substrates. *Esp* genes are encoded within the *esx-1* locus, with the exception of *espA*, *espC* and *espD* located within the *espACD* locus. This locus, regulated by the EspR protein [61], is mostly encountered in strict pathogens, such as members of the *Mtb* complex, *Mycobacterium leprae*, *Mma* and opportunistic pathogens like *Mycobacterium kansasii* (*Mka*) [62] (Table 1). In *Mtb* ESX-1, EspA and EspC secretion is co-dependent on that of EsxA-B [63, 64]. EspB, in ESX-1 secretion, is essential for *Mma* intracellular survival in macrophages [65] and proper conjugation in the *Msm* [66] (see below). EspE, EspF and EspM have recently been demonstrated to negatively regulate *esx-1* gene expression through the WhiB6 transcription factor in *Mma* [67–69]. EspE and EspF proteins share a dual function in *Mma* by negatively regulating *esx-1* expression inside the cytoplasm and, after secretion, by their involvement in virulence and lytic activity unrelated to EsxA and EsxB [68]. EspH was shown to interact with EspE, while an *espH* *Mma* mutant abolished secretion of both EspE and EspF. These results suggest EspH may intervene as a chaperone-like protein [56]. An EspI-like protein, uncovered by a transposon library screening in *Mab*, appears to play a role in intra-amoebal and intra-macrophage survival [29].

Finally, EccA (65 kDa), is characterized by a C-terminal ATPase domain belonging to the CbxX/CfqX AAA⁺ ATPase superfamily

Table 2. Function of ESX and their substrates in various NTM

NTM species	ESX	ESX substrates	ESX/ substrate function
<i>M. marinum</i>	ESX-1	EsxA	EsxA is involved in haemolysis, cytotoxicity, cytolysis (Gao <i>et al.</i> , 2004 [65]) host cell membrane lysis through pore formation (Smith <i>et al.</i> , 2008 [80]) and in phagosomal rupture (Simeone <i>et al.</i> , 2012 [79]). Controversial role of EsxA in virulence (Conrad <i>et al.</i> , 2017 [77]; Lienard <i>et al.</i> , 2019 [18]).
		EspB	EspB is essential for intracellular living (Gao <i>et al.</i> , 2004 [65]).
		EspE, EspF	EspE and EspF negatively regulate the <i>esx-1</i> locus through WhiB6 transcription factor (Chirakos <i>et al.</i> , 2020 [68], Sanchez <i>et al.</i> , 2020 [69]) inside cytoplasm and after secretion promote virulence and lytic activity (Chirakos <i>et al.</i> , 2020 [68]).
		EspM	EspM negatively regulate the <i>esx-1</i> locus through WhiB6 transcription factor (Chirakos <i>et al.</i> , 2020 [68], Sanchez <i>et al.</i> , 2020 [69]).
		EspH	EspH was shown to interact with EspE. EspH could undertake a chaperone-like role. Moreover, EspH is involved in haemolysis and growth in macrophage (Phan <i>et al.</i> , 2018 [56])
		MMAR_2894	MMAR_2894 is a PE involved in the haemolysis activity but not in the phagosomal membrane lysis. MMAR_2894 is also important for the secretion of other ESX-1 substrates (Bosserman <i>et al.</i> , 2019 [84]).
	ESX-5	PPE38	PPE38 is involved in host immune modulation and biofilm and cords formation (Dong <i>et al.</i> , 2012 [95]; Wang <i>et al.</i> , 2013 [96]).
		PPE10	ESX-5 and its substrates PPE10 are involved in capsule integrity (Ates <i>et al.</i> , 2016 [23]).
		PecA	PecA is protease that clive the PE motif of ESX substrates to the bacterial surface (Burggraaf <i>et al.</i> , 2019 [94]).
		LipY	LipY is a lipase possessing a PE motif and secreted by <i>Mma</i> ESX-5 (Daleke <i>et al.</i> , 2011 [111]).
<i>M. abscessus</i>	ESX-4	EsxU and EsxT	ESX-4 is involved in phagosomal membrane damage and prevent acidification. EsxU and EsxT seems to be secreted by ESX-4 in the secretome analysis (Laencina <i>et al.</i> , 2018 [29]).
	ESX-3	/	ESX-3 seems to be involved in virulence (Kim <i>et al.</i> , 2017 [106]), although this needs confirmation through complementation.
<i>M. smegmatis</i>	ESX-1	/	ESX-1 in the donor seems to negatively regulate DCT (Flint <i>et al.</i> , 2004 [99]) while the ESX-1 in the recipient is essential for DCT (Coros <i>et al.</i> , 2008 [66]).
	ESX-3	EsxG and EsxH	<i>esx-3</i> promoters are induced as a function of iron content (Fang <i>et al.</i> , 2017 [112]). ESX-3 is involved in iron uptake via a mycobactin dependent mechanism (Siegrist <i>et al.</i> , 2009 [20]). EsxG and EsxH are secreted by ESX-3 (Famelis <i>et al.</i> , 2019 [25])
	ESX-4	EsxU and EsxT	ESX-4 is involved in conjugation in the recipient strain. <i>esxU</i> and <i>esxT</i> transcripts are induce in the recipient strain but active secretion has not been proven (Gray <i>et al.</i> , 2016 [100]; Clark <i>et al.</i> , 2018 [101]).
<i>M. avium</i>	ESX-5	PPE25	PPE25 is involved in blocking the phagosomal acidification. It is an important factor for the growth in macrophages <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in mice (Li <i>et al.</i> , 2005 [54]). Moreover, PPE25 was shown to interact with an Esx protein (McNamara <i>et al.</i> , 2012 [97]).
<i>M. kansasii</i>	ESX-1	/	ESX-1 is proposed to be associated with the <i>espACD</i> locus that was demonstrated to be involved in virulence (Guan <i>et al.</i> , 2020 [87]).

(ATPase Associated to diverse cellular Activities) [70] and an N-terminal domain (NTD) composed of six tetratricopeptide repeats (TPR) interrupted between the second and third TPR by a β -finger [71]. To date, there is only one EccA structure, consisting of the NTD *Mtb*-EccA₁ (71). The role of EccA in secretion has been shown to be strain- and ESX-specific. Previous work attempting to identify EccA₃ interaction partners showed binding to the secreted substrates EsxG-H, EspC/EsxAB [72]. In addition, interactions between components of

the type II fatty acid synthase and EccA₁ hinted at EccA playing a regulatory role of mycolic acid synthesis in *Mma* [73]. Owing to the ATPase activity, it has been postulated that EccA may play a role in the dissociation of EspG-PE-PPE complexes [56, 74].

Mycobacterial virulence

ESX-1 and ESX-5 have been the most studied ESX systems within the context of mycobacterial virulence. Recently,

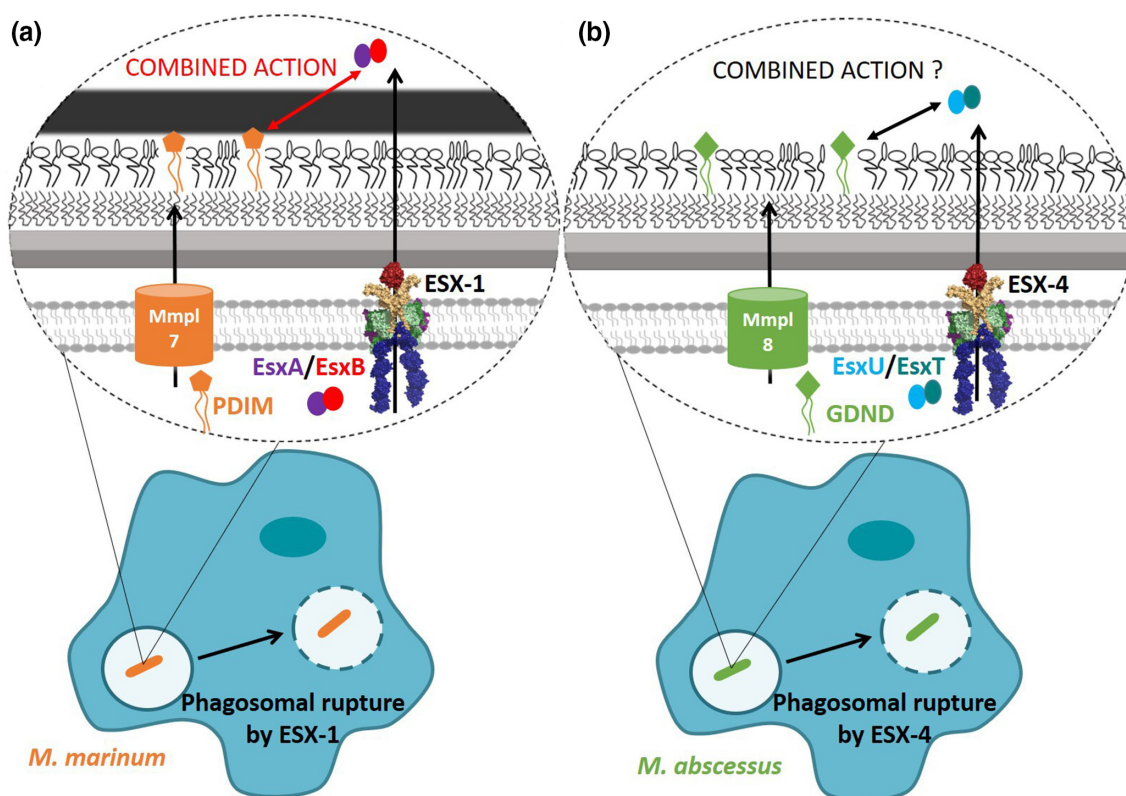


Fig. 3. Synergistic action of ESX and lipids to achieve phagosomal membrane rupture in infected macrophages. (a) Combined action between the secretion system ESX-1 and the phthiocerol dimycoserate lipid (PDIM), secreted by Mmpl7, for the phagosomal escape of *M. marinum* (Osman et al. 2020 [83]). (b) Hypothetical combined action between the secretion system ESX-4 and the glycosyl diacylated nonadecyl diol lipid (GDND), secreted by Mmpl8_{MAB}, for the disruption of the phagosomal membrane by *M. abscessus*.

ESX-4 was shown to play a similar role in *Mab* virulence [29] (Table 2). The biological function of ESX complexes, particularly ESX-1, have been extensively scrutinised for their association with virulence in the *Mtb* complex [2, 3, 75]. Among NTM, ESX-1-dependent virulence mechanisms have largely been explored in *Mma*, often used as a surrogate model to study *Mtb* pathogenesis [76]. *Mma* ESX-1 has been implicated in haemolysis [65, 77], phagosomal escape [18, 78, 79], cell-to-cell spread [65] and host cell death [79]. There are several reports on the pore-forming activity of EsxA, upon interaction with host cellular membranes, leading to cytosol access and cell lysis [80]. Moreover, the ESX-1 cell membrane lysis activity in *Mma* was demonstrated to be a contact-dependant process inducing membrane disruption, albeit the pore-forming and lytic activity of EsxA has been proposed to be due to residual detergent present after protein purification EsxA [77]. However, it remains to be determined whether EsxA on its own is involved in phagosomal escape, as many contradictory results are found in the literature [18, 65, 79]. Recent studies support the view that EsxA requires additional partners to trigger phagosomal escape of *Mtb*. For instance, EsxA membrane permeabilization is potentiated by the phthiocerol dimycoserate (PDIM), which are cell-surface associated lipids capable of disrupting

the biochemical properties of host membranes [81, 82]. The combined action of PDIM and ESX-1 in phagosomal membrane disruption was confirmed in *Mma* [83]. Indeed, a mutant defective in Mmpl7, the transporter of PDIM, demonstrated decreased phagosomal permeabilization similarly to the ESX-1 deletion mutant [83] (Fig. 3a). Moreover, the Mmpl7 mutant retains haemolytic activity, suggesting a different mechanism of membrane damage in red blood cells [83]. *Mma* haemolysis appears to imply another ESX-1 substrate; notably a *pe* mutant (*MMAR_2894*) encoding a PE protein secreted by ESX-1, displays a red blood cell lysis defect while maintaining cytolysis activity in macrophages [84]. Moreover, this PE is necessary for the secretion of other ESX-1 substrates, such as EsxA and possibly other proteins involved in *Mma* virulence [84].

Following access to the cytosolic compartment, several host cell responses are induced via an ESX-1-dependent mechanism. There is a type I interferon response after infection, which may be related to the release of mitochondrial and nuclear DNA in the cytosol [18]. The ESX-1 system from *Mma* also plays an important virulence function in zebrafish, promoting the formation of granulomas, which play a critical role in constraining mycobacterial dissemination [76, 85].

However, since ESX-1 is missing in *Mab*, a bacterium which can also have access to the cytosolic compartment of macrophages, it has been proposed that this may be achieved by ESX-4 in this species [29], although this remains to be addressed experimentally. Phagosomal escape has also been observed in other NTM species, such as *Mycobacterium szulgai*, as well as the opportunistic *Mka* type I strains, which has also been reported to secrete major ESX-1 virulence proteins EsxA and EsxB [78, 86]. The ESX-1 virulence seems to be associated with the *espACD* locus [33, 62, 79]. Indeed, the *espACD* operon is found in mycobacteria inducing a phagosomal rupture through an ESX-1 mechanism. The *espACD* operon is notably present in the *Mka* subtype I, the most frequently identified subtype in clinical isolates, while this operon is absent in other subtypes. The virulence function of the *espACD* operon was confirmed by the complementation of *Mka* subtype II, which does not harbour this operon [87], further suggesting that this operon may be a critical determinant of ESX-1 virulence. Interestingly, in the saprophyte *Msm* possessing ESX-1, *espACD* operon is absent which may explain differences in the pathogenicity of these species (Table 1).

ESX-4

In *Mab*, the screening of a transposon library to identify the genes required for growth in amoeba and macrophages revealed the importance of the *esx-4* locus where 12 transposon insertions were identified [29]. Comparatively, no clones with a transposon insertion and attenuated growth were identified in the *Mab* *esx-3* locus, suggesting that ESX-3 is indispensable for growth in amoeba and macrophages. Deletion of the gene coding for an ESX-4 structural protein, EccB₄, led to a loss of the capacity of *Mab* to block acidification and phagosomal membrane disruption in infected macrophages [29], two intracellular survival strategies employed by wild-type *Mab* [88]. Importantly, an *eccB₄* deletion mutant showed partial reduction in the secretion of ESX-4 effector proteins: EsxT and EsxU, which are respectively homologs to EsxB and EsxA of *Mtb* ESX-1 [29]. These results support the view that *Mab* ESX-4 functions as a secretion apparatus and importantly with respect to the phenotype conferred to the *eccB₄* mutant, one may ascribe ESX-4 the same functionalities as those attributed to ESX-1 in strict pathogenic mycobacteria. While there is no reported virulence-associated function for ESX-4 in any other mycobacterial species, the identified function of *Mab* ESX-4 could reasonably be explained by the presence of EccE₄ found exclusively in the *M. abscessus-chelonae* complex [31]. This raises the question of whether ESX-4 is functional in the absence of EccE₄, or whether EccE₄ represents an essential ancestral component for the proper functioning of ESX-4.

Interestingly, another transposon resulting in defective phagosome membrane disruption was identified in *mmpL8*, encoding a transporter of a newly described lipid designated glycosyl diacylated nonadecyl diol (GDND) [89]. It has been hypothesized that there may be a cooperative mechanism in *Mab* between ESX-4 and GDND, similar to the one existing

in *Mma* between ESX-1 and PDIM, to promote phagosomal membrane disruption (Fig. 3a, b).

ESX-5

The ESX-5 and ESX-2 systems are the two secretion systems restricted to the SGM (Table 1). Until now, no apparent function has been identified for ESX-2 [33, 38] while ESX-5 remains the major T7SS involved in PE/PPE secretion [90, 91]. *Pe* and *ppe* genes emerged from the *esx-1* duplication and are associated with *esx* loci, with the exception of *esx-4*. *Pe/ppe* genes can also be found outside the *esx* loci as in *Mab* genome [55], raising the question of whether ESX-3 and ESX-4 assists the secretion of these PE/PPE proteins in this species.

In *Mma*-infected macrophages, ESX-5 acts in association with ESX-1, playing an important role in virulence. The ESX-5 substrates trigger cytotoxicity and inflammasome activation after cytosol access by an ESX-1 dependent-mechanism [92]. Interestingly, ESX-5 seems to have a complex role during infection, as it also modulates the cell immune response via its substrates to escape the immune system and maintain a persistent infection.

PE/PPE proteins secreted by ESX-5 are hypothesized to be involved in antigenic variation due to their polymorphic C-terminal domain that could allow escape from the host immune system [93]. PE/PPE may also be required for virulence indirectly. For instance, a *pecA* (an aspartic protease) mutant in *Mma* only exhibits moderate virulence in zebrafish [94]. *PecA* processes other PE-PGRS, as well as itself by removing the PE domain of secreted protein at the bacterial surface. *PecA* is entailed in virulence by the cleavage and activation of virulence factor [94].

Moreover, comparison of the wild-type and an ESX-5 mutant strain indicates that *Mma* ESX-5 is involved in decreased antigen presentation, cytokine secretion and attenuates signalling through Toll-like receptors [17]. Other studies described a dual role for PPE38 inducing pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6 in macrophages [95]. Cellular proteomic approaches on *Mma*-infected macrophages [96] demonstrate the potential role of PPE38 in preventing antigen presentation and major histocompatibility complex class I processing [96]. In the opportunistic *Mav*, a *ppe* mutant failed to block phagosome acidification, displayed a growth defect in macrophages and attenuated virulence in mice, supporting the idea that in this species lacking ESX-1 (Table 1), ESX-5 is able to fulfil the virulence function [54, 97].

Mycobacterial gene flow

Compared to pathogenic mycobacteria, in the non-pathogenic NTM *Msm*, the *esx-1* locus is involved in conjugal DNA transfer, namely Distributive Conjugal Transfer (DCT). DCT is unidirectional from donor-to-recipient and is cell-cell contact dependent, with the capacity to transfer multiple segments that results in the transconjugants possessing a mosaic genome [98]. Thus, DCT seemingly requires the ESX-1 system in both donor and recipient strains. Indeed, an ESX-1 donor mutant leads to an hyper-conjugative phenotype [99], whereas an ESX-1 recipient

mutant expresses a hypo-conjugative phenotype in *Msm* [66]. Similarly, *Msm* ESX-4 appears to be involved in DCT, with a recipient ESX-4 mutant defective for conjugation. However, no role for ESX-4 in the donor strain was identified. Moreover, the recipient *esx-4* locus transcripts including *esxU* and *esxT* are induced only in co-culture with the donor by an ESX-1 dependent mechanism and a cell contact dependent process [100]. Furthermore, SigM, an extracytoplasmic transcription factor, was identified as the direct donor-recipient cell contact activator, which activates *esx-4* regulation and promotes *esxT* and *esxU* transcription [101]. Although ESX-4 plays an important function in the DCT, substrate secretion by ESX-4 was not demonstrated. It can be hypothesized that ESX-4 in *Msm* may have evolved to perform a different function from the virulence function observed in *Mab* to overcome the absence of the *eccE* gene. Overall, the role of ESX systems in DCT reflects the interaction and communication of two seemingly disparate secretion systems involved in the same processes with no functional redundancies.

DCT has not been described in other mycobacteria but some mosaic genome patterns have been found in the genome of *Mycobacterium canettii* where this DCT was experimentally demonstrated [102]. A mosaic genome is also observed in *Mab* [103] and some patterns similar to DCT in a 4kb of *Mav* genome were found [19]. These hallmarks suggest that DCT or substantial horizontal gene transfer took place within mycobacteria and probably participated in the evolution and niche adaptation of mycobacteria [31]. Furthermore, we can also presume that DCT exists in other mycobacteria due to the conservation of ESX and their regulation, however this remains to be proven.

Finally, genes encoding an ESX system and a Type IV secretion system usually present in non-mycobacterial bacteria were detected in a conjugative plasmid found in SGM (pRAW). An *eccC* mutant from this plasmidic ESX impaired the plasmid transfer, suggesting that an ESX secretion system may be involved in DCT as well as in plasmid conjugation [104].

Nutrient uptake

ESX systems may participate in the uptake of nutrients essential for the mycobacterial planktonic lifestyle and/or survival in phagocytes.

ESX-3

The ESX-3 secretion system is widespread among mycobacteria, but its role has primarily been explored in *Mtb* where it is involved in iron and zinc homeostasis [20, 21] and in virulence [105]. The ESX-3 function in iron acquisition is conserved in *Msm* but has not been studied in other NTM [20]. While ESX-3 is essential in *Mtb*, it is dispensable in *Msm*, suggesting differential functions/requirements among mycobacterial species. Moreover, ESX-3 has been linked to virulence in *Mab*, in which an *esx-3* mutant exhibits a more attenuated phenotype *in vivo* with a decrease in the inflammatory cytokine response [106]. However, the role of *Mab* ESX-3 in contributing to virulence remains yet to be confirmed with functional complementation studies.

ESX-5

Most studies relating the ESX-5 function in *Mma* include a mutant possessing a transposon in the cytosolic components, *eccA* and *espG* gene, while no transposons were identified in genes composing the core of the ESX-5 complex [90]. *Mma* ESX-5 has been shown to be essential *in vitro*, but it can be by-passed by disturbing the permeability of the mycomembrane or by the expression of a mycobacterial porin from *Msm*, MspA, only described in RGM [22]. In addition, cultures with different carbon sources unravelled the role of ESX-5 and its substrates in the uptake of fatty acids [22]. Since ESX-5 systems are a hallmark of SGM, considered to be the group in which most pathogenic mycobacteria are found, it can be inferred that ESX-5 has evolved towards a role dedicated to the transport of small nutrients. Moreover, increased permeability seems to disadvantage persistence of mycobacteria during infection, and thus ESX-5 could represent a niche adaptation of SGM to pathogenicity [22].

Bacterial cell envelope homeostasis

In addition to virulence and fatty acid uptake, *Mma* ESX-5 and its PPE substrates are also involved in the mycobacterial capsule integrity. Indeed, an *esx-5* (*espG5::Tn*) and *ppe10* mutant showed an impairment in the integrity of the capsule, characterized by a decrease of capsular proteins and ESX-1 substrates to the bacterial surface leading to an attenuated virulence phenotype [23]. The link between mycomembrane homeostasis and PPE proteins was also demonstrated with *Mma* PPE38, for which the absence leads to deficiencies in the cell wall integrity, affecting cord and biofilm formation, ultimately resulting in defective phagocytosis and reduced virulence *in vivo* [95]. Both results demonstrate the importance of PPE in the mycobacterial membrane integrity.

In addition, in *Mma*, several ESX-1 substrate mutants, *espE*, *espG*, *espF* and *espH* exhibit a biofilm and sliding motility defect [107]. Mycobacterial biofilms are found in the environment, as well as on patient medical devices, and represents an advantage for persistent infections and antibiotic resistance [108]. The involvement of ESX in biofilm formation illustrates the role of ESX in the adaptation of mycobacteria and notably NTM to the various environments in which they are isolated.

CONCLUSION

The last few years have been marked by key achievements in the study of ESX in mycobacteria. The structures of the ESX-3 and ESX-5 systems from two NTM species were solved, allowing a better understanding of the interaction of the core complex proteins, as well as their integration into the mycomembrane. The interaction of EccE with other ESX core components raises questions about the functionality of ESX-4 where EccE is absent, with the exception of *Mab* ESX-4. Recently, ESX-4 from *Mab* has been shown to be functional and involved in the resistance of this mycobacterium to phagocytic cells whereas, until recently, ESX-1 and ESX-5 were perceived as the major players in the

virulence of pathogenic and opportunistic mycobacteria. In addition to their role in virulence, ESX-4 and ESX-1 are also involved in DNA transfer in the saprophytic mycobacteria *Msm*, indicating that the pathogenicity of a strain cannot be explained by the sole presence of one ESX system. Plasmid-mediated evolution provides clues for understanding ESX acquisition in the different species, while ESX evolution correlates with the growth dichotomy typifying RGM and SGM, as illustrated by the emergence of ESX-2 and ESX-5 in the latter. Overall, ESX systems represent a powerful resource that allow mycobacteria to adapt to their various ecological niches.

Funding information

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement n°846476 (to C.P.) and from the Joachim Herz Stiftung, Hamburg, Germany (to M.W. and F.P.M. as members of the Infectophysics Consortium). M.L. has received funding from the French associations 'Vaincre la mucoviscidose Association and Grégory Lemarchal Association' (grant agreement n° (RIF20190502522)). M.D.J. received a post-doctoral fellowship granted by Labex EpiGenMed, an «Investissements d'avenir» program (ANR-10-LABX-12-01).

Author contributions

M.L., C.P., F.V., M.D.J. wrote the original manuscript, K.S.H.B. and C.R. contributed to the description of structural data; F.M., J.-L.H., F.G.-M. supervised the project. J.-L.H., F.G.-M., M.W., F.M. and L.K. participated in writing the manuscript and supported the project.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13001–13006.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178:1274–1282.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520–1523.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999;32:643–655.
- Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, Cox J, Luirink J, et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:883–891.
- Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:1710–1717.
- Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761–776.
- Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12420–12425.
- Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2004;51:359–370.
- Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, de Jonge MI, Bottai D, et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* 2006;74:88–98.
- Bitter W, Houben ENG, Bottai D, Brodin P, Brown EJ, et al. Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000507.
- Houben ENG, Korotkov KV, Bitter W. Take five — Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2014;1843:1707–1716.
- Bunduc CM, Bitter W, Houben ENG. Structure and function of the mycobacterial type VII secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 2020;74:315–335.
- Unnikrishnan M, Constantinidou C, Palmer T, Pallen MJ. The enigmatic Esx proteins: Looking beyond mycobacteria. *Trends Microbiol* 2017;25:192–204.
- Bottai D, Gröschel MI, Brosch R. Type VII secretion systems in gram-positive bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017;404:235–265.
- Chirakos AE, Balaram A, Conrad W, Champion PA. Modeling tubercular ESX-1 secretion using *Mycobacterium marinum*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2020;84:e00082.
- Abdallah AM, Savage NDL, van Zon M, Wilson L, Vandenbroucke-Grauls C, et al. The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J Immunol* 2008;181:7166–7175.
- Lienard J, Nobs E, Lovins V, Mover E, Valfridsson C, et al. The *Mycobacterium marinum* ESX-1 system mediates phagosomal permeabilization and type I interferon production via separable mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 2020;116:0–1166.
- Gray TA, Derbyshire KM. Blending genomes: distributive conjugal transfer in mycobacteria, a sexier form of HGT: Distributive conjugal transfer. *Mol Microbiol* 2018;108:601–613.
- Siegrist MS, Unnikrishnan M, McConnell MJ, Borowsky M, Cheng T-Y, et al. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18792–18797.
- Serafini A, Boldrin F, Palù G, Manganelli R. Characterization of a mycobacterium tuberculosis ESX-3 conditional mutant: Essentiality and rescue by iron and zinc. *J Bacteriol* 2009;191:6340–6344.
- Ates LS, Ummels R, Commandeur S, van de Weerd R, van der Weerd R, et al. Essential role of the ESX-5 secretion system in outer membrane permeability of pathogenic mycobacteria. *PLoS Genet* 2015;11:e1005190.
- Ates LS, van der Woude AD, Bestebroer J, van Stempvoort G, Musters RJP, et al. The ESX-5 system of pathogenic mycobacteria is involved in capsule integrity and virulence through its substrate PPE10. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005696.
- Beckham KSH, Ciccarelli L, Bunduc CM, Mertens HDT, Ummels R, et al. Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat Microbiol* 2017;2:17047.
- Famelis N, Rivera-Calzada A, Degliesposti G, Wingender M, Mietrach N, et al. Architecture of the mycobacterial type VII secretion system. *Nature* 2019;576:321–325.
- Poweleit N, Czudnochowski N, Nakagawa R, Trinidad DD, Murphy KC, et al. The structure of the endogenous ESX-3 secretion system. *eLife* 2019;8:e52983.
- Bunduc CM, Fahrenkamp D, Wald J, Ummels R, Bitter W, et al. Structure and dynamics of the ESX-5 type VII secretion system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 2021;593:445–448.
- Beckham KSH, Ritter C, Chojnowski G, Mullapudi E, Rettel M, et al. Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system hexameric pore complex. *Microbiology* 2020.
- Laencina L, Dubois V, Moigne L, Viljoen A, Majlessi L, et al. Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in

- vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115:1002–1011.
30. Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol* 2020;18:392–407.
 31. Dumas E, Christina Boritsch E, Vandenbogaert M, Rodríguez de la Vega RC, Thiberge J-M, et al. Mycobacterial pan-genome analysis suggests important role of plasmids in the radiation of type VII secretion systems. *Genome Biol Evol* 2016;8:387–402.
 32. Newton-Foot M, Warren RM, Sampson SL, van Helden PD, Gey van Pittius NC. The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems. *BMC Evol Biol* 2016;16:16–62.
 33. Majlessi L, Prados-Rosales R, Casadevall A, Brosch R. Release of mycobacterial antigens. *Immunol Rev* 2015;264:25–45.
 34. Houben ENG, Bestebroer J, Ummels R, Wilson L, Piersma SR, et al. Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Mol Microbiol* 2012;86:472–484.
 35. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, et al. Evolution and expansion of the mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the esat-6 (ESX) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* 2006;6:95.
 36. Gey Van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, et al. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol* 2001;2:RESE ARCH0044:10..
 37. Bottai D, Brosch R. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. *Mol Microbiol* 2009;73:325–328.
 38. Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:677–691.
 39. Wagner JM, Chan S, Evans TJ, Kahng S, Kim J, et al. Structures of EccB1 and EccD1 from the core complex of the mycobacterial ESX-1 type VII secretion system. *BMC Struct Biol* 2016:16.
 40. Rosenberg OS, Dovala D, Li X, Connolly L, Bendebury A, et al. Substrates control multimerization and activation of the multi-domain atpase motor of type vii secretion. *Cell* 2015;161:501–512.
 41. Bunduc CM, Ummels R, Bitter W, Houben ENG. Species-specific secretion of ESX-5 type VII substrates is determined by the linker 2 of EccC5. *Mol Microbiol* 2020;114:66–76.
 42. van Winden VJC, Ummels R, Piersma SR, Jiménez CR, Korotkov KV, et al. Mycosins are required for the stabilization of the ESX-1 and ESX-5 type VII secretion membrane complexes. *mBio* 2016;7.
 43. van Winden VJC, Damen MPM, Ummels R, Bitter W, Houben ENG. Protease domain and transmembrane domain of the type VII secretion mycosin protease determine system-specific functioning in mycobacteria. *J Biol Chem* 2019;294:4806–4814.
 44. van Winden VJC, Bunduc CM, Ummels R, Bitter W, Houben ENG. A chimeric EccB-MycP fusion protein is functional and a stable component of the ESX-5 type VII secretion system membrane complex. *J Mol Biol* 2020;432:1265–1278.
 45. Sun D, Liu Q, He Y, Wang C, Wu F, et al. The putative propeptide of MycP1 in mycobacterial type VII secretion system does not inhibit protease activity but improves protein stability. *Protein Cell* 2013;4:921–931.
 46. Wagner JM, Evans TJ, Chen J, Zhu H, Houben ENG, et al. Understanding specificity of the mycosin proteases in ESX/type VII secretion by structural and functional analysis. *J Struct Biol* 2013;184:115–128.
 47. Solomonson M, Huesgen PF, Wasney GA, Watanabe N, Gruninger RJ, et al. Structure of the mycosin-1 protease from the mycobacterial ESX-1 protein type VII secretion system. *J Biol Chem* 2013;288:17782–17790.
 48. Ohol YM, Goetz DH, Chan K, Shiloh MU, Craik CS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe* 2010;7:210–220.
 49. Solomonson M, Setiaputra D, Makepeace KAT, Lameignere E, Petrotchenko EV, et al. Structure of EspB from the ESX-1 type VII secretion system and insights into its export mechanism. *Structure* 2015;23:571–583.
 50. Poulsen C, Panjikar S, Holton SJ, Wilmanns M, Song YH. WXG100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an α -helical C-terminal conserved residue pattern. *PLoS ONE* 2014;9:e89313.
 51. Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J* 2005;24:2491–2498.
 52. Champion PAD, Stanley SA, Champion MM, Brown EJ, Cox JS. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2006;313:1632–1636.
 53. Daleke MH, Ummels R, Bawono P, Heringa J, Vandenbroucke-Grauls C, et al. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:11342–11347.
 54. Li Y, Miltner E, Wu M, Petrofsky M, Bermudez LE. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell Microbiol* 2005;7:539–548.
 55. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS ONE* 2009;4:e5660.
 56. Phan TH, Houben ENG. Bacterial secretion chaperones: The mycobacterial type VII case. *FEMS Microbiol Lett* 2018;365.
 57. Damen MPM, Phan TH, Ummels R, Rubio-Canalejas A, Bitter W, et al. Modification of a PE/PPE substrate pair reroutes an Esx substrate pair from the mycobacterial ESX-1 type VII secretion system to the ESX-5 system. *J Biol Chem* 2020;295:5960–5969.
 58. Williamson ZA, Chaton CT, Ciocka WA, Korotkova N, Korotkov KV. PE5-PPE4-EspG3 heterotrimer structure from mycobacterial ESX-3 secretion system gives insight into cognate substrate recognition by ESX systems. *J Biol Chem* 2020;295:12706–12715.
 59. Ekiert DC, Cox JS. Structure of a PE–PPE–EspG complex from *Mycobacterium tuberculosis* reveals molecular specificity of ESX protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:14758–14763.
 60. Tuukkanen AT, Freire D, Chan S, Arbing MA, Reed RW, et al. Structural variability of ESPG chaperones from mycobacterial ESX-1, ESX-3, and ESX-5 type VII secretion systems. *J Mol Biol* 2019;431:289–307.
 61. Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, Dovey C, Cox JS. Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Nature* 2008;454:717–721.
 62. Ates LS, Brosch R. Discovery of the type VII ESX-1 secretion needle? *Mol Microbiol* 2017;103:7–12.
 63. Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sassetti CM, et al. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10676–10681.
 64. MacGurn JA, Raghavan S, Stanley SA, Cox JS. A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2005;57:1653–1663.
 65. Gao L-Y, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, et al. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* 2004;53:1677–1693.
 66. Coros A, Callahan B, Battaglioli E, Derbyshire KM. The specialized secretory apparatus ESX-1 is essential for DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 2008;69:794–808.
 67. Sala C, Odermatt NT, Soler-Arnedo P, Gülen MF, von Schultz S, et al. EspL is essential for virulence and stabilizes EspE, EspF and EspH levels in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2018;14:e1007491.

68. Chirakos AE, Nicholson KR, Huffman A, Champion PA. Conserved ESX-1 substrates ESPE and ESPF are virulence factors that regulate gene expression. *Infect Immun* 2020;88:e00289-20.
69. Sanchez KG, Ferrell MJ, Chirakos AE, Nicholson KR, Abramovitch RB, et al. ESPM is a conserved transcription factor that regulates gene expression in response to the ESX-1 system. *mBio* 2020;11:e02807-19.
70. Luthra A, Mahmood A, Arora A, Ramachandran R. Characterization of Rv3868, an essential hypothetical protein of the ESX-1 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2008;283:36532–36541.
71. Wagner JM, Evans TJ, Korotkov KV. Crystal structure of the N-terminal domain of EccA₁ ATPase from the ESX-1 secretion system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins* 2014;82:159–163.
72. Champion PAD, Champion MM, Manzanillo P, Cox JS. ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* 2009;73:950–962.
73. Joshi SA, Ball DA, Sun MG, Carlsson F, Watkins BY, et al. EccA₁, a component of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 protein virulence factor secretion pathway, regulates mycolic acid lipid synthesis. *Chem Biol* 2012;19:372–380.
74. Crosskey TD, Beckham KSH, Wilmanns M. The ATPases of the mycobacterial type VII secretion system: Structural and mechanistic insights into secretion. *Prog Biophys Mol Biol* 2019;152:25–34.
75. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002;46:709–717.
76. Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* 2009;136:37–49.
77. Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, Chu F, Takaki KK, et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:1371–1376.
78. Houben D, Demangel C, van Ingen J, Perez J, Baldeón L, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* 2012;14:1287–1298.
79. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, et al. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002507.
80. Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu J, et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect Immun* 2008;76:5478–5487.
81. Augenstreich J, Arbues A, Simeone R, Haanappel E, Wegener A, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol* 2017;19.
82. Quigley J, Hughitt VK, Velikovskiy CA, Mariuzza RA, El-Sayed NM, et al. The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* 2017;8:e00148-17.
83. Osman MM, Pagán AJ, Shanahan JK, Ramakrishnan L. *Mycobacterium marinum* phthiocerol dimycocerosates enhance macrophage phagosomal permeabilization and membrane damage. *PLoS One* 2020;15:e0233252.
84. Bosserman RE, Nicholson KR, Champion MM, Champion PA. A new ESX-1 substrate in *Mycobacterium marinum* that is required for hemolysis but not host cell lysis. *J Bacteriol* 2019;201:e00760-18.
85. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JCW, Sherman DR, et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterial virulence determinant. *PLoS Biol* 2004;2:e367.
86. Wang J, McIntosh F, Radomski N, Dewar K, Simeone R, et al. Insights on the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the analysis of *Mycobacterium kansasii*. *Genome Biol Evol* 2015;7:856–870.
87. Guan Q, Ummels R, Ben-Rached F, Alzahid Y, Amini MS, et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of mycobacterium kansasii subtypes provide new insights into their pathogenicity and taxonomy. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:122.
88. Roux A-L, Viljoen A, Bah A, Simeone R, Bernut A, et al. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* 2016;6:160185.
89. Dubois V, Viljoen A, Laencina L, Moigne L, Bernut A, et al. MmpL8MAB controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E10147-56.
90. Abdallah AM, Verboom T, Weerdenburg EM, Gey van Pittius NC, Mahasha PW, et al. PPE and PE₁PGRS proteins of *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol Microbiol* 2009;73:329–340.
91. Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, et al. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* 2006;62:667–679.
92. Abdallah AM, Bestebroer J, Savage NDL, de Punder K, van Zon M, et al. Mycobacterial secretion systems ESX-1 and ESX-5 play distinct roles in host cell death and inflammasome activation. *J Immunol* 2011;187:4744–4753.
93. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537–544.
94. Burggraaf MJ, Speer A, Meijers AS, Ummels R, van der Sar AM, et al. Type VII Secretion Substrates of Pathogenic Mycobacteria Are Processed by a Surface Protease. *mBio* 2019;10.
95. Dong D, Wang D, Li M, Wang H, Yu J, et al. PPE38 modulates the innate immune response and is required for *Mycobacterium marinum* virulence. *Infect Immun* 2012;80:43–54.
96. Wang H, Dong D, Tang S, Chen X, Gao Q. PPE38 of *Mycobacterium marinum* triggers the cross-talk of multiple pathways involved in the host response, as revealed by subcellular quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2013;12:2055–2066.
97. McNamara M, Danelishvili L, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* ESX-5 PPE protein, PPE25-MAV, interacts with an ESAT-6 family Protein, MAV₂₉₂₁, and localizes to the bacterial surface. *Microb Pathog* 2012;52:227–238.
98. Gray TA, Krywy JA, Harold J, Palumbo MJ, Derbyshire KM. Distributive conjugal transfer in mycobacteria generates progeny with meiotic-like genome-wide mosaicism, allowing mapping of a mating identity locus. *PLoS Biol* 2013;11:e1001602.
99. Flint JL, Kowalski JC, Karnati PK, Derbyshire KM. The RD1 virulence locus of *Mycobacterium tuberculosis* regulates DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:12598–12603.
100. Gray TA, Clark RR, Boucher N, Lapiere P, Smith C, et al. Inter-cellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. *Science* 2016;354:347–350.
101. Clark RR, Judd J, Lasek-Nesselquist E, Montgomery SA, Hoffmann JG, et al. Direct cell-cell contact activates SigM to express the ESX-4 secretion system in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E6595-603.
102. Boritsch EC, Khanna V, Pawlik A, Honoré N, Navas VH, et al. Key experimental evidence of chromosomal DNA transfer among selected tuberculosis-causing mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:9876–9881.
103. Sapriel G, Konjek J, Orgeur M, Bouri L, Frézal L, et al. Genome-wide mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: evolutionary and epidemiological implications. *BMC Genomics* 2016;17:118.
104. Ummels R, Abdallah AM, Kuiper V, Aâjoud A, Sparrius M, et al. Identification of a novel conjugative plasmid in mycobacteria that requires both type IV and type VII secretion. *mBio* 2014;5:e01744-01714.
105. Tufariello JM, Chapman JR, Kerantzas CA, Wong K-W, Vilchèze C, et al. Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E348-57.

106. Kim YS, Yang C-S, Nguyen LT, Kim JK, Jin HS, et al. *Mycobacterium abscessus* ESX-3 plays an important role in host inflammatory and pathological responses during infection. *Microbes Infect* 2017;19:5–17.
107. Lai LY, Lin TL, Chen YY, Hsieh PF, Wang JT. Role of the *Mycobacterium marinum* ESX-1 secretion system in sliding motility and biofilm formation. *Front Microbiol* 2018;9:1160.
108. Esteban J, García-Coca M. *Mycobacterium* biofilms. *Front Microbiol* 2017;8:2651.
109. Everall I, Nogueira CL, Bryant JM, Sánchez-Busó L, Chimara E, et al. Genomic epidemiology of a national outbreak of post-surgical *Mycobacterium abscessus* wound infections in Brazil. *Microb Genom* 2017;3:e000111.
110. Kim BJ, Cha GY, Kim BR, Kook YH, Kim BJ. Insights from the genome sequence of *Mycobacterium Paragordona*, a potential novel live vaccine for preventing mycobacterial infections: The putative role of type VII secretion systems for an intracellular lifestyle within free-living environmental predators. *Front Microbiol* 2019;10:1524.
111. Daleke MH, Cascioferro A, de Punder K, Ummels R, Abdallah AM, et al. Conserved Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE) protein domains target LipY lipases of pathogenic mycobacteria to the cell surface via the ESX-5 pathway. *J Biol Chem* 2011;286:19024–19034.
112. Fang Z, Newton-Foot M, Sampson SL, Gey van Pittius NC. Two promoters in the *esx 3* gene cluster of *Mycobacterium smegmatis* respond inversely to different iron concentrations *in vitro*. *BMC Res Notes* 2017;10:426.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

OBJECTIFS

M. abscessus est un pathogène opportuniste qui responsable d'infections sévères chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces patients, l'infection a des effets délétères sur leur fonction respiratoire et peut aussi entraîner des complications post-opératoires à la suite d'une greffe pulmonaire. En outre, l'arsenal antibiotique n'est pas suffisant pour venir à bout de ces infections du fait de la multirésistance de cette mycobactérie.

Certains aspects des infections à *M. abscessus* sont encore mal connus tel que le mode de transmission de la mycobactérie et la présence ou absence d'un réservoir environnemental. Le génome de *M. abscessus* a permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans un mode de vie à l'interface eau-sol-amibes ainsi qu'une vie intracellulaire. Les études réalisées dans notre laboratoire ont permis par des approches transcriptomiques ainsi que de mutagénèse aléatoire, d'identifier des gènes importants dans la vie intra-amibienne et intra macrophagique de *M. abscessus*. Notamment, la mutagénèse par transposition a permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle d'un des deux locus *esx* de *M. abscessus*, le locus *esx-4*, dans sa survie intracellulaire.

Au sein des mycobactéries, les systèmes de sécrétion ESX sont impliqués dans diverses fonctions, telles que la conjugaison, la capture de nutriments, l'homéostasie de la paroi et la virulence. Ces systèmes sécrètent un grand nombre de substrats appartenant à différentes familles de protéines et principalement les Esx, Esp et les PE/PPE. A l'issue d'une infection par *M. tuberculosis*, ces protéines sont reconnues par le système immunitaire de l'hôte, provoquant une réponse immune à médiation cellulaire via les lymphocytes T, et la production d'anticorps via les lymphocytes B, représentant des candidats vaccins. EsxA et EsxB par exemple, sécrétées par ESX-1, un des cinq systèmes de sécrétion ESX de *M. tuberculosis*, sont deux protéines utilisées dans les tests IGRA « Interferon γ release assays » qui permettent de caractériser cette réponse immune à médiation cellulaire T observée au cours de la maladie, et utilisée pour réaliser le diagnostic de tuberculose latente, voire de tuberculose maladie.

Considérant ces propriétés immunologiques associées aux protéines sécrétées par les systèmes ESX et le rôle majeur d'ESX-4 de *M. abscessus* dans la survie dans les cellules phagocytaires, l'objectif de ce projet de thèse était d'étudier le rôle ainsi que l'immunogénicité des protéines sécrétées par l'ESX-4 de *M. abscessus*. En amont de ce projet, l'analyse comparative du sécrétome de *M. abscessus* sauvage et du mutant $\Delta eccB_4$ du système de sécrétion ESX-4 a permis d'identifier EsxU et EsxT, deux protéines codées par des gènes du locus *esx-4*, ainsi que des PE/PPE comme cibles potentielles. Nous nous sommes d'abord concentrés sur la caractérisation d'EsxU et EsxT ainsi que sur leur potentiel pouvoir immunogène. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'antigénicité des autres substrats identifiés dans le sécrétome. En effet, nous voulions voir si l'étude de la réponse immune de ces protéines sécrétées pouvait ouvrir la voie vers la découverte de cibles diagnostiques et/ ou vaccinales dans le cadre des infections à *M. abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose.

RESULTATS

Partie I : Le rôle d'EsxU et EsxT

Dans le cadre de l'étude du rôle des protéines EsxU et EsxT sécrétées par l'ESX-4 de *M. abscessus*, nous avons collaboré avec deux équipes allemandes de Borstel (Centre national et de l'OMS de référence des mycobactéries) et Hambourg (EMBL), spécialisées dans l'étude de la structure des ESX, la biophysique et dans les aspects cliniques des infections à *M. abscessus*. Cette collaboration fait intervenir un 4^{ème} acteur, l'équipe de Laurent Kremer, (IRIM) de Montpellier qui travaille sur *M. abscessus* et qui a développé le modèle zebrafish pour étudier la pathophysiologie des infections à *M. abscessus*. Cette collaboration nous a permis d'étudier le rôle de ces protéines selon une approche multidisciplinaire.

The ESX-4 substrates, EsxU and EsxT, modulate *Mycobacterium abscessus* fitness

Marion Lagune^{a,1}, Vincent Le Moigne^{a,1}, Matt D. Johansen^{b,1,\$}, Flor Vásquez Sotomayor^{c,1}, Wassim Daher^{b,h}, Cécile Petit^d, Gina Cosentino^a, Laura Paulowski^c, Thomas Gutschmann^e, Matthias Wilmans^d, Florian P. Maurer^{c,f*}, Jean-Louis Herrmann^{a,g*}, Fabienne Girard-Misguich^{a*}, Laurent Kremer^{b,h*}.

^aUniversité Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, Infection et inflammation, 78180, Montigny-Le-Bretonneux, France

^bCentre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier, France

^cNational and WHO Supranational Reference Center for Mycobacteria, Research Center Borstel, Leibniz Lung Center, 23845 Borstel, Germany

^dEuropean Molecular Biology Laboratory, Hamburg Unit, Notkestraße 85, 22607 Hamburg, Germany

^eResearch Center Borstel, Leibniz Lung Center, Division of Biophysics, Parkallee 10, 23845 Borstel, Germany

^fInstitute of Medical Microbiology, Virology and Hospital Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany

^gAPHP, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Service de Microbiologie, Garches, France

^hINSERM, IRIM, 34293 Montpellier, France

¹Authors contributed equally to this work

*co-senior researchers

To whom correspondence may be addressed. **Emails:** jean-louis.herrmann@aphp.fr, fabienne.misguich@uvsq.fr, fmaurer@fz-borstel.de, laurent.kremer@irim.cnrs.fr

^{\$} Current address: Centre for Inflammation, Centenary Institute and University of Technology Sydney, Faculty of Science, Sydney, NSW, Australia;

Author Contributions: F.G-M., T.G., J-L.H., L.K., F.P.M., M.W. designed experiments, G.C., W.D, M.D.J., M.L., V.L.M., C.P, L.P., F.V.S. performed research, G.C., W.D, M.D.J., M.L., V.L.M., C.P, L.P., F.V.S., F.G-M., T.G., J-L.H., L.K., F.P.M., M.W. analyzed data, G.C., W.D, M.D.J., M.L., V.L.M., C.P, L.P., F.V.S., F.G-M., T.G., J-L.H., L.K., F.P.M., M.W. wrote the paper.

Competing Interest Statement: The authors declare no conflict of interest.

Classification: Biological Science (Major), Microbiology (Minor).

Keywords: Non-tuberculous mycobacteria, *Mycobacterium abscessus*, type VII secretion system, ESX, macrophage, infection, virulence.

Abstract

ESX type VII secretion systems are complex secretion machineries spanning across the mycobacterial membrane and playing a role in pathogenicity, nutrient uptake and conjugation. We previously reported the role of ESX-4 in modulating *Mycobacterium abscessus* virulence by demonstrating that deletion of one of its structural components, EccB4, resulted in reduced bacterial survival in cellular and animal models. In addition, the loss of EccB4 was associated with limited secretion of two effector proteins, EsxU and EsxT, encoded by the *esx-4* locus. These proteins belong to the WVG-100 family, similarly to the EsxA/EsxB heterodimer secreted by ESX-1 in *Mycobacterium tuberculosis*. That EsxA and EsxB promote survival of *M. tuberculosis* in phagocytic cells and participate in virulence, prompted us to investigate the function of *M. abscessus* EsxU and EsxT *in vitro* and *in vivo*. Herein, we show that EsxU and EsxT are substrates of ESX-4 and form a stable 1:1 heterodimer that permeabilizes artificial membranes. While expression of *esxU* and *esxT* was up-regulated in *M. abscessus*-infected macrophages, their absence in an *esxUT* deletion mutant prevented phagosomal membrane disruption while maintaining *M. abscessus* in an unacidified phagosome. Unexpectedly, the *esxUT* deletion was associated with a hyper-virulent phenotype, characterised by increased bacterial loads and mortality in mouse and zebrafish infection models. Collectively, these results suggest that the presence of EsxU and EsxT dampens survival and persistence of *M. abscessus* during infection.

Significance Statement

The evolution of bacterial secretion systems is strongly associated with the intracellular lifestyle and interactions of bacteria with their hosts. Here, we show that an ancestral type VII secretion system, ESX-4, plays a role in modulating the pathophysiology of *Mycobacterium abscessus* infection, which is directly related to its major effectors, EsxU and EsxT. While EsxU/EsxT were found to permeabilize lipid bilayers, deletion of the *esxUT* genes increases the virulence of *M. abscessus* in animal models. Supporting these observations, mycobacterial species, which are strict pathogens in humans and animals, have evolved as such without evidence of production of their respective EsxU/EsxT substrates. Together, these results underscore the *in vivo* advantage procured by the absence of EsxU and EsxT in mycobacteria.

Introduction

Type VII secretion systems (T7SS), also known as Early Antigenic Secretion (ESX) systems, are well- conserved among mycobacterial species and are known to be essential for protein secretion. To date, five ESX systems have been reported in mycobacteria, namely ESX-1 to ESX-5. T7SS are structurally composed of at least four ESX-conserved structural components (EccB, EccC, EccD, EccE), as recently demonstrated for ESX-3 and ESX-5 (1–3), and further stabilized by a conserved membrane-bound mycosin protease (MycP) (4), ESX-type-specific associated proteins (Esp), and secreted/exported effectors organized in an operonic arrangement. However, not all mycobacteria possess the five *esx* loci. Strictly pathogenic species have four ESX systems (*Mycobacterium marinum* *esx*-1-3-4-5) or five ESX systems (*Mycobacterium tuberculosis* complex (*esx*-1-2-3-4-5) (5, 6) whereas opportunistic pathogens such as *Mycobacterium abscessus* possess only two (*esx*-3-4) (7). In addition, some loci, such as *esx*-1, involved in the virulence of strict pathogens, are also present in saprophytic species, such as *Mycobacterium smegmatis*. Different roles have been ascribed to ESX systems, individually or in association with each other, such as virulence, nutrient and ion uptake, toxin trafficking and secretion and mycobacterial conjugation (8–14). One of the most studied examples is ESX-1 from *M. tuberculosis*. The ESX-1 operon contains two antigenic effector proteins, EsxA and EsxB, previously named the 6-kDa Early Secretory Antigenic Target (ESAT-6) and 10-kDa Culture Filtrate Protein (CFP-10), respectively. EsxA and EsxB form a 1:1 heterodimeric complex with phagosomal membrane-permeabilization activity, which contributes to the phagosomal escape of pathogenic mycobacteria (8, 15, 16). Phylogenetic analyses suggest that *esx*-4 is the ancestral locus from which all other mycobacterial ESX systems have evolved (6). Until recently, ESX-4 was considered as non-functional in pathogenic mycobacteria, such as *M. tuberculosis* (8, 17). Comparatively, deletion of one of the structural components of the *M. abscessus* T7SS ESX-4, EccB4, resulted in decreased intracellular survival, with impaired phagosomal membrane rupture and phagosomal acidification (18). However, the underlying molecular mechanism explaining the *in vivo* attenuated phenotype of the Δ *eccB4* mutant remained to be established. Noteworthingly, Δ *eccB4* was reported to reduce

the secretion of two *esx4*-encoded proteins, EsxU and EsxT, in the culture supernatant, suggesting that decreased intracellular replication of $\Delta eccB4$ may be correlated with the level of EsxU/EsxT secretion (18).

M. abscessus represents an excellent surrogate to examine the role of ESX-4 effectors with respect to host-pathogen interactions and persistence in the host, involvement in membrane interaction and phagosomal escape and virulence. Critically, deletion of *esxUT* resulted in enhanced virulence in infected mice and zebrafish, characterised by increased bacterial burdens and mortality. This opens to the attractive hypothesis that the loss of these two ESX-4 substrates may have led to the emergence of increased virulence in pathogenic mycobacteria.

Results

***M. abscessus* EsxU and EsxT co-expression and secretion**

EsxU and EsxT are encoded by the *M. abscessus* *esx-4* locus (5) (Fig. 1A) and belong to the WXG-100 family, similarly to the *M. tuberculosis* EsxA and EsxB effectors. They are characterised by the presence of the characteristic WXG (tryptophan-X-glycine) motif in EsxU and a secretory signal motif (HxxxD/ExhxH) in the C-terminus of EsxT (19) (Fig. 1B). Previous work indicated that the EsxU and EsxT protein levels were slightly reduced in the secretome of *M. abscessus* Δ *eccB4*, suggesting that they are, at least partially, secreted through the ESX-4 machinery (18).

Initially, we sought to visualise the localization of EsxU and EsxT on the surface of *M. abscessus* using the Δ *esxUT* mutant, which was then individually complemented with GFP-tagged EsxT or EsxU (See Material and Methods; Sup Fig. 1A). Probing the crude lysates from the various strains with anti-GFP antibodies revealed a band of the expected size, corresponding to EsxU-GFP or EsxT-GFP proteins (Sup Fig. 1B). Using confocal microscopy, we observed patchy green fluorescent signals for EsxU-GFP, EsxT-GFP, or EsxUT-GFP as well as exclusively detectable cell wall labeling (Fig. 1C, white arrows), contrasting with the green fluorescent signal of GFP alone, which was homogeneously distributed along the longitudinal axis of cells (Fig. 1C). The intensity of the EsxU-GFP signal was strongly reduced compared with the EsxT-GFP signal, in agreement with the Western blot analysis using anti-GFP antibodies (Sup Fig. 1B, and below).

Proteins resulting from subcellular fractionations or concentrated culture filtrates were then probed using a mouse polyclonal antibody to identify the presence of EsxU and EsxT (Fig. 1D). Specific bands corresponding to EsxU and EsxT were detected in the culture filtrate, cytoplasm, total lysate, cell wall, and plasma membrane, with EsxU bands being slightly weaker in intensity than EsxT bands (Fig. 1D).

As described for other low molecular weight Esx substrates (20, 21), EsxU and EsxT were co-purified as heterodimers (Fig. 1E) where EsxT was purified with EsxU under native conditions or alone under denaturing conditions in *M. smegmatis* (Fig. 1E, left panel) and *Escherichia coli* (Fig. 1F) and by Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) experiments on the co-purified proteins (Fig. 1E,

right panel). Moreover, the strong association between EsxU and EsxT was further confirmed in GFP-pulldown experiments followed by mass spectrometry analyses, with EsxT reproducibly associated with EsxU (Sup Fig. 1C, 1D, 1E and Table S2). This reveals that EsxT may also act in concert with additional protein factors (Sup Fig. 1E and Table S2). Collectively, these data indicate that a functional EsxU/EsxT heterodimer is expressed in *M. abscessus* and is translocated across the plasma membrane and secreted into the culture filtrate.

EsxU/EsxT interacts with artificial eukaryotic membranes

To decipher the properties of the EsxU/EsxT heterodimer and its potential interaction with biological membranes, biophysical experiments were performed using dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC) as a model of eukaryotic membranes. The heterodimer-membrane interaction was then studied using the NanoSpot approach (Fig. 2A). The intensity of a fluorescent dye trapped in cavities underneath a DOPC bilayer was monitored. We observed a decrease in fluorescence upon addition of purified EsxU/EsxT, suggesting a direct interaction with the membrane that allowed the dye to escape (Fig. 2B). To verify whether the complex formed an organized structure, such as a pore, and did not just perforating the membrane in a single event, a second fluorescent dye (larger dextran conjugate) was added above the membrane. Single-cavity analysis showed an increase in fluorescence of the second dye in several cavities (two cavities represented), indicating dextran influx. Taken together, this demonstrates that EsxU/EsxT complexes are capable of forming stable higher-order structures in lipid bilayers (Fig. 2C).

EsxU and EsxT are involved in phagosomal membrane damage in macrophages

The ESX-1 substrates EsxA and EsxB promote intracellular survival and phagosomal escape of *M. tuberculosis* (22). In view of the above-mentioned results (Fig. 2), we next determined the expression level of *esxU* and *esxT* during infection of macrophages by *M. abscessus*. qRT-PCR analysis performed after infection of macrophages pointed to an upregulation of *esxU* and *esxT* transcription 24 hours post-infection (hpi) (Fig. 3A). While these results indicate that *esxU* and *esxT* are transcribed under intracellular conditions, one may speculate for a role of the EsxU/EsxT

heterodimer in intracellular replication of *M. abscessus*. To test this hypothesis, *esxUT* deletion mutant (Δ *esxUT*) were generated (Supp Figs. S2A and S3A) along with their corresponding complemented strains (Δ *esxUT*::*esxUT*). Macrophages were infected with either the wild-type (WT), Δ *esxUT* or Δ *esxUT*::*esxUT* strains (Fig. 3B). Δ *esxUT* neither show any morphotypic changes on plates nor any growth defect in broth medium, as compared with the WT strain (Supp Figs. S2B and S2C). Furthermore, macrophage infections failed to show differences in the intracellular growth of the WT, Δ *esxUT* and Δ *esxUT*::*esxUT* strains (Figs. 3B and S3E). Similar results were obtained in amoebae, a unicellular phagocytic cell type regarded as a potential environmental reservoir, possibly involved in shaping the *M. abscessus* virulence profile for intracellular adaptation (18, 23, 24) (Fig. S2D).

This prompted us to next examine the potential effect of EsxU/EsxT on phagosomal membrane disruption using a FRET-based assay (18). As shown in Fig. 3C and S3F, Δ *esxUT* mutants and heat-killed WT *M. abscessus* were unable to damage the phagosomal membrane, unlike the WT or Δ *esxUT*::*esxUT* strains. However, Δ *esxUT* remained present in a non-acidified compartment, as evidenced by confocal microscopy, similar to the WT strain, but to a lesser extent than heat-killed *M. abscessus* (Fig. 3D and 3E). Therefore, the loss of EsxU and EsxT abolishes phagosomal membrane damage but maintains the blockage of phagosomal acidification.

Deletion of *esxUT* leads to a hypervirulent phenotype in different animal models

To explore the role of the EsxU/EsxT complex in the virulence of *M. abscessus* in the presence of a functional immune system, several previously established animal models were used (25, 26). In this context, the zebrafish (*Danio rerio*) model, which harbours only innate immunity (used as an acute infection model), and the C3HeB/FeJ mouse model, which possesses both innate and adaptive immunity (used as a persistent infection model), were exploited to address the contribution of EsxU/EsxT in *M. abscessus* pathogenesis. Survival curves in both animal models demonstrated that Δ *esxUT* confers a hypervirulent phenotype as compared with WT and complemented strains (Fig. 4A and 4F). A significant increase in Δ *esxUT* burdens was found in zebrafish embryos (Fig. 4B) as well as in C3HeB/FeJ mice (Fig. 4G), presumably explaining the

increased mortality observed in both animal models (Fig. 4A and 4F). Furthermore, we observed a significantly higher proportion of embryos with granulomas at both 4 and 6 days post-infection (dpi), as well as a significantly increased number of embryos with abscesses at both 4 and 6 dpi in zebrafish infected with $\Delta esxUT$ as compared with WT and complemented strains (Fig. 4D and 4E). Similarly, we observed a significant increase in the number of CFU in the lungs, liver, kidneys and spleen at 14 and 20 dpi, confirming the increased growth of $\Delta esxUT$ *in vivo* (Fig. 4G). Overall, these findings indicate that deletion of *esxUT* in *M. abscessus* confers a hypervirulent phenotype in two complementary animal models.

Lack of specific immunological responses against EsxU and EsxT during infection in mice and disease in CF patients

The above-mentioned results suggest that the absence of EsxU and EsxT favors the survival and multiplication of *M. abscessus* within the infected host. However, while under natural infection conditions *M. abscessus* harbour both *esxU* and *esxT* genes, it is not known whether they are expressed *in vivo*, either during experimental infection or in humans with an *M. abscessus* disease. To address this question, we have analyzed the serological response raised against EsxU and EsxT in mice infected with *M. abscessus* as well as in cystic fibrosis (CF) patients, showing increased susceptibility to pulmonary infections by *M. abscessus* (27).

Mice were infected twice consecutively (15 days interval), subcutaneously with 10^6 CFU of WT, $\Delta esxUT$, and complemented strains. ELISA failed to detect specific antibody responses against EsxU and EsxT, regardless of the strains used to infect the mice. The anti- $\Delta esxUT$ antibody titers were comparable to those in uninfected animal, indicating a (near) complete absence of anti- $\Delta esxUT$ antibody production during infection (Fig. 5A). Conversely, a specific antibody response was generated against the Phospholipase C (PLC), included as a positive control (28).

In addition, a previously described panel of sera from CF patients infected with various microorganisms (Le Moigne et al., 2021) was analyzed to detect the presence of a humoral response against the EsxU/EsxT complex. No specific IgG response was detected in the sera from patients with *M. abscessus* infection, which was equivalent to the one observed in the CF patients

infected either with *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, or *Aspergillus* and in healthy controls (Fig. 5B). Collectively, these results underscore the lack of EsxU and EsxT antibody production during experimental or natural infection with *M. abscessus*.

Discussion

Despite the increasing incidence of *M. abscessus* infections, little is known regarding the route of transmission of human-acquired infections (29). Genetic evidence suggests that amoebae may represent an environmental reservoir, but this has not been clearly proven yet (7). The amoebae/*M. abscessus* pairing unraveled important virulence determinants in *M. abscessus* (23, 30), including a functional ESX-4 system (18). This was subsequently confirmed in *M. tuberculosis* and *M. marinum*, by studying secretion of two ESX substrates, EsxE and EsxF (17) and of the CpnT toxin (8, 31) and for which *M. tuberculosis* ESX-4 is essential for their secretion both *in vitro* and in macrophages (8). However, *M. tuberculosis* or *M. marinum* lacks one of the cornerstone of the ESX secretory machinery, EccE₄, as recently shown for ESX-3 and ESX-5, which calls into question a functional and or stable secretory apparatus (1, 2). An important aspect of this work relies on the role of ESX-4 in phagosomal membrane permeabilization/disruption (8), a feature previously ascribed for ESX-1, but without incriminating the EsxU or EsxT secreted substrates, encoded by the *M. tuberculosis* *esx-4* locus. Importantly, data on the secretion of these molecules by ESX-4 are still missing in pathogenic mycobacteria, which was recently confirmed in *M. marinum* (32).

Using molecular and biophysical approaches, we confirmed that both EsxU and EsxT are substrates of *M. abscessus* ESX-4, forming a 1:1 heterodimer which is secreted into the culture filtrate (Fig. 1) and capable of inducing stable lesions on a synthetic membranes (Fig. 2). The interaction with membranes was confirmed in macrophage experiments whereby Δ *esxUT* remained inside the phagosome and was unable to induce phagosome membrane damage. As anticipated, phagosome-cytoplasm communication was restored in the complemented strain (Figs. 3 and S3F). Comparatively, Δ *eccB4* also failed to induce phagosomal membrane permeabilization (18). The Δ *eccB4* secretome showed reduced secretion of EsxU and EsxT, confirming the

association between the presence of EsxU and EsxT and phagosomal membrane permeabilization and potential communication of *M. abscessus* with the macrophage cytosolic compartment (18). Finally, immunofluorescence and Western blotting emphasized the localization of EsxU and EsxT in the cell wall as well as in the culture filtrate. This localization indicates that EsxU and EsxT are well positioned to interact directly with the phagosomal membrane during the early intracellular steps of infection.

The phenotypic comparison between the two classes of mutants ($\Delta eccB4$ versus $\Delta esxUT$) revealed a major difference in their intracellular behavior. While $\Delta esxUT$ did not show a defect in intracellular growth compared to WT, presumably because it resides in phagosomes that do not acidify (Fig. 3), this contrasts with the phagosomes containing $\Delta eccB4$ that acidify, leading to reduced intracellular survival (18). The maintenance of *M. abscessus* within the phagosome, in contact with endocytosis and recycling pathways has been considered advantageous for intracellular multiplication of pathogenic mycobacteria (33). It allows escape from the apoptosis and autophagy mechanisms encountered in the cytosol, after phagosomal escape (34–36). Furthermore, differences in phagosomal acidification support the existence of additional bacterial substrate(s), that may still be present in $\Delta esxUT$ but not in $\Delta eccB4$. The absence of a functional secretion apparatus may have an impact on other compounds than just ESX-4 substrates, such as lipids. Indeed, the synergistic role of phthiocerol dimycocerosates (PDIM) associated with ESX-1-secreted effectors has been demonstrated in *M. tuberculosis* (37, 38). In *M. abscessus*, deletion of *mmpL8_{MAB}* involved in the transport of another lipid, designated GDND, does not allow the bacteria to damage the phagosomal membrane (39). These findings demonstrate the fine regulation and interaction between ESX-4 and its substrates in the pathophysiology of *M. abscessus* within phagocytic cells.

We show that $\Delta esxUT$ displays a hypervirulent phenotype in zebrafish and mice, supported by increased bacterial growth and mortality and enhanced granuloma and abscess formation, thus highlighting a central role for EsxU/EsxT in *M. abscessus* virulence. Given that EsxU/EsxT are largely found at the bacterial periphery and are capable of inducing phagosomal damage, one would predict that the absence of EsxU/EsxT leads to changes in the intracellular host-pathogen

interface. This is not surprising, given that the smooth variant of *M. abscessus* used in this study is characterized by a tight phagosomal apposition surrounding the bacterial surface in macrophages (40). Moreover, *M. abscessus* possesses a myriad of complex lipids on the outer surface, including glycopeptidolipids (GPL) and GDND, known to modulate infection outcomes and which are likely unaltered upon *esxUT* deletion. Interestingly, a hypervirulent phenotype was observed in adult zebrafish following infection with an ESX-5 mutant of *M. marinum* (41). Similarly to Δ *esxUT*, an *esx-5* transposon mutant of *M. marinum* in EspG was accompanied by increased granuloma formation in adult zebrafish, while no growth defect was observed in THP-1 macrophages, as compared to the WT *M. marinum*. In addition, deletion of a gene encoding a PE-PGRS protein (a substrate of ESX-5 in *M. tuberculosis*) exhibits a hypervirulent phenotype in mice (42). Together, these findings demonstrate that the ESX-4 substrates EsxU and EsxT can exhibit a virulence-associated phenotype similar to that of ESX-5 substrates such as PE-PGRS protein. Importantly, our data demonstrate a mechanism responsible for hypervirulence in animal models following deletion of *esxUT*.

The lack of immune recognition of EsxU and EsxT during infection in mice was confirmed by the absence of a specific serological response and similar results were found in the sera from CF patients infected with *M. abscessus* (43). The lack of humoral response against EsxU/EsxT is rather unexpected given the localization of the proteins on the bacterial surface. A likely explanation could rely on a partial or complete reduction of EsxU/EsxT production by *M. abscessus* once it is established within the host, perhaps as an adaptative mechanism to increase its virulence level. Overall, this lead to the tempting hypothesis linking the emergence of highly pathogenic mycobacterial species, such as *M. tuberculosis*, to the loss of ESX-4 substrate production resulting from the selection of non-functional ESX-4 systems lacking the essential EccE4 component.

Materials and Methods

Strains, Cells, and Culture Conditions

M. abscessus CIP104536^T was grown in Middlebrook 7H9 broth (BD Difco) supplemented with 1% of glucose or 0.05% Tween 80 and 10% oleic acid, albumin, dextrose, catalase (OADC enrichment; BD Difco) at 37°C in the presence of antibiotics, when required. For bacterial selection, media were supplemented either with 25 mg/L of zeocine (Thermo Fisher Scientific) for Δ esxUT, 1 g/L hygromycin (Invivogen) for strains carrying pTEC27 (Addgene, plasmid 30182) and pMVH361 or with 250 mg/L kanamycin when harboring the pMV306 or pVV16 derivatives. J774 cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ using Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). J774 cells were allowed to adhere in a 24-well plate at a density of 5x10⁴ cells/well for 24 h at 37°C in 5% CO₂.

Construction of EsxU and/or EsxT tagged with GFP and fluorescence microscopy

The *esxU* (MAB_3753c.), *esxT* (MAB_3754c), and *esxUT* genes were PCR-amplified using the primers sets 15/16, 17/18, and 19/20 (Table S1). The resulting amplicons were digested with NdeI/BamHI and subsequently ligated to NdeI-BamHI-linearized pVV16-GFP to produce an in-frame C-terminal fusion with GFP.

Extracellular bacilli expressing either GFP or EsxT-GFP or EsxU-GFP or EsxUT-GFP were imaged using confocal microscopy. High resolution confocal microscopy images were acquired with a LSM880 confocal microscope paired with an Airyscan module (ZEISS) with a 63x lens. The Zeiss LSM 880, Axio-Observer microscope is equipped with a Plan-Apochromat 63x Oil 1.4 NADIC M27 objective (Zeiss). The bacilli expressing GFP or EsxT-GFP or EsxU-GFP or EsxUT-GFP were sectioned (mode Z-stacks of 12 slide).

Identification of EsxT protein partners

Briefly, each bacterial pellet recovered from a 400-ml culture was resuspended in 2 ml of PBS containing 1 mM benzamidine. Subsequently, the bacteria were lysed using a bead beater and by incubating them in lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 1% Triton, 1% Bridj96 and protease inhibitor [Benzamidine]). Subsequently, the supernatants were

subjected to immunoprecipitation following the instructions provided with the available kit (GFP-Trap Agarose Beads from ChromoTek). Proteins bound to the beads were then separated and detected by silver staining. The remaining beads were subjected to trypsin treatment for mass spectrometry analysis..

Mass spectrometry analysis

After denaturation at 100 °C in 5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 1-mM EDTA, 10% glycerol, and 10-mM Tris pH 8 buffer for 3 min, protein samples were fractionated on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel. The electrophoretic migration was stopped as soon as the protein sample entered 6 mm into the separating gel. The gel was briefly labeled with Coomassie Blue, and three bands, containing the whole sample, was cut. In gel, digestion of gel slices was performed as previously described (44). An UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific) was used for separation of the protein digests. Peptides were processed and identified as previously described (45).

Proteomic data analysis

MS/MS data were analyzed using search engine Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK). Searches were performed with a tolerance on mass measurement of 10 ppm for precursor and 0.02 Da for-fragment ions, against a composite target-decoy database (181602*2 total entries) built with a *Mycobacterium abscessus* Uniprot database (taxonomy 561007, march 2020, 4940 entries) fused with the sequences of EsxT-GFP. For each sample, peptides were filtered out according to the cut-off set for protein hits with one or more peptides taller than 9 residues, and a 1% false positive rate.

EsxU and EsxT expression and purification in *M. smegmatis*

esxUT, *esxU* and *esxT* were amplified from *M. abscessus* ATCC 19977 genomic DNA inserted between NcoI and HindIII of the pMyNT vector using the SLiCE cloning method (Motohashi et al. 2015). The resulting constructs in the pMyNT vector were used to transform *M. smegmatis* mc²155 groEL1 Δ C cells and transformants were grown in 7H9 broth with 0.2%glycerol, 0.2 glucose and

0.05%Tween-80, 50 µg/ml Hygromycin. Gene expression was induced with 1% acetamide for 14 h at 37 °C. Cell pellets were stored at -80 °C until cells were lysed in a 50 mM Tris pH 8.5, 300 mM NaCl containing protease inhibitors and DNaseI using high-pressure emulsification. Unbroken cells were then removed by centrifugation (40 min at 12,000g) and proteins were purified using 5 mL HiTrap™ TALON® Crude (GE Healthcare) (5 CV equilibration, Load 100 mL sample, Wash 15 CV, 50 mM imidazole for 5 CV, 200 mM imidazole for 10 CV, 500 mM imidazole for 8 CV). The protein was then dialyzed into 50 mM Tris pH 8.5, 300 mM NaCl overnight in presence of TEV protease and ran through a 5 mL HiTrap™ TALON® Crude (GE Healthcare). The resulting protein was then concentrated and run through an S75 preparative column (GE Healthcare). Concentration was performed using ultrafiltration (AMICON® MWCO 3kDa). Protein purity was assessed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

EsxU and EsxT expression and purification in *E. coli*

esxUT, *esxU* and *esxT* were also cloned in the plasmid pET6×HN-C (Clontech, CA, USA), under the control of the T7/lac hybrid promoter, for expression in *E. coli* BL21(DE3) strain; Primers used for cloning are given in Table S1. Recombinant proteins were expressed after addition of IPTG at concentration from 0.1 to 10 mM in a 4 h culture realized at 28°C. They were purified either under native or denaturing conditions. In this ultimate case, IPTG-induced bacterial pellet was resuspended in a 7 M urea buffer (with 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0). After incubation for 15 min with agitation and centrifugation at 12,000 g for 30 min, cleared supernatant was passed on a Ni-NTA column pre-equilibrated with lysis buffer. Then a second buffer (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl) with various pH was used for washes (first pH 6.3 and then pH 5.9) and elution (pH 4.5).

RNA extraction, qRT-PCR,

RNA and cDNA were prepared from 5 ml of mid-logarithmic-phase bacterial cultures grown in 7H9. Control experiments without reverse transcriptase were performed for each RNA sample to rule out DNA contamination. The *sigA* gene was used as an internal control. The sequences of primers used for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) are listed in Table S1. For isolation of bacterial

RNA from *M. abscessus*-infected J774 macrophages, RNA were extracted as previously describe (30). Each qRT-PCR was performed with three biological replicates.

Protein extraction and analysis

To prepare bacterial lysates, *M. abscessus* cultures grown in Sauton's were centrifuged at 2,000xg, the supernatant was freezed and concentrated with Amicon 3K (Merck Millipore). Then, cell pellet was resuspended in Tris-buffered saline (TBS) with a cocktail of protease inhibitor (Roche) (the resuspension volume was normalized according to OD₆₀₀) All steps were performed at 4°C. Samples were sonicated on ice three times for 30 s each time and centrifuged at 1,000 × g. Lysate was centrifuged at 16,000g 30 min to obtain cytosol and plasma membrane in the supernatant and cell wall in the pellet. Cytosol and plasma membrane were separated by ultracentrifugation at 100,000 × g 3h. Protein concentrations in all sample were determined using the Bradford assay and 4µg of each sample were then separated using 15% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with mouse serum collected after DNA immunization (In-Cell-Art, Nantes, France) as previously describe (28). The specificity of the mouse serum (dilution, 1/500) was checked using a crude lysate from *E. coli* expressing the recombinant His-tagged EsxT or EsxU proteins. A peroxidase-conjugated goat antimouse IgG (H + L, Southern Biotech) was then added (dilution, 1/2,000) prior to detection using the peroxidase substrate. Mice anti-GroEL antibodies were used as a loading control and Ag85 antibodies were used as sereted protein control.

SEC-MALLS Experiments

The EsxT homodimer and EsxU/EsxT heterodimeric proteins were purified as detailed above and dialyzed in both 20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 % glycerol and 20 mM acetic acid pH 3.0, 300 mM NaCl, 5 % glycerol overnight. EsxT and EsxU/EsxT were injected at 10 mg/ml, and experiments were performed at a flow rate of 0.8 ml/min. SEC-MALLS was performed using an Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC system and an S200 5/150 (GE Healthcare). Protein elution was detected by absorbance at 280 nm, and protein concentration was quantified with differential refractometry using an Optilab T-rEX detector (Wyatt). Light scattering data were measured with a

miniDAWN TREOS multiangle light scattering detector (Wyatt). Molecular weights were computed from the concentration and light scattering data using the software ASTRA version 7.1.3.15 (Wyatt).

Pore spanning lipid bilayer (NanoSpot assay)

Indium tin oxide (ITO)-coated glass slides were used for the electroformation of giant unilamellar vesicles (GUVs), made of dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC, Avanti Polar Lipids, Alabama, USA, Cat # 850375P) as described before(46, 47).

For the preparation of lipid bilayers, a Si/SiO₂ chip-based protocol based on the one described in (48), was previously developed and tested in the laboratory. The chips were prepared “in house” using silicon wafer with pre-cut and pre-etched chips (Micromotive GmbH, Mainz, Germany). 250 µl of SEC buffer (300 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.5) was added to each well and the chamber was sonicated for 2 min to remove air bubbles trapped in the cavities. 5 µl of Atto488 carboxy fluorescence dye (ATTO-TEC GmbH, North Rhine-Westphalia, Germany, Cat # AD 488-21) was added to each well (final concentration of 5 nM), followed by 50 µl of previously harvested GUVs. Chambers were centrifuged at 400xg for 10 min at room temperature (Heraeus® Megafuge® 1.0, Germany) to allow rupture of GUVs and formation of lipid bilayers on top of the cavities. The chamber was placed in a dark camera kept at 37°C connected to a fluorescence inverted microscope (MORE integrated Life Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific FEI Munich formerly Till Photonics, Planegg, Germany) equipped with a 10x/0.45 objective (planapochromat 420640–9900–000, Zeiss, Jena, Germany), a FITC filterset (ET480_40x/ET535_50m/T510LPXRXT, Chroma, Rockingham, USA) and LED (transmitted light) and oligochrome (fluorescence) light sources (Thermo Fisher Scientific). 16-bit images were taken with a Andor clara low light imaging interline CCD camera (Andor Technology plc, Belfast, Northern Ireland) using Live Acquisition Software (LAS V. 2.2.2, Thermo Fisher Scientific). 20µl of EsxU/EsxT was added to the well to initiate the experiment. Membrane permeabilization was detected in terms of fluorescence dye-efflux. In some experiments, 10 µl of 10 mg/ml TexasRed®-

labeled dextran molecules (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) of 40 000 MW were added before the complex.

Image analysis (drift correction, identification of fluorescent areas, and extraction of time series) was done with ImageJ 1.52p (USA). Final data analysis and graphs were done with and GraphPad Prism software version 9.0.

Δ esxUT Mutant Construction and Complementation

Disruption of the *esxUT* gene marked with a zeocine resistance cassette was performed using the recombineering system as described previously (23, 49). Complementation was performed after amplifying and cloning *esxUT* into the integrative plasmid pMVH361 as described (23)

Disruption of the *esxUT* gene unmarked in *M. abscessus* was performed as described previously (50). Complementation was performed after amplifying and cloning *esxUT* into the integrative plasmid pMV306 as described (50).

Cell Infection Assays and Flow Cytometry Analysis to Study Phagosomal Rupture

Infection of J774.2 M Φ and *A. castellanii* infection were performed as previously described (18). After J774.2 infection in 12-well plates CCF-4 FRET measurements to study phagosomal rupture were performed as described (51).

Analysis of Phagosomal Acidification by LysoTracker Colocalization

J774.2 M Φ were distributed into 24-well plates containing glass coverslips and were infected with *M. abscessus* expressing mCherry for 3h at 37°C, 5% CO₂. Infected cells were treated 1h with amikacin (250 μ g/ml) to kill extracellular bacteria and Green LysoTracker (dilution, 1/2000) (Thermofischer) was added to each well. Colocalization of cell infected by mCherry *M. abscessus* and green Lysotraker was measured by Pearson correlation by analyzing more than 100 infected cells from at least 10 random fields with a Leica SP8-X confocal microscope. Pictures analyses and PCC evaluation were done with Icy and Image J software.

Mice infection and bacterial load determination

Animal experiments were performed according to institutional and national ethical guidelines (Agreement n°783223). C3HeB/FeJ mice were infected intravenously (i.v.) in the tail vein with 1×10^8 CFU/mouse in a total volume of 200 μ l of water containing 0.9% sodium chloride, either with the wild-type smooth *M. abscessus* strain or with Δ esxUT mutant. Mice were then euthanized and experimental groups were evaluated for bacterial burden in the lungs, liver, spleen and kidneys on day 1, 7, 14 and 20. Whole organs were harvested and were homogenized, serially diluted, and plated onto VCAT (vancomycin, colistin sulfate, amphotericin B, and trimethoprim) chocolate agar plates (bioMérieux, France) and incubated for 5 to 6 days at 37°C before CFU counting. Bacterial load in each group are expressed as $\log_{10}$ CFU $\pm$ SD at 1, 7, 14 and 20 dpi. Five mice were used per group except for day 1 (four mice) and day 20 in mutant strain (two mice due to precocious death). Differences between means were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey posttest, allowing for multiple comparisons. n.s., nonsignificant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Experiment was performed twice.

Zebrafish experiments

Zebrafish experiments were completed under European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm). Housing and husbandry were approved by the Direction Sanitaire et Vétérinaire de l'Hérault for the CRBM zebrafish facility (Montpellier) (registration number C-34-175-39). Handling and experiments were approved by "le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation" under the reference APAFIS#24406-2020022815234677 V3. Zebrafish infections were completed as previously described (25, 52). The golden mutant zebrafish line and the Tg(mpeg:mCherry) red fluorescent macrophage line were used as previously described. Embryos at 30 hours post-fertilisation were dechorionated and anaesthetised in tricaine prior to caudal vein injection with 2-3 nL of *M. abscessus* strains (~ 100 CFU/nL) expressing TdTomato fluorescent protein under the control of pTEC27 plasmid. After infection, embryos were recovered in fresh embryo water and placed into 24-well plates with (2 embryos/well. Embryos were monitored daily,

with dead embryos removed from the well daily until 12 days post-infection. At 2, 4 and 6 days post-infection, embryos were anaesthetised in tricaine and placed on 3% methylcellulose (w/v) for fluorescent microscopy using Zeiss Axio Zoom.V16 coupled with an Axiocam 503 mono (Zeiss). Granulomas were quantified based on the bacterial colocalisation with macrophage fluorescent signal. Bacterial burden was quantified in ImageJ using the 'Analyze particles' function to quantify bacterial fluorescence. Abscesses were quantified based on the large uncontrolled extracellular growth of fluorescent bacteria that exceeded 100 µm in diameter. All experiments were performed in at least three independent experiments.

EsxU/EsxT ELISA

A total of 173 sera from CF patients, including 33 patients with *M. abscessus* positive cultures, and 31 non-CF healthy controls were analyzed. The distribution of the different groups depending on the results of sputum cultures were previously described (43). IgG levels were evaluated by indirect ELISA assays using a EsxU/EsxT recombinant protein complex with sera diluted at 1/400. ELISA assays were developed as previously described (Le Moigne et al., 2021) with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG (Southern biotechnology, Birmingham, USA) diluted in PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 0.5% BSA (PBS-T-BSA). OD mean $\pm$ standard deviation was calculated for each patient group.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Kate Beckham for her preliminary guidance on protein expression and purification, Dr. Christian Nehls for his advice throughout the biophysical experiments and Dr Tobias Dallenga for advices, Sonja Stack for her help and expertise in purifying some of the EsxU and EsxT proteins for the biophysical experiments and Sabrina Groth for performing the TethaPod experiments, Pr. Roland Brosch and his team (Institut Pasteur, Paris) for providing GroEL antibodies, and CCF-4, and Aurore Desquennes for her technical support.

We are also truly grateful to Chloé Maille and Chloé Chaillou for their precious help in protein purification and serological analysis. We are grateful to the Montpellier RIO Imaging facilities, P. Richard and M. Plays for zebrafish husbandry,

This project received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under Marie Skłodowska-Curie grant agreement n° 846476 (to C.P.) and from the Joachim Herz Stiftung, Hamburg, Germany (to M.W. and F.P.M. as members of the Infectophysics Consortium). F.P.M. was supported by a financial grant from Mukoviszidose Institut gGmbH, Bonn, the research and development arm of the German Cystic Fibrosis Association Mukoviszidose e.V. M.L. received funding from the French associations 'Vaincre la mucoviscidose Association and Grégory Lemarchal Association' (grant agreement n°RIF20190502522). MDJ received a post-doctoral fellowship from the Labex EpiGenMed, program «Investissements d'avenir» (ANR-10-LABX-12-01).

References

1. Beckham, *et al.*, Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat Microbiol* **2**, 17047 (2017).
2. N. Famelis, *et al.*, Architecture of the mycobacterial type VII secretion system. *Nature* **576**, 321–325 (2019).
3. N. Poweleit, *et al.*, The structure of the endogenous ESX-3 secretion system. *eLife* **8**, e52983 (2019).
4. C. M. Bunduc, *et al.*, Structure and dynamics of a mycobacterial type VII secretion system. *Nature* **593**, 445–448 (2021).
5. E. Dumas, *et al.*, Mycobacterial Pan-Genome Analysis Suggests Important Role of Plasmids in the Radiation of Type VII Secretion Systems. *Genome Biol Evol* **8**, 387–402 (2016).
6. M. Newton-Foot, R. M. Warren, S. L. Sampson, P. D. van Helden, N. C. Gey van Pittius, The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems. *BMC Evol Biol* **16**, 62 (2016).
7. F. Ripoll, *et al.*, Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS ONE* **4**, e5660 (2009).
8. D. Pajuelo, *et al.*, Toxin secretion and trafficking by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **12**, 6592 (2021).
9. J. M. Tufariello, *et al.*, Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E348–357 (2016).
10. M. S. Siegrist, *et al.*, Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 18792–18797 (2009).
11. A. S. Pym, P. Brodin, R. Brosch, M. Huerre, S. T. Cole, Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* **46**, 709–717 (2002).
12. A. M. Abdallah, *et al.*, The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J. Immunol.* **181**, 7166–7175 (2008).
13. L. S. Ates, *et al.*, The ESX-5 System of Pathogenic Mycobacteria Is Involved In Capsule Integrity and Virulence through Its Substrate PPE10. *PLoS Pathog* **12**, e1005696 (2016).
14. T. A. Gray, *et al.*, Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. *Science* **354**, 347–350 (2016).
15. J. Augenstreich, *et al.*, Phthiocerol Dimycocerosates From *Mycobacterium tuberculosis* Increase the Membrane Activity of Bacterial Effectors and Host Receptors. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 420 (2020).
16. Houben, *et al.*, ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell. Microbiol.* **14**, 1287–1298 (2012).

17. U. Tak, T. Dokland, M. Niederweis, Pore-forming Esx proteins mediate toxin secretion by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **12**, 394 (2021).
18. L. Laencina, *et al.*, Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E1002–E1011 (2018).
19. C. Poulsen, S. Panjikar, S. J. Holton, M. Wilmanns, Y.-H. Song, WXG100 protein superfamily consists of three subfamilies and exhibits an α -helical C-terminal conserved residue pattern. *PLoS ONE* **9**, e89313 (2014).
20. F. X. Berthet, P. B. Rasmussen, I. Rosenkrands, P. Andersen, B. Gicquel, A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology (Reading, Engl.)* **144** (Pt 11), 3195–3203 (1998).
21. P. S. Renshaw, *et al.*, Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J.* **24**, 2491–2498 (2005).
22. R. Simeone, F. Sayes, E. Lawarée, R. Brosch, Breaching the phagosome, the case of the tuberculosis agent. *Cell Microbiol* **23**, e13344 (2021).
23. J. C. Bakala N’Goma, *et al.*, *Mycobacterium abscessus* phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances *M. abscessus* virulence in mice. *Infect Immun* **83**, 780–791 (2015).
24. V. Dubois, *et al.*, *Mycobacterium abscessus* virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages. *PLoS Pathog* **15**, e1008069 (2019).
25. A. Bernut, *et al.*, *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E943–E952 (2014).
26. V. Le Moigne, *et al.*, Efficacy of Bedaquiline, Alone or in Combination with Imipenem, against *Mycobacterium abscessus* in C3HeB/FeJ Mice. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, e00114-20 (2020).
27. A.-L. Roux, *et al.*, Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 4124–4128 (2009).
28. V. Le Moigne, *et al.*, Bacterial phospholipases C as vaccine candidate antigens against cystic fibrosis respiratory pathogens: the *Mycobacterium abscessus* model. *Vaccine* **33**, 2118–2124 (2015).
29. M. D. Johansen, J.-L. Herrmann, L. Kremer, Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Rev. Microbiol.* (2020) <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>.
30. V. Le Moigne, *et al.*, MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection. *Infect Immun* **84**, 2895–2903 (2016).
31. B. Izquierdo Lafuente, R. Ummels, C. Kuijl, W. Bitter, A. Speer, *Mycobacterium tuberculosis* Toxin CpnT Is an ESX-5 Substrate and Requires Three Type VII Secretion Systems for Intracellular Secretion. *mBio* **12**, e02983-20 (2021).
32. Wang, *et al.*, Crosstalk between the ancestral type VII secretion system ESX-4 and other T7SS in *Mycobacterium marinum*. *iScience* **25**, 103585 (2022).

33. L. Tailleux, *et al.*, Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* **170**, 1939–1948 (2003).
34. R. Simeone, *et al.*, Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* **8**, e1002507 (2012).
35. M. G. Gutierrez, *et al.*, Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
36. I. Vergne, *et al.*, Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4033–4038 (2005).
37. J. Augenstreich, *et al.*, ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol* **19** (2017).
38. J. Quigley, *et al.*, The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **8** (2017).
39. V. Dubois, *et al.*, MmpL8MAB controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10147–E10156 (2018).
40. A.-L. Roux, *et al.*, The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* **6** (2016).
41. E. M. Weerdenburg, *et al.*, ESX-5-deficient *Mycobacterium marinum* is hypervirulent in adult zebrafish. *Cell Microbiol* **14**, 728–739 (2012).
42. L. S. Ates, *et al.*, Mutations in *ppe38* block PE_PGRS secretion and increase virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Microbiol* **3**, 181–188 (2018).
43. V. Le Moigne, *et al.*, Serological biomarkers for the diagnosis of *Mycobacterium abscessus* infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, S1569-1993(21)01360–6 (2021).
44. L. Miguet, *et al.*, Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res* **8**, 3346–3354 (2009).
45. L. Berry, *et al.*, *Toxoplasma gondii* chromosomal passenger complex is essential for the organization of a functional mitotic spindle: a prerequisite for productive endodyogeny. *Cell Mol Life Sci* **75**, 4417–4443 (2018).
46. C. Herold, G. Chwastek, P. Schwille, E. P. Petrov, Efficient electroformation of supergiant unilamellar vesicles containing cationic lipids on ITO-coated electrodes. *Langmuir* **28**, 5518–5521 (2012).
47. H. Bi, D. Fu, L. Wang, X. Han, Lipid nanotube formation using space-regulated electric field above interdigitated electrodes. *ACS Nano* **8**, 3961–3969 (2014).
48. I. Kusters, A. M. van Oijen, A. J. M. Driessen, Membrane-on-a-chip: microstructured silicon/silicon-dioxide chips for high-throughput screening of membrane transport and viral membrane fusion. *ACS Nano* **8**, 3380–3392 (2014).

49. H. Medjahed, A. K. Singh, Genetic manipulation of *Mycobacterium abscessus*. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 10**, Unit 10D.2 (2010).
50. A. Viljoen, A. V. Gutiérrez, C. Dupont, E. Ghigo, L. Kremer, A Simple and Rapid Gene Disruption Strategy in *Mycobacterium abscessus*: On the Design and Application of Glycopeptidolipid Mutants. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 69 (2018).
51. R. Simeone, *et al.*, Cytosolic Access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. *PLoS Pathog* **11**, e1004650 (2015).
52. A. Bernut, *et al.*, Deciphering and Imaging Pathogenesis and Cording of *Mycobacterium abscessus* in Zebrafish Embryos. *J Vis Exp* (2015) <https://doi.org/10.3791/53130>.

Figure Legends

Fig 1. *M. abscessus* EsxU and EsxT are co-expressed and secreted by ESX-4.

(A) Schematic representation of the *M. abscessus* *esx-4* gene cluster. (B) Model of *M. abscessus* EsxU/EsxT made using ProMod version 3.3.2.10 and based on the NMR structure of *M. tuberculosis* EsxAB (PDB code: 1wa8.1). EsxU and EsxT are shown in orange and green, respectively, and the essential residues of the WxG motifs and the secretion sequence are represented in boxes. (C) Representative confocal microscopy images of Δ *esxUT* strains expressing either GFP, EsxT-GFP, EsxU-GFP or EsxUT-GFP to illustrate protein localization. A series of Z-stacks were collected with a Zeiss LSM880 Airyscan confocal microscope and the images were assembled and reconstructed with Zen blue software. (D) Immunoblotting showing the localization of EsxU and EsxT in different fractions: culture filtrate (CF), total lysate (TL), cell wall (CW) and plasma membrane (PM). The cytosolic marker GroEL and the secreted protein Antigen 85B were included as controls. MW, molecular weight marker. (E, left) Co-purified *M. abscessus* EsxU/EsxT complex that was cloned and expressed in *M. smegmatis*, observed at approximately 10 kDa in 15% Coomassie-stained SDS-PAGE. (Right) EsxT homodimerization (green) and EsxU/EsxT heterodimerization (gray) were observed by SEC-MALLS. (F) Ni-NTA column purification of His-tagged EsxT alone in denaturing condition (with urea) and co-purification of EsxU and EsxT in native condition (without urea) in *E. coli*.

Fig 2. Interaction of the *M. abscessus* EsxU/EsxT complex with DOPC bilayers.

(A) Schematic of the NanoSpot method. DOPC bilayers were built over cavities filled with a fluorescent dye (green). A second fluorescent dye of known size (red) was added to the top of the membrane prior to addition of the protein complex. Fluorescent signals were continuously measured to monitor the interaction between the protein and the membrane. (B) Dye influx and efflux using the NanoSpot technique. DOPC bilayers were formed at 37°C and pH 7.2 on top of cavities filled with Atto488 carboxy fluorescence dye. Fluorescence (black curve) decreases with increasing EsxU/EsxT concentration up to 80 μ M. Upon addition of Triton X-100, fluorescence decreased abruptly. The red curve represents the trend line of fluorescence loss if no protein had

been added. Over 300 cavities covered with DOPC membrane are plotted in this graph. (C) 40,000 MW TexasRed-labelled dextran was added to the media outside the cavities before the EsxU/EsxT complex was supplemented to the well (final concentration: 10 μ M). Green dots represent efflux of Atto488 carboxy efflux dye and red dots represent influx of TexasRed dye. Each graph represents one cavity.

Fig 3. *ΔesxUT* is maintained in an intact phagosome without acidification in macrophages.

(A) Expression of *esxU* and *esxT* genes in J774.2 macrophages at 4 hrs and 24 hrs post-infection (black) relative to planktonic growth expression in broth medium (gray). (B) Relative intracellular survival of WT (black), *ΔesxUT* (red), and *ΔesxUT::esxUT* (blue) strains as determined by CFU counts during infection in J774.2 macrophages at an MOI of 10:1. (C) Phagosomal rupture detected by CCF-4 FRET-based flow cytometry. Results are depicted as signal overlays per group with 1,000,000 events per condition acquired in WT (black line), heat-killed (dotted line), *ΔesxUT* (red line), *ΔesxUT::esxUT* (blue line) strains and in uninfected cells (NI, gray line). (D) Colocalization of *M. abscessus* WT, heat-killed, *ΔesxUT* and *ΔesxUT::esxUT* strain expressing mCherry with the acidotropic dye LysoTracker Green in infected J774.2 cells. Arrows indicate intracellular mycobacteria co-localizing with LysoTracker green. (Scale bar, 10 μ m). (E) mCherry-labeled strains colocalized with LysoTracker were measured by Pearson correlation of at least 100 infected cells in 10 different fields. Data are representative of three (B and C) or two (D and E) independent experiments and represent means $\pm$ SEM. *P* values were determined by ANOVA with Tukey's test using GraphPad prism program (A and B) and unpaired t test (E); ns, not significant; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

Fig 4. *ΔesxUT* is hypervirulent in zebrafish and C3HeB/FeJ mice.

(A) Zebrafish were injected with 250-300 CFU of *M. abscessus* strains by tail vein injection and monitored daily for a 12-day infection period to determine relative embryo survival (B). At 6 dpi, zebrafish embryos were imaged under a fluorescent microscope and fluorescent pixel counts (FPC) calculated for each group using ImageJ. Each dot represents an individual embryo. (C) At 2, 4 and 6 dpi, infected zebrafish embryos were imaged using fluorescence microscopy to calculate

the number of embryos with granulomas. Granulomas were identified on the basis of colocalisation of several fluorescent macrophages at an infection foci. (D) On days 2, 4, and 6 dpi, infected zebrafish embryos were imaged using fluorescence microscopy to calculate the proportion of embryos with abscesses. Abscesses were identified based on the relative size of infection foci far exceeding the surrounding recruited immune cells, representing uncontrolled bacterial growth. (E) Representative images of zebrafish infected with *M. abscessus* strains at day 6 post-infection. Red represents bacterial infection foci. Scale bar = 1mm. (F) Survival curves of C3HeB/FeJ mice after tail vein infection with 10^8 CFU/mouse of WT (black line) and Δ esxUT (red line). (G) CFU counts of WT (black dots) and Δ esxUT (red dots) in lung, liver, kidney, and spleen at 1, 7, 14, and 20 dpi. *P* values were determined by ANOVA with Tukey's test using GraphPad prism program (A and B) and unpaired *t* test (E); ns, not significant; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001. The log-rank (Mantel-Cox) test for Kaplan-Meier survival curves was used to assess survival statistics significance.

Fig 5. Lack of immunological response against EsxU/EsxT during infection.

(A) Five BALB/c mice per group were infected sub-cutaneously twice (with a four weeks latency/interval) with 10^6 CFU WT (orange line), Δ esxUT (yellow line) or Δ esxUT::esxUT (pink line). Antibody response against EsxU/EsxT was determined by ELISA two weeks after the second infection. Sera from uninfected mice (green line) were also analyzed to assess the baseline of aspecific antibody binding. Superposed is the antibody response against Phospholipase C (PLC) (gray line). (B) IgG response in the different groups of CF patients infected with various pathogens: *Mabs*, MAC, other NTM, Pa, NTM-/Pa-, F and in healthy controls (HC) using purified recombinant EsxU/EsxT as antigen. Each dot represents one patient in the scatterplots. CF patients were classified based on their culture-positivity: for *M. abscessus* (*Mabs*), mycobacteria of the *M. avium* complex (*M. avium*, *M. chimaera* or *M. intracellulare*), for other non-tuberculous mycobacteria (other NTM), for *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), for fungi (F). NTM-/Pa- represents CF patients without a positive culture for NTM and *Pseudomonas aeruginosa*. Finally, the HC group represents healthy controls who are not CF patients.

Fig S1. Confirmation of EsxU and EsxT partnership by GFP-pulldown experiments and mass spectrometry.

(A) EsxU and EsxT were fused to a C-terminal GFP tag under the control of the *hsp60* promoter. Molecular weight in kDa is indicated at the bottom of each schema. (B) Western blot analysis of Δ esxUT strain expressing GFP, EsxT-GFP, EsxU-GFP or EsxUT-GFP fusion proteins using anti-GFP antibodies. (C) Illustration of the affibody GFP nanobody pull-down kit. (D) Silver-stained gel showing that a major band migrating between 10 and 15 kDa, presumably corresponding to EsxU, was detected after immunoprecipitation using anti-GFP nanobodies. The bacterial strain stably expressing GFP was used as a negative control. The eluates of GFP and EsxT-GFP beads were subjected to mass spectrometry analysis. (E) Selection of the most representative proteins belonging to the EsxT interaction network.

Fig S2. Construction of Δ esxUT knockout mutant.

(A *Left*) Strategy for generating Δ esxUT by homologous recombination between the allelic exchange sequence and the genomic DNA of *M. abscessus*. The *esxUT* gene is replaced with a zeocin resistance cassette. The arrows represent the primers used to verify the mutation. (*Right*) Primers in *esxU* and *esxT* were used as controls. (B) Comparison of WT (black), Δ esxUT (red) and Δ esxUT::*esxUT* (blue) bacterial growth in 7H9 tween medium. (C) Colony morphology of WT, Δ esxUT and Δ esxUT::*esxUT* strains under the binocular microscope. (D) Relative intracellular survival of WT (black), Δ esxUT (red), and Δ esxUT::*esxUT* (blue) strains as determined by CFU counts during co-culture with the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. Data are representative of three independent experiments and represent means $\pm$ SEM. *P* values were determined by ANOVA with Tukey's test using the GraphPad prism program. ns, not-significant.

Fig S3. The unmarked Δ esxUT behaves similarly to the recombineering Δ esxUT mutant

(A) The *esx4UT* genes are sandwiched between *MAB_3755c* and the *50S ribosomal protein L13* gene. The plasmid pUX1-katG-*esxUT* was generated to remove the *esxUT* genes by double homologous recombination. Black arrows represent the primers used for PCR analysis. (B) PCR analysis demonstrating deletion of *esxUT* genes. Genomic DNA from WT bacteria was used to amplify

the intact *esxUT* locus. The mutant amplicon (2127 bp) was subjected to sequencing to confirm the proper deletion of *esxUT*. (C) The Δ *esxUT* mutant was complemented using the integrative pMV306 carrying either *esxU*, *esxT* or *esxUT* fused to a C-terminal HA tag under the control of the *hsp60* promoter. The molecular weight in kDa is indicated at the bottom of each schema. (D) Western blot analysis of complemented strains expressing single or combined subunits fused to an HA tag using anti-HA and anti-KasA (loading control) antibodies. (E) Relative intracellular survival of WT (black), Δ *esxUT* (red), and Δ *esxUT*::*esxUT* (blue) strains as determined by CFU counts during infection in THP-1 human macrophages (M Φ) at an MOI of 10:1. (F) Phagosomal rupture detected by CCF-4 FRET-based flow cytometry. Results are depicted as signal overlays per group with 1,000,000 events per condition acquired in WT (dark line), heat-killed (dark dotted line), Δ *esxUT* (red line), and uninfected (NI, light gray filled curve) strains. Data are representative of two independent experiments.

Figure 1

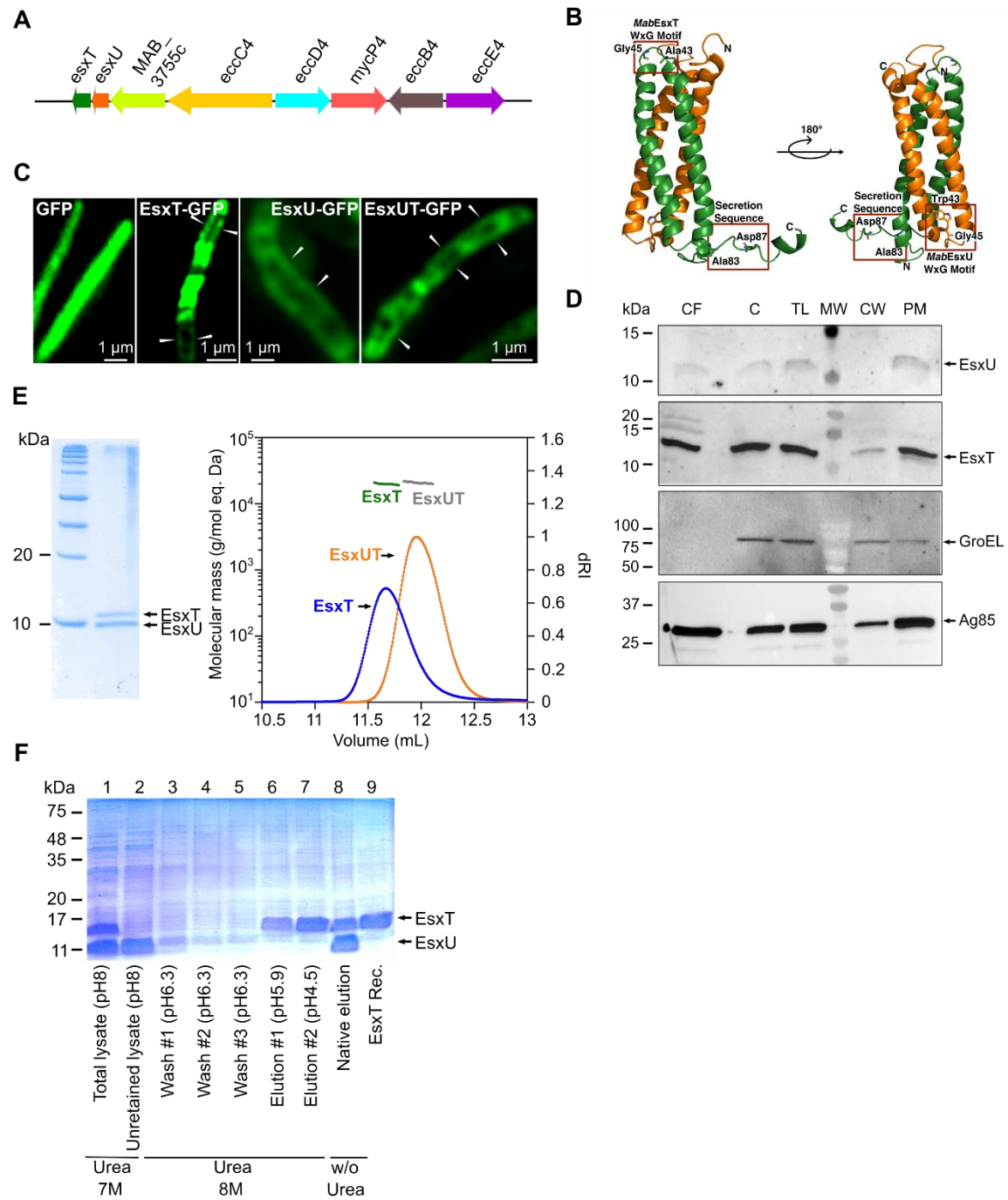


Figure 2

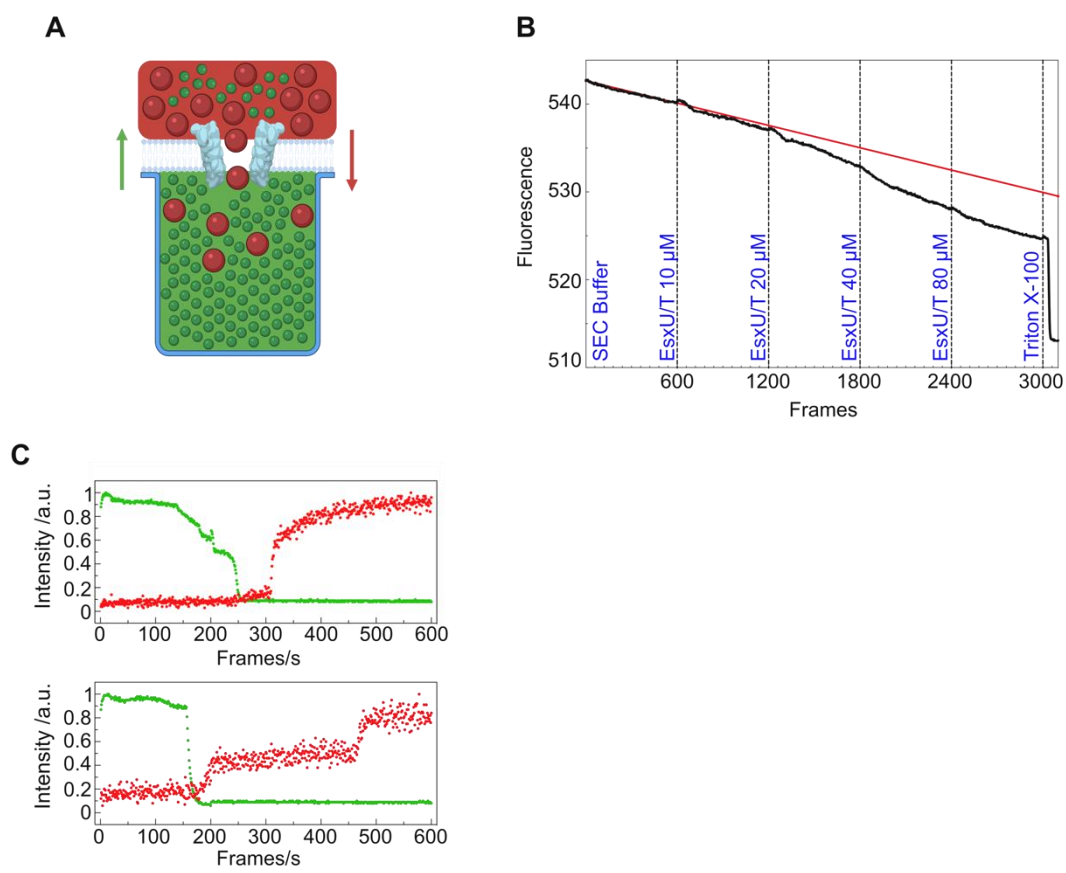


Figure 3

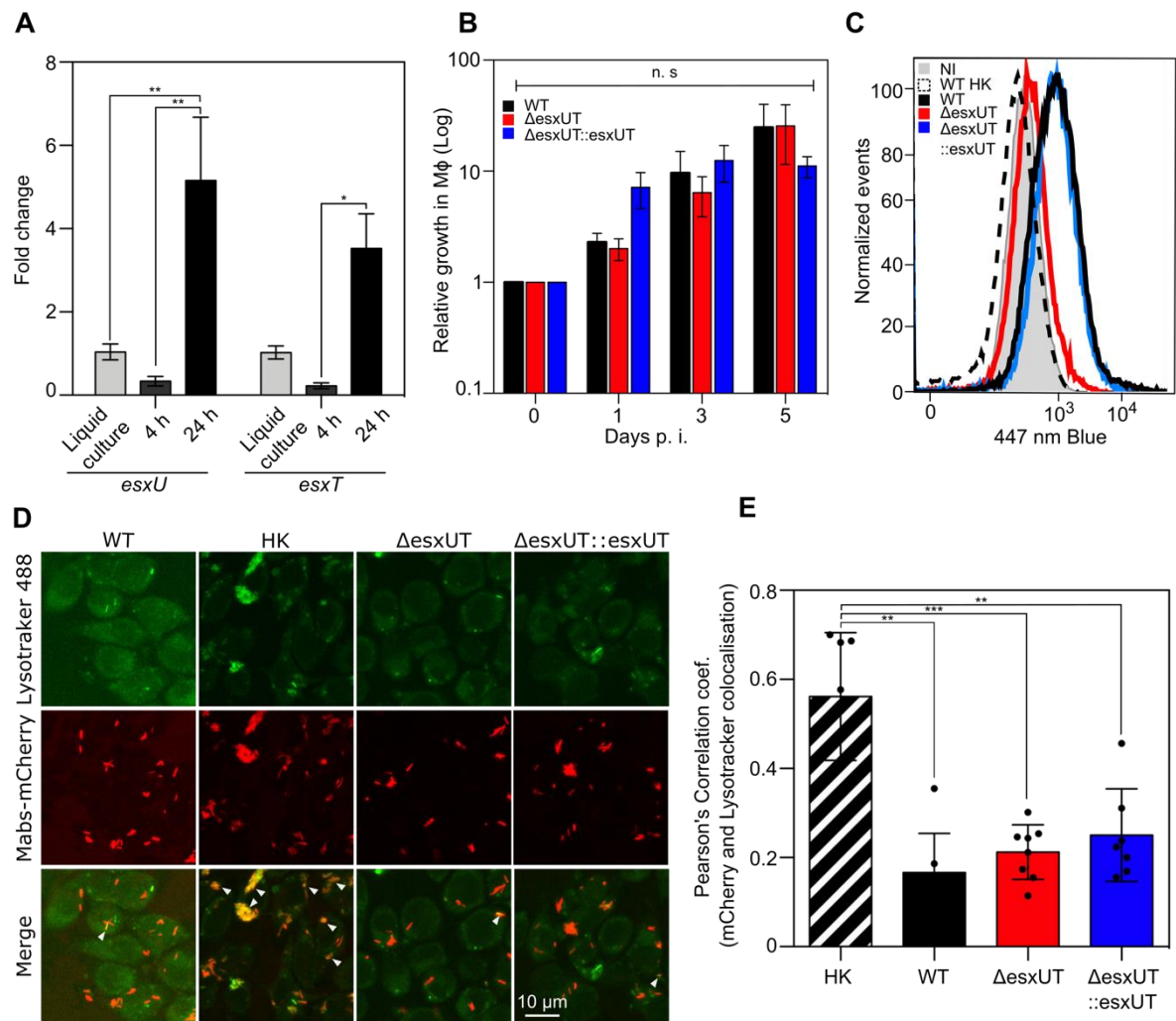


Figure 4

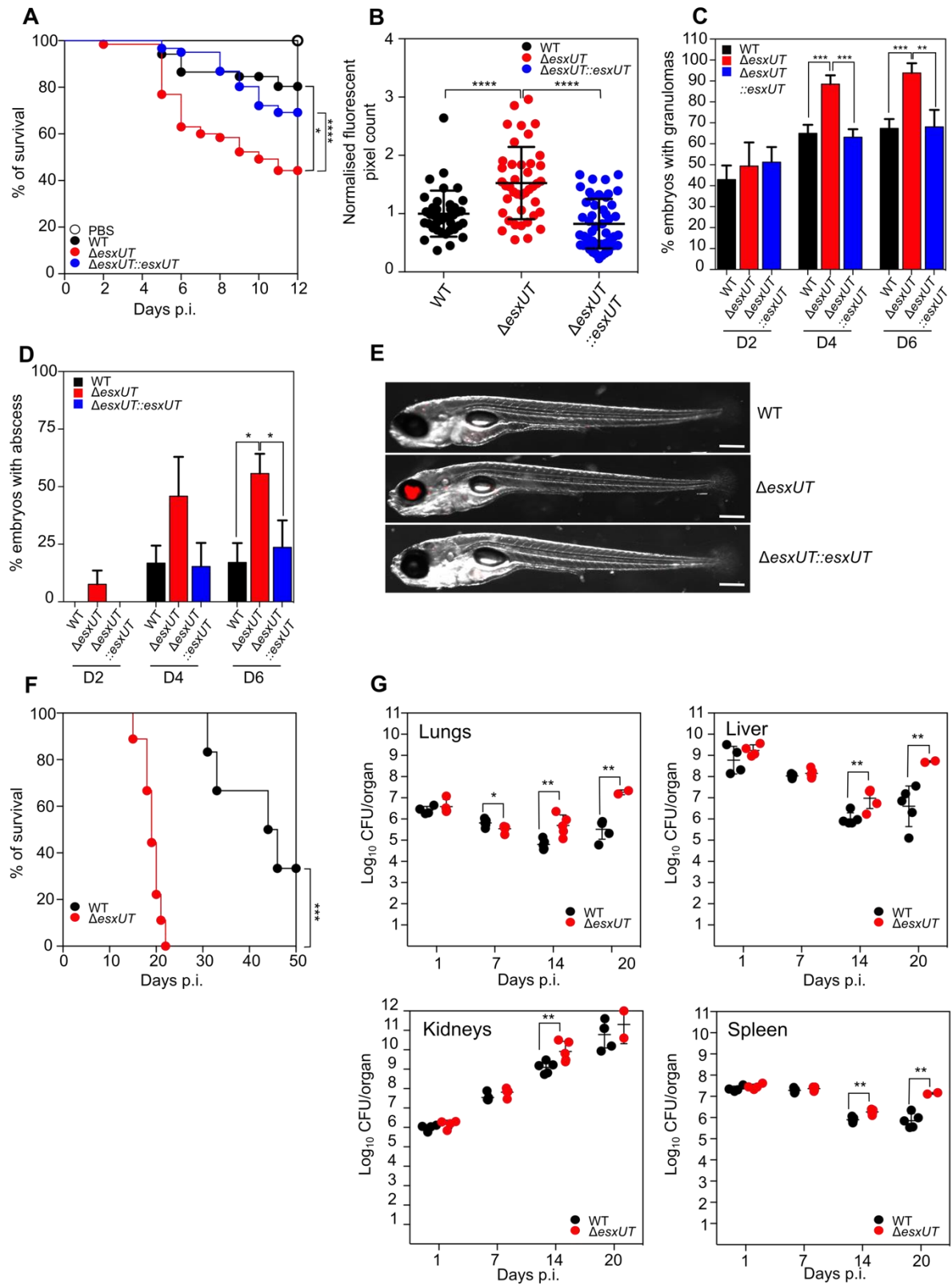
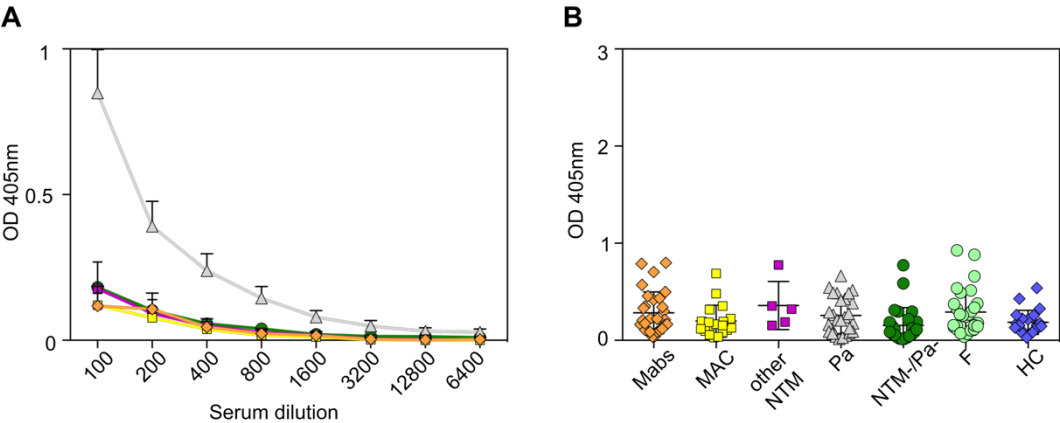


Figure 5



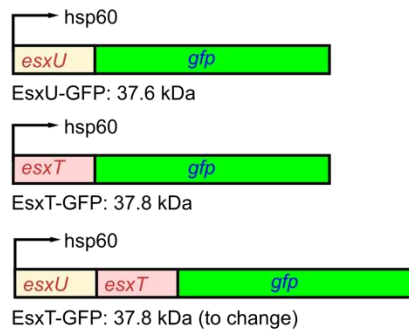
Supplementary Table 1: primers used in this study

Number	5'→3' sequence	Restriction site	F (sense), R (antisense)
Cloning in pUX1-katG			
1	gagaTTAATTAAtagtccgcgatgaa cgtccaggagt	PacI	To clone the right arm of <i>esxUT</i> in pUX1-katG (F)
2	gagaCAATTGATTCTGAAAAACAGCC ACTtcagttcctccc	MfeI	To clone the right arm of <i>esxUT</i> in pUX1-katG (R)
3	gagaCAATTGcactgacccttcgggtcaatctgtag	MfeI	To clone the left arm of <i>esxUT</i> in pUX1-katG (F)
4	gagaGCTAGCttgatgagctgctggtgcacctgttc	NheI	To clone the left arm of <i>esxUT</i> in pUX1-katG (R)
Primers to verify double homologous recombination			
5	ttgccaccttgaggatcgatcctg	-	To check double homologous recombination Δ <i>esxUT</i> (F)
6	tcaggtgggcgtaaatgtccacgct	-	To check double homologous recombination Δ <i>esxUT</i> (R)
Primers to sequence modified <i>esxUT</i> locus			
7	catggagaaggagcctcaa	-	To sequence Δ <i>esxUT</i> locus (F)
8	attgatgatgatgacgaaatcgc	-	To sequence Δ <i>esxUT</i> locus (R)
Cloning in pMV306-KanR			
9	gagaCAATTGCCGTGGCTGTTTTTCAGAATGACCTGGC	MfeI	To clone the <i>esxU</i> ORF in pMV306 (F)
10	gagaAAGCTTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAG AAGGTCTGGCTCTCGTCCATC	HindIII	To clone the <i>esxU</i> ORF in pMV306 (R)
11	gagaCAATTGCCATGAGCCAGATTACTTACAACCACGGC	MfeI	To clone the <i>esxT</i> ORF in pMV306 (F)
12	gagaAAGCTTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTAGTGGTGCCAGGCGCCGG	HindIII	To clone the <i>esxT</i> ORF in pMV306 (R)
13	gagaCAATTGCCGTGGCTGTTTTTCAGAATGACCTGGC	MfeI	To clone the <i>esxUT</i> ORFs in pMV306 (F)
14	gagaAAGCTTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTAGTGGTGCCAGGCGCCGG	HindIII	To clone the <i>esx4UT</i> ORFs in pMV306 (R)
Cloning in pVV16-KanR			
15	gagaCATATGGTGGCTGTTTTTCAGAATGACCTGGC	NdeI	To clone the <i>esxU</i> ORF in pVV16 (F)
16	gagaGGATCCGAAGGTCTGGCTCTCGTCCATC	BamHI	To clone the <i>esxU</i> ORF in pVV16 (R)
17	gagaCATATGATGAGCCAGATTACTTACAACCACGGC	NdeI	To clone the <i>esxT</i> ORF in pVV16 (F)
18	gagaGGATCCGTGGTGCCAGGCGCCG	BamHI	To clone the <i>esxT</i> ORF in pVV16 (R)
19	gagaCATATGGTGGCTGTTTTTCAGAATGACCTGGC	NdeI	To clone the <i>esxUT</i> ORFs in pVV16 (F)
20	gagaGGATCCGTGGTGCCAGGCGCCG	BamHI	To clone the <i>esxUT</i> ORFs in pVV16 (R)
Cloning in pUC19 zeo			
21	gccaaagcttgcagtcctgcagATCGATCCTGGGAGACCAG		Gibson_EsxU_Left_Fwd
22	gttgctctagAAAACAGCCACTTCAGTTCC		Gibson_EsxU_Left
23	tggctgtttCTAGAGCAACGAAAGGCTCAG		Gibson_Zeocine_Fwd
24	gtcagtggtgGCGGAACGCTCAGTGGAAAC		Gibson_Zeocine_Rev
25	agcgttccgcCACCCTGACCCTTCCGG		Gibson_EsxT_Right_Fwd
26	agtgaattcgagctcggtaccGATGAGCTGCTGGTGCAC		Gibson_EsxT_Right_Rev
27	agtgaattcgagctcggtaccGATGAGCTGCTGGTGCAC		EsxUT_pMVH361_Fwd
28	taactacgtcgacatcgataTCAGTGGTGCCAGGCGC		EsxUT_pMVH361_Rev
Primer to check if the <i>esxUT</i> gene are replaced by zeocine			
29	GTCCGACGGTGATGAACCCGCTGCG		To check double homologous recombination Δ <i>esxUT</i> primer1
30	GAGCACCGGAACGGCACTGGTCAAC		To check double homologous recombination Δ <i>esxUT</i> primer2

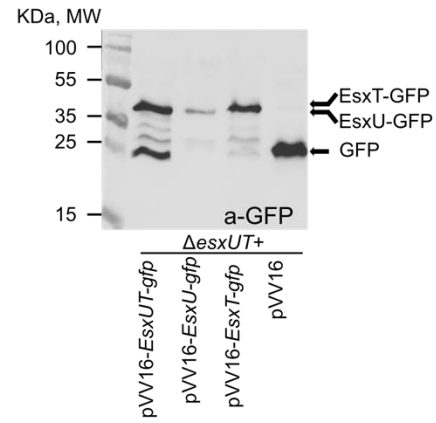
31	GCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCG		To check double homologous recombination Δ esxUT primer 3
32	GTGGGCGTAAATGTCCACGCTGTC		To check double homologous recombination Δ esxUT primer 4
Cloning in pET6HN			
33	ATATCCAAGCTTGTGGCTGTTTTTCAGAATGACCT-	HindIII	pET6HN-MAB_3754-HindIII
34	CCGGAATTCGCGAAGGTCTGGCTCTCGTCC	EcoRI	pET6HN-MAB_3754-EcoRI
35	ATATCCAAGCTTATGAGCCAGATTACTTACAACCAC	HindIII	pET6HN-MAB_3753c-HindIII
36	CCGGAATTCGCGTGGTGCCAGGCGCCG	EcoRI	pET6HN-MAB_3753c-EcoRI
qPCR primers			
37	TACCAGGAGTTCACGGCGAT		qRT_MAB_3754_Fwd
38	CATCTCCTGGTCGAAGCGAG		qRT_MAB_3754_Rev
39	CGCTGGTTGCTGATGTCAAG		qRT_MAB_3753_Fwd
40	GTACTCCTGGTACGCAGTGG		qRT_MAB_3753_Rev
41	TCCGAGAAAGACAAGGCTTC		SigA_Fwd
42	CCAGCTCAACTTCCTCTTCG		SigA_Rev

Sup. Figure 1

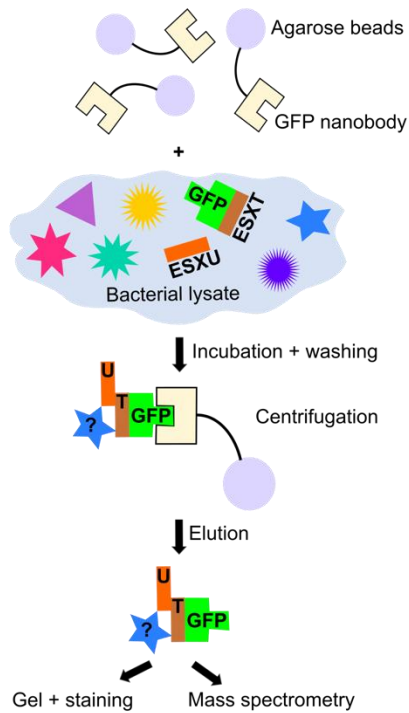
A



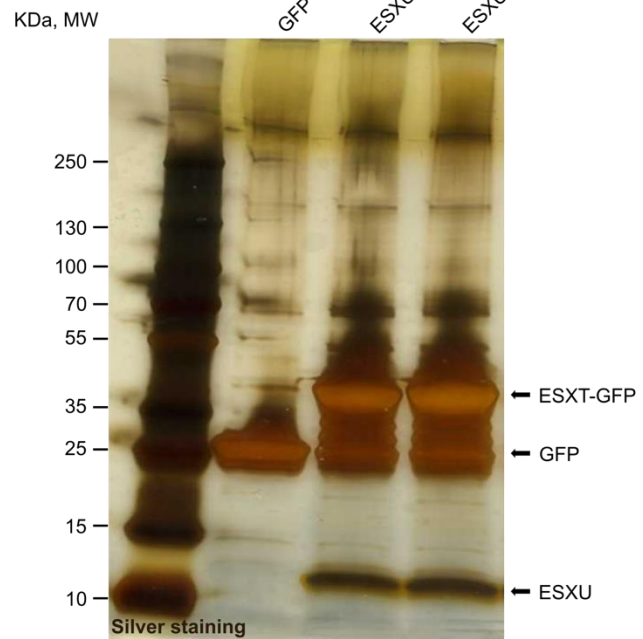
B



C



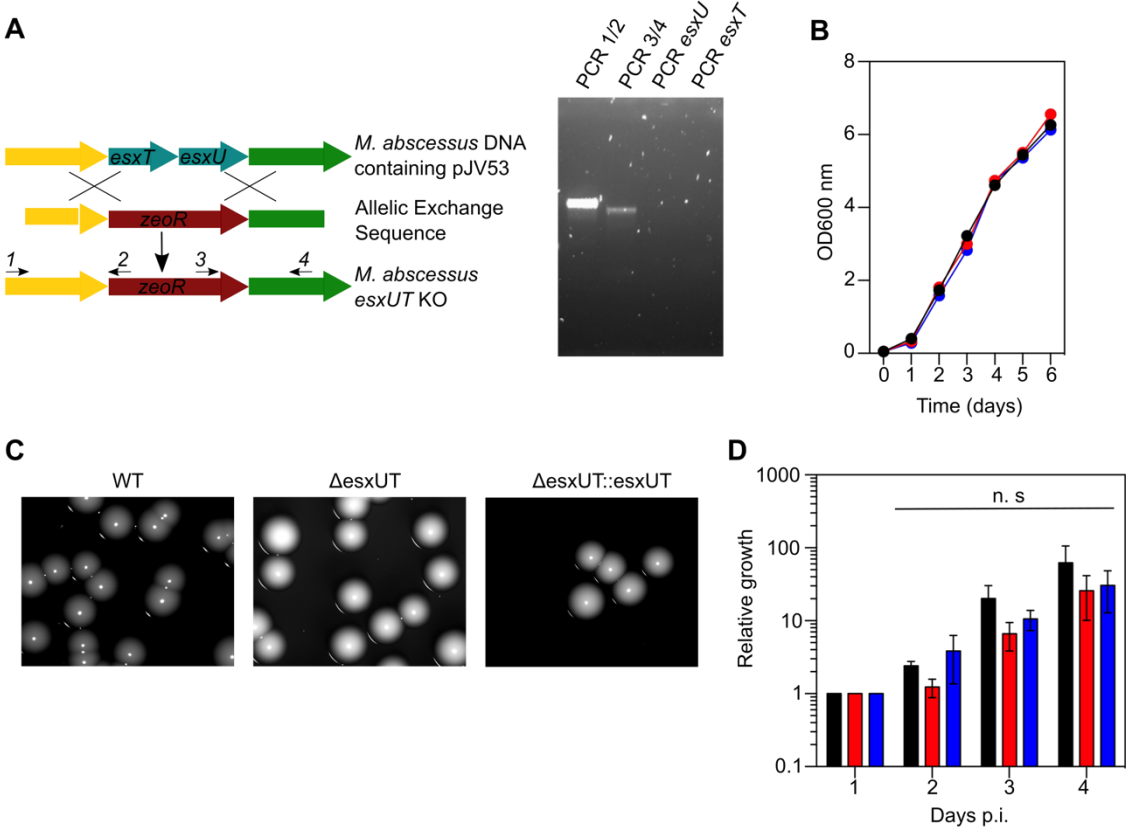
D



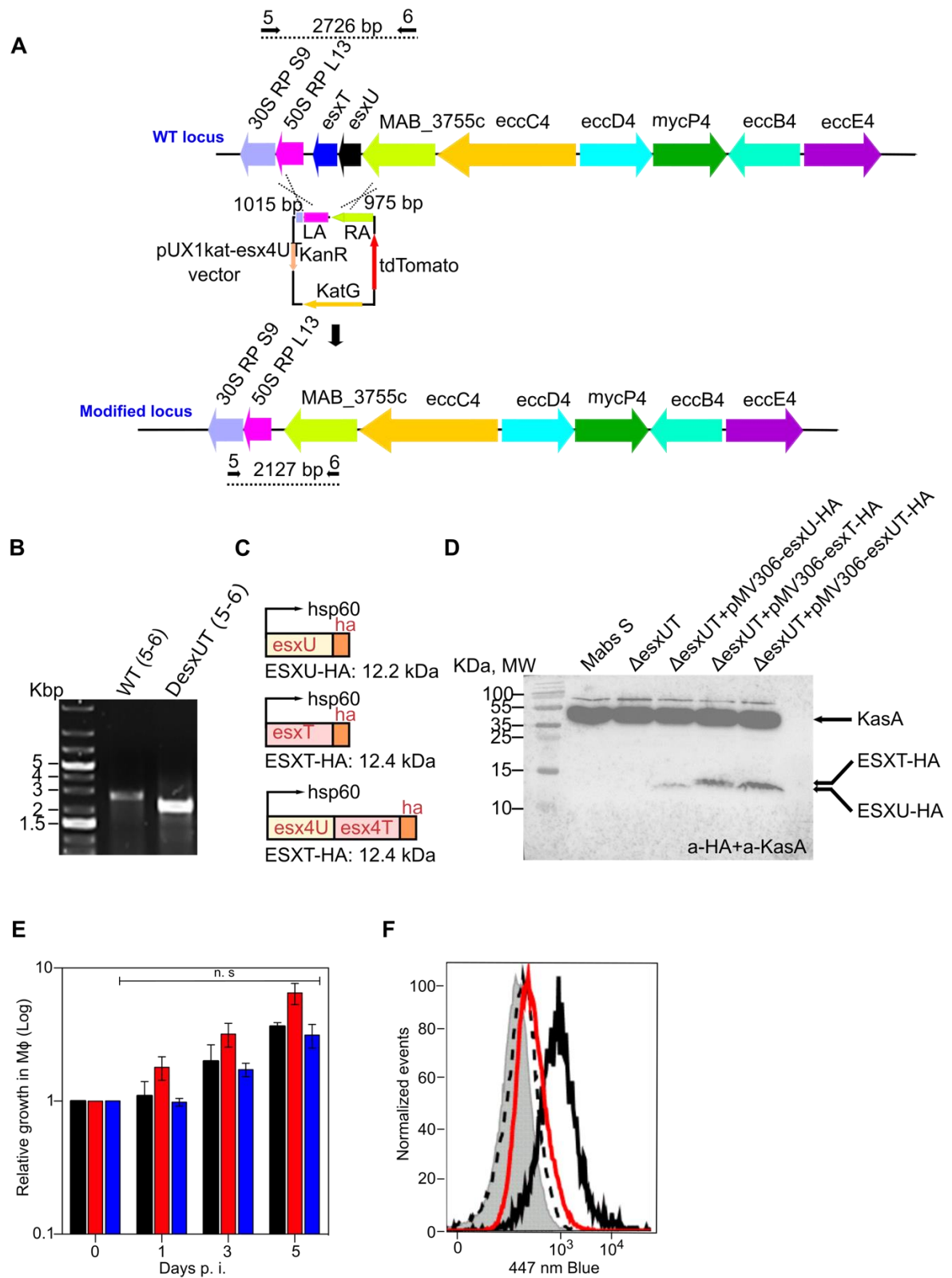
E

Protein name	Accession number	MW (kDa)	Total number of unique peptides		
			Control	Pull-down-1	Pull-down-2
ESXT	Mab_3753c	10.7	0	72	96
ESXU	Mab_3754c	10.5	0	47	52
rpoC	Mab_3868c	146.5	1	9	14
Cpn60.2	Mab_650	56.4	2	14	6
Ag84	Mab_2017	30	0	2	1

Sup. Figure 2



Sup. Figure 3



Partie II : Réponse de l'hôte vis-à-vis des substrats du système ESX

1. Introduction

Le travail réalisé sur les deux principaux substrats sécrétés par ESX-4, EsxU et EsxT, a révélé que *M. abscessus* était plus virulent en absence d'expression de ces deux substrats. Il se pose alors la question de leur expression au cours de la maladie, comme indiqué dans le travail précédent par l'absence de réponse anticorps aussi bien chez la souris infectée que chez les patients atteints de mucoviscidose infectés par *M. abscessus*. Il était donc important d'étudier la réponse cellulaire T afin de confirmer ou pas cette observation. Le second point important, que nous avons étudié, découle des résultats du sécrétome comparatif entre la souche sauvage et le mutant $\Delta eccB_4$ de *M. abscessus* (Laencina *et al.*, 2018). L'idée sous-jacente de ce sécrétome comparatif était de révéler les composés qui n'étaient plus sécrétés en l'absence d'un système ESX-4 fonctionnel. Le nombre important de produits révélés par cette approche nous a fait choisir une approche similaire à celle développée chez *M. tuberculosis* (Sayes *et al.*, 2012; Sayes *et al.*, 2018), et qui est basée sur la réponse de l'hôte, en comparant souche sauvage et mutant de sécrétion ESX, pour révéler les produits qui n'étaient plus reconnus par le système immunitaire de l'hôte à l'issue de la mutation provoquée dans le système de sécrétion ESX. Les résultats que nous présentons sont donc issus de cette approche *in vivo*, chez la souris, caractérisée par la reconnaissance des substrats sécrétés par ESX-4 via les lymphocytes T de l'hôte infecté.

2. *M. abscessus* inoculé par voie sous-cutanée (s. c.) induit une réponse de type Th1 mais n'induit pas de réponse de type Th2

Dans un premier temps, nous avons étudié si l'injection de *M. abscessus* induit une réponse de type Th1 ou une réponse de type Th2. Nous avons inoculé par voie sous-cutanée (s.c.) 1×10^6 CFU/souris de *M. abscessus* dans des souris immunocompétentes BALB/c et C57BL/6, deux modèles couramment utilisés au laboratoire pour l'étude de la physiologie de l'infection à *M. abscessus*.

Nous présentons les réponses T-IFN γ observées chez les souris préalablement infectées par le BCG, la CIPS (*M. abscessus ssp abscessus* de morphotype S) et la CIPR (*M. abscessus ssp abscessus* de

morphotype R). Nous pouvons observer une réponse de type Th1 mesurée par la production d'IFN γ après stimulation des cellules (splénocytes) extraites des rates de souris infectées (**Figure 16**).

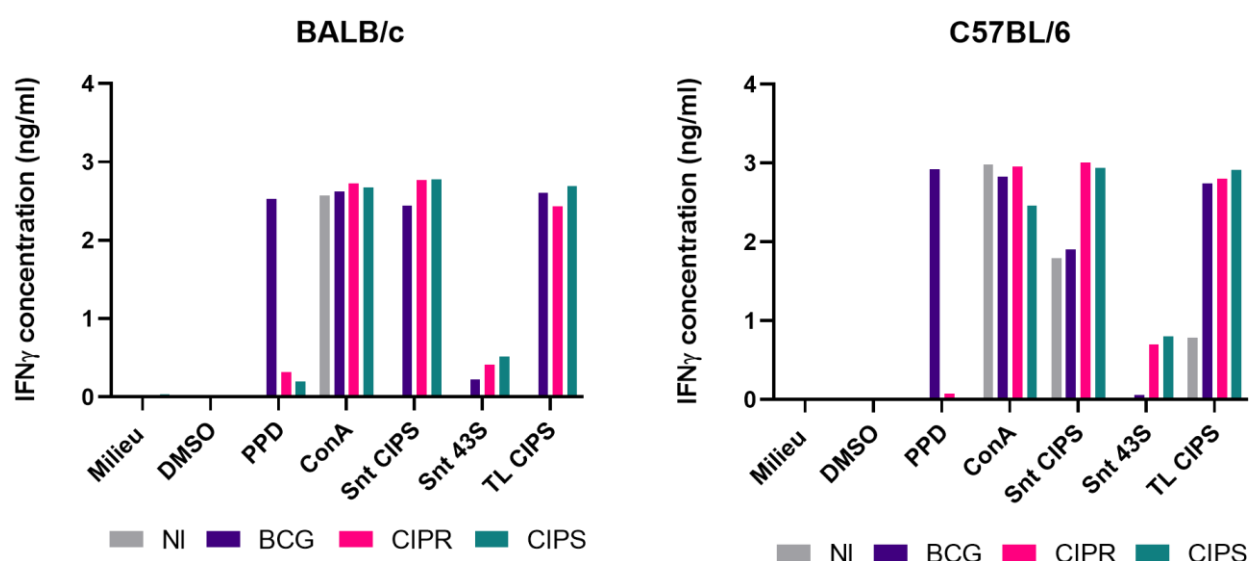


Figure 16 : Réponse IFN γ à la suite de l'inoculation du BCG, CIPR, CIPS ou PBS en s. c. dans des souris BALB/c ou C57BL/6

La sécrétion d'IFN γ est mesurée après 72h de stimulation des splénocytes des souris par le DMSO, PPD, ConA, le total lysat (TL) de la souche CIPS et le surnageant de culture filtré et concentré (Snt) de la CIPS ou de la 43S

Nous n'obtenons pas de réponse pour les contrôles dits négatifs, le milieu et le DMSO, tandis que nous observons une réponse pour le contrôle positif, la concanavaline A (ConA), un activateur pléiotropique des LT.

Nous détectons une sécrétion d'IFN γ après stimulation des splénocytes par le lysat bactérien total de la CIPS ainsi que par le surnageant de culture filtré et concentré (Snt) de la CIPS suite à l'inoculation des souches CIPS et CIPR chez la souris. Cette réponse IFN γ n'est pas ou peu observée avec les splénocytes des souris non infectées (NI) chez lesquelles nous avons injecté du PBS. Une détection d'IFN γ est observée chez les souris C57BL/6 NI avec le lysat total et le Snt. Ceci peut être due au fait que ces souris ne seraient pas « naïves » vis-à-vis de mycobactéries déjà rencontrées dans leur environnement malgré leur statut « Specific pathogens free » (SPF).

Comparativement, une réponse IFN γ plus faible est observée après stimulation des splénocytes par le surnageant de la souche 43S (souche clinique *M. abscessus ssp massiliense*), issus des rates des souris infectées par la CIPS et la CIPR. Cette observation intéressante suggère une différence de répertoire antigénique entre ces deux souches appartenant à deux sous espèces au sein du complexe *M. abscessus*.

De manière similaire, nous notons une absence de réponse IFN γ après stimulation des splénocytes par le PPD, issus des rates des souris inoculées par la souche CIPS ou la souche CIPR, confirmant cette différence de répertoire antigénique entre espèce.

Une réponse IFN γ est bien observée avec les splénocytes des souris infectées par le BCG, et stimulés par le PPD. Cependant, une réponse IFN γ est également obtenue après stimulation des splénocytes des souris infectées par le BCG, par le surnageant de la CIPS et le lysat total CIPS mais pas par le surnageant de la 43S.

Ces différents résultats démontrent une réaction croisée, et un répertoire antigénique commun, essentiellement dans le sens souris infectées par le BCG et stimulation ensuite des cellules T par des antigènes de *M. abscessus*, plutôt que l'inverse, *i.e.* souris infectées par *M. abscessus* et stimulation avec des antigènes issus de *M. tuberculosis* comme le PPD. Cela peut nous indiquer d'une part une meilleure infection et réponse à la suite de l'injection du BCG, ce qui dans la durée de l'expérience amène à une meilleure réponse T tout antigène confondu. D'autre part, nous pouvons considérer que l'infection par *M. abscessus* s'effectue, car démontrée par les réponses avec les antigènes spécifiques de cette espèce, mais avec un répertoire antigénique différent car non reconnu par la stimulation par le PPD. Cela peut paraître surprenant au regard des différents travaux et constations sur les réactions croisées PPD mycobactéries atypiques ou échec vaccination BCG et infections préalables par les mycobactéries atypiques.

En revanche, nous n'avons pas détecté de réponse IL-13 par les splénocytes des souris inoculées par les différentes souches (BCG, CIPS et CIPR) à la suite de la stimulation par le PPD, le surnageant et le lysat total, ce qui indiquerait que l'injection de 1×10^6 CFU de *M. abscessus* en s.c. chez les souris BALB/c et C57BL/6 n'induit pas de réponse de type Th2. L'inoculation de *M. abscessus* dans ce modèle induit une réponse de type Th1 mesurable par la production d'IFN γ que ce soit chez les souris BALB/c ou C57BL/6. Pour la suite, nous avons décidé de poursuivre avec les souris BALB/c car, la souris BALB/c NI ne répond pas au lysat total et au surnageant de CIPS.

3. Les protéines EsxU et EsxT n'induisent pas de réponse T-IFN γ

EsxA et EsxB, deux protéines sécrétées par le locus *esx-1* d'environ 10 kDa ont été découvertes puis étudiées pour leur immunogénicité (Sørensen *et al.*, 1995). Elles sont aujourd'hui utilisées pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente chez les patients infectés par *M. tuberculosis* en mesurant la réponse IFN γ produit par les cellules T circulantes après stimulation par ces deux protéines (Van Pinxteren *et al.*, 2000). Au regard des analogies observées, notamment au cours de ce travail, entre EsxAB et EsxUT, nous avons choisi d'étudier la réponse T-IFN γ de ces protéines à l'issue d'une infection par voie s.c. chez la souris BALB/c. Il était également important de confirmer et/ou d'expliquer les raisons de l'absence de réponse anticorps vis-à-vis de EsxUT telle qu'observée dans le travail précédent.

Selon le même protocole, voie s.c. et 1×10^6 CFU/souris BALB/c, nous constatons une absence totale de production d'IFN γ par les splénocytes des souris infectées par la souche CIPS (**Figure 17**). Dans cette expérience, nous avons travaillé avec 17 (EsxU) et 18 (EsxT) peptides chevauchants de 5 acides-aminés à l'instar de ce qui avait été réalisé chez *M. tuberculosis* (Sayes *et al.*, 2012). Aucun peptide ne provoque une réponse T-IFN γ ou n'est reconnu par les cellules T. L'injection du mutant Δ esxUT à des souris BALB/c entraîne de manière attendue une absence de réponse vis-à-vis des mêmes peptides.

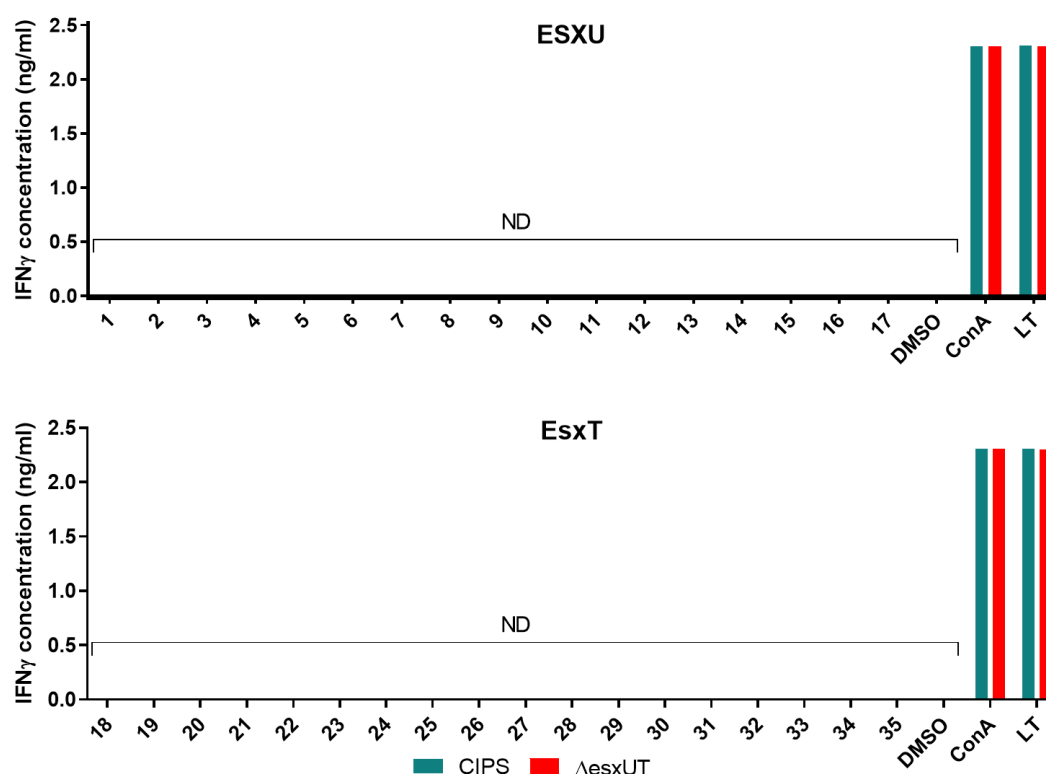


Figure 17 : Réponse IFN γ induite par les peptides synthétiques issus des protéines EsxU et EsxT après primo-infection de souris par la souche CIPS ou Δ esxUT.

Les splénocytes des souris infectées en s.c. par les souches CIPS ou Δ esxUT sont mises en culture 72h avec un peptide chevauchant de la protéines EsxU (n°1 à 17) et EsxT (n°8 à 35) ou stimulées avec de la ConA, du DMSO ou du lysat total de la souche CIPS. ND : Non détecté.

Pour vérifier que ces deux protéines n'induisent réellement pas de réponse Th1, nous avons testé différentes conditions (**Tableau 3**). Quelles que soient les conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence de peptides d'EsxU et EsxT induisant une réponse T-IFN γ chez les souris infectées. Nous avons testé la réponse T-IFN γ après un boost (seconde injection de CIPS) à J15 comme pour un protocole vaccinal afin de voir si nous augmentions la réponse T-IFN γ . Nous avons également évalué la réponse T-IFN γ après inoculation du morphotype R (CIPR) pour voir s'il y avait une différence entre les deux morphotypes de *M. abscessus*. Nous avons aussi inoculé le mutant Δ esxUT complémenté avec les gènes *esxU* et *esxT* sous contrôle d'un promoteur constitutif fort (celui du gène *hsp60*) afin de pallier une absence potentielle d'expression *in vivo* de ces deux gènes.

Nous avons analysé la réponse chez des souris avec un fond génétique CBA car il a été décrit que la réponse peptidique d'EsxA varie selon l'haplotype des souris (CBA haplotype H-2k et BALB/c haplotype H-2d) (Brandt *et al.*, 1996). Enfin, des souris ont été immunisées par les protéines EsxUT purifiées en présence de l'adjuvant incomplet de Freund, et nous avons mesuré la réponse IFN γ vis-à-vis des

différents peptides d'EsxU et d'EsxT, mais sans succès comme pour toutes les conditions testées. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'EsxU et EsxT n'induisent pas de réponse de type Th1 et qu'ils n'ont pas d'épitopes T immunogènes chez la souris.

Tableau 3 : Les différentes conditions testées pour identifier des épitopes T des protéines sécrétées EsxU et EsxT

Conditions testées pour évaluer la réponse IFN γ pour les protéines EsxU et EsxT	Réponse IFN γ pour les peptides d'EsxU et EsxT
Deux injections de la souche CIPS (J0 et J15) et comparaison avec la souche $\Delta esxUT$	Négative
Deux injections de la souche CIPR (J0 et J15) et comparaison avec la souche $\Delta esxUT$	Négative
La souche complémentée $\Delta esxUT::esxUT$, avec les gènes <i>esxU</i> et <i>esxT</i> exprimés sous un promoteur constitutif, celui du gène <i>hsp60</i> (CIPS versus NI)	Négative
Souris de différents fonds génétiques Balb/c, CBA (CIPS vs. $\Delta esxUT$ vs. NI)	Négative
Souris BALB/c immunisées par les protéines EsxU et EsxT purifiées en présence de l'adjuvant incomplet de Freund	Négative
Injections s.c. de souches cliniques ayant une forte expression des gènes <i>esxU</i> et <i>esxT</i> <i>in vitro</i> de morphotype S et R avec des souches représentantes des trois sous-espèces de <i>M. abscessus</i>	Négative

4. L'antigène 85-B induit une réponse T-IFN γ

La comparaison du sécrétome de la souche sauvage CIPS de *M. abscessus* avec celui du mutant $\Delta eccB_4$ du locus *esx-4* a permis d'identifier des protéines appartenant aux substrats classiquement décrits comme étant transportés par les ESX, tels que les protéines Esx, des PE/PPE mais aussi des lipoprotéines ainsi que l'antigène 85 (Ag 85) (Laencina, 2017; Laencina *et al.*, 2018). Bien que ce dernier soit connu pour être sécrété par le système de sécrétion Tat, nous souhaitons connaître sa reconnaissance par les cellules T, selon cette méthode d'inoculation s.c. de la souche CIPS chez la souris, ainsi que l'impact de la mutation $\Delta eccB_4$ dans sa sécrétion (voir partie II. 6).

Chez *M. tuberculosis*, il existe trois paralogues qui possèdent une activité mycolyltransferase impliquée dans la synthèse de la paroi (Belisle *et al.*, 1997). Chez *M. abscessus* il existe quatre paralogues Ag 85-C, Ag 85-A, Ag 85A/B/C et Ag 85-B respectivement *MAB_0175*, *MAB_0176*, *MAB_0177* et

MAB_1579 qui possèdent le site catalytique de l'activité mycolyltransferase ainsi que le motif de sécrétion du système Tat tout comme l'Ag 85 de *M. tuberculosis* (Viljoen *et al.*, 2020). De plus, l'Ag 85 présent à la surface de *M. abscessus* participe à l'adhésion de la mycobactérie à la surface de cellules hôte de par l'interaction de l'Ag 85 avec la fibronectine de la matrice extracellulaire (Viljoen *et al.*, 2020). Chez *M. tuberculosis* l'Ag 85-C est moins sécrété, il est davantage associé à la paroi et par conséquent il induit moins de réponse T, tandis que l'Ag 85-B est connu pour son immunogénicité (Huygen *et al.*, 1994).

Nous avons donc évalué la réponse T-IFN γ vis-à-vis des peptides de l'Ag 85-B (*MAB_1579*) (n°99 à 163) chez des souris BALB/c inoculées avec 1×10^6 CFU/souris de *M. abscessus* CIPS. Deux peptides (n°159 et 160) induisent une réponse T-IFN γ (**Figure 18 A**). Du fait de l'homologie des séquences en acide aminés entre les différents paralogues de l'Ag 85, ces peptides ne sont pas spécifiques de l'Ag 85-B (**Figure 18 B**) et peuvent correspondre à un ou plusieurs paralogues. Ces résultats montrent que l'un ou plusieurs de ces paralogues induisent une réponse T-IFN γ à l'issue d'une infection s.c. chez la souris par la CIPS.

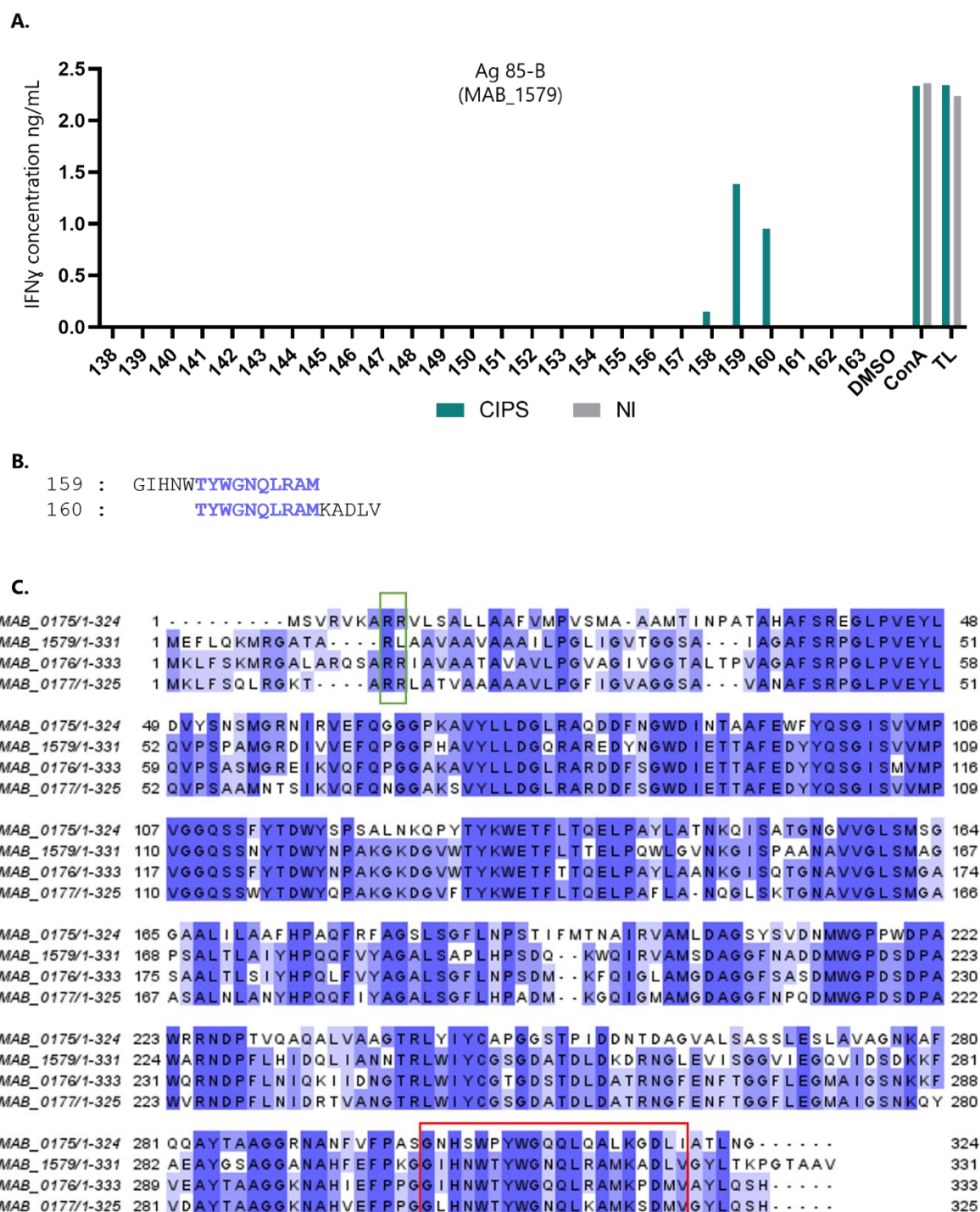


Figure 18 : Réponse IFN γ induite par les peptides de l'Ag85B (n°99 à 163) après inoculation de la souche CIPS avec comme contrôle des souris non infectées (NI)

A. Réponse IFN γ des splénocytes issus de souris BALB/c infectées par la souche CIPS après stimulation avec les peptides n°138 à 163 (graphe représentatif de trois expériences indépendantes).

B. Séquence des peptides n°159 et 160. Les AA communs aux deux peptides sont en violet

C. Alignement des quatre paralogues Ag 85 de *M. abscessus*. Le motif de sécrétion Tat est encadré en vert et la séquence des peptides n°159 et 160 est encadrée en rouge. Les différentes nuances de bleu/violet représentent l'identité entre les différents acides aminés.

5. Certaines PE/PPE possèdent des épitopes T

Nous avons étudié la réponse T-IFN γ vis-à-vis de protéines présentant des motifs PE/PPE caractéristiques d'une autre famille de substrats des systèmes ESX. Quatre protéines PE/PPE ont été testées : MAB_0664 (peptides n°1 à 19), MAB_4141 (n°20 à 123), MAB_0047 (n°124 à 223) et MAB_0665 (n°224 à 241). Parmi ces protéines, seules MAB_0664 et MAB_0047 possèdent respectivement deux et trois peptides chevauchants induisant une réponse T-IFN γ . La réponse vis-à-vis de la protéine MAB_0664 est présentée **Tableau 4** et **Figure 19**.

Tableau 4 : Réponse peptidique vis-à-vis des peptides des PE/PPE testées

Protéines testées	Motif PE ou PPE	Réponse IFN détectée
MAB_0664 (peptides n°1 à 19)	PE	Positive, peptides n°3 à 5
MAB_4141 (n°20 à 123)	Aucun	Négative
MAB_0047 (n°124 à 223)	PPE	Positive faible, peptides n°144 à 145
MAB_0665 (n°224 à 241)	PA (proline-alanine)	Négative

A. Réponse IFN γ des splénocytes issus des souris BALB/c infectées par la souche CIPS après stimulation avec les peptides de MAB_0664 (graphe représentatif de deux expériences indépendantes).

B. Séquence des peptides n°3 à 5. Les AA communs aux trois peptides sont en violet.

C. Alignement des séquences protéiques de MAB_0664 et de ses paralogues. L'identité entre les protéines est représentée par le dégradé de bleu/violet. Les motifs PE et YxxxD sont encadrés en orange et bleu respectivement. Les séquences des peptides chevauchants n°3 à 5 sont encadrées en rouge.

117

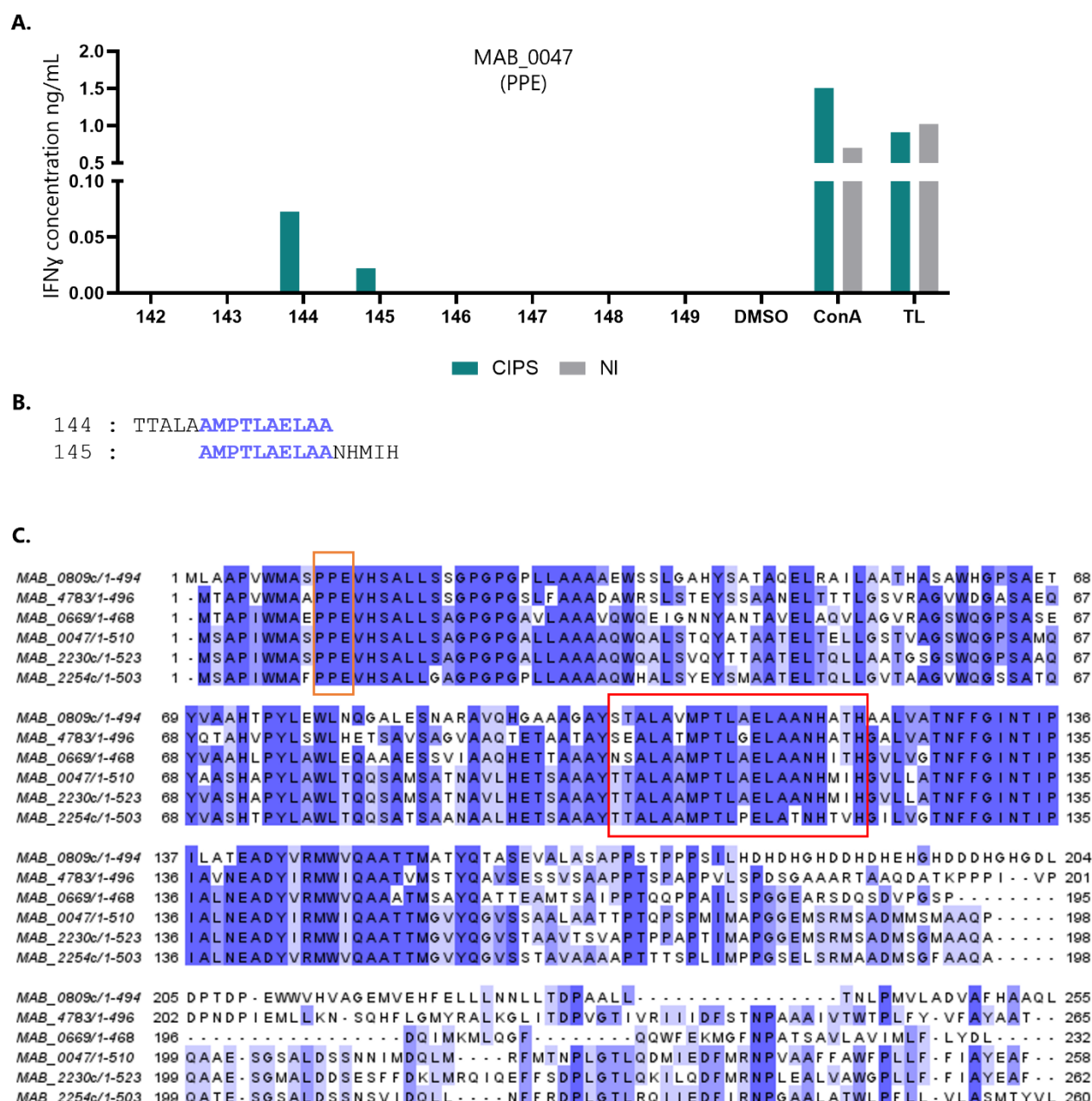


Figure 20 : Réponse IFN γ induite par les peptides de MAB_0047 et de ses paralogues après inoculation de la souche CIPS avec comme contrôle des souris non infectées (NI)

A. Réponse IFN γ des splénocytes issus des souris BALB/c infectées par la souche CIPS après stimulation avec les peptides n°142 à 149 de MAB_0047 (graphe représentatif de deux expériences indépendantes).

B. Séquence des peptides n°144 et 145. Les AA communs aux deux peptides sont en violet.

C. Alignement des séquences protéiques de MAB_0047 et de ses paralogues. L'identité entre les protéines est représentée par le dégradé de bleu/violet. Les motif PE sont encadrés en orange. Les séquences des peptides chevauchants n°144 et 145 sont encadrées en rouge.

La recherche de paralogues de ces deux protéines dans le génome de *M. abscessus* a permis de mettre en évidence, la présence de trois et cinq paralogues respectivement pour MAB_0664 et MAB_0047 (**Figure 19 C. et Figure 20 C.**) Les peptides qui induisent une réponse sont conservés dans le cas de MAB_0047 et de ses paralogues. En revanche, pour MAB_0664, seuls trois des paralogues possèdent la séquence reconnue. MAB_2225c la possède également mais elle diffère sur 16 acides aminés (**Figure 19 C**). Pour connaître l'origine de cette réponse T-IFN γ vis-à-vis des peptides 3-4-5 et l'attribuer spécifiquement à MAB_0664, un mutant de MAB_0664, Δ MAB_0664 a été construit et une expérience de stimulation chez la souris a été réalisée après inoculation s.c. de ce mutant (**Figure 21**).

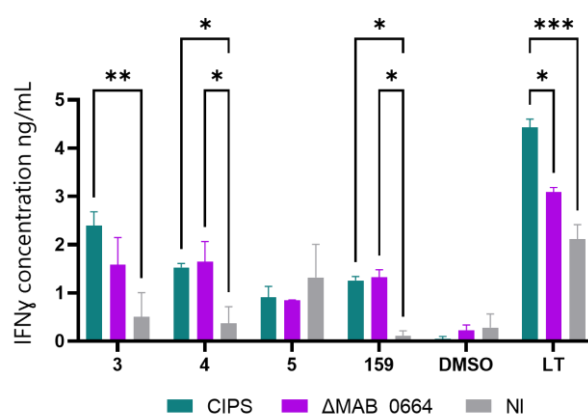


Figure 21 : Comparaison de la réponse peptidique de MAB_0664 après inoculation avec la souche CIPS ou avec la souche mutée pour ce gène Δ MAB_0664.

Les peptides n°3 à 5 correspondent aux peptides de MAB_0664 et le n°159 de l'Ag 85 sert de peptide contrôle positif. Pour le peptide n° 159 la réponse IFN γ doit être similaire entre les splénocytes des souris infectées par la souche CIPS et le Δ MAB_0664.

Lorsque l'on compare la réponse T-IFN γ des splénocytes issus des souris inoculées avec la souche CIPS et la réponse de ceux issus des souris inoculées avec la souche mutante Δ MAB_0664, nous observons une réponse T-IFN γ pour les 3 peptides étudiés. Mais cette réponse T-IFN γ est identique que les souris aient été infectées par la souche sauvage ou par la souche Δ MAB_0664. Cela démontre que la réponse T-IFN γ observée pour les peptides n°3 à 5 de MAB_0664 n'est pas spécifique de cette protéine, et peut être induite par l'un ou plusieurs de ses paralogues. Le mutant de Δ MAB_0047 n'a pas pu être obtenu mais au vu de l'homologie entre les paralogues, on peut supposer que la réponse T-IFN γ observée serait également due à MAB_0047 ou l'un de ses paralogues possédant la séquence des peptides n°144 et 145.

6. La sécrétion de certaines PE/PPE de *M. abscessus* fait intervenir ESX-4

Certaines PE et PPE ont été retrouvées comme moins sécrétées dans le sécrétome du mutant $\Delta eccB_4$ comparativement au sécrétome de la souche sauvage CIPS. C'était le cas de MAB_4141 (peptides n°20 à 123) et pour laquelle aucune réponse T-IFN γ n'avait été détectée, et de MAB_0664 (Laencina *et al.*, 2018). La comparaison de la réponse T-IFN γ vis-à-vis des peptides précédemment caractérisés après l'inoculation de la CIPS, $\Delta eccB_4$ et la souche complémentée chez les souris BALB/c devrait donc nous permettre de caractériser la sécrétion via ESX-4 de ces protéines *in vivo*.

Selon le même protocole d'inoculation, nous observons une réponse T-IFN γ significativement diminuée des splénocytes de souris infectées par la souche $\Delta eccB_4$ comparativement à la réponse T-IFN γ observée avec les splénocytes des souris infectées avec la souche CIPS, et cela après stimulation par les peptides 4, 144 et 145 (**Figure 22 A et B.**). Cette diminution de la réponse T-IFN γ n'est pas dû à un défaut d'expression du gène *MAB_0664* dans la souche $\Delta eccB_4$ (**Figure 22 D.**). On peut noter que le peptide 4 semble induire une meilleure réponse que ses peptides adjacents 3 et 5. Le peptide 4 doit posséder la séquence optimale à la présentation au TCR par le CMHII.

Nous n'observons pas de diminution de la réponse T-IFN γ après stimulation des splénocytes avec les peptides n°159 et 160 appartenant à l'Ag 85 et cela, quelle que soit la souche ayant été inoculée chez les souris (**Figure 22 C.**).

Les résultats obtenus, selon cette approche d'étude de la réponse T-IFN γ après stimulation par des peptides issus des séquences de protéines sécrétées par les ESX, tendent à nous démontrer l'intervention d'ESX-4, selon un mécanisme à définir, pour la sécrétion de ces deux PE/PPE et/ou de leurs paralogues. Il est important de souligner que parmi les paralogues qui possèdent ce motif, nous retrouvons la PE MAB_2231c et la PPE MAB_2230c (**Figure 19 C. et Figure 20 C.**) appartenant au locus *esx-3* de *M. abscessus*. On ne peut donc pas exclure une sécrétion de ces protéines par l'ESX-3 bien que nous retrouvons une réponse T-IFN γ diminuée avec le mutant $\Delta eccB_4$.

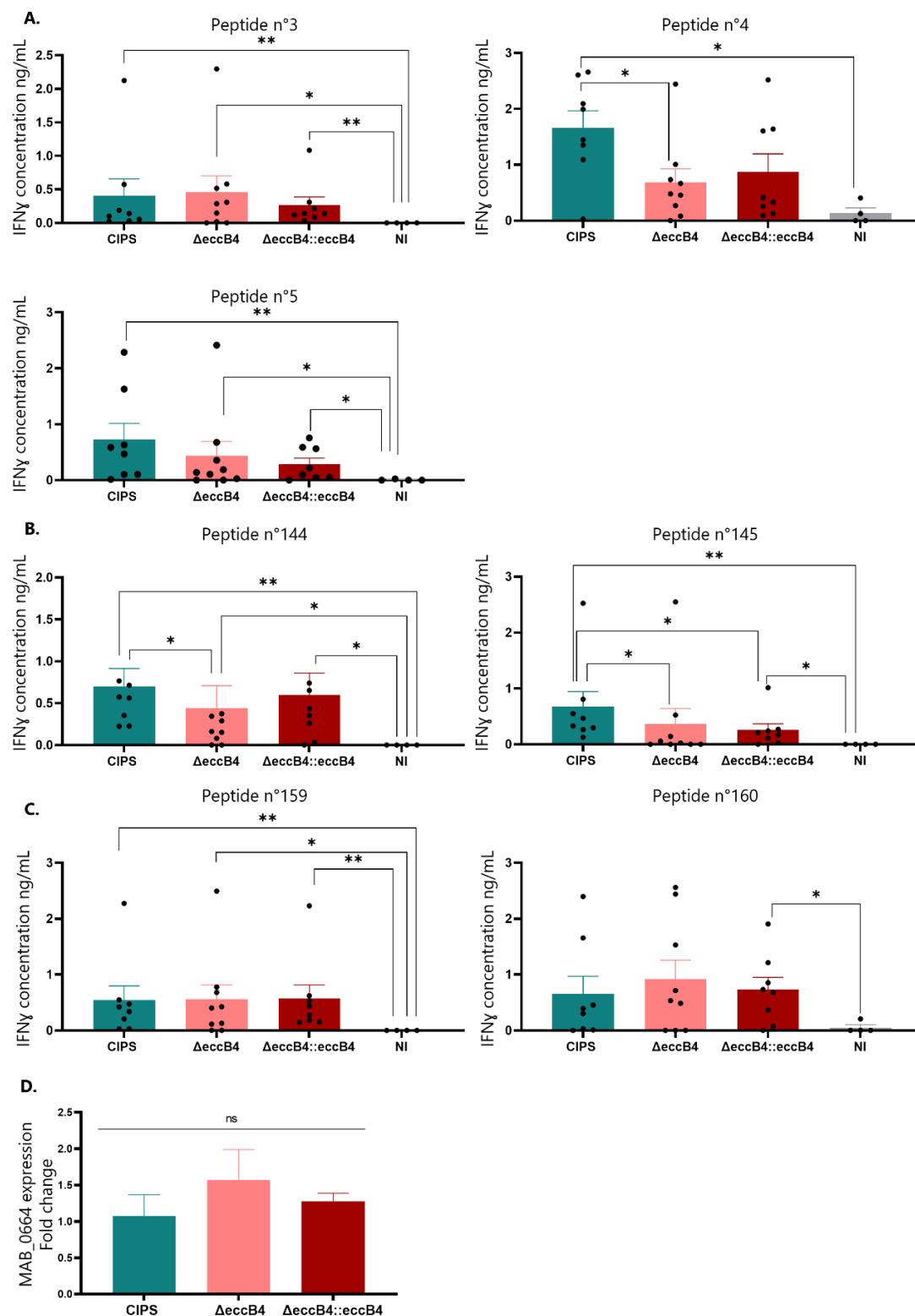


Figure 22 : Réponse IFN γ des splénocytes issus de souris infectées par la souche CIPS ou la souche mutant $\Delta eccB_4$ vis-à-vis des peptides sélectionnés du fait de leur activité et issus de deux PE/PPE MAB_0664 et MAB_0047 et de l'Ag85.

Comparaison de la réponse peptidique de **A.** MAB_0664 (n°3 à 5), **B.** MAB_0047 (n°144 et 145) et **C.** Ag 85 (n°159 à 160) après inoculation à des souris BALB/c des souches CIPS, $\Delta eccB4$ ou $\Delta eccB4::eccB4$ avec comme contrôle des souris non infectées (NI). **D.** Expression du gène MAB_0664 dans les différentes souches en culture liquide relative à la CIPS. Le gène *sigA* est utilisé comme gène de ménage.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Les ESX sont des systèmes de sécrétion dits de type VII et présents chez les mycobactéries. Le système ESX ancestral est codé par le locus *esx-4*, qui suite à sa présence au sein de plasmides et à différents événements de recombinaison au sein des génomes mycobactériens, a permis d'obtenir jusqu'à quatre loci *esx* supplémentaires (*esx-1,3,2* et *5*) intégrés dans le génome des différentes mycobactéries (Dumas *et al.*, 2016; Newton-Foot *et al.*, 2016). Les ESX et leur substrats sont impliqués dans diverses fonctions telles que la conjugaison, la capture de nutriments, l'homéostasie de la paroi et la virulence (Bunduc *et al.*, 2020; Lagune *et al.*, 2021). Le locus *esx* le plus étudié est le locus *esx-1* de *M. tuberculosis*, car il joue un rôle majeur dans sa virulence (Hsu *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004; Brodin *et al.*, 2006; Houben *et al.*, 2012). Chez *M. abscessus*, une NTM pathogène opportuniste, le locus *esx-4* a été décrit comme un acteur majeur de la survie dans les cellules phagocytaires (Laencina *et al.*, 2018). Il participe au blocage de l'acidification du phagosome ainsi qu'au blocage de la sortie du phagosome de *M. abscessus* (Laencina *et al.*, 2018). La fonction d'ESX-4 de *M. abscessus* ressemble ainsi à celle d'ESX-1 de *M. tuberculosis*, alors qu'aucun rôle dans la virulence de ce locus n'avait été décrit jusqu'alors. La comparaison du sécrétome de la souche sauvage avec celui d'un mutant pour une protéine structurale du locus *esx-4*, *EccB₄*, a permis de mettre en évidence des substrats potentiels d'ESX-4 de *M. abscessus* qui pourraient jouer un rôle dans la survie des mycobactéries au sein de cellules phagocytaires.

Quel rôle pour EsxU et EsxT ?

Ce projet a permis de montrer que deux protéines, EsxU et EsxT de *M. abscessus*, sont moins sécrétées dans le surnageant du mutant $\Delta eccB_4$ d'ESX-4 par rapport à la souche sauvage et dont les gènes codants ces deux protéines sont présents au sein du locus *esx-4*. Nous montrons également qu'EsxU et EsxT de *M. abscessus* forment un complexe caractéristique des protéines WXG100 avec un motif WxG non conservé pour EsxT tout comme pour le complexe EsxUT de *M. tuberculosis* (Pandey *et al.*, 2018), qui n'empêche pas la formation d'un complexe hétérodimérique (Lagune *et al.*, manuscrit en cours de soumission). Lorsque l'on infecte des macrophages avec le mutant $\Delta esxUT$, nous observons

qu'il est incapable de rompre la membrane du phagosome mais qu'il maintient le blocage de l'acidification expliquant pourquoi ce mutant ne présente pas de défaut de croissance au sein de ces cellules phagocytaires. Le mutant reste ainsi dans un phagosome intact qui représente un environnement plus propice à sa survie qu'une fois libéré dans le cytosol à l'instar de la souche sauvage (Tailleux *et al.*, 2003). Ce phénotype d'absence de défaut de croissance intra-macrophagique pour le mutant $\Delta esxUT$ pourrait expliquer pourquoi aucun transposon n'a été retrouvé inséré dans les gènes *esxU* et *esxT* lors du crible de survie sur amibes qui a permis d'identifier le locus *esx-4* comme un acteur majeur de la survie intracellulaire de *M. abscessus* (Laencina *et al.*, 2018). En effet, les clones présentant un transposon dans les protéines qui composent l'ESX-4, comme le mutant $\Delta eccB_4$, présentaient un défaut de croissance en macrophage et en amibe probablement dû au fait que le mutant $\Delta eccB_4$ était maintenu dans un phagosome qui s'acidifie (Laencina, 2017). De plus, le travail réalisé *in vitro* par nos collaborateurs a permis de confirmer l'interaction d'EsxUT avec des membranes lipidiques artificielles de type eucaryote nommées DOPC (dioleoylphosphocholine) et de démontrer que le complexe EsxUT était capable de former des pores stables dans ces membranes artificielles (Lagune *et al.*, manuscrit en cours de soumission). En combinant les résultats obtenus avec les deux mutants ($\Delta esxUT$ et $\Delta eccB_4$) et ces données biochimiques, les protéines EsxU et EsxT sont impliquées dans la rupture du phagosome probablement avec d'autres partenaires mais elles n'interviennent pas dans le blocage de l'acidification du phagosome. Ce blocage doit être médié par un autre substrat d'ESX-4 ou un partenaire de *M. abscessus* comme montré par le phénotype de survie du mutant $\Delta eccB_4$. Chez *M. tuberculosis*, ce blocage de l'acidification est induit par différents mécanismes, tels que le détournement des voies cellulaires par le bacille (Queval *et al.*, 2017), ainsi que par divers acteurs mycobactériens *i.e.* des lipides (MacGurn and Cox, 2007; Brodin *et al.*, 2010), des protéines sécrétées par le système SecA2 (Zulauf *et al.*, 2018) mais aussi par le système ESX-1 sans que l'effecteur n'ait pu être identifié (MacGurn and Cox, 2007). Ces derniers ont tout de même démontré que la protéine EsxA n'est pas impliquée dans l'arrêt de l'acidification (MacGurn and Cox, 2007). Le blocage de l'acidification fait intervenir d'autres système ESX, notamment le système de sécrétion ESX-3, via l'altération du complexe ESCRT par les protéines EsxGH (Mehra *et al.*, 2013). Chez *M. bovis* le crible d'une banque de transposon a aussi permis d'identifier que des substrats des ESX, les PPE, jouent un rôle dans le blocage de l'acidification (Stewart *et al.*, 2005). Chez *M. abscessus*, seul le locus *esx-4* a été démontré comme étant impliqué dans le blocage de l'acidification du phagosome et le rôle du locus *esx-3*, et des PE et PPE, dans ce mécanisme n'a pas été exploré.

À travers notre étude sur la fonction d'EsxUT, nous avons pu mettre également en évidence un phénotype, un peu surprenant, d'hypervirulence pour le mutant ΔesxUT confirmé à l'aide de plusieurs modèles animaux (zebrafish et souris) (Lagune *et al.*, manuscrit en préparation). Le lien entre le phénotype en cellule (maintien dans un phagosome qui ne s'acidifie pas) et en animal (hypervirulence) peut s'expliquer au travers de différents résultats obtenus chez *M. tuberculosis* et *M. marinum*. En effet, comme discuté dans l'article sur le rôle d'EsxU et EsxT, cette hypervirulence a déjà été observée pour un mutant de l'ESX-5 de *M. marinum* chez le zebrafish adulte (Weerdenburg *et al.*, 2012).

Chez *M. tuberculosis*, il a été proposé que le blocage de l'acidification du phagosome interfère avec la présentation des antigènes par les macrophages, permettant ainsi au bacille d'échapper à la réponse immunitaire et la survie de la mycobactérie chez l'hôte (Ramachandra *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2006). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que ce mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire soit une des explications de la virulence accrue du mutant ΔesxUT qui est maintenu dans un phagosome non fonctionnel empêchant ainsi la dégradation de la mycobactérie et sa présentation au système immunitaire. Par ailleurs, le mutant du système de sécrétion ΔeccB_4 a été évalué chez l'animal et présente le même phénotype d'hypervirulence (Le Moigne *et al.*, résultats non publiés). Bien que, ces mutants, ΔesxUT et ΔeccB_4 , présentent un phénotype de survie en macrophages différent.

Nous avons évoqué la notion de partenaires pour s'assurer d'une survie au sein d'un phagosome qui ne s'acidifie pas, ou d'un phagosome dont on ne peut s'échapper. Parmi ces partenaires, les lipides pariétaux sont les meilleurs candidats, à l'instar des PDIMs chez *M. tuberculosis*, qui en association avec ESX-1 favorisent la sortie du phagosome de *M. tuberculosis* (Augenstreich *et al.*, 2017). Nous pouvons proposer, chez *M. abscessus*, un exemple similaire avec un lipide récemment identifié, le GDND, comme un partenaire impliqué dans la sortie du phagosome, car un mutant dans la protéine MmpL8, impliquée dans la synthèse et le transport de ce lipide, est incapable de s'échapper du phagosome (Dubois *et al.*, 2018).

Caractérisation de la réponse immune induite à la suite de l'inoculation de *M. abscessus* chez la souris

La réponse immune que nous avons pu mettre en évidence à l'issue d'une inoculation de *M. abscessus* par voie s.c. chez la souris à la dose de 1×10^6 CFU/souris, est une réponse protectrice de type Th1. Ce résultat corrobore d'autres études réalisées chez des souris infectées par *M. abscessus* (Rottman *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2009) mais aussi lors d'infection par d'autres mycobactéries (Power *et al.*, 1998; González-Pérez *et al.*, 2013). Nous n'avons pas détecté de réponse de type Th2 à la suite de l'immunisation par voie sous-cutanée du BCG ou de *M. abscessus*. La nature de la réponse immune, de type Th1 ou de type Th2 chez la souris, semble être majoritairement définie par la dose de BCG administrée plutôt que par la voie d'administration (Power *et al.*, 1998). Une faible dose (400 CFU) induit seulement une réponse de type Th1, tandis qu'une dose plus forte (4×10^8 CFU) induit à la fois une réponse de type Th1 et de type Th2. Dans le cas des infections à *M. abscessus*, il a été montré qu'une forte dose en i.v. (1×10^7 CFU) pouvait induire la production d'anticorps (Jeon *et al.*, 2009). Ils ont également observé une réponse Th1 dans deux conditions d'administration : voie i.v. à forte dose (1×10^7 CFU) et voie aérosol à faible dose (400 CFU) (Jeon *et al.*, 2009). Dans notre cas, la dose de *M. abscessus* utilisée (1×10^6 CFU) n'était peut-être pas assez forte pour induire une réponse de type Th2.

EsxU et EsxT ne présentent pas de propriétés immunogènes que ce soit à la suite d'une infection par *M. abscessus* ou à la suite d'une immunisation par des protéines recombinantes

Tout ce que nous avons décrit précédemment, sur le plan du rôle d'EsxU et EsxT, ainsi que celui d'ESX-4 dans la physiologie de l'infection par *M. abscessus*, sont similaires aux rôles décrits pour EsxA et EsxB chez *M. tuberculosis*. Ces deux protéines sont également très bien reconnues par les lymphocytes T et B des sujets présentant une tuberculose infection latente ou une tuberculose maladie (Lyashchenko *et al.*, 1998; Skjøl et al., 2000; Van Pinxteren *et al.*, 2000). Cependant, dans notre étude, nous n'avons détecté aucune production d'IFN γ après stimulation par des peptides issus d'EsxU et EsxT, quelles que soient les conditions utilisées (**Tableau 3**). De plus, aucune réponse anticorps n'a été détectée dans le sérum de ces mêmes souris alors qu'une réponse contre une autre protéine, la PLC, était détectée par ELISA. De la même façon, aucune réponse anticorps vis-à-vis d'EsxU ou d'EsxT n'a été détectée dans le sérum d'une cohorte de patients pour lesquels, l'infection

à *M. abscessus* a été confirmée par des techniques microbiologiques, et pour lesquels des réponses ont été détectées vis-à-vis d'autres protéines de *M. abscessus* (Le Moigne *et al.*, 2021). Ces résultats suggèrent soit qu'EsxU et EsxT ne sont pas reconnues par le système immunitaire de l'hôte à l'issue d'une infection par *M. abscessus*, ou par voie s.c. chez la souris soit qu'elles ne sont plus produites *in vivo* à l'issue de l'infection comme tend à le démontrer l'absence de réponse anticorps chez les patients. Chez *M. tuberculosis*, la reconnaissance d'EsxA et EsxB par les LT CD4⁺ et CD8⁺ est dépendante de la sécrétion de ces protéines (Brodin *et al.*, 2006; Woodworth *et al.*, 2008), ce qui permet d'émettre l'hypothèse qu'EsxUT ne sont potentiellement pas sécrétées *in vivo* ou que leur sécrétion est finement régulée, ce qui pourrait expliquer l'absence de reconnaissance par le système immunitaire. Nous avons étudié cette dernière hypothèse par l'infection des souris avec la souche complémentée $\Delta esxUT :: esxUT$ avec les gènes *esxUT* exprimés sous un promoteur constitutif mais nous n'avons pour autant pas obtenu de réponse T vis-à-vis d'EsxU et EsxT, suggérant le caractère non immunogène de ces deux protéines.

Alors qu'EsxU et EsxT de *M. abscessus* ne semblent pas induire de réponse immune chez la souris et chez l'homme, cette absence de réponse diffère de celle observée chez *M. tuberculosis*. En effet, la réponse humorale ainsi que la réponse cellulaire vis-à-vis de ces protéines ont été évaluées chez des patients présentant une tuberculose et des souris BALB/c immunisées avec EsxU et EsxT de *M. tuberculosis* purifiées chez *E. coli* (Pandey *et al.*, 2018). Une forte réponse IgG est détectée vis-à-vis d'EsxU et EsxT, dans le sérum des souris. De plus les splénocytes de souris immunisées avec EsxU et EsxT de *M. tuberculosis* prolifèrent après stimulation *in vitro* par ces mêmes protéines et sécrètent fortement du TNF- α et de l'IL-6. Néanmoins, ils ne détectent aucune réponse IFN γ après stimulation de ces mêmes cellules avec les protéines purifiées. La réponse vis-à-vis des protéines purifiées EsxU et EsxT de *M. tuberculosis* chez les patients présentant une tuberculose concorde avec celle obtenue chez la souris. En effet, une forte réponse IgG est détectée vis-à-vis d'EsxU et EsxT dans le sérum de ces patients et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) prolifèrent après stimulation par EsxU et EsxT de manière comparable à la prolifération induite par EsxB (Pandey *et al.*, 2018). Tout comme pour EsxU et EsxT de *M. abscessus*, ils n'observent aucune réponse T-IFN γ . En revanche, ils observent une forte réponse anticorps IgG vis-à-vis d'EsxUT de *M. tuberculosis* à la fois chez le patient et les souris.

Le potentiel diagnostique et vaccinal des protéines sécrétées par *M. abscessus*

L'analyse de la réponse T-IFN γ chez *M. abscessus* ne nous a pas permis de détecter des épitopes T ni chez EsxU, ni chez EsxT mais nous avons pu détecter une réponse T-IFN γ vis-à-vis de l'Ag 85. Ce complexe protéique est déjà connu pour induire une forte réponse de type Th1 dans le modèle souris après une infection par *M. tuberculosis* ou par le BCG (Huygen *et al.*, 1994; D'Souza *et al.*, 2003), ainsi que chez l'Homme (Launois *et al.*, 1994). Du fait de sa forte immunogénicité, l'Ag85 est utilisé comme cible vaccinale dans plusieurs essais cliniques détaillés dans cette revue (Karbalaei Zadeh Babaki *et al.*, 2017). Les protéines du complexe Ag85 sont très conservées au sein des mycobactéries (**Figure 23**) et par conséquent des réactions croisées ont pu être observées avec des NTM tel que *M. ulcerans* (Tanghe *et al.*, 2008) et *Mycobacterium scrofulaceum* (Lozes *et al.*, 1997). L'alignement de l'Ag 85-B de *M. abscessus* avec celui de *M. tuberculosis*, *M. ulcerans* et *M. avium* montre bien la forte identité qui existe au sein des différentes mycobactéries, ce qui en fait peut être une protéine plus adaptée pour représenter un candidat à la vaccination plutôt qu'un candidat pour le diagnostic.

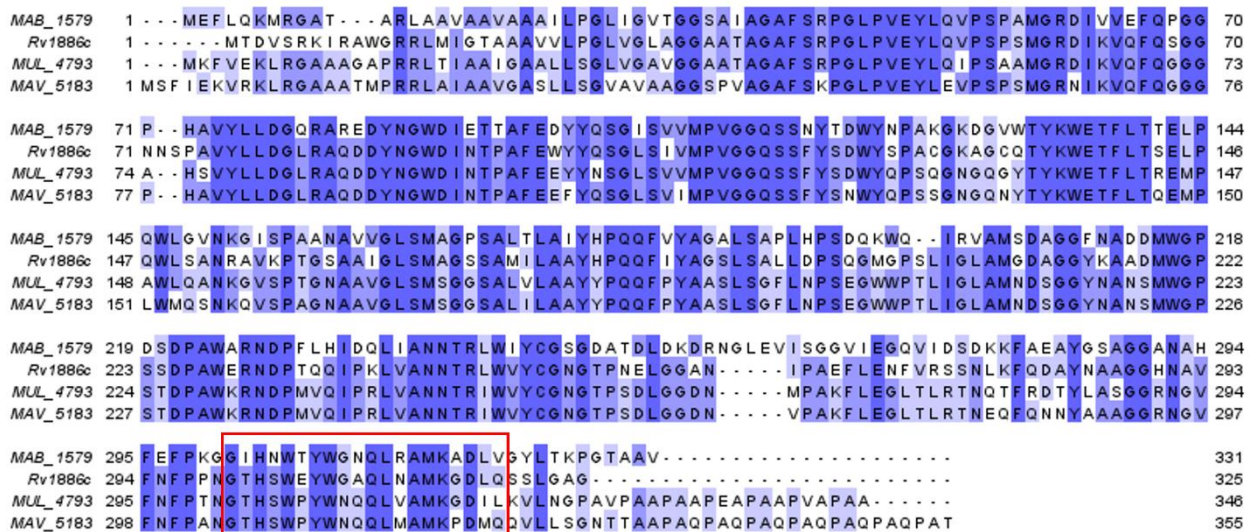


Figure 23 : Alignement de l'Ag 85-B de *M. abscessus* (MAB_1579), *M. tuberculosis* (Rv1886c), *M. ulcerans* (MUL_4793) et *M. avium* (MAV_5183).

L'identité entre les protéines est signalée par les trois nuances de bleu/violet. La séquence des peptides n°159 et 160 de *M. abscessus* qui induisent une réponse T chez les souris BALB/c est encadrée en rouge.

De même, nous avons mis en évidence une réponse T de type IFN γ vis-à-vis de peptides issus de protéines de *M. abscessus* appartenant à la famille des PE et PPE, MAB_0664 et MAB_0047. Cependant, nous n'avons pas observé de réponse T de type IFN γ vis-à-vis des peptides issus des protéines MAB_4141 et MAB_0665. Ces deux protéines ne possèdent pas le motif PPE et PE classiquement

décrit, bien qu'elles soient répertoriées comme appartenant à cette famille de protéines dans le génome de *M. abscessus* (**Tableau 4**).

La recherche de paralogues pour les protéines MAB_0664 et MAB_0047 dans le génome de *M. abscessus* a permis d'identifier trois et cinq paralogues respectivement. L'analyse de la réponse immune cellulaire à la suite de l'inoculation du mutant Δ MAB_0664 n'a pas entraîné de diminution de la réponse T-IFN γ suggérant que cette réponse pourrait être due à un ou plusieurs de ces paralogues. Le mutant Δ MAB_0047 n'a pas été obtenu, seul des simples recombinants ont été obtenus mais le criblage de clones supplémentaires devrait permettre d'identifier des doubles recombinaisons et ainsi de tester la réponse cellulaire à la suite de l'inoculation du mutant chez la souris. Nous pouvons tout de même supposer, du fait de la forte identité entre les paralogues que la réponse immune cellulaire détectée peut aussi correspondre à un ou plusieurs de ses paralogues. L'étude de la réponse immune vis-à-vis des PE/PPE chez des patients infectés avec *M. tuberculosis* et des bovins infectés par *M. bovis* montre que la réaction croisée entre les peptides des PE/PPE participe à leur reconnaissance (Vordermeier *et al.*, 2012). De plus, dans la même étude, ils ont mis en évidence que les peptides reconnus les plus immunogènes correspondent à la région conservée N-terminal de ces protéines (Vordermeier *et al.*, 2012). Les réponses T-IFN γ que nous obtenons pour les PE/PPE de *M. abscessus* corroborent ces observations.

Chez les mycobactéries, les PE/PPE représentent des cibles intéressantes du fait de leur immunogénicité mais la majorité des études se concentrent sur les protéines PE_PGRS et PPE_MPTR associées majoritairement au locus *esx-5* (Sampson, 2011; Sayes *et al.*, 2012). L'un des points négatifs de leur utilisation en tant qu'outil diagnostique est le risque de réactions croisées entre les espèces car les PE/PPE sont retrouvées chez toutes les mycobactéries. Ces protéines semblent représenter des cibles vaccinales prometteuses étant donné leur rôle dans la virulence. Notamment, chez *M. tuberculosis* le mutant Δ ppe25-pe19 (*ppe25-pe19* sont dans le locus *esx-5*) présente une virulence atténuée tout en maintenant une réponse cellulaire grâce à la réaction croisée vis-à-vis de PE/PPE localisées en dehors du locus *esx-5*. De plus, ce mutant induit aussi une réponse vis-à-vis des protéines sécrétées par les autres ESX dont ESX-1 (Sayes *et al.*, 2016). En effet, la sécrétion des substrats de l'ESX-1 est importante pour conférer une protection efficace. La souche du BCG (qui ne possède donc pas le locus *esx-1*) complétée avec le locus *esx-1* de *M. marinum* confère une protection vaccinale plus importante que la souche BCG vis-à-vis d'une infection à *M. tuberculosis* chez la souris (Gröschel *et al.*, 2017).

Bien que les PE/PPE semblent être des cibles thérapeutiques prometteuses, il est nécessaire de bien étudier leur fonction car elles sont aussi connues chez *M. tuberculosis* et *M. marinum* pour leur rôle immunomodulateur. Les PE25/PPE41 de *M. tuberculosis* induisent la maturation *in vitro* des cellules dendritiques en favorisant la sécrétion de cytokines entraînant une réponse de type Th2 (Chen *et al.*, 2016). De plus, l'immunisation de souris avec les PE32/PPE65 de *M. tuberculosis* diminue la réponse IFN γ des splénocytes de ces souris après stimulation avec les protéines PE32/PPE65 et semble favoriser la réponse Th2 ce qui peut avantager la vie intracellulaire de la mycobactérie (Khubaib *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2020). Par ailleurs, des SNP ont été retrouvés dans les protéines PE/PPE ainsi que les Esx de souches cliniques de *M. tuberculosis* ce qui soulève le risque que les épitopes de ces protéines ne soient plus reconnues et que cela permette aux bactéries d'échapper à la réponse immune (Hebert *et al.*, 2007; Uplekar *et al.*, 2011). Une analyse bio-informatique des gènes *pe* et *ppe* a démontré que l'on retrouve environ trois fois plus de SNP dans ces gènes comparativement aux autres gènes de *M. tuberculosis* non *pe* et non *ppe*. Néanmoins ces gènes ne semblent pas être soumis à une pression de sélection positive caractéristique de la variation antigénique (McEvoy *et al.*, 2012).

L'étude des PE/PPE et des Esx chez *M. tuberculosis* a permis d'ouvrir de nombreuses voies dans le diagnostic et la vaccination. Dans le cas de *M. abscessus*, ces protéines sont très peu voire non étudiées. Elles pourraient représenter des cibles diagnostiques intéressantes, mais cela reste à être analysé au sein d'une cohorte de patients. Actuellement, l'étude de cibles diagnostiques et vaccinales chez *M. abscessus* est limitée à des gènes de virulence tels que la PLC, Mgtc et la fraction TLR2 (Le Moigne *et al.*, 2015; Le Moigne *et al.*, 2016; Le Moigne *et al.*, 2021) tandis qu'un test interféron a montré que la protéine putative MAB_0405c est reconnue chez les patients, mais avec une faible sensibilité (Steindor *et al.*, 2021). Par conséquent, d'autres cibles sont donc nécessaires.

Sécrétion des PE/PPE

Les PE/PPE sont des protéines qui ont évoluées conjointement avec les locus *esx* à partir de l'apparition du locus *esx-1* et se sont largement dupliquées avec l'apparition du locus *esx-5*. En effet, aucune PE/PPE n'est associée au locus ancestral *esx-4* (Gey van Pittius *et al.*, 2006). Chez *M. abscessus* qui ne possède que les locus *esx-3* et *4*, nous montrons pour la première fois que la sécrétion de certaines PE/PPE dépend de l'ESX-4. Cependant, une PE et une PPE, possédant les mêmes séquences peptidiques que les peptides ayant entraîné une réponse T-IFN γ (paralogues de MAB_0664 et de MAB_0047), sont codées par des gènes localisés dans le locus *esx-3*. Afin d'étudier la capacité du locus *esx-3* de *M. abscessus* à sécréter ces protéines PE ou PPE, un mutant $\Delta eccB_3$ a été construit et nous sommes en train d'analyser la réponse T-IFN γ à la suite de l'injection de ce mutant chez la souris, comparativement à la réponse T-IFN γ obtenue avec la souche sauvage. À ce jour, la sécrétion d'aucun substrat via ESX-3 de *M. abscessus* n'a été démontrée.

Nous avons vu dans la partie introduction que chez *M. tuberculosis*, la régulation des locus *esx* est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs qui peuvent réguler différents locus *esx* tel que EspR et mIHF qui semblent réguler ESX-1 ainsi qu'ESX-2 et ESX-5 (Blasco *et al.*, 2012; Odermatt *et al.*, 2018) et WhiB5 qui régule potentiellement des composants d'ESX-2 et 4 (Casonato *et al.*, 2012). À ma connaissance aucun mécanisme de régulation commun à ESX-3 et ESX-4 n'a été mis en évidence et *M. abscessus* pourrait représenter un bon modèle d'étude car il ne possède que ces deux ESX. Par ailleurs, l'analyse du protéome de l'extrait total du mutant $\Delta esx-4$ de *M. smegmatis* a montré une diminution significative de deux protéines structurales de l'ESX-3, EccC₃ et EccD₃ ce qui suggère qu'ESX-4 pourrait influencer l'expression du locus *esx-3* (Newton-Foot, 2013).

ESX-4 intervient dans certaines fonctions en coopération avec d'autres ESX. Chez *M. smegmatis*, il joue un rôle dans la conjugaison ou DCT pour « Distributive Conjugal transfer » avec ESX-1. Le contact entre la souche donneuse et la souche receveuse entraîne chez cette dernière l'expression des gènes du locus *esx-4* via l'activation du facteur SigM ainsi qu'un mécanisme dépendant de l'ESX-1 de la souche donneuse (Gray *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2018). Récemment, un nouvel exemple de coopération entre les ESX a été publié chez *M. marinum*. L'analyse du sécrétome de la souche sauvage et du mutant $\Delta eccC_4$ a révélé que la perte de la protéine EccC₄ impactait la sécrétion des substrats de l'ESX-1 et 5 de *M. marinum*, en augmentant la sécrétion de ces protéines (Wang *et al.*, 2022).

Les auteurs ont montré que le phénotype de phagocytose accrue observé était dû à l'un des substrats de l'ESX-1, EspJ dont la sécrétion est augmentée dans le mutant $\Delta eccC_4$ (Wang *et al.*, 2022). On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'il existerait une coopération chez *M. abscessus* au sein des deux systèmes ESX qu'il possède, à l'instar de ce qui existe chez les autres mycobactéries.

Dans nos résultats, nous n'avons pas observé de différence de sécrétion *in vivo* de l'Ag 85 en présence ou non d'un ESX-4 fonctionnel. Bien que l'Ag 85 soit retrouvé en moins grande quantité dans le sécrétome du mutant $\Delta eccB_4$, il semble qu'ESX-4 n'influence pas la sécrétion via le système Tat de l'Ag 85 dans notre modèle d'infection. Chez *M. tuberculosis*, ESX-1 et Tat sont tous deux régulés par le système à deux composantes PhoP/R. Le mutant PhoP impacte la sécrétion dans les phagosomes de l'Ag 85 ainsi que de la sécrétion d'EsxB et EspC, deux substrats de l'ESX-1 (Sayes *et al.*, 2018). La diminution de sécrétion de l'Ag 85 observée *in vitro* (Laencina *et al.*, 2018) dans le mutant d'ESX-4 peut s'expliquer par une régulation commune entre ESX-4 et Tat sous certaines conditions qui restent à démontrer.

Fonctionnalité de l'ESX-4 au sein des mycobactéries

La première fonction impliquant le locus ancestral *esx-4* a été décrite chez la mycobactérie saprophyte *M. smegmatis* avec un rôle dans le DCT même si le mécanisme d'action reste inconnu. Alors que le locus *esx-4* n'est pas exprimé quand *M. smegmatis* est cultivé seul, à la suite de la co-culture avec une souche donneuse, l'expression du locus et notamment d'*esxU* et *esxT* est fortement induite dans la souche réceptrice. Par contre, la sécrétion de ces protéines n'a pas été rapportée (Gray *et al.*, 2016; Clark *et al.*, 2018; Gray and Derbyshire, 2018). Nous avons démontré l'implication d'ESX-4 de *M. abscessus* dans sa survie au sein des cellules phagocytaires ainsi que dans la sécrétion active de protéines à travers l'ESX-4 grâce à une analyse comparative du sécrétome (Laencina *et al.*, 2018). La présence d'EsxU et EsxT dans le surnageant de culture confirme la sécrétion de ces protéines, EsxT ayant déjà été observé dans le sécrétome de *M. abscessus* et non dans celui de *M. chelonae* dans les mêmes conditions (Yadav and Gupta, 2012). L'hypothèse expliquant la fonctionnalité d'ESX-4 chez *M. abscessus*, une mycobactérie pathogène opportuniste était essentiellement basée sur la présence du gène *eccE₄* absent du locus *esx-4* chez toutes les mycobactéries à l'exception du complexe *M. abscessus-chelonae* (Laencina *et al.*, 2018). Mais très récemment le rôle du locus *esx-4* de *M. tuberculosis* (dépourvu d'EccE₄) a été démontré dans la

sécrétion de CpnT et d'EsxEF qui forme un pore dans la mycomembrane permettant la sécrétion de CpnT. CpnT et EsxEF sont codés par des gènes situés en dehors du locus *esx-4* (Pajuelo *et al.*, 2021). De même, la sécrétion des protéines EsxU et T codées dans ce locus n'a jamais été décrite (Målen *et al.*, 2007). Il a été montré, mais de façon indirecte, qu'elles étaient produites *in vivo*, par l'équipe qui a étudié la reconnaissance d'EsxU et EsxT en analysant les réponses cellulaires B et T chez des patients infectés par *M. tuberculosis*. Ils postulent que ces protéines sont « sécrétées » au cours de l'infection au regard de la réponse anticorps chez leurs patients vis-à-vis de ces protéines (Pandey *et al.*, 2018). En dehors de la sécrétion de CpnT à la surface de la bactérie chez *M. tuberculosis*, ESX-4 semble intervenir dans la rupture de la membrane du phagosome tout comme ESX-1 et ESX-2 (Pajuelo *et al.*, 2021) alors que jusqu'à présent seul ESX-1 était connu pour ce rôle en association avec PDIM (Augenstreich *et al.*, 2017). Une autre équipe a souhaité étudier la sécrétion de CpnT. Pour cela, ils ont exprimé la protéine de *M. tuberculosis* chez *M. marinum* et ont observé dans ce contexte que la toxine CpnT était sécrétée par ESX-5 et qu'ESX-4 joue un rôle dans la sécrétion de cette protéine dans le cytosol des cellules (Izquierdo Lafuente *et al.*, 2021). Les auteurs de cet article présentent leurs résultats comme la description de la voie de sécrétion de CpnT de *M. tuberculosis*. Il est difficile de conclure du fait de la complexité du modèle : CpnT de *M. tuberculosis* étudié chez *M. marinum*. Ces résultats semblent davantage démontrer le mécanisme de sécrétion de CpnT chez *M. marinum* que le mécanisme de sécrétion chez *M. tuberculosis*. Tout de même, ils montrent qu'ESX-4 de *M. marinum* ne semble pas être impliqué dans la rupture du phagosome (Izquierdo Lafuente *et al.*, 2021). Enfin, un travail publié très récemment a permis de montrer que les protéines EsxU et EsxT chez *M. marinum* étaient bien produites mais qu'elles n'étaient pas sécrétées (Wang *et al.*, 2022). Ces résultats obtenus chez *M. tuberculosis* et *M. marinum* soulèvent de nombreuses questions concernant la sécrétion de substrats à travers le complexe de sécrétion ESX-4 qui ne possède pas la protéine EccE₄, décrite comme nécessaire à la stabilité du complexe de sécrétion selon les récentes études structurales publiées sur ESX-3 de *M. smegmatis* (Famelis *et al.*, 2019) et ESX-5 de *M. xenopi* (Beckham *et al.*, 2017). Puisque la sécrétion d'EsxU et EsxT n'a pas été démontrée chez des mycobactéries avec un ESX-4 incomplet, on peut se demander si la protéine EccE₄ n'est pas finalement essentielle à leur sécrétion. Des travaux de complémentation fonctionnelle ont été amorcés en collaboration avec l'équipe « Pathogénomique Mycobactérienne intégrée » de l'Institut Pasteur pour étudier l'impact de l'ajout de l'ESX-4 de *M. abscessus* chez le BCG, et s'il peut compléter l'absence de l'ESX-1 ou encore si l'ajout d'ESX-4 de *M. abscessus* ou seulement du

gène *eccE4* peut induire la sécrétion d'EsxUT chez *M. tuberculosis*.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis d'identifier le rôle des protéines EsxU et EsxT dont les gènes sont présents dans le locus *esx-4*. EsxU et EsxT forment un hétérodimère caractéristique des substrats des SST7 et capable d'interagir *in vitro* avec des membranes artificielles en formant des structures semblables à des pores. Dans les macrophages, ces protéines interviennent dans la rupture de la membrane du phagosome mais n'interviennent pas dans le blocage de l'acidification. De plus, l'absence de ces deux protéines induit un phénotype d'hypervirulence chez l'animal et semble améliorer la survie et la persistance de *M. abscessus*. L'étude de la réponse de l'hôte vis-à-vis de ces protéines a démontré qu'EsxU et EsxT ne sont pas reconnues par la réponse T, ni la réponse B chez la souris dans notre modèle d'injection sous-cutanée avec *M. abscessus*. De plus, aucune réponse B n'a été détectée vis-à-vis de ces protéines dans le sérum de patients atteints de mucoviscidose. EsxU et EsxT ne semblent pas représenter de bonnes cibles diagnostics. Une réponse T a été détectée vis-à-vis de l'antigène 85-B et des PE/PPE. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour étudier si ces protéines pourraient représenter des cibles de diagnostic et/ou vaccinales intéressantes. Enfin, nous avons vu que l'ESX-4 semble intervenir de manière directe ou indirecte via des mécanismes de régulation dans la sécrétion de ces PE/PPE.

Perspectives

Bien que ce travail de thèse ait permis d'en apprendre davantage sur le rôle des substrats de l'ESX-4, de nombreuses questions restent en suspens. Notamment, le phénotype observé pour le mutant $\Delta eccB4$ (absence de blocage de l'acidification et défaut de rupture de la membrane du phagosome) a été partiellement expliqué par l'étude du rôle d'EsxU et EsxT. Les substrats de l'ESX-4 impliqués dans le blocage de l'acidification restent à être identifiés. De plus, chez *M. tuberculosis* la rupture du phagosome fait intervenir EsxAB ainsi que le lipide PDIM. Dans le cas de *M. abscessus*, le mutant du transporteur du lipide GDND induit aussi un défaut dans la rupture de la membrane du phagosome. Il serait intéressant d'étudier l'interaction entre GDND et EsxUT dans le but d'étudier si leur rôle dans la rupture du phagosome est synergique et quels sont les mécanismes biophysiques qui peuvent expliquer ce rôle. De plus, la virulence accrue observée chez l'animal lorsque les protéines EsxU et EsxT sont absentes, soulève de nombreuses questions du point de vue de l'interaction hôte

pathogène et une étude approfondie de ces mécanismes est nécessaire. Ces protéines sont-elles exprimées tout au long de l'infection ou seulement à certaines étapes. En outre, dans la littérature, on observe que chez les autres mycobactéries les protéines EsxU et EsxT ne semblent pas être sécrétées, on peut se demander si l'absence de sécrétion chez les autres mycobactéries est due à l'absence du gène *eccE4*. Le travail entamé avec l'équipe « Pathogénomique Mycobactérienne intégrée » devrait peut-être apporter ces réponses.

Concernant les PE/PPE, nous devons étudier la réponse T de ces protéines après inoculation du mutant $\Delta eccB3$ de *M. abscessus* pour déterminer par quel système ESX ces protéines sont sécrétées et s'il existe un mécanisme de régulation entre l'ESX-4 et l'ESX-3. De plus, la réponse T des PE/PPE semble correspondre à la reconnaissance d'un ou plusieurs paralogues, il serait intéressant d'étudier la réponse T de ces différents paralogues dans le but de voir si des peptides présents dans les régions variables induisent des réponses T, ce qui permettrait d'identifier des peptides spécifiques de chaque paralogues et ce qui pourrait faciliter l'étude de la sécrétion de ces protéines.

Bien que nous observions des réponses chez la souris on ignore si les PE/PPE et l'Ag 85 sont reconnus chez les patients et si cette reconnaissance est spécifique de *M. abscessus*. Il serait aussi intéressant d'étudier la réponse B chez l'Homme et si ces protéines induisent une protection après immunisation chez la souris à la suite de l'inoculation de *M. abscessus*. Ces différentes approches devraient permettre de déterminer si ces protéines représentent de bonnes cibles vaccinales et/ ou diagnostics chez les patients atteints de mucoviscidose.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Obtention des mutants chez *M. abscessus*

Les bras d'homologie (1000 paires de bases en amont et en aval du gène à supprimer) sont amplifiés à partir de l'ADN génomique de la souche CIPS ainsi que la cassette zeocine à partir du plasmide pMVH361zeo. Les produits d'amplification sont ensuite clonés dans le plasmide pUC19 par la technologie Gibson (New England Biolabs). Le produit du Gibson est électroporé dans *Escherichia coli*. Après purification du plasmide, la séquence comprenant les bras d'homologie et la cassette de résistance à la zeocine appelée « allelic exchange sequence » (AES) est purifiée après coupure avec les enzymes de restriction correspondantes. L'AES (300 ng) est électroporé dans la souche sauvage CIPS contenant le plasmide pJV53 qui exprime la recombinaise Che9c et un gène de résistance à la kanamycine. Les clones sont sélectionnés sur milieu 7H11 zeocine (50 mg/L) et kanamycine (250 mg/L) et sont criblés par PCR pour sélectionner ceux dans lesquels les deux événements de recombinaison ont eu lieu, le gène cible est alors remplacé par la cassette de résistance à la zeocine. Le clone positif est mis en culture sans kanamycine et après plusieurs passages en absence de l'antibiotique on finit par observer une perte du plasmide pJV53 exprimant la recombinaise.

Le mutant est ensuite complémenté. Le gène délété est amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche sauvage CIPS et est cloné par Gibson dans le plasmide intégratif pMVH361 qui possède un gène de résistance à l'hygromycine. Les clones sont sélectionnés sur milieu 7H11 (1 g/L).

Pour ce projet, j'ai construit les mutants $\Delta eccB3$, ΔMAB_0664 et $\Delta esxUT$ ainsi que la souche complémentée $\Delta esxUT::esxUT$.

2. Etude de la croissance de *M. abscessus* dans les macrophages

Les macrophages murins J774.2 sont mis en culture 16h avant l'infection à raison de 5×10^4 macrophages par puit dans une plaque 24 puits en milieu DMEM+glutamax (Gibco), 5 % serum de vœux foetal (SVF) (Thermofisher). Les cellules sont infectées à une MOI de 10 pendant 3h (5 % CO₂, 37°C), puis sont lavées trois fois avec du PBS (Gibco) et incubées 1h (5 % CO₂, 37°C) avec du DMEM, SVF

(5 %) et de l'amikacine (250 mg/L) pour éliminer les mycobactéries extracellulaires. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS puis incubées avec du DMEM, SVF (5 %) et de l'amikacine (50 mg/L). Les cellules de la plaque J0 sont lysées dans de l'eau au minimum 30 min. à 4°C et les CFU sont dénombrées pour quantifier la croissance des bactéries. Les autres plaques sont traitées de la même façon respectivement à J1, J3 et J5 post-infection.

3. Analyse de la rupture du phagosome

Cette technique a été mise en place chez *M. tuberculosis* (Simeone *et al.*, 2015) et adaptée chez *M. abscessus* avec l'aide Laleh Majlessi (Laencina *et al.*, 2018; Dubois *et al.*, 2018). Cette technique est basée sur le fait que la molécule CCF-4 qui peut traverser la membrane des cellules et une fois dans le cytosol des cellules émet dans le vert à 520 nm. La β -lactamase à la surface de *M. abscessus* est capable de cliver la molécule CCF-4 qui émet alors dans le bleu à 447 nm. Cette technique permet d'établir s'il y a contact cytosol-phagosome grâce à l'interaction entre la β -lactamase à la surface de *M. abscessus* dans le phagosome et le CCF-4 dans le cytosol des cellules.

Les macrophages murins J774.2 sont mis en culture 16h avant à raison de 1×10^6 cellules/puit dans une plaque 12 puits en milieu DMEM+glutamax (Gibco), SVF (5 %) (Thermofisher). Puis les cellules sont infectées comme précédemment à l'exception que les cellules ne sont pas lysées dans de l'eau mais grattées et transvasées en plaque 96 puits à fond rond pour les différents marquages.

Les cellules de la plaque J0 sont marquées avec la molécule CCF-4 dans un tampon EM (120 mM NaCl, 7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,8 mM MgCl₂, 5 mM glucose, et 25 mM HEPES, pH 7,3), supplémenté avec la solution B et 2,5 mM de probénécide pendant 2h à température ambiante. Les cellules sont lavées avec du tampon FACS (PBS commercial, SVF 3 %, 1/1000^e azide). Puis marquées avec le live-dead 1/2000^e pendant 3 min à température ambiante. Les cellules sont lavées et fixées avec de la PFA 4 %. Les échantillons sont analysés avec un cytomètre Fortessa (BD LSRFortessa™ Cell Analyzer, BD Biosciences) en utilisant le logiciel BD FACSDiva™. Au moins 100 000 événements par échantillon sont enregistrés et les données sont analysées avec le logiciel FlowJo. Le même marquage est réalisé pour les cellules de la plaque 24h post-infection.

4. La cartographie épitopique des protéines sécrétées ou pepsan

Nous avons mis au point cette expérience pour identifier les peptides des protéines sécrétées de *M. abscessus* qui induisent une réponse T de type CD4. Cette technique a été mise au point puis développée dans le cas d'infection à *M. tuberculosis* (Sayes *et al.*, 2012; Sayes *et al.*, 2018). Dans le cas de *M. abscessus*, nous avons dû adapter la technique du fait de la différence de pathogénicité qui existe entre les deux mycobactéries. Notamment, nous avons adapté le contrôle positif de l'infection et nous utilisons un milieu synthétique (Thermofisher) pour la culture des cellules primaires dans le but de nous émanciper des réponses non spécifiques observées et probablement dues au SVF.

Les différentes souches de *M. abscessus* (1×10^6 CFU/ souris dans 200 μ L) ainsi que le contrôle PBS pour les souris NI (200 μ L) sont injectées en s.c. au niveau du cou de souris BalBc de 7 semaines. Ces expériences sur les animaux ont été réalisées conformément aux directives éthiques institutionnelles et nationales (Agreement n°783223).

Deux semaines après l'inoculation de *M. abscessus*, les souris sont sacrifiées et les rates sont prélevées. Les rates sont écrasées dans un milieu synthétique additionné de pénicilline-streptomycine 1 % et GlutaMax à l'aide de deux lames, puis les cellules sont passées à travers un « cell stainer » de résolution 100 μ m. Les cellules sont centrifugées 8 min à 1500 rpm à température ambiante. Les cellules sont resuspendues dans 1mL de milieu puis dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules sont diluées dans le milieu synthétique pour obtenir environ 1×10^7 cellules/mL. 100 μ L de cette dilution (1×10^6 cellules/puit) sont déposés dans une plaque 96 puits préalablement préparée et qui contient les peptides (50-150 μ g/mL) (stock resuspendu dans 50 μ L de DMSO puis 950 μ L d'eau) et les contrôles DMSO (0,25 μ L dans 99,75 μ L), ConA (2 μ g/mL) et le lysat total de *M. abscessus* (10 μ g/mL). Les peptides (Mimotope, Australie) sont longs de 15 mers avec un offset de 5 pour recouvrir au mieux la protéine.

Les cellules sont mises en culture avec les peptides 72h à 37°C, 5 % CO₂ puis la sécrétion d'IFN γ est mesurée par Elisa (ThermoFisher). Cette réponse IFN γ correspond à la reconnaissance des peptides présentés par le complexe d'histocompatibilité de classe II (CMHII) par les LT helper CD4⁺.

Dans le cas de la réponse Th2, nous avons mesuré la sécrétion d'IL-13 (Elabscience) après 72h de culture.

Pour la comparaison des réponses peptidiques après inoculation de la souche sauvage, du mutant Δ eccB₄ et du complémenté, les souris présentant une réponse DMSO supérieure à la moyenne de la

population sont éliminées. Les P value ont été déterminées par test non paramétrique en utilisant le programme GraphPad prism, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, $****P < 0,0001$.

L'alignement des protéines est réalisé sur Clustal (Madeira *et al.*, 2019) et visualisé par le logiciel Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAPHIE

- Abate, G., Hamzabegovic, F., Eickhoff, C.S., and Hoft, D.F. (2019) BCG Vaccination Induces M. avium and M. abscessus Cross-Protective Immunity. *Front Immunol* **10**: 234.
- Adékambi, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M.-J., La Scola, B., Raoult, D., and Drancourt, M. (2004) Amoebal coculture of “Mycobacterium massiliense” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol* **42**: 5493–5501.
- Agustí, G., Astola, O., Rodríguez-Güell, E., Julián, E., and Luquin, M. (2008) Surface Spreading Motility Shown by a Group of Phylogenetically Related, Rapidly Growing Pigmented Mycobacteria Suggests that Motility Is a Common Property of Mycobacterial Species but Is Restricted to Smooth Colonies. *J Bacteriol* **190**: 6894–6902.
- Alami, M., Lüke, I., Deitermann, S., Eisner, G., Koch, H.-G., Brunner, J., and Müller, M. (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli. *Mol Cell* **12**: 937–946.
- Andersen, P., Munk, M.E., Pollock, J.M., and Doherty, T.M. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**: 1099–1104.
- Ates, L.S., Dippenaar, A., Ummels, R., Piersma, S.R., Woude, A.D. van der, Kuij, K. van der, *et al.* (2018) Mutations in ppe38 block PE_PGRS secretion and increase virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Microbiol* **3**: 181–188.
- Augenstreich, J., Arbues, A., Simeone, R., Haanappel, E., Wegener, A., Sayes, F., *et al.* (2017) ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol* **19**.
- Bageshwar, U.K., and Musser, S.M. (2007) Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the Escherichia coli Tat machinery. *J Cell Biol* **179**: 87–99.
- Bakala N’Goma, J.C., Le Moigne, V., Soismier, N., Laencina, L., Le Chevalier, F., Roux, A.-L., *et al.* (2015) Mycobacterium abscessus phospholipase C expression is induced during coculture within amoebae and enhances M. abscessus virulence in mice. *Infect Immun* **83**: 780–791.
- Beckham, Ciccarelli, L., Bunduc, C.M., Mertens, H.D.T., Ummels, R., Lugmayr, W., *et al.* (2017) Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat Microbiol* **2**: 17047.
- Beckham, K.S.H., Ritter, C., Chojnowski, G., Mullapudi, E., Rettel, M., Savitski, M.M., *et al.* (2020) Structure of the mycobacterial ESX-5 Type VII Secretion System hexameric pore complex. Microbiology, . <http://bio-rxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.11.17.387225>. Accessed January 26, 2021.
- Belisle, J.T., and Brennan, P.J. (1989) Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol* **171**: 3465–3470.

- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420–1422.
- Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E943–E952.
- Bernut, A., Herrmann, J.-L., Ordway, D., and Kremer, L. (2017) The Diverse Cellular and Animal Models to Decipher the Physiopathological Traits of *Mycobacterium abscessus* Infection. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 100.
- Bernut, A., Loynes, C.A., Floto, R.A., and Renshaw, S.A. (2020) Deletion of *cftr* Leads to an Excessive Neutrophilic Response and Defective Tissue Repair in a Zebrafish Model of Sterile Inflammation. *Front Immunol* **11**: 1733.
- Bernut, A., Nguyen-Chi, M., Halloum, I., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2016a) *Mycobacterium abscessus*-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking. *PLoS Pathog* **12**: e1005986.
- Bernut, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., *et al.* (2016b) Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* **99**: 866–883.
- Blasco, B., Chen, J.M., Hartkoorn, R., Sala, C., Uplekar, S., Rougemont, J., *et al.* (2012) Virulence regulator EspR of *Mycobacterium tuberculosis* is a nucleoid-associated protein. *PLoS Pathog* **8**: e1002621.
- Bottai, D., Majlessi, L., Simeone, R., Frigui, W., Laurent, C., Lenormand, P., *et al.* (2011) ESAT-6 secretion-independent impact of ESX-1 genes *espF* and *espG1* on virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **203**: 1155–1164.
- Brandt, L., Oettinger, T., Holm, A., Andersen, A.B., and Andersen, P. (1996) Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **157**: 3527–3533.
- Braunstein, Brown, A.M., Kurtz, S., and Jacobs, W.R. (2001) Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol* **183**: 6979–6990.
- Braunstein, Espinosa, B.J., Chan, J., Belisle, J.T., and Jacobs, W.R. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **48**: 453–464.
- Brode, S.K., Daley, C.L., and Marras, T.K. (2014) The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* **18**: 1370–1377.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., Jonge, M.I. de, Bottai, D., Demangel, C., *et al.* (2006) Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* **74**: 88–98.
- Brodin, P., Poquet, Y., Levillain, F., Peguillet, I., Larrouy-Maumus, G., Gilleron, M., *et al.* (2010) High Content Phenotypic Cell-Based Visual Screen Identifies *Mycobacterium tuberculosis* Acyltrehalose-Containing Glycolipids Involved in Phagosome Remodeling. *PLOS Pathogens* **6**: e1001100.

- Bryant, J.M., Brown, K.P., Burbaud, S., Everall, I., Belardinelli, J.M., Rodriguez-Rincon, D., *et al.* (2021) Step-wise pathogenic evolution of *Mycobacterium abscessus*. *Science* **372**: eabb8699.
- Bryant, J.M., Grogono, D.M., Greaves, D., Foweraker, J., Roddick, I., Inns, T., *et al.* (2013) Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* **381**: 1551–1560.
- Bryant, J.M., Grogono, D.M., Rodriguez-Rincon, D., Everall, I., Brown, K.P., Moreno, P., *et al.* (2016) Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* **354**: 751–757.
- Bunduc, C.M., Bitter, W., and Houben, E.N.G. (2020) Structure and Function of the Mycobacterial Type VII Secretion Systems. *Annu Rev Microbiol* .
- Bunduc, C.M., Fahrenkamp, D., Wald, J., Ummels, R., Bitter, W., Houben, E.N.G., and Marlovits, T.C. (2021) Structure and dynamics of a mycobacterial type VII secretion system. *Nature* **593**: 445–448.
- Byrd, T.F., and Lyons, C.R. (1999) Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* **67**: 4700–4707.
- Calmette, A. (1863-1933) A. du texte (1928) *La vaccination préventive de la tuberculose par le B.C.G. (Bacille Calmette-Guérin) / par A. Calmette,...* <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k54537102>. Accessed January 30, 2022.
- Casanova, J.-L., and Abel, L. (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* **20**: 581–620.
- Casonato, S., Cervantes Sánchez, A., Haruki, H., Rengifo González, M., Provvedi, R., Dainese, E., *et al.* (2012) WhiB5, a transcriptional regulator that contributes to *Mycobacterium tuberculosis* virulence and reactivation. *Infect Immun* **80**: 3132–3144.
- Catherinot, Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J.-F., Daffé, M., *et al.* (2007) Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* **75**: 1055–1058.
- Catherinot, E., Roux, A.-L., Vibet, M.-A., Bellis, G., Ravilly, S., Lemonnier, L., *et al.* (2013) *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J Cyst Fibros* **12**: 74–80.
- Catherinot, Roux, A.-L., Edouard Macheras, Hubert, D., Matmar, M., Dannhoffer, L., *et al.* (2009) Acute Respiratory Failure Involving an R Variant of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* **47**: 271–274.
- Caverly, L.J., Caceres, S.M., Fratelli, C., Happoldt, C., Kidwell, K.M., Malcolm, K.C., *et al.* (2015) *Mycobacterium abscessus* morphotype comparison in a murine model. *PLoS One* **10**: e0117657.
- Chen, W., Bao, Y., Chen, X., Burton, J., Gong, X., Gu, D., *et al.* (2016) *Mycobacterium tuberculosis* PE25/PPE41 protein complex induces activation and maturation of dendritic cells and drives Th2-biased immune responses. *Med Microbiol Immunol* **205**: 119–131.
- Chew, K.L., Octavia, S., Jureen, R., Ng, O.T., Marimuthu, K., Lin, R.T.P., and Teo, J.W.P. (2021) Molecular epidemiology and phylogenomic analysis of *Mycobacterium abscessus* clinical isolates in an Asian population. *Microb Genom* **7**.

- Chirakos, A.E., Nicholson, K.R., Huffman, A., and Champion, P.A. (2020) Conserved ESX-1 substrates EspE and EspF are virulence factors that regulate gene expression. *Infect Immun* .
- Clark, R.R., Judd, J., Lasek-Nesselquist, E., Montgomery, S.A., Hoffmann, J.G., Derbyshire, K.M., and Gray, T.A. (2018) Direct cell-cell contact activates SigM to express the ESX-4 secretion system in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E6595–E6603.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–544.
- Coros, A., Callahan, B., Battaglioli, E., and Derbyshire, K.M. (2008) The specialized secretory apparatus ESX-1 is essential for DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology* <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2008.06299.x>. Accessed March 30, 2020.
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **13**: 343–359.
- Cullen, A.R., Cannon, C.L., Mark, E.J., and Colin, A.A. (2000) *Mycobacterium* abscessus infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 641–645.
- Daleke, M.H., Cascioferro, A., Punder, K. de, Ummels, R., Abdallah, A.M., Wel, N. van der, *et al.* (2011) Conserved Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE) protein domains target LipY lipases of pathogenic mycobacteria to the cell surface via the ESX-5 pathway. *J Biol Chem* **286**: 19024–19034.
- Daley, C.L., Iaccarino, J.M., Lange, C., Cambau, E., Wallace, R.J., Jr, Andrejak, C., *et al.* (2020) Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clinical Infectious Diseases* **71**: e1–e36.
- Danilchanka, O., Sun, J., Pavlenok, M., Maueröder, C., Speer, A., Siroy, A., *et al.* (2014) An outer membrane channel protein of *Mycobacterium tuberculosis* with exotoxin activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 6750–6755.
- Davidson, L.B., Nessar, R., Kempaiah, P., Perkins, D.J., and Byrd, T.F. (2011) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by H β D2 gene expression and IL-8 release. *PLoS One* **6**: e29148.
- Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., *et al.* (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* **25**: 730–733.
- DeLisa, M.P., Tullman, D., and Georgiou, G. (2003) Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6115–6120.
- Drancourt, M. (2014) Looking in amoebae as a source of mycobacteria. *Microb Pathog* **77**: 119–124.
- D’Souza, S., Rosseels, V., Romano, M., Tanghe, A., Denis, O., Jurion, F., *et al.* (2003) Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **71**: 483–493.

- Dubois, V., Pawlik, A., Bories, A., Le Moigne, V., Sismeiro, O., Legendre, R., *et al.* (2019) Mycobacterium abscessus virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages. *PLoS Pathog* **15**: e1008069.
- Dubois, V., Viljoen, A., Laencina, L., Le Moigne, V., Bernut, A., Dubar, F., *et al.* (2018) MmpL8MAB controls Mycobacterium abscessus virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E10147–E10156.
- Dulberger, C.L., Rubin, E.J., and Boutte, C.C. (2020) The mycobacterial cell envelope - a moving target. *Nat Rev Microbiol* **18**: 47–59.
- Dumas, E., Christina Boritsch, E., Vandenbogaert, M., Rodríguez de la Vega, R.C., Thiberge, J.-M., Caro, V., *et al.* (2016) Mycobacterial Pan-Genome Analysis Suggests Important Role of Plasmids in the Radiation of Type VII Secretion Systems. *Genome Biol Evol* **8**: 387–402.
- Esther, C.R., Esserman, D.A., Gilligan, P., Kerr, A., and Noone, P.G. (2010) Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837580/>. Accessed January 6, 2020.
- Famelis, N., Rivera-Calzada, A., Degliesposti, G., Wingender, M., Mietrach, N., Skehel, J.M., *et al.* (2019) Architecture of the mycobacterial type VII secretion system. *Nature* **576**: 321–325.
- Fedrizzi, T., Meehan, C.J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., *et al.* (2017) Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Sci Rep* **7**: 45258.
- Feltcher, M.E., Gunawardena, H.P., Zulauf, K.E., Malik, S., Griffin, J.E., Sasseti, C.M., *et al.* (2015) Label-free Quantitative Proteomics Reveals a Role for the Mycobacterium tuberculosis SecA2 Pathway in Exporting Solute Binding Proteins and Mce Transporters to the Cell Wall. *Mol Cell Proteomics* **14**: 1501–1516.
- Floto, R.A., Olivier, K.N., Saiman, L., Daley, C.L., Herrmann, J.-L., Nick, J.A., *et al.* (2016) US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* **71 Suppl 1**: i1-22.
- Fortune, S.M., Jaeger, A., Sarracino, D.A., Chase, M.R., Sasseti, C.M., Sherman, D.R., *et al.* (2005) Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10676–10681.
- Gallant, J., Heunis, T., Beltran, C., Schildermans, K., Bruijns, S., Mertens, I., *et al.* (2021) PPE38-Secretion-Dependent Proteins of M. tuberculosis Alter NF- κ B Signalling and Inflammatory Responses in Macrophages. *Front Immunol* **12**: 702359.
- Gao, L.-Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N., and Brown, E.J. (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* **53**: 1677–1693.
- Gey Van Pittius, N.C., Gamielien, J., Hide, W., Brown, G.D., Siezen, R.J., and Beyers, A.D. (2001) The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol* **2**: RESEARCH0044.

- Gey van Pittius, N.C., Sampson, S.L., Lee, H., Kim, Y., Helden, P.D. van, and Warren, R.M. (2006) Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* **6**: 95.
- Gijsbers, A., Vinciauskaite, V., Siroy, A., Gao, Y., Tria, G., Mathew, A., *et al.* (2021) Priming mycobacterial ESX-secreted protein B to form a channel-like structure. *Curr Res Struct Biol* **3**: 153–164.
- González-Pérez, M., Mariño-Ramírez, L., Parra-López, C.A., Murcia, M.I., Marquina, B., Mata-Espinoza, D., *et al.* (2013) Virulence and immune response induced by *Mycobacterium avium* complex strains in a model of progressive pulmonary tuberculosis and subcutaneous infection in BALB/c mice. *Infect Immun* **81**: 4001–4012.
- Gray, T.A., Clark, R.R., Boucher, N., Lapierre, P., Smith, C., and Derbyshire, K.M. (2016) Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria. *Science* **354**: 347–350.
- Gray, T.A., and Derbyshire, K.M. (2018) Blending genomes: distributive conjugal transfer in mycobacteria, a sexier form of HGT: Distributive conjugal transfer. *Molecular Microbiology* **108**: 601–613.
- Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., *et al.* (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **175**: 367–416.
- Gröschel, M.I., Sayes, F., Shin, S.J., Frigui, W., Pawlik, A., Orgeur, M., *et al.* (2017) Recombinant BCG Expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. *Cell Rep* **18**: 2752–2765.
- Gröschel, M.I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., and Brosch, R. (2016) ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat Rev Microbiol* **14**: 677–691.
- Guinn, K.M., Hickey, M.J., Mathur, S.K., Zakel, K.L., Grotzke, J.E., Lewinsohn, D.M., *et al.* (2004) Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **51**: 359–370.
- Gupta, R.S., Lo, B., and Son, J. (2018) Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol* **9**: 67.
- Hebert, A.M., Talarico, S., Yang, D., Durmaz, R., Marrs, C.F., Zhang, L., *et al.* (2007) DNA Polymorphisms in the *pepA* and *PPE18* Genes among Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for Vaccine Efficacy. *Infect Immun* **75**: 5798–5805.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., and Engelhardt, H. (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3963–3967.
- Hou, J.M., D’Lima, N.G., Rigel, N.W., Gibbons, H.S., McCann, J.R., Braunstein, M., and Teschke, C.M. (2008) ATPase activity of *Mycobacterium tuberculosis* SecA1 and SecA2 proteins and its importance for SecA2 function in macrophages. *J Bacteriol* **190**: 4880–4887.
- Houben, Demangel, C., Ingen, J. van, Perez, J., Baldeón, L., Abdallah, A.M., *et al.* (2012) ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* **14**: 1287–1298.

- Houben, Korotkov, K.V., and Bitter, W. (2014) Take five — Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**: 1707–1716.
- Howard, S.T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., *et al.* (2006) Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology (Reading, Engl)* **152**: 1581–1590.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M., *et al.* (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12420–12425.
- Hunt, D.M., Sweeney, N.P., Mori, L., Whalan, R.H., Comas, I., Norman, L., *et al.* (2012) Long-range transcriptional control of an operon necessary for virulence-critical ESX-1 secretion in Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* **194**: 2307–2320.
- Huygen, K., Lozes, E., Gilles, B., Drowart, A., Palfliet, K., Jurion, F., *et al.* (1994) Mapping of TH1 helper T-cell epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85A in mice infected with live Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun* **62**: 363–370.
- Ingen, J. van, Boeree, M.J., Dekhuijzen, P.N.R., and Soolingen, D. van (2009) Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clin Microbiol Infect* **15**: 888–893.
- Izquierdo Lafuente, B., Ummels, R., Kuijl, C., Bitter, W., and Speer, A. (2021) Mycobacterium tuberculosis Toxin CpnT Is an ESX-5 Substrate and Requires Three Type VII Secretion Systems for Intracellular Secretion. *mBio* **12**: e02983-20.
- Jeon, B.-Y., Kwak, J., Lee, S.-S., Cho, S., Won, C.J., Kim, J.M., and Shin, S.J. (2009) Comparative analysis of immune responses to Mycobacterium abscessus infection and its antigens in two murine models. *J Microbiol* **47**: 633–640.
- Jeong, Y.J., Lee, K.S., Koh, W.-J., Han, J., Kim, T.S., and Kwon, O.J. (2004) Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients: comparison of thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology* **231**: 880–886.
- Johansen, M.D., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2020) Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. *Nat Rev Microbiol* .
- Jonge, M.I. de, Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M.M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P., *et al.* (2007) ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol* **189**: 6028–6034.
- Jönsson, B.E., Gilljam, M., Lindblad, A., Ridell, M., Wold, A.E., and Welinder-Olsson, C. (2007) Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **45**: 1497–1504.
- Karbalaee Zadeh Babaki, M., Soleimanpour, S., and Rezaee, S.A. (2017) Antigen 85 complex as a powerful Mycobacterium tuberculosis immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microbial Pathogenesis* **112**: 20–29.

- Khubaib, M., Sheikh, J.A., Pandey, S., Srikanth, B., Bhuwan, M., Khan, N., *et al.* (2016) Mycobacterium tuberculosis Co-operonic PE32/PPE65 Proteins Alter Host Immune Responses by Hampering Th1 Response. *Front Microbiol* **7**: 719.
- Kim, Kang, M.-J., Kim, W.S., Han, S.J., Kim, H.M., Kim, H.W., *et al.* (2015) Essential engagement of Toll-like receptor 2 in initiation of early protective Th1 response against rough variants of Mycobacterium abscessus. *Infect Immun* **83**: 1556–1567.
- Kim, Yang, C.-S., Nguyen, L.T., Kim, J.K., Jin, H.S., Choe, J. ho, *et al.* (2017) Mycobacterium abscessus ESX-3 plays an important role in host inflammatory and pathological responses during infection. *Microbes and Infection* **19**: 5–17.
- Koh, W.-J., Jeong, B.-H., Kim, S.-Y., Jeon, K., Park, K.U., Jhun, B.W., *et al.* (2017) Mycobacterial Characteristics and Treatment Outcomes in Mycobacterium abscessus Lung Disease. *Clin Infect Dis* **64**: 309–316.
- Laencina, L. (2017) Avantages génomiques conférés à Mycobacterium abscessus pour une existence intracellulaire. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01721663>. Accessed November 4, 2021.
- Laencina, L., Dubois, V., Le Moigne, V., Viljoen, A., Majlessi, L., Pritchard, J., *et al.* (2018) Identification of genes required for Mycobacterium abscessus growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**: E1002–E1011.
- Lagune, M., Petit, C., Sotomayor, F.V., Johansen, M.D., Beckham, K.S.H., Ritter, C., *et al.* (2021) Conserved and specialized functions of Type VII secretion systems in non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology (Reading)* **167**.
- Launois, P., DeLeys, R., Niang, M.N., Drowart, A., Andrien, M., Dierckx, P., *et al.* (1994) T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun* **62**: 3679–3687.
- Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., and Vincent, V. (2002) Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5318–5325.
- Le Moigne, V., Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., *et al.* (2016) MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against Mycobacterium abscessus Infection. *Infect Immun* **84**: 2895–2903.
- Le Moigne, V., Bernut, A., Cortès, M., Viljoen, A., Dupont, C., Pawlik, A., *et al.* (2019) Lsr2 Is an Important Determinant of Intracellular Growth and Virulence in Mycobacterium abscessus. *Front Microbiol* **10**: 905.
- Le Moigne, V., Raynaud, C., Moreau, F., Dupont, C., Nigou, J., Neyrolles, O., *et al.* (2020) Efficacy of Bedaquiline, Alone or in Combination with Imipenem, against Mycobacterium abscessus in C3HeB/FeJ Mice. *Antimicrob Agents Chemother* **64**: e00114-20.
- Le Moigne, V., Rottman, M., Goulard, C., Barteau, B., Poncin, I., Soismier, N., *et al.* (2015) Bacterial phospholipases C as vaccine candidate antigens against cystic fibrosis respiratory pathogens: the Mycobacterium abscessus model. *Vaccine* **33**: 2118–2124.
- Le Moigne, V., Roux, A.-L., Mahoudo, H., Christien, G., Ferroni, A., Dumitrescu, O., *et al.* (2021) Serological biomarkers for the diagnosis of Mycobacterium abscessus infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **21**: 1569–1593.

- Leao, S.C., Tortoli, E., Euzéby, J.P., and Garcia, M.J. (2011) Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2311–2313.
- Lee, M.-R., Sheng, W.-H., Hung, C.-C., Yu, C.-J., Lee, L.-N., and Hsueh, P.-R. (2015) *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. *Emerg Infect Dis* **21**: 1638–1646.
- Lenz, L.L., and Portnoy, D.A. (2002) Identification of a second *Listeria* *secA* gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol* **45**: 1043–1056.
- Lopez, A., Shoen, C., Cynamon, M., Dimitrakopoulou, D., Paiola, M., Pavelka, M.S., and Robert, J. (2021) Developing Tadpole *Xenopus laevis* as a Comparative Animal Model to Study *Mycobacterium abscessus* Pathogenicity. *Int J Mol Sci* **22**: E806.
- Lou, Y., Rybníček, J., Sala, C., and Cole, S.T. (2017) EspC forms a filamentous structure in the cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* and impacts ESX-1 secretion. *Mol Microbiol* **103**: 26–38.
- Lozes, E., Denis, O., Drowart, A., Jurion, F., Palfliet, K., Vanonckelen, A., *et al.* (1997) Cross-reactive immune responses against *Mycobacterium bovis* BCG in mice infected with non-tuberculous mycobacteria belonging to the MAIS-Group. *Scand J Immunol* **46**: 16–26.
- Lyashchenko, K., Colangeli, R., Houde, M., Al Jahdali, H., Menzies, D., and Gennaro, M.L. (1998) Heterogeneous Antibody Responses in Tuberculosis. *Infect Immun* **66**: 3936–3940.
- MacGurn, J.A., and Cox, J.S. (2007) A Genetic Screen for *Mycobacterium tuberculosis* Mutants Defective for Phagosome Maturation Arrest Identifies Components of the ESX-1 Secretion System. *Infect Immun* **75**: 2668–2678.
- MacGurn, J.A., Raghavan, S., Stanley, S.A., and Cox, J.S. (2005) A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **57**: 1653–1663.
- Macheras, E., Konjek, J., Roux, A.-L., Thiberge, J.-M., Bastian, S., Leão, S.C., *et al.* (2014) Multilocus sequence typing scheme for the *Mycobacterium abscessus* complex. *Res Microbiol* **165**: 82–90.
- Macheras, E., Roux, A.-L., Bastian, S., Leão, S.C., Palaci, M., Sivadon-Tardy, V., *et al.* (2011) Multilocus Sequence Analysis and *rpoB* Sequencing of *Mycobacterium abscessus* (Sensu Lato) Strains. *J Clin Microbiol* **49**: 491–499.
- Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, G.M., Milano, A., Provvedi, R., Pasca, M.R., *et al.* (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* **189**: 730–740.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., *et al.* (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* **47**: W636–W641.
- Malcolm, K.C., Caceres, S.M., Pohl, K., Poch, K.R., Bernut, A., Kremer, L., *et al.* (2018) Neutrophil killing of *Mycobacterium abscessus* by intra- and extracellular mechanisms. *PLoS One* **13**: e0196120.
- Malcolm, K.C., Nichols, E.M., Caceres, S.M., Kret, J.E., Martiniano, S.L., Sagel, S.D., *et al.* (2013) *Mycobacterium abscessus* induces a limited pattern of neutrophil activation that promotes pathogen survival. *PLoS One* **8**: e57402.

- Målen, H., Berven, F.S., Fladmark, K.E., and Wiker, H.G. (2007) Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* **7**: 1702–1718.
- McEvoy, C.R.E., Cloete, R., Müller, B., Schürch, A.C., Helden, P.D. van, Gagneux, S., *et al.* (2012) Comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* *pe* and *ppe* genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PLoS One* **7**: e30593.
- Medjahed, H., Gaillard, J.-L., and Reyrat, J.-M. (2010) *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol* **18**: 117–123.
- Meehan, C.J., Barco, R.A., Loh, Y.-H.E., Cogneau, S., and Rigouts, L. 2021 (2021) Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **71**: 004922.
- Mehra, A., Zahra, A., Thompson, V., Sirisaengtaksin, N., Wells, A., Porto, M., *et al.* (2013) *Mycobacterium tuberculosis* type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathog* **9**: e1003734.
- Mignard, S., and Flandrois, J.-P. (2008) A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1432–1441.
- Minnikin, D.E., Lee, O.Y.-C., Wu, H.H.T., Nataraj, V., Donoghue, H.D., Ridell, M., *et al.* (2015) *Pathophysiological Implications of Cell Envelope Structure in Mycobacterium tuberculosis and Related Taxa*. IntechOpen, . <https://www.intechopen.com/chapters/48054>. Accessed December 29, 2021.
- Moore, M., and Frerichs, J.B. (1953) An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J Invest Dermatol* **20**: 133–169.
- Nash, K.A., Brown-Elliott, B.A., and Wallace, R.J. (2009) A novel gene, *erm*(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1367–1376.
- Newton-Foot, M. (2013) Understanding the evolution and function of the mycobacterial Type VII ESX secretion systems (T7SSs) and their substrates. <https://scholar.sun.ac.za:443/handle/10019.1/79805>. Accessed January 30, 2022.
- Newton-Foot, M., Warren, R.M., Sampson, S.L., Helden, P.D. van, and Gey van Pittius, N.C. (2016) The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems. *BMC Evol Biol* **16**: 62.
- Odermatt, N.T., Sala, C., Benjak, A., and Cole, S.T. (2018) Essential Nucleoid Associated Protein mIHf (Rv1388) Controls Virulence and Housekeeping Genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* **8**: 14214.
- Oh, C.-T., Moon, C., Jeong, M.S., Kwon, S.-H., and Jang, J. (2013) *Drosophila melanogaster* model for *Mycobacterium abscessus* infection. *Microbes Infect* **15**: 788–795.
- Ohl, Y.M., Goetz, D.H., Chan, K., Shiloh, M.U., Craik, C.S., and Cox, J.S. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe* **7**: 210–220.
- Olivier, K.N., Weber, D.J., Wallace, R.J., Faiz, A.R., Lee, J.-H., Zhang, Y., *et al.* (2003) Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 828–834.

- Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., *et al.* (2013) Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 3185–3192.
- Pajuelo, D., Tak, U., Zhang, L., Danilchanka, O., Tischler, A.D., and Niederweis, M. (2021) Toxin secretion and trafficking by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **12**: 6592.
- Pandey, H., Fatma, F., Yabaji, S.M., Kumari, M., Tripathi, S., Srivastava, K., *et al.* (2018) Biophysical and immunological characterization of the ESX-4 system ESAT-6 family proteins Rv3444c and Rv3445c from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis (Edinb)* **109**: 85–96.
- Pang, X., Samten, B., Cao, G., Wang, X., Tvinnereim, A.R., Chen, X.-L., and Howard, S.T. (2013) MprAB Regulates the *espA* Operon in *Mycobacterium tuberculosis* and Modulates ESX-1 Function and Host Cytokine Response. *J Bacteriol* **195**: 66–75.
- Pawlik, A., Garnier, G., Orgeur, M., Tong, P., Lohan, A., Le Chevalier, F., *et al.* (2013) Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol* **90**: 612–629.
- Piton, J., Pojer, F., Wakatsuki, S., Gati, C., and Cole, S.T. (2020) High resolution CryoEM structure of the ring-shaped virulence factor EspB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Struct Biol X* **4**: 100029.
- Poweleit, N., Czudnochowski, N., Nakagawa, R., Trinidad, D.D., Murphy, K.C., Sasseti, C.M., and Rosenberg, O.S. (2019) The structure of the endogenous ESX-3 secretion system. *eLife* **8**: e52983.
- Power, C.A., Wei, G., and Bretscher, P.A. (1998) Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect Immun* **66**: 5743–5750.
- Prinzis, S., Rivoire, B., and Brennan, P.J. (1994) Search for the molecular basis of morphological variation in *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* **62**: 1946–1951.
- Qian, J., Chen, R., Wang, H., and Zhang, X. (2020) Role of the PE/PPE Family in Host-Pathogen Interactions and Prospects for Anti-Tuberculosis Vaccine and Diagnostic Tool Design. *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 594288.
- Queval, C.J., Song, O.-R., Carralot, J.-P., Saliou, J.-M., Bongiovanni, A., Deloison, G., *et al.* (2017) *Mycobacterium tuberculosis* Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling. *Cell Rep* **20**: 3188–3198.
- Qvist, T., Taylor-Robinson, D., Waldmann, E., Olesen, H.V., Hansen, C.R., Mathiesen, I.H., *et al.* (2016) Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **15**: 380–385.
- Raffetseder, J., Iakobachvili, N., Loitto, V., Peters, P.J., and Lerm, M. (2019) Retention of EsxA in the Capsule-Like Layer of *Mycobacterium tuberculosis* Is Associated with Cytotoxicity and Is Counteracted by Lung Surfactant. *Infect Immun* **87** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6386552/>. Accessed April 9, 2020.
- Raghavan, S., Manzanillo, P., Chan, K., Dovey, C., and Cox, J.S. (2008) Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Nature* **454**: 717–721.

- Ramachandra, L., Noss, E., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2001) Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med* **194**: 1421–1432.
- Raman, S., Puyang, X., Cheng, T.-Y., Young, D.C., Moody, D.B., and Husson, R.N. (2006) Mycobacterium tuberculosis SigM positively regulates Esx secreted protein and nonribosomal peptide synthetase genes and down regulates virulence-associated surface lipid synthesis. *J Bacteriol* **188**: 8460–8468.
- Rapisarda, C., Tassinari, M., Gubellini, F., and Fronzes, R. (2018) Using Cryo-EM to Investigate Bacterial Secretion Systems. *Annu Rev Microbiol* **72**: 231–254.
- Ratnatunga, C.N., Lutzky, V.P., Kupz, A., Doolan, D.L., Reid, D.W., Field, M., *et al.* (2020) The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease. *Front Immunol* **11**: 303.
- Raynaud, C., Daher, W., Johansen, M.D., Roquet-Banères, F., Blaise, M., Onajole, O.K., *et al.* (2020) Active Benzimidazole Derivatives Targeting the MmpL3 Transporter in Mycobacterium abscessus. *ACS Infect Dis* **6**: 324–337.
- Registre français de la mucoviscidose (2019) *Vaincre la Mucoviscidose* <https://www.vaincrelamuco.org/registredelamuco>. Accessed January 9, 2022.
- Rhoades, E.R., Archambault, A.S., Greendyke, R., Hsu, F.-F., Streeter, C., and Byrd, T.F. (2009) Mycobacterium abscessus Glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF-alpha by preventing interaction with TLR2. *J Immunol* **183**: 1997–2007.
- Rickman, L., Scott, C., Hunt, D.M., Hutchinson, T., Menéndez, M.C., Whalan, R., *et al.* (2005) A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in Mycobacterium tuberculosis is required for virulence in mice and controls transcription of the rpfA gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol* **56**: 1274–1286.
- Rigel, N.W., Gibbons, H.S., McCann, J.R., McDonough, J.A., Kurtz, S., and Braunstein, M. (2009) The Accessory SecA2 System of Mycobacteria Requires ATP Binding and the Canonical SecA1. *J Biol Chem* **284**: 9927–9936.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066–1073.
- Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., *et al.* (2009) Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. *PLoS ONE* **4**: e5660.
- Rivera-Calzada, A., Famelis, N., Llorca, O., and Geibel, S. (2021) Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. *Nat Rev Microbiol* **19**: 567–584.
- Rodriguez, G.M., Voskuil, M.I., Gold, B., Schoolnik, G.K., and Smith, I. (2002) ideR, an Essential Gene in Mycobacterium tuberculosis: Role of IdeR in Iron-Dependent Gene Expression, Iron Metabolism, and Oxidative Stress Response. *Infect Immun* **70**: 3371–3381.
- Rottman, M., Catherinot, E., Hochedez, P., Emile, J.-F., Casanova, J.-L., Gaillard, J.-L., and Soudais, C. (2007) Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower Mycobacterium abscessus in C57BL/6 mice. *Infect Immun* **75**: 5898–5907.

- Roux, A.-L., Catherinot, E., Ripoll, F., Soismier, N., Macheras, E., Ravilly, S., *et al.* (2009) Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. *J Clin Microbiol* **47**: 4124–4128.
- Roux, A.-L., Catherinot, E., Soismier, N., Heym, B., Bellis, G., Lemonnier, L., *et al.* (2015) Comparing Mycobacterium massiliense and Mycobacterium abscessus lung infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **14**: 63–69.
- Roux, A.-L., Ray, A., Pawlik, A., Medjahed, H., Etienne, G., Rottman, M., *et al.* (2011) Overexpression of pro-inflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol* **13**: 692–704.
- Roux, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., *et al.* (2016) The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages. *Open Biol* **6** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5133439/>. Accessed January 6, 2020.
- Runyon, E.H. (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* **43**: 273–290.
- Sala, C., Odermatt, N.T., Soler-Arnedo, P., Gülen, M.F., Schultz, S. von, Benjak, A., and Cole, S.T. (2018) EspL is essential for virulence and stabilizes EspE, EspF and EspH levels in Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* **14**: e1007491.
- Sampson, S.L. (2011) Mycobacterial PE/PPE Proteins at the Host-Pathogen Interface. *Clin Dev Immunol* **2011**: 497203.
- Sani, M., Houben, E.N.G., Geurtsen, J., Pierson, J., Punder, K. de, Zon, M. van, *et al.* (2010) Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins. *PLoS Pathog* **6** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832766/>. Accessed December 30, 2019.
- Sapriel, G., Konjek, J., Orgeur, M., Bouri, L., Frézal, L., Roux, A.-L., *et al.* (2016) Genome-wide mosaicism within Mycobacterium abscessus: evolutionary and epidemiological implications. *BMC Genomics* **17**: 118.
- Sayes, F., Blanc, C., Ates, L.S., Deboosere, N., Orgeur, M., Le Chevalier, F., *et al.* (2018) Multiplexed Quantitation of Intraphagocyte Mycobacterium tuberculosis Secreted Protein Effectors. *Cell Rep* **23**: 1072–1084.
- Sayes, F., Pawlik, A., Frigui, W., Gröschel, M.I., Crommelynck, S., Fayolle, C., *et al.* (2016) CD4+ T Cells Recognizing PE/PPE Antigens Directly or via Cross Reactivity Are Protective against Pulmonary Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS Pathog* **12**: e1005770.
- Sayes, F., Sun, L., Di Luca, M., Simeone, R., Degaiffier, N., Fiette, L., *et al.* (2012) Strong immunogenicity and cross-reactivity of Mycobacterium tuberculosis ESX-5 type VII secretion: encoded PE-PPE proteins predicts vaccine potential. *Cell Host Microbe* **11**: 352–363.
- Serafini, A., Boldrin, F., Palù, G., and Manganelli, R. (2009) Characterization of a Mycobacterium tuberculosis ESX-3 Conditional Mutant: Essentiality and Rescue by Iron and Zinc. *JB* **191**: 6340–6344.
- Shi, Y., Queller, D.C., Tian, Y., Zhang, S., Yan, Q., He, Z., *et al.* (2021) The Ecology and Evolution of Amoeba-Bacterium Interactions. *Appl Environ Microbiol* **87**: e01866-20.

- Shin, D.-M., Yang, C.-S., Yuk, J.-M., Lee, J.-Y., Kim, K.H., Shin, S.J., *et al.* (2008) Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* **10**: 1608–1621.
- Shteinberg, M., Haq, I.J., Polineni, D., and Davies, J.C. (2021) Cystic fibrosis. *Lancet* **397**: 2195–2211.
- Siboo, I.R., Chaffin, D.O., Rubens, C.E., and Sullam, P.M. (2008) Characterization of the accessory Sec system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190**: 6188–6196.
- Siegrist, M.S., Unnikrishnan, M., McConnell, M.J., Borowsky, M., Cheng, T.-Y., Siddiqi, N., *et al.* (2009) Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 18792–18797.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012) Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* **8**: e1002507.
- Simeone, R., Sayes, F., Lawarée, E., and Brosch, R. (2021) Breaching the phagosome, the case of the tuberculosis agent. *Cell Microbiol* **23**: e13344.
- Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015) Cytosolic Access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. *PLoS Pathog* **11**: e1004650.
- Singh, C.R., Moulton, R.A., Armitage, L.Y., Bidani, A., Snuggs, M., Dhandayuthapani, S., *et al.* (2006) Processing and Presentation of a Mycobacterial Antigen 85B Epitope by Murine Macrophages Is Dependent on the Phagosomal Acquisition of Vacuolar Proton ATPase and In Situ Activation of Cathepsin D. *The Journal of Immunology* **177**: 3250–3259.
- Skjöt, R.L.V., Oettinger, T., Rosenkrands, I., Ravn, P., Brock, I., Jacobsen, S., and Andersen, P. (2000) Comparative Evaluation of Low-Molecular-Mass Proteins from *Mycobacterium tuberculosis* Identifies Members of the ESAT-6 Family as Immunodominant T-Cell Antigens. *Infect Immun* **68**: 214–220.
- Skolnik, K., Kirkpatrick, G., and Quon, B.S. (2016) Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. *Curr Treat Options Infect Dis* **8**: 259–274.
- Smibert, O., Snell, G.I., Bills, H., Westall, G.P., and Morrissey, C.O. (2016) Mycobacterium abscessus Complex – a Particular Challenge in the Setting of Lung Transplantation. *Expert Review of Anti-infective Therapy* <https://www.tandfonline-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1586/14787210.2016.1138856>. Accessed November 29, 2019.
- Solans, L., Aguiló, N., Samper, S., Pawlik, A., Frigui, W., Martín, C., *et al.* (2014a) A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Infect Immun* **82**: 3446–3456.
- Solans, L., Gonzalo-Asensio, J., Sala, C., Benjak, A., Uplekar, S., Rougemont, J., *et al.* (2014b) The PhoP-dependent ncRNA Mcr7 modulates the TAT secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **10**: e1004183.
- Soler-Arnedo, P., Sala, C., Zhang, M., Cole, S.T., and Piton, J. (2020) Polarly Localized EccE1 Is Required for ESX-1 Function and Stabilization of ESX-1 Membrane Proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **202**.

- Solomonson, M., Huesgen, P.F., Wasney, G.A., Watanabe, N., Gruninger, R.J., Prehna, G., *et al.* (2013) Structure of the mycosin-1 protease from the mycobacterial ESX-1 protein type VII secretion system. *J Biol Chem* **288**: 17782–17790.
- Solomonson, M., Setiাপutra, D., Makepeace, K.A.T., Lameignere, E., Petrotchenko, E.V., Conrady, D.G., *et al.* (2015) Structure of EspB from the ESX-1 type VII secretion system and insights into its export mechanism. *Structure* **23**: 571–583.
- Sørensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P., and Andersen, A.B. (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 1710–1717.
- Steindor, M., Stehling, F., Olivier, M., Kehrmann, J., Diricks, M., Maurer, F.P., *et al.* (2021) Species-Specific Interferon-Gamma Release Assay for the Diagnosis of *Mycobacterium abscessus* Complex Infection. *Front Microbiol* **12**: 692395.
- Stewart, G.R., Patel, J., Robertson, B.D., Rae, A., and Young, D.B. (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog* **1**: 269–278.
- Sullivan, J.T., Young, E.F., McCann, J.R., and Braunstein, M. (2012) The *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages. *Infect Immun* **80**: 996–1006.
- Sun, Liu, Q., He, Y., Wang, C., Wu, F., Tian, C., and Zang, J. (2013) The putative propeptide of MycP1 in mycobacterial type VII secretion system does not inhibit protease activity but improves protein stability. *Protein Cell* **4**: 921–931.
- Sun, Siroy, A., Lokareddy, R.K., Speer, A., Doornbos, K.S., Cingolani, G., and Niederweis, M. (2015) The tuberculosis necrotizing toxin kills macrophages by hydrolyzing NAD. *Nat Struct Mol Biol* **22**: 672–678.
- Tailleux, L., Neyrolles, O., Honoré-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.-P., *et al.* (2003) Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* **170**: 1939–1948.
- Tak, U., Dokland, T., and Niederweis, M. (2021) Pore-forming Esx proteins mediate toxin secretion by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **12**: 394.
- Tanghe, A., Dangy, J.-P., Pluschke, G., and Huygen, K. (2008) Improved protective efficacy of a species-specific DNA vaccine encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium ulcerans* by homologous protein boosting. *PLoS Negl Trop Dis* **2**: e199.
- Taylor, J.L., and Palmer, S.M. (2006) *Mycobacterium abscessus* chest wall and pulmonary infection in a cystic fibrosis lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* **25**: 985–988.
- Thomson, R., Tolson, C., Sidjabat, H., Huygens, F., and Hargreaves, M. (2013) *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. *BMC Infect Dis* **13**: 241.
- Tian, S., Chen, H., Sun, T., Wang, H., Zhang, X., Liu, Y., *et al.* (2016) Expression, purification and characterization of Esx-1 secretion-associated protein EspL from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif* **128**: 42–51.

- To, K., Cao, R., Yegiazaryan, A., Owens, J., and Venketaraman, V. (2020) General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Med* **9** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7463534/>. Accessed November 26, 2020.
- Tortoli, E., Brown-Elliott, B.A., Chalmers, J.D., Cirillo, D.M., Daley, C.L., Emler, S., *et al.* (2019) Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. *Eur Respir J* **54**: 1900795.
- Tortoli, E., Fedrizzi, T., Meehan, C.J., Trovato, A., Grottola, A., Giacobazzi, E., *et al.* (2017) The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infect Genet Evol* **56**: 19–25.
- Tortoli, E., Kohl, T.A., Brown-Elliott, B.A., Trovato, A., Leão, S.C., Garcia, M.J., *et al.* (2016) Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 4471–4479.
- Tufariello, J.M., Chapman, J.R., Kerantzas, C.A., Wong, K.-W., Vilchèze, C., Jones, C.M., *et al.* (2016) Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E348–357.
- Turenne, C.Y. (2019) Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. *Infect Genet Evol* **72**: 159–168.
- Uplekar, S., Heym, B., Friocourt, V., Rougemont, J., and Cole, S.T. (2011) Comparative genomics of Esx genes from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* provides evidence for gene conversion and epitope variation. *Infect Immun* **79**: 4042–4049.
- Van Pinxteren, L.A.H., Ravn, P., Agger, E.M., Pollock, J., and Andersen, P. (2000) Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**: 155–160.
- Van Winden, V.J.C., Damen, M.P.M., Ummels, R., Bitter, W., and Houben, E.N.G. (2019a) Protease domain and transmembrane domain of the type VII secretion mycosin protease determine system-specific functioning in mycobacteria. *J Biol Chem* **294**: 4806–4814.
- Van Winden, V.J.C., Houben, E.N.G., and Braunstein, M. (2019b) Protein Export into and across the Atypical Diderm Cell Envelope of Mycobacteria. *Microbiol Spectr* **7**.
- Van Winden, V.J.C., Ummels, R., Piersma, S.R., Jiménez, C.R., Korotkov, K.V., Bitter, W., and Houben, E.N.G. (2016) Mycosins Are Required for the Stabilization of the ESX-1 and ESX-5 Type VII Secretion Membrane Complexes. *mBio* **7** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5082899/>. Accessed April 22, 2020.
- Varghese, B., Shajan, S.E., Al, M.O., and Al-Hajoj, S.A. (2012) First case report of chronic pulmonary lung disease caused by *Mycobacterium abscessus* in two immunocompetent patients in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* **32**: 312–314.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., and Sinderen, D. van (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 495–548.
- Viljoen, A., Alsteens, D., and Dufrêne, Y. (2020) Mechanical Forces between Mycobacterial Antigen 85 Complex and Fibronectin. *Cells* **9**: E716.

- Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Wilkinson, R.J., Wilkinson, K.A., Gideon, H.P., Young, D.B., and Sampson, S.L. (2012) Conserved immune recognition hierarchy of mycobacterial PE/PPE proteins during infection in natural hosts. *PLoS One* **7**: e40890.
- Wagner, J.M., Evans, T.J., Chen, J., Zhu, H., Houben, E.N.G., Bitter, W., and Korotkov, K.V. (2013) Understanding specificity of the mycosin proteases in ESX/type VII secretion by structural and functional analysis. *J Struct Biol* **184**: 115–128.
- Wang, Boshoff, H.I.M., Harrison, J.R., Ray, P.C., Green, S.R., Wyatt, P.G., and Barry, C.E. (2020) PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **367**: 1147–1151.
- Wang, Tang, Y., Lin, C., Zhang, J., Mai, J., Jiang, J., *et al.* (2022) Crosstalk between the ancestral type VII secretion system ESX-4 and other T7SS in *Mycobacterium marinum*. *iScience* **25**: 103585.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189–1191.
- Weerdenburg, E.M., Abdallah, A.M., Mitra, S., Punder, K. de, Wel, N.N. van der, Bird, S., *et al.* (2012) ESX-5-deficient *Mycobacterium marinum* is hypervirulent in adult zebrafish. *Cell Microbiol* **14**: 728–739.
- Woodworth, J.S., Fortune, S.M., and Behar, S.M. (2008) Bacterial protein secretion is required for priming of CD8+ T cells specific for the *Mycobacterium tuberculosis* antigen CFP10. *Infect Immun* **76**: 4199–4205.
- Woude, A.D. van der, Luirink, J., and Bitter, W. (2013) Getting across the cell envelope: mycobacterial protein secretion. *Curr Top Microbiol Immunol* **374**: 109–134.
- Yadav, J., and Gupta, M. (2012) Secretome differences between the taxonomically related but clinically differing mycobacterial species *Mycobacterium abscessus* and *M. Chelonae*. *Journal of Integrated OMICS* **2**.
- Yan, J., Kevat, A., Martinez, E., Teese, N., Johnson, K., Ranganathan, S., *et al.* (2020) Investigating transmission of *Mycobacterium abscessus* amongst children in an Australian cystic fibrosis centre. *J Cyst Fibros* **19**: 219–224.
- Zelazny, A.M., Root, J.M., Shea, Y.R., Colombo, R.E., Shamputa, I.C., Stock, F., *et al.* (2009) Cohort Study of Molecular Identification and Typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* **47**: 1985–1995.
- Zhang, Chen, J.M., Sala, C., Rybniker, J., Dhar, N., and Cole, S.T. (2014) Espl regulates the ESX-1 secretion system in response to ATP levels in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **93**: 1057–1065.
- Zhang, Fu, J., Zong, G., Liu, M., Pang, X., and Cao, G. (2018) Novel MprA binding motifs in the phoP regulatory region in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **112**: 62–68.
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffé, M. (2008) Direct Visualization of the Outer Membrane of *Mycobacteria* and *Corynebacteria* in Their Native State. *JB* **190**: 5672–5680.
- Zulauf, K.E., Sullivan, J.T., and Braunstein, M. (2018) The SecA2 pathway of *Mycobacterium tuberculosis* exports effectors that work in concert to arrest phagosome and autophagosome maturation. *PLOS Pathogens* **14**: e1007011.

ANNEXES

Touré et al., *Mycobacterium abscessus* resists the innate cytotoxic response by surviving granzyme-mediated cell lysis of infected phagocytes

Drosophila melanogaster a été proposé comme organisme modèle pour étudier la physiopathologie des infections à *M. abscessus* en 2013. Cet article montre que *M. abscessus* est capable de se multiplier et de provoquer la mort des drosophiles tout en induisant une réponse dite humorale (Oh *et al.*, 2013). Ce modèle est développé au sein de notre laboratoire et fait l'objet du projet de thèse d'Hamadou Touré qui a mis en place le modèle et étudie la réponse immunitaire chez la drosophile vis-à-vis de *M. abscessus* afin d'identifier des facteurs de sensibilité de l'hôte.

La réponse immune activée suite à l'infection de drosophiles par *M. abscessus* est à 2 composantes : la réponse humorale et la réponse cellulaire. La réponse cellulaire est médiée par des cellules de la lymphe (hémocytes), qui sont divisées en trois types : les plasmotocytes (phagocytose, production de peptides antimicrobiens, élimination de corps apoptotiques), les cellules cristallines (mélanisation, production de ROS) et les lamellocytes (élimination des parasites). Dans un contexte d'infection par *M. abscessus*, H. Touré a mis en évidence le rôle d'une sous-population de plasmotocytes, les thanacytes, nouvellement identifiée par « single cell sequencing ». Les thanacytes semblent posséder une activité cytotoxique et lyser les plasmotocytes phagocytaires infectés par *M. abscessus* sans tuer la bactérie. Cette toxicité est médiée par deux protéines dont les séquences possèdent une forte identité avec celles des granzymes B et H de l'Homme. Chez les mammifères, ces granzymes sont produites par les lymphocytes TCD8⁺ et les cellules « Natural Killers » (NK). Nous avons donc voulu étudier si les NK étaient capables de lyser les macrophages infectés par *M. abscessus* dans un contexte murin à l'instar des thanacytes de la drosophile. En collaboration avec Simon Glatigny (U1173, IRIS), j'ai infecté des macrophages primaires murins avec *M. abscessus* et mis en culture ces macrophages infectés en présence ou en absence de cellules NK autologues. Nous avons démontré que comme pour les thanacytes, on observe une mortalité des cellules infectées en présence de NK sans que *M. abscessus* ne soit tuée. Ces résultats démontrent que *M. abscessus* résiste à la lyse des phagocytes par les cellules cytotoxiques chez l'hôte infecté. Cette propension de *M. abscessus* à résister à la réponse innée de l'hôte est semblable à ce qui est observé pour les mycobactéries pathogènes strictes à croissance lente comme *M. tuberculosis*. Ce manuscrit est actuellement en révision dans la revue Cell reports.

***Mycobacterium abscessus* resists the innate cytotoxic response by surviving
granzyme-mediated cell lysis of infected phagocytes**

Hamadoun Touré^{1, a}, Lee Ann Galindo^{1, a}, Marion Lagune¹, Simon Glatigny¹, Isabelle Guéna²,
Jean-Louis Herrmann^{1, 3}, Fabienne Girard-Misguich^{1, *, §}, Sébastien Szuplewski^{2, *, §}

Affiliation

¹Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM, Infection et Inflammation, 78180, Montigny-Le-
Bretonneux, France.

²Université Paris-Saclay, UVSQ, LGBC, 78000, Versailles, France.

³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Ile-de-France Ouest, GHU
Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, 92380, Garches, France.

^atheses authors contribute equally

*co-corresponding authors: fabienne.misguich@uvsq.fr; sebastien.szuplewski@uvsq.fr

[§]co-senior authors.

Short title: Granzyme-producing cytotoxic cells in *Mycobacterium abscessus* infection

18 **Abstract**

19 *Mycobacterium abscessus*, a human opportunistic pathogen, is the most pathogenic species
20 among fast-growing mycobacteria, that are predominantly saprophytic. This is due to its ability
21 to survive within the host, causing severe infections that are difficult to eradicate. How
22 *M. abscessus* colonizes and infects the host and what could explain its pathogenicity remain
23 poorly understood. Using primary murine cells and *Drosophila*, we demonstrate that
24 intracellular *M. abscessus* remains insensitive to the granzyme-mediated cytotoxicity of infected
25 phagocytic cells by cytotoxic cells. Indeed, we show the existence of such population in
26 *Drosophila*, the thanocytes, which induce infected phagocytes apoptosis, depleting the main
27 cell population capable of controlling the infection. *M. abscessus* systemic multiplication is thus
28 favored since the observed antimicrobial peptides production is not required for the infection
29 control. These results demonstrate the propensity of *M. abscessus* to resist the host's cytotoxic
30 innate response, reminiscent of that observed with strict pathogenic slow-growing
31 mycobacteria.

Introduction

Mycobacteria are divided into two groups according to their growth rate and their strict pathogenicity to humans and animals (Runyon, 1959). A typical example of a slow-growing mycobacterium (SGM) is *Mycobacterium tuberculosis* complex, that is strictly pathogenic to humans and animals constituting their reservoir. In contrast, the group of the rapid-growing mycobacteria (RGM) comprises the most of the mycobacterial species, all of which are predominantly saprophytic and, therefore, non-pathogenic to humans and animals (Johansen et al., 2020). An exception is *M. abscessus*, the most pathogenic within the RGM, responsible of respiratory and mucocutaneous pathologies in humans with or without predisposing factors (Griffith et al., 2007; Misch et al., 2018; Prevots et al., 2010). After several taxonomical proposals, debates and re-classifications, *M. abscessus* complex consists of 3 subspecies: *M. abscessus subsp. abscessus*, *M. abscessus subsp. massiliense*, and *M. abscessus subsp. bolletii*. Indeed, *Mycobacterium chelonae*, the closest species to *M. abscessus*, and *Mycobacterium fortuitum*, were formerly classified in the same complex as *M. abscessus*. *M. abscessus* possesses several virulence factors absent from other RGMs such as *Mycobacterium smegmatis* or *M. chelonae* (e.g. phospholipase C) (Ripoll et al., 2009). It is able to survive in amoeba (Laencina et al., 2018) and mammalian macrophages by blocking the acidification of their phagosome (Roux et al., 2016). The essential role played by *M. abscessus* *esx4* secretion system confirmed its similarity with *M. tuberculosis* in the intracellular behavior (Laencina et al., 2018). *M. abscessus* also has the property of evolving during the course of infection (Catherinot et al., 2009) from a smooth (S) infectious form, to a irreversibly rough (R) form by loss of parietal lipids called glycopeptidolipids (Byrd and Lyons, 1999; Pawlik et al., 2013; Ripoll et al., 2009). This R form is associated with more-aggressive pulmonary disease (Catherinot et al., 2009) and with the formation of cords in zebrafish model, whose large size may protect it from ingestion and destruction by professional phagocytes (Bernut et al., 2014). These properties can be seen as advantages and possible escape mechanisms from surveillance by the host immune system, promoting infection and survival of *M. abscessus* in the host.

Different animal models have confirmed the increased virulence of *M. abscessus*, particularly its R form (Bernut et al., 2014; Byrd and Lyons, 1999; Catherinot et al., 2009; Howard et al., 2006; Ordway et al., 2008). However, the establishment of the infectious process by the S form was not studied, or even detailed. Indeed, only this S form is currently found in the environment, and because of its intracellular survival qualities, has to resist from the very beginning the host's innate immune response (Roux et al., 2016; Whang et al., 2017). Different immunocompromised mouse models confirmed that the innate and adaptative immune response, were essential for the progressive elimination of *M. abscessus*, compared to *M. chelonae*, requiring only the innate response for its elimination (Rottman et al., 2007). This was also found in the zebrafish model with the R form (Bernut et al., 2014). In addition, cytokines such as IFN γ (Rottman et al., 2007) and TNF α (Bernut et al., 2016; Ordway et al., 2008; Rottman et al., 2007) were shown to be critical for *M. abscessus* infection control, as shown by the rapid death of animals having a defective TNF pathway (Bernut et al., 2016; Rottman et al., 2007). Nevertheless, these models (mice and zebrafish) are not susceptible to an infection with the S form. Indeed, a progressive elimination or a persistence without elimination of S *M. abscessus* were observed in mice (Le Moigne et al., 2015) and zebrafish (Bernut et al., 2014) respectively. This limits deciphering the specific contribution of the innate response in controlling active replication of S *M. abscessus*, and how S *M. abscessus* would resist to the innate response and establish infection. The virulence of the S form has been demonstrated in *Drosophila melanogaster* (Oh et al., 2013). Indeed, this morphotype is able to infect and multiply in *Drosophila* in a dose-dependent manner, leading to severe tissue damages and eventually infected flies death (Oh et al., 2013). Fruit flies have also been used for rapid testing of anti-*M. abscessus* drug effectiveness (Oh et al., 2014).

To fight the infection, whether bacterial or fungal, *Drosophila* use an innate response that splits into a humoral and a cellular arm. The cellular response relies on immune cells, equivalent to the myeloid lineage in humans, called hemocytes. Until recently, they had been divided into three immune cell types: the plasmatocytes (the most abundant, with a phagocytic activity), crystal cells (involved in wound healing and reactive oxygen species production), and lamellocytes (involved in response to wasp parasitisation) (Banerjee et al., 2019). The humoral

response relies mainly on antimicrobial Peptides (AMPs) production mediated by two conserved NF- κ B signalling pathways, the Toll and Immune deficiency (Imd) pathways (Lemaitre et al., 1995, 1996). Whereas the Toll pathway is involved in the response against Gram-positive bacteria and fungi, the Imd pathway is involved in the response against Gram-negative bacteria (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Here, we studied how *S. M. abscessus* resists to the host innate system in order to establish an infection. The question was first addressed in the *Drosophila* model, that we show to be a suitable model for studying *M. abscessus* virulence. After systemic injection, the mycobacterium was quickly internalized by plasmatocytes in which it grew intracellularly. Our results highlight that systemic spreading of *M. abscessus* is promoted by a subset of newly identified *Drosophila* plasmatocytes, the thanocytes, that strongly expresses granzyme-encoding genes characteristic of human natural killer (NK) and cytotoxic T cells. Furthermore, despite the lysis of infected phagocytes by thanocytes, the intracellular bacteria survived. We confirmed *M. abscessus* resistance to cytotoxic lysis in another model after contact of murine *M. abscessus*-infected macrophages with autologous NK cells, reminiscent of bacterial resistance to granzyme-mediated cytotoxic NK cells activities occurring with strict pathogenic SGM, such as *M. tuberculosis*.

Results

M. abscessus is more pathogenic for *Drosophila* as compared to some other RGM or SGM

Thoracic nano-injections were performed at different doses of mycobacteria. All flies, injected with 1,000 colony forming units (CFU) of living *S. M. abscessus*, died after 6 days post infection (p.i.), compared to heat-killed or PFA-fixed *S. M. abscessus* (Figure 1A). At the same time point, only 50% survival was observed for the lowest dose (10 CFU) (Figure 1B), whereas 87% of flies infected with 100 CFU died, showing that survival of infected flies was dependent on *S. M. abscessus* concentration.

Comparison of fly survival after infection with other mycobacteria at the 10 CFU dose confirmed the acute virulence of *S. M. abscessus* in *Drosophila* (Figure 1C). Indeed, death was delayed when flies were infected with *M. marinum*, a strict pathogenic SGM for human, compared to *M. abscessus*-infected ones. *M. smegmatis*, a saprophytic RGM, induces an almost identical behaviour to uninfected flies during the whole period of the experiment (Figure 1C). We also compared survival of flies infected with subspecies of *M. abscessus* and with *M. chelonae* (Figure 1D). *M. chelonae* was the most virulent, killing all infected flies at day 10 p.i whereas *M. bolletii* was the least pathogenic, killing only half of the population at the same time point. Infection with *M. massiliense*, a subspecies of *M. abscessus*, behaves in the same manner as *S. M. abscessus* infection (Figure 1D).

Finally, infection of *Drosophila* with two attenuated mutant strains of *M. abscessus*, $\Delta 0855$ and $\Delta 4532$, characterized by their poor survival in environmental (amoeba) and human phagocytes (Dubois et al., 2019; Laencina et al., 2018), causes fewer lethality as compared to infection with wild-type *M. abscessus* (Figure 1E and 1F).

In conclusion, we confirmed *Drosophila* sensitivity to *S. M. abscessus* infection. In addition, *Drosophila* death was correlated to *M. abscessus* level of virulence levels as demonstrated by the less mortality induced by avirulent mutants. It was by so of interest to decipher the *Drosophila* innate response able to counteract *M. abscessus* pathogenicity.

Antimicrobial peptides are unnecessary for *Drosophila* survival during *M. abscessus* infection

To assess whether *M. abscessus* infection induces expression of AMPs-encoding genes in *Drosophila*, we first quantified the expression of the main AMPs-encoding genes, during infections with 10 and 1,000 CFU. Infection with 10 CFU resulted in increased level of *Attacin-A* and *Diptericin* transcripts, whose expression are Imd-regulated, and of Toll-regulated *Metchnikowin*, as compared to uninfected controls (Figure 2A). This induction was time-dependent with a peak on day 3 p.i.. In comparison, the injection of 1,000 CFU resulted in higher transcript levels for almost all the genes on day 3 p.i. (Figure 2B).

To directly assess whether the AMPs were involved in response against *M. abscessus*, we used mutant flies, generated by CRISPR/Cas9 gene editing technology (Hanson et al., 2019), defective for the AMPs-encoding genes whose expression is either regulated by the Imd (group B: *AttC^{Mi}*, *Dro-AttA-B^{SK2}*, *DptA-B^{Ski}*; *AttD^{Ski}*), the Toll pathway (group C: *Mtk^{R1}*; *Drs^{R1}*) or both (group A: *Def^{SK3}*). We confirmed that water injected mutant flies were not more sensitive compared to controls (Figure S1A). Mutant flies for *Relish* (*Rel^{F20}*) and Bomanins encoding genes (*Bom^{Δ55C}*) were used as a control for the Imd and the Toll pathway respectively. Mutant flies were infected with a low and high doses of *M. abscessus* (10 and 1,000 CFU). No significant difference in survival between each group was observed (Figure 2C-D). Similar results were obtained with $\Delta 0855$ and $\Delta 4532$ *M. abscessus* attenuated strains (Figure 2E-F), suggesting that whatever the level of virulence of *M. abscessus*, AMPs remain ineffective to protect *Drosophila*. Comparatively, and as a positive control, AMPs mutant flies were infected with 10 CFU of *B. cepacia*, a Gram-negative bacterium. All AMPs mutant flies were more sensitive to the infection than the control flies, notably the defective flies for Imd and Imd-regulated AMPs (Figure S1B).

Taken together these results show that *M. abscessus* infection induces expression of AMPs-encoding genes. However, this response is not required to control *M. abscessus* infection in *Drosophila*, independently of its degree of virulence.

***Drosophila* phagocytic cells control *M. abscessus* proliferation and are crucial for fly survival**

Plasmatocytes, equivalent to macrophages in *Drosophila*, represent the majority of total hemocytes population in flies, and thus the cellular part of the protective innate response. To assess whether *M. abscessus* was internalized by phagocytic plasmatocytes during the course of infection, we infected reporter flies with GFP-producing plasmatocytes (*hml>GFP*) (Boulet et al., 2021; Goto et al., 2003) with 500 CFU of red fluorescent *M. abscessus* Td-Tomato. Red fluorescent mycobacteria were already observed inside GFP-producing plasmatocytes as early as 30 min. post infection (Figure 3A). Red fluorescent *M. abscessus* were still detectable intracellularly 24 hours p.i.. This increased red fluorescence, observed up to 4 days p.i. (Figure 3A), shows that *M. abscessus* survives and grows inside the GFP-producing plasmatocytes. Furthermore, *M. abscessus* expansion in infected flies on day 5 p.i. indicates a systemic spreading after intracellular replication (Figure S2). Thus, we hypothesized that infected phagocytic plasmatocytes could control the infection by limiting *M. abscessus* spreading during the first 4 days p.i..

To test this hypothesis, we neutralised the phagocytic property of plasmatocytes by saturating their phagocytic capacities with 1 μ m polystyrene beads injected 24 h before inoculating *M. abscessus*. Beads-pre-injected flies demonstrated an increased susceptibility to *M. abscessus* infection, compared to control (Figure 3B). In parallel a more important bacterial load in bead-pre-injected flies was observed on day 3 p.i. (Figure 3C).

These results were further confirmed by using clodronate containing liposomes that deplete phagocytic plasmatocytes in flies by inducing plasmatocyte apoptosis (Ramesh Kumar et al., 2021). Infection of phagocytic plasmatocytes-depleted flies led to a drastic mortality rate, with all clodronate pre-injected flies dying on day 6 p.i. as compared to control flies (Figure 3D). Consistently, this hyper-susceptibility was correlated with a significant increased mycobacterial load (Figure 3E). Altogether these results strongly suggest that phagocytic plasmatocytes are crucial for controlling *M. abscessus* replication in *Drosophila* during the first days of infection and are required for fly survival.

***Drosophila* plasmatocyte subpopulations have opposing actions during *M. abscessus* infection**

To support the critical role of phagocytic plasmatocytes on the infection control, we used the *UAS/GAL4* system to perform genetic depletion. We crossed transgenics *UAS-debcl* flies with transgenics *Hemese (He)-GAL4* or *croquemort (crq)-GAL4* plasmatocytes driver lines. This results in a GAL4-dependent expression of the *debcl* pro-apoptotic gene in plasmatocytes of the progenies, leading to the depletion of these immune cells. Flies receiving a water injection were still alive throughout the experiments (Figure S3A). Infected control driver flies showed a similar survival rate to the wild-type flies (Figure S3B). Depletion of *crq* expressing cells led to a drastic increased susceptibility to *M. abscessus* infection compared to control flies (Figure 4A). Mycobacteria CFU was increased on day 3 p.i. for the *crq>debcl* genotype (Figure 4B), supporting that *crq* expressing cells participate in *M. abscessus* proliferation control. These results are like those obtained by altering the phagocytic properties by beads pre-injection and chemical depletion of phagocytic cells, indicating that phagocytic plasmatocytes express *crq*.

In contrast, depletion of *Hemese (He)* expressing cells conferred an increased resistance to *M. abscessus* infection and a better control of mycobacterial growth. Survival of *He>debcl* flies was increased, with 95% survival on day 6 p.i. compared to 45% for the control flies at this time point (Figure 4C). In addition, *He>debcl* flies had significantly less bacteria on day 3 p.i. (Figure 4D), pointing to an increased control of *M. abscessus* growth in flies depleted of, at least, one *He*-expressing plasmatocyte subpopulation.

Collectively, these results clearly show that, at least, two plasmatocyte subpopulations have opposing actions during *M. abscessus* in *Drosophila*.

***M. abscessus* resists granzyme-mediated lysis of plasmatocytes by thanacytes**

Recently, the *Hemese* gene has been reported to be more highly expressed than *crq* gene in a new class of plasmatocytes called thanacytes, at the larval stage (Fu et al., 2020). Thanacytes are defined by a high expression of *CG30088* and *CG30090*, which are

respectively homologous to granzyme B and granzyme H encoding genes, expressed by mammalian Natural Killer (NK) cells and cytotoxic T CD8⁺ lymphocytes (Fu et al., 2020). Thus, we hypothesized that thanacytes might be the deleterious hemocyte subpopulation which was depleted in *He>debcl* flies (Figure 4C-D).

To test this hypothesis, we expressed the pro-apoptotic gene *debcl* thanks to *ance-GAL4*, a likely thanacyte specific driver (Fu et al., 2020). We confirmed by confocal analysis *ance* expression in adult *Drosophila* hemocytes (Figure S4). After *S. M. abscessus* injection, *ance>debcl* flies were more resistant to the infection when compared to control flies. Indeed, only 22% of control flies survived compared to 53% of *ance>debcl* flies, on day 10 p.i. (Figure 5A). Despite their increased survival, no significant difference in bacterial load was observed between *ance>debcl* and control flies (Figure 5B). Moreover, there was no difference in survival between control and thanacytes-depleted flies infected with the avirulent RGM *M. smegmatis* (Figure S5).

To define the mechanism by which thanacytes might be deleterious, we individually depleted *CG30088/GZMB* and *CG30090/GZMH* transcripts in thanacytes by RNA interference (RNAi). Our hypothesis was that thanacytes, through the expression of granzyme-encoding genes, could lyse infected phagocytic cells with or without killing the intracellular *M. abscessus*, as described in mammals for other pathogenic mycobacteria, such as *M. tuberculosis* (Brill et al., 2001; Stenger et al., 1997, 1998; Yoneda and Ellner, 1998). An increased survival of *ance>GZMB-RNAi* and *ance>GZMH-RNAi* flies was observed, with 85% and 80% flies still alive on 7-day p.i. respectively, as compared to control flies (Figure 5C). Similar results were obtained using *Tep4-Gal4*, another likely thanacyte specific driver (Fu et al., 2020) for which we also verified the expression in adult hemocytes (Figure S4). Indeed, *Tep4>GZMH-RNAi* also showed an increased survival compared to control (Figure 5D), suggesting that, by depleting the thanacytes or the transcripts of their granzyme-encoding genes, the potential deleterious effect of thanacytes on phagocytic plasmatocytes during *M. abscessus* infection was impeded.

Granzymes are serine proteases produced by cytotoxic immune cells in order to kill infected phagocytes. The prediction of our hypothesis, according to which thanacytes lyse

plasmatocytes through granzymes, is that depletion of plasmatocytes in *GZM-RNAi* flies should suppress the increased survival phenotype of granzyme-depleted flies. In this context of double depletion (depletion of phagocytic plasmatocytes by clodronate treatment + depletion of *GZM* transcripts in thanocytes), all double depleted flies died on day 6 p.i., similarly to clodronate-treated control flies (Figure 5E).

Finally, the non-significant difference of bacterial load between *Tep4>GZMH-RNAi* and control flies despite the increased survival of *Tep4>GZMH-RNAi* flies suggest that *M. abscessus* resists to the granzyme-mediated killing of plasmatocytes by thanocytes (Figure 5F). Collectively, these data show that on the one hand, phagocytic plasmatocytes are necessary and potentially sufficient to control *S. M. abscessus* infection, especially in the first 3 days p.i.. On the other hand, the presence of thanocytes results in the lysis of infected phagocytic plasmatocytes without killing intracellular *M. abscessus*, and thus, the progressive depletion of the main phagocytic plasmatocyte pool capable of controlling the infection, favouring the infection.

As granzymes mainly induce a caspase dependant apoptosis (Belizário et al., 2018), we expressed specifically in the adult phagocytic plasmatocytes, thanks to the TARGET system (McGuire et al., 2003), a transgene encoding the caspase inhibitor baculovirus protein p35. *p35* expression in phagocytic plasmatocytes significantly increased fly survival compared to control, as observed when depleting the thanocytes or blocking granzyme gene expression (Figure S6). This result support that thanocytes kill infected phagocytic plasmatocytes by induction of a caspase-dependent apoptosis.

Intracellular *M. abscessus* resists lysis of murine macrophages by autologous NK cells

Due to a common expression of granzyme-encoding genes, thanocytes and mammalian natural killer (NK) cells could be functionally homologous cell types. To test whether *M. abscessus* could resist to the lysis of infected macrophages induced by NK cells as observed in *Drosophila*, we performed co-cultures of purified mouse primary NK cells and autologous macrophages. Macrophages were infected with *M. abscessus* Td-Tomato at a MOI of 1:10; then, NK cells were either added or not 4 hours post infection. On day 1 and 2 p.i., we observed

275 a significant decrease of *M. abscessus*-infected macrophage survival in the presence of NK
276 cells compared to infected macrophages alone on day 1 p.i. (22% of relative survival, Figure
277 6A). Furthermore, this effect was more pronounced at day 2 post infection (1.7% of relative
278 survival, Figure 6A). Supporting our previous hypothesis, the bacterial load of intracellular
279 *M. abscessus* was similar in presence or absence of NK cells on day 1 and 2 p.i. despite the
280 decrease survival of infected macrophages (Figure 6B). Overall, these results show that NK
281 cells can kill *S. M. abscessus*-infected macrophages however the intracellular mycobacteria is
282 resistant to this lysis.

Discussion

Over the last decades, in part due to the conservation with mammals of molecular and genetic pathways of innate immunity, *D. melanogaster* has emerged as a suitable model among the non-mammalian hosts for studying interactions between host and intracellular pathogens (Péan and Dionne, 2014; Troha and Buchon, 2019). Thus, RNA interference (RNAi) screens, performed on S2 cells (embryonic derived macrophage-like cells), have allowed the dissection of host factors involved in *Legionella pneumophila* and *Listeria monocytogenes* invasion and intracellular replication (Agaisse et al., 2005; Cheng et al., 2005; Dorer et al., 2006) or those required for the entry and survival of *M. fortuitum* (Philips et al., 2005) or *M. smegmatis* (Philips et al., 2008). Nevertheless, *M. marinum*, a strict pathogenic mycobacterium, remains the most studied species *in vivo* in *Drosophila* (Marshall and Dionne, 2021). In adult flies, this bacterium proliferates within phagocytic plasmatocytes then spreads systemically leading to fly death (Dionne et al., 2003).

Despite being a RGM, *S. M. abscessus* survived and proliferated within phagocytic plasmatocytes, similarly to the strict pathogenic SGM *M. marinum*. The ability of *M. abscessus* to survive in protozoa including amoebae, even after encystment (Drancourt, 2014), provides it with advantages (Le Moigne et al., 2016) that might reflect defense mechanisms acquired by the bacterium in contact with these predators, allowing it to survive intracellularly. Moreover, mutant strains unable to proliferate in phagocytic cells were less virulent in *Drosophila*, validating the results obtained in environmental phagocytes (amoebae) and mammalian macrophages (Laencina et al., 2018; Dubois et al., 2019), in which an intracellular growth deficit affects the survival of the *M. abscessus* within its host (Dubois et al., 2018, 2019; Laencina et al., 2018).

D. melanogaster has also the undeniable advantage of allowing the analysis of the host's innate immune response (Buchon et al., 2014). Unlike infections with *M. marinum* or *M. smegmatis* in which no AMPs production was reported (Dionne et al., 2003), a landmark study reported that *Drosophila* infection with *S. M. abscessus* induced the expression of *drosomycin*, a Toll related AMP-encoding gene (Oh et al., 2013). We confirmed and extended this observation by quantifying the expression of the main AMPs-encoding genes transcripts,

312 resulting in the induction of almost all Toll but also Imd-related AMP-encoding genes.
313 Strikingly, when we tested whether the induced AMPs were necessary to control S
314 *M. abscessus*, we found that their absence, using *Drosophila* strains lacking AMPs did not
315 increase fly susceptibility to the infection. Non-mutually exclusive interpretations of these
316 results are either that the cellular response prevails over humoral responses to control S
317 *M. abscessus* infection or that the intracellular survival of mycobacteria after internalization by
318 phagocytic cells protects them from the AMPs.

319 The importance of phagocytic plasmatocytes is demonstrated by the increased susceptibility
320 of flies observed after either saturation of phagocytic capacities by beads, clodronate-mediated
321 depletion of phagocytic cells or genetically-mediated depletion of *crq*-expressing
322 plasmatocytes. This population can be considered as the main immune cell type controlling
323 the infection during the first days post-infection but also as intracellular reservoir for S
324 *M. abscessus*.

325 We highlighted the cytotoxic activity of another sub-population of plasmatocytes expressing
326 *He*, *ance*, *Tep4*, *CG30088/GZMB* and *CG30090/GZMH*. Due to this expression profile, they
327 are presumably the subtype recently identified by single cell sequencing of *Drosophila* larval
328 hemocytes called either thanacytes (Fu et al., 2020) or PL-Pcd/PL-AMP (Cattenoz et al., 2020,
329 2021), that do not exhibit this capacity for phagocytosis (Cattenoz et al., 2021). Interestingly,
330 *Drosophila* are protected from S *M. abscessus* infection when *He*- or *ance*-expressing cells in
331 adults were depleted by expressing the pro-apoptotic *debcl* gene. A similar protection was
332 observed when *CG30088/GZMB* and *CG30090/GZMH* transcripts were depleted by RNAi in
333 either *ance*- or *Tep4*-expressing cells. This subtype is estimated to represent only 5 to 8.5%
334 of the larval hemocytes (Cattenoz et al., 2020; Fu et al., 2020) and seems to persist in the
335 adult as we observed.

336 We have retained the thanacyte named by Fu *et al.* Indeed, our results strongly suggest a
337 cytotoxic activity mediated by the products of *CG30088/GZMB* and *CG30090/GZMH*, whose
338 sequences have a strong identity to human granzymes B and H (Fu et al., 2020) specifically
339 expressed in human natural killer cells and cytotoxic CD8 T cells. Granzymes are serine
340 proteases, accumulated in cytoplasmic granules of vertebrate cytotoxic cells (e.g.: NK cells)

341 with pore forming proteins at the cytoplasmic membrane (*i.e.*: perforin) or the microbial cell
342 wall (*i.e.*: granulysin). Further studies should address how the products of *CG30088/GZMB*
343 and *CG30090/GZMH* genes gain access to infected phagocytic plasmatocytes.

344 Our results support the notion that in addition to expression of granzyme-encoding genes,
345 *Drosophila* thanacytes and murine NK cells both killed infected phagocytes without killing
346 intracellular *M. abscessus*. This observation is consistent with pioneering reports on the
347 understanding of T cell cytotoxic responses against *M. tuberculosis*. Indeed, human NK cells
348 (defined at the time as double negative lymphocyte for CD4 and CD8) killed *M. tuberculosis*-
349 infected macrophages without affecting the viability of the intracellular mycobacteria. This lysis
350 of macrophages by NK cells favors tolerance to the infection, by depleting the mycobacterial
351 cellular reservoir and therefore, reducing the inflammatory response (Stenger et al., 1997).
352 Likewise, CD8 T cells lysed infected macrophages, but also killed intracellular mycobacteria
353 during this process contrarily to NK cells (Stenger et al., 1997, 1998). This *M. tuberculosis*
354 killing during macrophages cytotoxic lysis by CD8 T cells constitute a mechanism of bacterial
355 control and thus, a protection (Stenger et al., 1997, 1998; Balin et al., 2018). These opposing
356 effects of macrophage lysis by NKs and CD8s on mycobacterial viability promote a balance
357 between the inflammatory response and tolerance to the infection (Dulphy et al., 2007; Stenger
358 and Modlin, 1999, 2002).

359 As mammalian cytotoxic cells (Voskoboinik et al., 2015), thanacytes lysed the infected
360 plasmatocytes. They killed them via a caspase-dependent apoptosis, as demonstrated by the
361 flies increased survival when caspases are blocked specifically in plasmatocytes. However,
362 this cytotoxicity was not effective against the mycobacterium. We confirm this resistance of *M.*
363 *abscessus* to phagocytes cytotoxic lysis in mice. We do not provide the complete mechanism
364 here, but in view of the conserved role of granzymes, our results suggest that the NK-
365 dependent killing of *M. abscessus*-infected macrophages may pass through induction of
366 caspase-dependent apoptosis after formation of pores in the cell membrane. This mechanism
367 is consistent with what is observed with *M. tuberculosis* infection of dendritic cells. Indeed, NK
368 cells lysed *M. tuberculosis*-infected phagocytes. Likewise, they also lysed non-infected
369 activated phagocytes (called bystander cells) depleting the mycobacterial cellular reservoir

370 and thus counterbalancing the inflammatory response at the expenses of the host (Stenger et
371 al., 1997, 1998; Dulphy et al., 2007).

372 To summarize, *Drosophila* infection with *S. M. abscessus* allowed us to reveal how this
373 mycobacterium escapes host innate response. Like strict human and animal pathogenic SGM,
374 such as *M. tuberculosis* or *M. marinum*, *S. M. abscessus* is internalized by phagocytes, within
375 which it survives and replicates. These host cells could constitute a shield from the AMPs.
376 Nevertheless, both in *Drosophila* and mice, the resistance of *M. abscessus* to the killing of the
377 phagocytes by cytotoxic cells could constitute a mode of mycobacterial spreading and, at least,
378 a severe depletion of the main cell reservoir able to control *M. abscessus* replication. This
379 propensity of *M. abscessus* to resist the host innate immune response, typical of strict
380 pathogenic SGM, could partially explain its superior pathogenicity among RGM that are
381 predominantly saprophytic.

382 **Star Methods**

383 **Key resources table**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
FITC-conjugated anti-mouse NK1.1 (clone NKRP1A)	BD Biosciences	Cat#553164
PE-conjugated anti-mouse CD3 (clone 145-2C11)	BioLegend	Cat#100308
Pacific Blue conjugated anti-mouse CD11b ⁺ (M1/70)	BioLegend	Cat#101224
Bacterial and virus strains		
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp <i>abscessus</i> (<i>M. abscessus</i> herein)	American Type Culture Collection (ATCC)	19977
<i>Mycobacterium abscessus</i> tandem dimer Tomato « tdTomato »	(Bernut et al., 2014)	N/A
<i>Mycobacterium abscessus</i> Δ0855	(Dubois et al., 2018)	N/A
<i>Mycobacterium abscessus</i> Δ4532	(Dubois et al., 2019)	N/A
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp <i>bolletii</i> (<i>M. bolletii</i> herein)	Culture Collection University of Gothenburg (CCUG)	50184T
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp <i>massiliense</i> (<i>M. massiliense</i> herein)	Collection of Institut Pasteur (CIP)	108297
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Culture Collection University of Gothenburg (CCUG)	47445
<i>Mycobacterium marinum</i> wild-type M	Collection of Institut Pasteur (CIP)	64.23
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (strain mc2 155)	American Type Culture Collection (ATCC)	700084
Critical commercial assays		
anti-CD11b microbeads	Miltenyi Biotec	130-049-601
RPMI 1640 media	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Cat#11875085
Collagenase D	Roche Diagnostics	11088866001
amikacin	Mylan laboratories Inc.	Cat#B1022
LIVE/DEAD	Thermo Fisher Scientific	Cat#65-0865-14
clodronate liposomes (Clodrosome)	Encapsula	CLD-8901
TRIzol reagent	ThermoFisher	15596026
Turbo DNA-free kit	Invitrogen	AM1907
Superscript III	Invitrogen	18080051
Maxima SYBR green master mix	ThermoFisher	K0221
Experimental models: Organisms/strains		
<i>Drosophila melanogaster</i>		
<i>w</i> ^[*] ; <i>P</i> { <i>w</i> ^[+mC] = <i>He-GAL4.Z</i> }85	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	8699
<i>y</i> ^[1] <i>w</i> ^[*] ; <i>P</i> { <i>w</i> ^[+mC] = <i>crq-GAL4</i> }2	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	25041

<i>y[1] w[*]; Mi{Trojan-GAL4.2}Tep4[MI13472-TG4.2]/SM6a</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	76750
<i>w[1118]; Mi{GFP[E.3xP3]=ET1}Ance[MB09828]</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	27809
<i>y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMJ23926}attP40/CyO</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	62448
<i>y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC05913}attP40</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	65039
<i>w[*]; sna[Sco]/CyO; P{w[+mC]=tubP-GAL80[ts]}ncd[GAL80ts-7]</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	7018
<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS-p35.H}BH2</i>	Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)	5073
<i>hml-GAL4; UAS-EGFP</i>	Dr. M. Crozatier	(Goto et al., 2003)
<i>w¹¹¹⁸</i>	Dr F. Rouyer (from NIG fly)	N/A
<i>UAS-debcl; UAS-debcl</i>	Dr H. Richardson	(Colussi et al., 2000)
<i>DrosDel iso w¹¹¹⁸</i>	Dr B. Lemaitre	(Hanson et al., 2019)
<i>iso Bom^{Δ55C}</i>	Dr B. Lemaitre	(Hanson et al., 2019)
<i>iso Rel^{E20}</i>	Dr B. Lemaitre	(Hanson et al., 2019)
Group A (<i>iso; Def^{SK3}</i>)	Dr B. Lemaitre	(Hanson et al., 2019)
Group B (<i>iso; AttC^{Mi}, Dro-AttA-B^{SK2}, DptA-B^{Ski}, AttD^{Ski}</i>)	Dr B. Lemaitre	(Hanson et al., 2019)
Group C (<i>iso; Mtk^{R1}; Drs^{R1}</i>)	Dr B. Lemaitre	(Hanson et al., 2019)
Mus musculus		
C57Bl6	Janvier LABS	C57BL/6JRj S PF FEM
Oligonucleotides for qPCR		
<i>Attacin A forward</i> : CGTTTGGATCTGACCAAGG	Eurogentec	N/A
<i>Attacin A reverse</i> : AAAGTTCCGCCAGGTGTGAC	Eurogentec	N/A
<i>Cecropin C forward</i> : TCATCCTGGCCATCAGCATT	Eurogentec	N/A
<i>Cecropin C reverse</i> : CGCAATTCCCAGTCCTTGAAT	Eurogentec	N/A
<i>Defensin forward</i> : GAGGATCATGTCCTGGTGCAT	Eurogentec	N/A
<i>Defensin reverse</i> : TCGCTTCTGGCGGCTATG	Eurogentec	N/A
<i>Diptericin A forward</i> : GCGGCGATGGTTTTGG	Eurogentec	N/A
<i>Diptericin A reverse</i> : CGCTGGTCCACACCTTCTG	Eurogentec	N/A
<i>Drosocin forward</i> : TTTGTCCACCACTCCAAGCAC	Eurogentec	N/A
<i>Drosocin reverse</i> : ATGGCAGCTTGAGTCAGGTGA	Eurogentec	N/A
<i>Drosomycin forward</i> : CTGCCTGTCCGGAAGATACAA	Eurogentec	N/A
<i>Drosomycin reverse</i> : TCCCTCCTCCTTGACACA	Eurogentec	N/A
<i>Metchnikowin forward</i> : AACTTAATCTTGGAGCGATTTTCTG	Eurogentec	N/A
<i>Metchnikowin reverse</i> :ACGGCCTCGTATCGAAAATG	Eurogentec	N/A
<i>RpL32 forward</i> : AGCATACAGGCCCAAGATCG	Eurogentec	N/A
<i>RpL32 reverse</i> : TGTTGTCGATACCCTTGGGC	Eurogentec	N/A
Software and algorithms		

ImageJ	NIH image	N/A
GraphPad Prism 9.0.0	GraphPad Software Inc.	N/A
FlowJo 10.6.2	FlowJo LLC	N/A

Contact for resource and reagent sharing

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr F. Misguich (fabienne.girard-misguich@uvsq.fr).

Experimental model and subject details

Bacterial strains and cultures

All mycobacterial strains were grown at 37°C excepted *M. marinum* (28°C) and *M. chelonae* (30°C) in Middelbrook 7H9 medium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) supplemented with 1% glucose and glycerol 0.2% at aerobic condition until an OD₆₀₀ between 0.6 and 0.8. *B. cepacia* was cultured in standard Luria-Bertani (LB) medium. Bacterial cultures were then centrifuged to get concentrated aliquots that were then frozen at -80°C in 10% glycerol.

Drosophila maintenance, crosses and infection

Flies were raised on standard corn-agar medium at 25°C. Crosses were performed at 25°C. An exception is for TARGET experiments, for which 19°C was used until pupal eclosion and a shift of adults at 29°C. Transgene expression was performed using the *UAS-GAL4* system (Brand and Perrimon, 1993). For infections, frozen bacterial aliquots were thawed on ice, homogenized with a 30-gauge insulin needle (Becton-Dickinson, France) to avoid clumps. Serial 10-fold-dilutions were done and 30 µL of each dilution were spread on blood agar plate for mycobacteria (COS, bioMérieux, France) or on classic LB agar plate for *B. cepacia*. Plates were then stored at 28°C or 37°C for 2 or 3-5 days depending on bacteria and colony forming units (CFU) counts were determined.

Bacterial inoculum was diluted in water to get suitable concentrations. 5-7 days old virgin female flies were anesthetized with CO₂ (Inject-Matic, Switzerland), and were infected with 50 nL of the suspension containing 10, 100 or 1,000 bacteria by injection into the sternopleural suture. Infections were performed using a nano-injector Nanoject III (Drummond Scientific company, USA) charged with a calibrated pulled glass needle made with a DMZ-universal-

electrode-puller (Zeitz instruments, Germany). To saturate phagocytic capacity or chemically deplete the phagocytes, 24h prior to infection with *M. abscessus*, flies were individually pre-injected with respectively 50 nL containing 500 polystyrene beads of 1 μ m of diameter; or with 69 nL of clodronate liposomes (Clodrosome CLD-8901, Encapsula, USA) diluted in PBS (ratio 1:5). Flies were kept anesthetized no more than 10 min. Infected flies were maintained at 28°C in controlled humidity condition. Twenty flies were used for every experimental condition and each experiment was performed at least in three independent replicates. Mortality was registered daily and surviving flies were transferred into a new vial every two days, until day 10 post-infection (p.i.).

Quantification of *M. abscessus* in vivo growth

Six infected flies per experimental condition were individually grounded in 250 μ L of water using sterile polypropylene cones (Kimble 749521-1590, Kimble Chase, USA). The broths were centrifuged at 1,200 *g* for 2 minutes (min.) and diluted by 10-fold serial dilutions. 50 μ L of each dilution were spread on VCA3 plates (VCA3, bioMérieux, France) containing selective antibiotics for *M. abscessus* (Vancomycin, Colimycin and Amphotericin B). The plates were kept at 37°C for one week.

Microscopy

For the monitoring of the kinetic of *M. abscessus* propagation in fly body, we infected female wild-type flies with 500 CFU of *M. abscessus* Td-Tomato. Living flies were anesthetized daily with CO₂ and visualised on dorsal face with a fluorescent stereomicroscope (MZFLIII, Leica microsystems, Germany) until five days p.i..

Plasmatocytes isolation and observation were performed on 5-7 days old female flies of *hml-Gal4; UAS-eGFP* genotype that were individually infected with 500 CFU of *M. abscessus* Td-Tomato. 6-8 flies were dissected as previously described (Sanchez Bosch et al., 2019). Circulating and sessile hemocytes were collected in 100 μ L of PBS containing 1% Hoechst (Invitrogen Hoechst 33342, USA) at 30 minutes, 24h, 48h, 72h and 96h p.i. 10 μ L of the solution were placed between a glass and a coverslip and observed with Leica SP8 X laser scanning confocal microscope. Acquired images were treated with ImageJ software (NIH).

qRT-PCR

Total RNA was extracted from 20 female flies per condition using TRIzol reagent (TRI reagent ThermoFisher, Waltham, USA), chloroform and isopropanol. Genomic DNA was removed from the extracted RNA using Turbo DNA-free kit (Invitrogen AM1907, Invitrogen, USA) and cDNA was generated using Superscript III (Invitrogen 18080051, Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. qPCR was performed in Maxima SYBR green master mix (ThermoFisher K0221, ThermoFisher, USA), using 100 ng of cDNA as template and 10 μ M of target genes specific primers. The primers used are presented in table 1. *RpL32* transcript levels were used for normalisation and the $\Delta\Delta$ ct method was used for expression relativization.

Murine immune cells isolation, infection and analysis

Spleens from female C57Bl6 mice were collected and cell suspensions were prepared after a 20 min. treatment with Collagenase D (2 mg/mL, Roche Diagnostics, Switzerland) at 37°C to release macrophages. After red blood cell lysis by Ammonium-Chloride-Potassium lysis buffer, CD11b⁺ cells were isolated by positive magnetic selection, using anti-CD11b microbeads and AutoMacs Pro Separator according to the manufacturer instructions (Miltenyi Biotec, USA). Negative fractions were used to isolate NK cells after staining with FITC-conjugated anti-mouse NK1.1 (clone NKRP1A, BD Biosciences) and PE-conjugated anti-mouse CD3 (clone 145-2C11, BioLegend, USA) (15 min. at 4°C) to exclude NKT cells. Pure NK cells were isolated with a BD Aria III cells sorter (BD-Biosciences, USA).

CD11b⁺ cells were cultured in RPMI 1640 media (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA). 10⁶ cells in 1 mL per conditions were infected with 10⁵ *M. abscessus* Td-Tomato (multiplicity of infection of 0.1) (37°C, 5% CO₂ for 3h). Infected cells were treated 1h with amikacin (250 μ g/mL) to kill extracellular bacteria and then maintained with a lower dose of antibiotic (50 μ g/mL) during the whole experiment. Purified NK cells were added to *M. abscessus* infected CD11b⁺ cells at a ratio of 1:2. At day 1 and 2 p.i., cells were labelled, first with LIVE/DEAD staining (Thermo Fisher Scientific, USA), followed by Pacific Blue conjugated anti-mouse CD11b⁺ (M1/70, BioLegend USA) and FITC conjugated anti-mouse NK1.1 (clone NKRP1A, BD-Biosciences, USA). Acquisitions were done on LSR III Fortessa flow cytometer (BD-Biosciences, USA) and data were analyzed with FlowJo software version 10.6.2.

469 **Biostatistical analysis**

470 All data were analyzed by GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., USA). The log-
471 rank (Mantel-Cox) test for Kaplan-Meier survival curves was used to evaluate survival statistics
472 significance. CFU quantification and genes expression level were compared by two-way
473 ANOVA. *p* values inferior to 0.05 were considered significant.

474

475 **Acknowledgements**

476 Thanks to Dr B. Marshall (Southampton University Hospitals Trust, United Kingdom) for careful
477 review of the manuscript, Dr N. Doisne and Dr E. Balse (UMR-S 1166) for forging the capillaries
478 for microinjections, Dr F. Le Guern for polystyrene microbeads, YN Phung, O. Piedallu and Dr
479 V. Dubois, respectively master, bachelor and graduate student for the assistance in the
480 laboratory. We thank Dr M. Crozatier, Dr B. Lemaitre and Dr H. Richardson for generously
481 giving us fly lines and the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) for fly stocks.

482

483 **Author contributions**

484 H.T., L.A.G. conducted the experiments in *Drosophila*, analyzed the data and wrote the paper.

485 M.L. and S.G. conducted the experiments in mouse, analyzed the data and wrote the paper.

486 J.L.H., I.G., F.M. and S.S. designed the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

487 **References**

- 488 Agaisse, H., Burrack, L.S., Philips, J.A., Rubin, E.J., Perrimon, N., and Higgins, D.E. (2005).
489 Genome-Wide RNAi Screen for Host Factors Required for Intracellular Bacterial Infection.
490 *Science* **309**, 1248–1251.
- 491 Balin, S.J., Pellegrini, M., Klechevsky, E., Won, S.T., Weiss, D.I., Choi, A.W., Hakimian, J., Lu, J.,
492 Ochoa, M.T., Bloom, B.R., et al. (2018). Human antimicrobial cytotoxic T lymphocytes, defined
493 by NK receptors and antimicrobial proteins, kill intracellular bacteria. *Sci Immunol* **3**,
494 eaat7668.
- 495 Banerjee, U., Girard, J.R., Goins, L.M., and Spratford, C.M. (2019). *Drosophila* as a Genetic
496 Model for Hematopoiesis. *Genetics* **211**, 367–417.
- 497 Belizário, J.E., Neyra, J.M., and Setúbal Destro Rodrigues, M.F. (2018). When and how NK cell-
498 induced programmed cell death benefits immunological protection against intracellular
499 pathogen infection. *Innate Immun* **24**, 452–465.
- 500 Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer,
501 L. (2014). *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess
502 formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E943–E952.
- 503 Bernut, A., Nguyen-Chi, M., Halloum, I., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2016).
504 *Mycobacterium abscessus*-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF
505 Signaling and Neutrophil Trafficking. *PLoS Pathog* **12**, e1005986.
- 506 Boulet, M., Renaud, Y., Lapraz, F., Benmimoun, B., Vandel, L., and Waltzer, L. (2021).
507 Characterization of the *Drosophila* adult hematopoietic system reveals a rare cell population
508 with differentiation and proliferation potential (*Developmental Biology*).
- 509 Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell
510 fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- 511 Brill, K.J., Li, Q., Larkin, R., Canaday, D.H., Kaplan, D.R., Boom, W.H., and Silver, R.F. (2001).
512 Human Natural Killer Cells Mediate Killing of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
513 via Granule-Independent Mechanisms. *Infection and Immunity* **69**, 1755–1765.
- 514 Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*--from
515 microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* **14**, 796–810.
- 516 Byrd, T.F., and Lyons, C.R. (1999). Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus*
517 mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* **67**, 4700–4707.
- 518 Catherinot, E., Roux, A.-L., Macheras, E., Hubert, D., Matmar, M., Dannhoffer, L., Chinet, T.,
519 Morand, P., Poyart, C., Heym, B., et al. (2009). Acute respiratory failure involving an R variant
520 of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* **47**, 271–274.
- 521 Cattenoz, P.B., Sakr, R., Pavlidaki, A., Delaporte, C., Riba, A., Molina, N., Hariharan, N.,
522 Mukherjee, T., and Giangrande, A. (2020). Temporal specificity and heterogeneity of
523 *Drosophila* immune cells. *EMBO J.* **39**, e104486.

524 Cattenoz, P.B., Monticelli, S., Pavlidaki, A., and Giangrande, A. (2021). Toward a Consensus in
525 the Repertoire of Hemocytes Identified in *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol* 9, 643712.

526 Cheng, L.W., Viala, J.P.M., Stuurman, N., Wiedemann, U., Vale, R.D., and Portnoy, D.A. (2005).
527 Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling
528 compartmentalization of an intracellular pathogen. *PNAS* 102, 13646–13651.

529 Colussi, P.A., Quinn, L.M., Huang, D.C., Coombe, M., Read, S.H., Richardson, H., and Kumar, S.
530 (2000). Debcl, a proapoptotic Bcl-2 homologue, is a component of the *Drosophila*
531 *melanogaster* cell death machinery. *J Cell Biol* 148, 703–714.

532 Dionne, M.S., Ghorri, N., and Schneider, D.S. (2003). *Drosophila melanogaster* is a genetically
533 tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect. Immun.* 71, 3540–3550.

534 Dorer, M.S., Kirton, D., Bader, J.S., and Isberg, R.R. (2006). RNA interference analysis of
535 Legionella in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog*
536 2, e34.

537 Drancourt, M. (2014). Looking in amoebae as a source of mycobacteria. *Microbial*
538 *Pathogenesis* 77, 119–124.

539 Dubois, V., Viljoen, A., Laencina, L., Le Moigne, V., Bernut, A., Dubar, F., Blaise, M., Gaillard, J.-
540 L., Guérardel, Y., Kremer, L., et al. (2018). MmpL8MAB controls *Mycobacterium abscessus*
541 virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
542 *U.S.A.* 115, E10147–E10156.

543 Dubois, V., Pawlik, A., Bories, A., Le Moigne, V., Sismeiro, O., Legendre, R., Varet, H.,
544 Rodríguez-Ordóñez, M.D.P., Gaillard, J.-L., Coppée, J.-Y., et al. (2019). *Mycobacterium*
545 *abscessus* virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages.
546 *PLoS Pathog.* 15, e1008069.

547 Dulphy, N., Herrmann, J.-L., Nigou, J., Réa, D., Boissel, N., Puzo, G., Charron, D., Lagrange, P.H.,
548 and Toubert, A. (2007). Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-
549 activated human dendritic cells. *Cell Microbiol* 9, 1412–1425.

550 Fu, Y., Huang, X., Zhang, P., van de Leemput, J., and Han, Z. (2020). Single-cell RNA sequencing
551 identifies novel cell types in *Drosophila* blood. *J Genet Genomics* 47, 175–186.

552 Goto, A., Kadowaki, T., and Kitagawa, Y. (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in
553 embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Developmental*
554 *Biology* 264, 582–591.

555 Griffith, D.E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B.A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S.M.,
556 Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M.F., et al. (2007). An official ATS/IDSA statement:
557 diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir.*
558 *Crit. Care Med.* 175, 367–416.

559 Hanson, M.A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., and Lemaitre, B. (2019).
560 Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic
561 knockout approach. *ELife* 8, e44341.

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

Johansen, M.D., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2020). Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol* 18, 392–407.

Laencina, L., Dubois, V., Le Moigne, V., Viljoen, A., Majlessi, L., Pritchard, J., Bernut, A., Piel, L., Roux, A.-L., Gaillard, J.-L., et al. (2018). Identification of genes required for *Mycobacterium abscessus* growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E1002–E1011.

Le Moigne, V., Rottman, M., Goulard, C., Barteau, B., Poncin, I., Soismier, N., Canaan, S., Pitard, B., Gaillard, J.-L., and Herrmann, J.-L. (2015). Bacterial phospholipases C as vaccine candidate antigens against cystic fibrosis respiratory pathogens: the *Mycobacterium abscessus* model. *Vaccine* 33, 2118–2124.

Le Moigne, V., Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., Gaillard, J.-L., Kremer, L., Herrmann, J.-L., and Blanc-Potard, A.-B. (2016). MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection. *Infect Immun* 84, 2895–2903.

Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9465–9469.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.

Marshall, E.K.P., and Dionne, M.S. (2021). *Drosophila* versus Mycobacteria: A Model for Mycobacterial Host-Pathogen Interactions. *Mol Microbiol*.

McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302, 1765–1768.

Misch, E.A., Saddler, C., and Davis, J.M. (2018). Skin and Soft Tissue Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Curr Infect Dis Rep* 20, 6.

Oh, C.-T., Moon, C., Jeong, M.S., Kwon, S.-H., and Jang, J. (2013). *Drosophila melanogaster* model for *Mycobacterium abscessus* infection. *Microbes Infect.* 15, 788–795.

Oh, C.-T., Moon, C., Park, O.K., Kwon, S.-H., and Jang, J. (2014). Novel drug combination for *Mycobacterium abscessus* disease therapy identified in a *Drosophila* infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1599–1607.

599 Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., Bai, X., Basaraba,
600 R.J., Orme, I.M., and Chan, E.D. (2008). Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung
601 infection. *J Leukoc Biol* 83, 1502–1511.

602 Pawlik, A., Garnier, G., Orgeur, M., Tong, P., Lohan, A., Le Chevalier, F., Sapriel, G., Roux, A.-L.,
603 Conlon, K., Honoré, N., et al. (2013). Identification and characterization of the genetic changes
604 responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically
605 persistent *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol* 90, 612–629.

606 Péan, C.B., and Dionne, M.S. (2014). Intracellular infections in *Drosophila melanogaster*: host
607 defense and mechanisms of pathogenesis. *Dev Comp Immunol* 42, 57–66.

608 Philips, J.A., Rubin, E.J., and Perrimon, N. (2005). *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family
609 member required for mycobacterial infection. *Science* 309, 1251–1253.

610 Philips, J.A., Porto, M.C., Wang, H., Rubin, E.J., and Perrimon, N. (2008). ESCRT factors restrict
611 mycobacterial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3070–3075.

612 Prevots, D.R., Shaw, P.A., Strickland, D., Jackson, L.A., Raebel, M.A., Blosky, M.A., Montes de
613 Oca, R., Shea, Y.R., Seitz, A.E., Holland, S.M., et al. (2010). Nontuberculous Mycobacterial Lung
614 Disease Prevalence at Four Integrated Health Care Delivery Systems. *Am J Respir Crit Care*
615 *Med* 182, 970–976.

616 Ramesh Kumar, J., Smith, J.P., Kwon, H., and Smith, R.C. (2021). Use of Clodronate Liposomes
617 to Deplete Phagocytic Immune Cells in *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti*. *Front Cell*
618 *Dev Biol* 9, 627976.

619 Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., Macheras, E., Heym, B.,
620 Herrmann, J.-L., Daffé, M., et al. (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of
621 the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 4, e5660.

622 Rottman, M., Catherinot, E., Hochedez, P., Emile, J.-F., Casanova, J.-L., Gaillard, J.-L., and
623 Soudais, C. (2007). Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in
624 immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice. *Infect Immun*
625 75, 5898–5907.

626 Roux, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., Deramaudt, T., Rottman,
627 M., Gaillard, J.-L., Majlessi, L., et al. (2016). The distinct fate of smooth and rough
628 *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol* 6, 160185.

629 Runyon, E.H. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 43,
630 273–290.

631 Sanchez Bosch, P., Makhijani, K., Herboso, L., Gold, K.S., Baginsky, R., Woodcock, K.J.,
632 Alexander, B., Kukar, K., Corcoran, S., Jacobs, T., et al. (2019). Adult *Drosophila* Lack
633 Hematopoiesis but Rely on a Blood Cell Reservoir at the Respiratory Epithelia to Relay
634 Infection Signals to Surrounding Tissues. *Dev. Cell* 51, 787–803.

635 Stenger, S., and Modlin, R.L. (1999). T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*.
636 *Curr Opin Microbiol* 2, 89–93.

637 Stenger, S., and Modlin, R.L. (2002). Control of *Mycobacterium tuberculosis* through
638 mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 14, 452–457.

639 Stenger, S., Mazzaccaro, R.J., Uyemura, K., Cho, S., Barnes, P.F., Rosat, J.P., Sette, A., Brenner,
640 M.B., Porcelli, S.A., Bloom, B.R., et al. (1997). Differential effects of cytolytic T cell subsets on
641 intracellular infection. *Science* 276, 1684–1687.

642 Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma-
643 Uzynski, S., Melián, A., Bogdan, C., et al. (1998). An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells
644 Mediated by Granulysin. *Science* 282, 121–125.

645 Troha, K., and Buchon, N. (2019). Methods for the study of innate immunity in *Drosophila*
646 *melanogaster*. *WIREs Developmental Biology* 8, e344.

647 Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function,
648 dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388–400.

649 Whang, J., Back, Y.W., Lee, K.-I., Fujiwara, N., Paik, S., Choi, C.H., Park, J.-K., and Kim, H.-J.
650 (2017). *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and
651 bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis* 8, e3012.

652 Yoneda, T., and Ellner, J.J. (1998). CD4+ T Cell and Natural Killer Cell-dependent Killing of
653 *Mycobacterium tuberculosis* by Human Monocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 395–403.

654

Figure legends

Figure 1. *M. abscessus* is virulent in *Drosophila*.

(A-F) (A) Survival curves of *w¹¹¹⁸* flies injected with water or 1,000 CFU (Colony Forming Unit) of living *M. abscessus* (*Mabs*), heat-killed *M. abscessus* (*Mabs*: HK) or *M. abscessus* fixed with 4% PFA (*Mabs*: 4% PFA) (B) different doses of live *M. abscessus* (10, 100 or 1,000 CFU) (C) 10 CFU of different mycobacterial species of different virulence (*M. abscessus*, *M. marinum* or *M. smegmatis*) (D) 10 CFU of different subspecies of *M. abscessus* and *M. chelonae* (E-F) 10 CFU of *M. abscessus* and the *M. abscessus* Δ 0855 mutant strain (E) and Δ 4532 mutant strain (F), both defective for intracellular growth. Curves represent survival of 60 flies. Data were analyzed using the log-rank statistical test. Asterisks represent p values **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Figure 2. AMPs are induced but are unnecessary for controlling *M. abscessus* infection.

(A-B) Quantification of AMPs-encoding genes relative expression by qRT-PCR. (A) RNA were extracted on day 1, 2, 3 and 7 p.i. (post-infection) from *w¹¹¹⁸* flies injected with 10 CFU (Colony Forming Unit) (B) RNA were extracted on day 3 p.i. (post-infection) from *w¹¹¹⁸* flies injected with 10 or 1000 CFU. (C-D) Survival curves of *w¹¹¹⁸* (iso *DrosDel*), *Defensin* (Group A), *Attacins-Drosocin-Diptericin* (Group B), *Drosomycin-Metchnikowin* (Group C), *Bomanins* (*Bom^{Δ55C}*), *Relish* (iso *Rel^{E20}*) mutant flies injected with (C) 10 CFU or (D) 1,000 CFU of *M. abscessus*. (E-F) Survival curves of *w¹¹¹⁸* flies injected with (E) 10 CFU of *M. abscessus* and the *M. abscessus* Δ 0855 or (F) 10 CFU of *M. abscessus* and the *M. abscessus* Δ 4532 mutant. Histograms represent data from 3 independent experiments performed in triplicates, error bars representing the standard deviations. Data were analyzed using a two-way ANOVA statistical test (*p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.0005) in (A-B). Survival were analyzed on 120 flies per genotype in (C) and 60 flies per genotype in (D-F). Data were analyzed using the log-rank statistical test (*p = 0.0475).

Figure 3. Plasmatocytes are crucial for controlling *M. abscessus* infection.

(A) DNA (Hoechst) stained hemocytes (GFP) isolated from *hml>eGFP* flies injected with 500 CFU (Colony Forming Unit) *M. abscessus* (Td-Tomato) at 30 minutes (min.), 1, 2, 3 and 4 days post-infection (days p.i.). Scale bar represents 50 μ m. (B) Survival curves of *w¹¹¹⁸* flies injected with water or/and beads and then injected with water or 10 CFU of *M. abscessus* (*Mabs*). (C) Bacterial load quantification on day 3 p.i. by CFU counting of *w¹¹¹⁸* flies injected with water or beads and then injected with 10 CFU of *M. abscessus* (*Mabs*). (D) Survival curves of *w¹¹¹⁸* flies injected with water or clodronate liposomes (Clodro.) and then injected with water or 10 CFU of *M. abscessus* (*Mabs*). (E) Bacterial load quantification on day 3 p.i. by CFU counting of *w¹¹¹⁸* flies injected with water or clodronate liposomes (Clodro.) and then injected with 10 CFU of *M. abscessus* (*Mabs*). Survivals were analyzed on 40-60 flies per condition using long-rank test (*p < 0.05; ****p < 0.0001) (B and D). Bacterial loads were individually quantified from 6 flies per condition. Histograms represent the mean CFU number, error bars representing the standard deviations. Data were analyzed using a two-way ANOVA statistical test. Asterisks represent p values *p = 0.01, **p = 0.005 (C and E).

Figure 4. Plasmatocytes sub-populations have opposite contribution during *M. abscessus* infection.

(A) Survival curves of *crq>* and *crq>debcl* flies injected with 10 CFU (Colony Forming Unit) of *M. abscessus*. (B) Bacterial load quantification on 0 and 3 days post-infection (Days p.i.) by CFU counting of *crq>* and *crq>debcl* flies injected with 10 CFU of *M. abscessus*. (C) Survival curves of *He>* and *He>debcl* flies injected with 10 CFU of *M. abscessus*. (A and C) Survivals were analyzed on 60 flies per genotype using long-rank test (*p = 0.03; ****p < 0.0001). (B and D) Bacterial loads were individually quantified from 6 flies per genotype. Histograms represent the mean CFU number, error bars representing the standard deviations. (B and D) Data were analyzed by using a two-way ANOVA test (*p < 0.05, ns = non-significative).

Figure 5. Thanocyte depletion confers resistance of *Drosophila* to *M. abscessus* infection.

(A) Survival curves of *ance>* and *ance>debcl* flies injected with 10 CFU of *M. abscessus*. (B) Bacterial load quantification on 0 and 3 days p.i. by CFU counting of *ance>* and *ance>debcl* flies injected with 10 CFU of *M. abscessus*. (C) Survival curves of *ance>*, *ance>GZMH-RNAi* and *ance>GZMB-RNAi* flies injected with 10 CFU (Colony Forming Unit) of *M. abscessus*. (D) Survival curves of *Tep4>* and *Tep4>GZMH-RNAi* flies injected with 10 CFU of *M. abscessus*. (E) Survival curves of *Tep4>* and *Tep4>GZMH-RNAi* flies injected with water (+ water) or clodronate liposomes (+ Clodro.) then with 10

CFU of *M. abscessus*. (E) Bacterial load quantification on 0 and 3 days p.i. by CFU counting of *Tep4>* and *Tep4>GZMH-RNAi* flies injected with water or clodronate liposomes (+ Clodro.) then with 10 CFU of *M. abscessus*. Survivals were analyzed on 40 flies per condition using long-rank test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$) (A, C, D and E). Bacterial loads were individually quantified from 6 flies per condition (B and F). Histograms represent the mean CFU number, error bars representing the standard deviations. Data were analyzed by two-way ANOVA test (ns=non-significative).

Figure 6. intracellular *M. abscessus* survives infected macrophages killing by NK cells.

(A) Survival of murine macrophages injected with *M. abscessus* Td-Tomato in absence (grey bars) or in presence (white bars) of NK (Natural Killer) cells, analyzed by flow cytometry, on day 1 and 2 post-infection (p.i.)

(B) Intracellular *M. abscessus* load quantification on day 1 and 2 p.i. by CFU (Colony Forming Unit) counting in absence (grey bars) or in presence (white bars) of NK (Natural Killer) cells (**B**). These data are representative of 3 independent experiments. Data were analyzed by two-way ANOVA test (**** $p < 0.0001$; ns=non-significative).

Figure S1. AMPs mutant flies are sensitive to *B. cepacia* infection.

(A) Survival curves of *w¹¹¹⁸* (iso DrosDel), *Defensin* (Group A), *Attacins-Drosocin-Diptericin* (Group B), *Drosomycin-Metchnikowin* (Group C), *Bomanins* (*Bom^{Δ55C}*), *Relish* (iso *Rel^{E20}*) mutant flies injected with water or (B) 10 CFU (Colony Forming Unit) of *B. cepacia*.

Survivals were analyzed on 20 flies per genotype in (A) and 60 flies per genotype in (B) using a long-rank test (**** $p < 0.0001$).

Figure S2. Visualization of *M. abscessus* infection in *Drosophila*.

Dorsal views of the same living anesthetized *w¹¹¹⁸* fly injected with water or another one injected with 500 CFU (Colony Forming Unit) of *M. abscessus* (*Mabs*), observed with a fluorescent stereomicroscope on day 0, 1, 3 and 5 post-infection (day p.i.).

Figure S3. Hemocytes-depleted flies are viable and do not present an impaired survival to water injection.

(A) Survival curves of *w¹¹¹⁸*, *crq>debcl* and *He>debcl* injected with water. (B) Survival curves of *w¹¹¹⁸*, *crq>*, *He>*, *Tep4>* and *ance>* injected with 10 CFU (Colony Forming Unit) of *M. abscessus*.

Figure S4. *Tep4*- and *ance*-GAL4 drive an expression in adult *Drosophila* hemocytes.

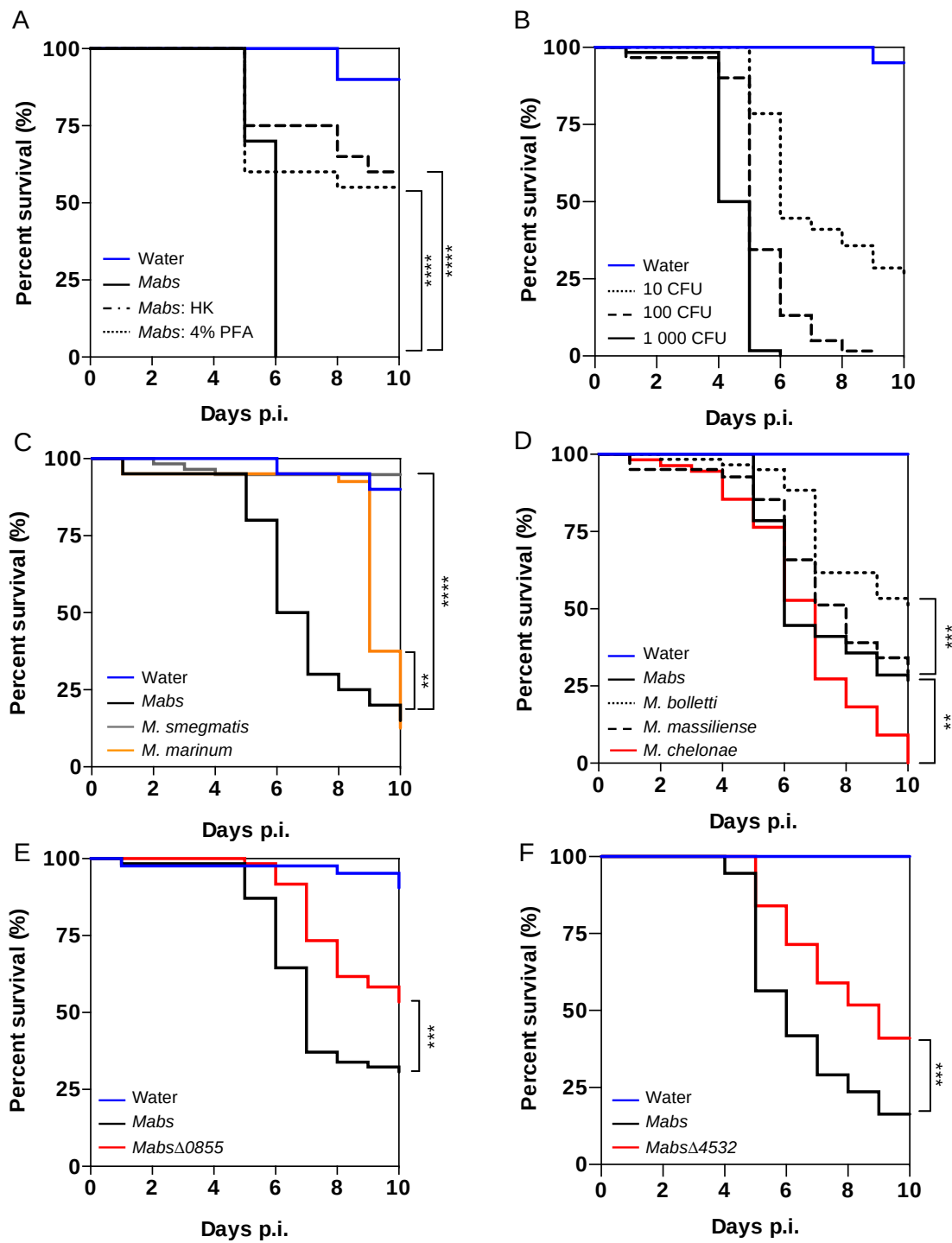
DNA (Hoechst) stained hemocytes (GFP) isolated from *ance>*, *Tep4>*, *ance>eGFP* and *Tep4>eGFP* adult flies. Scale bar represents 50 μ m.

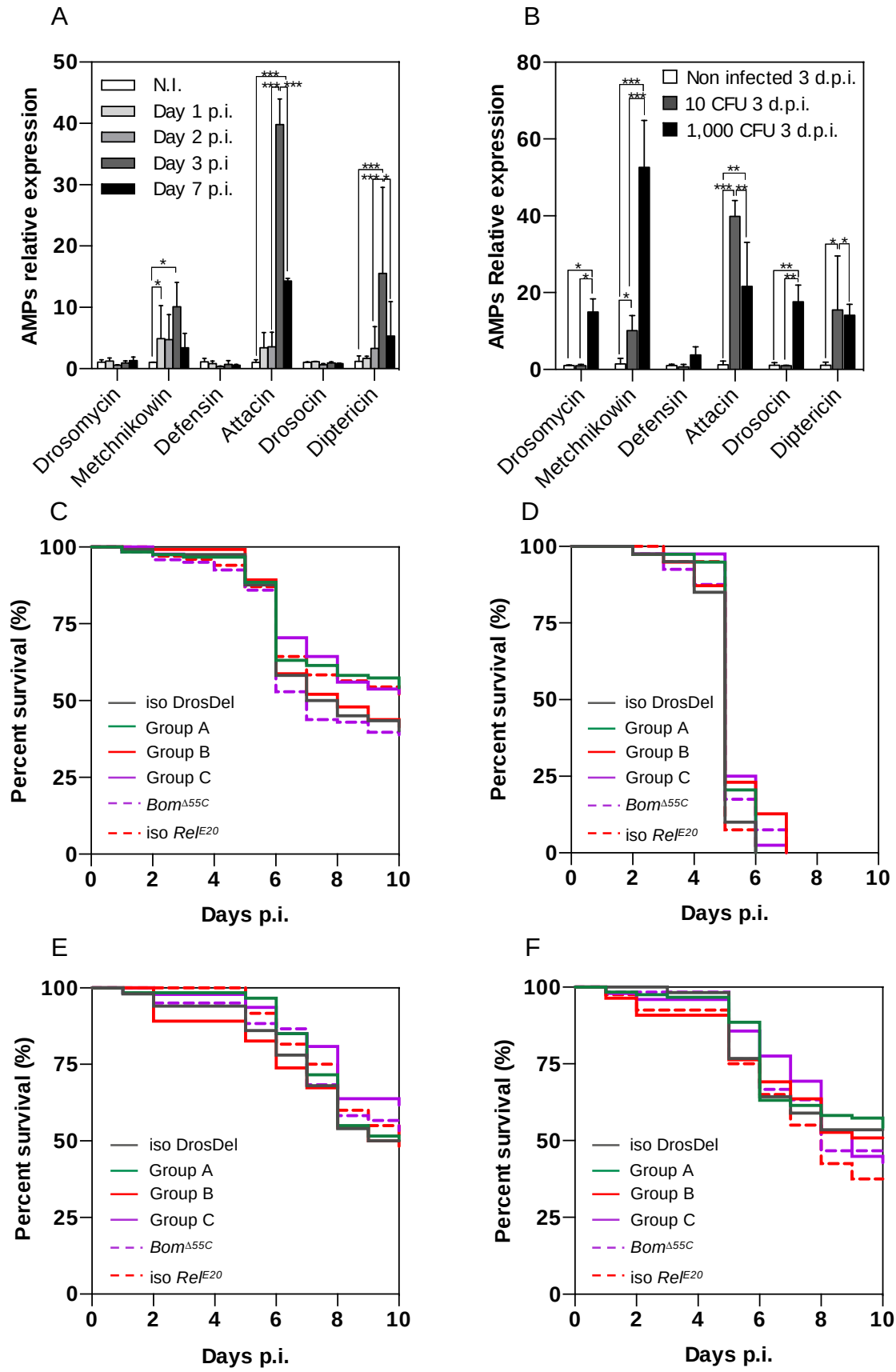
Figure S5. Thanocytes-depleted flies survival to infection with the avirulent *M. smegmatis*.

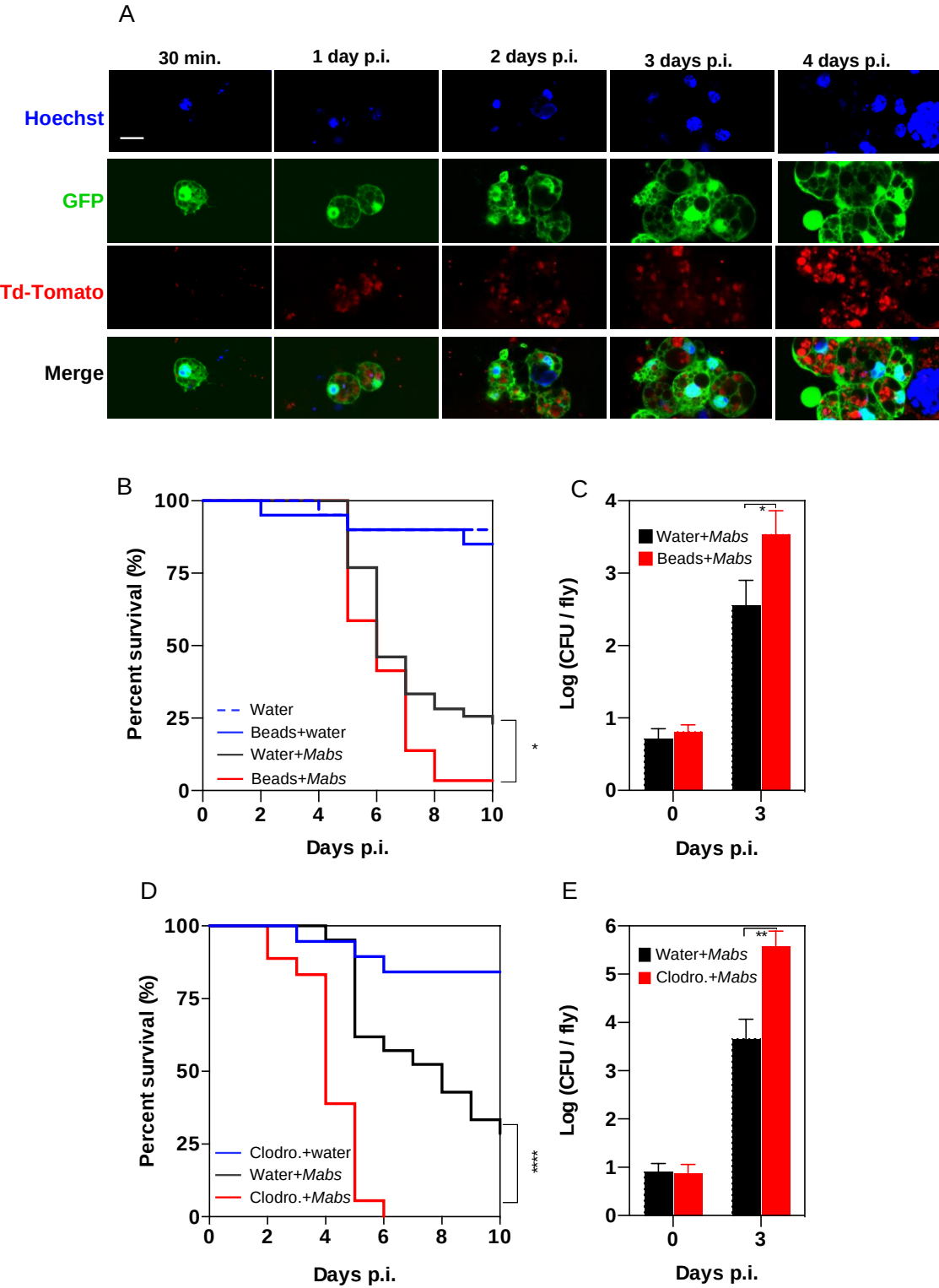
Survival curves of *w¹¹¹⁸* flies injected with water and *w¹¹¹⁸*, *ance>* and *ance>debcl* and *He>debcl* flies injected with 10 CFU (Colony Forming Unit) of *M. smegmatis*.

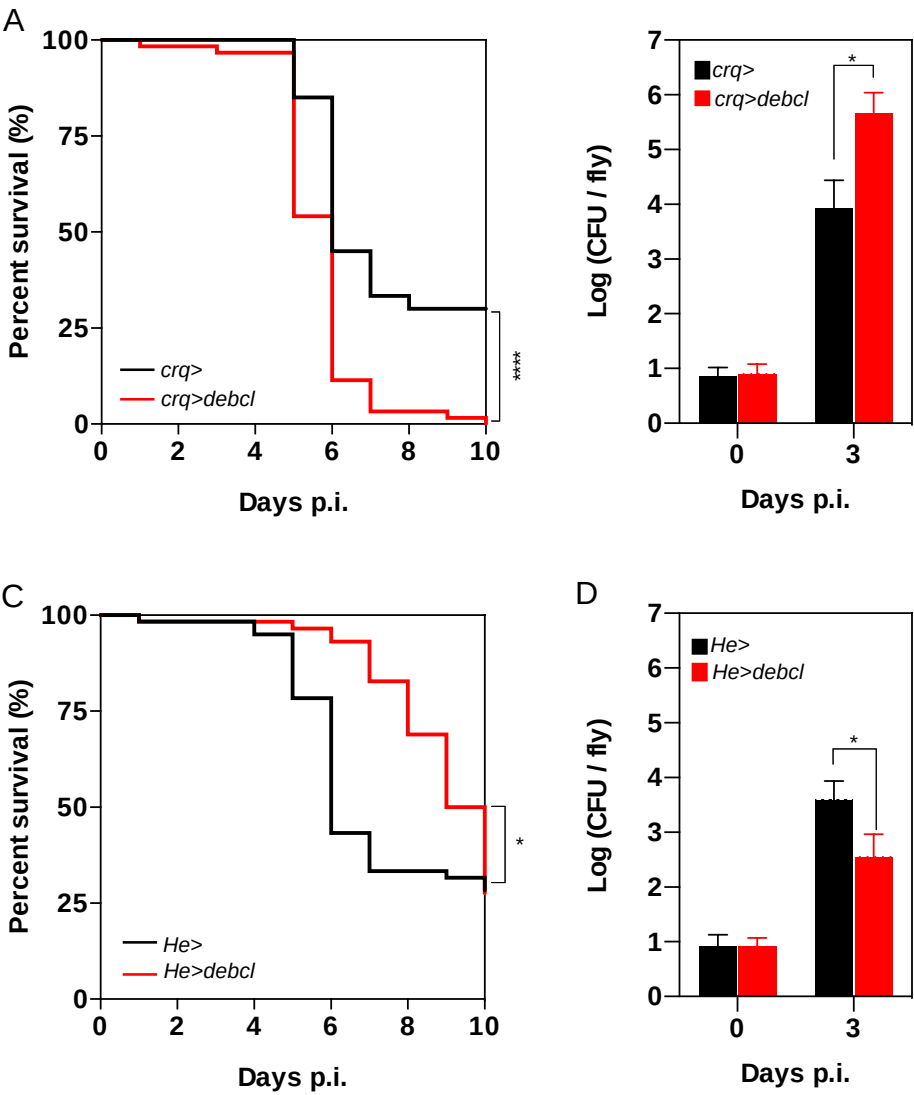
Figure S6. *p35* expression in plasmatocytes confers resistance to *M. abscessus* infection.

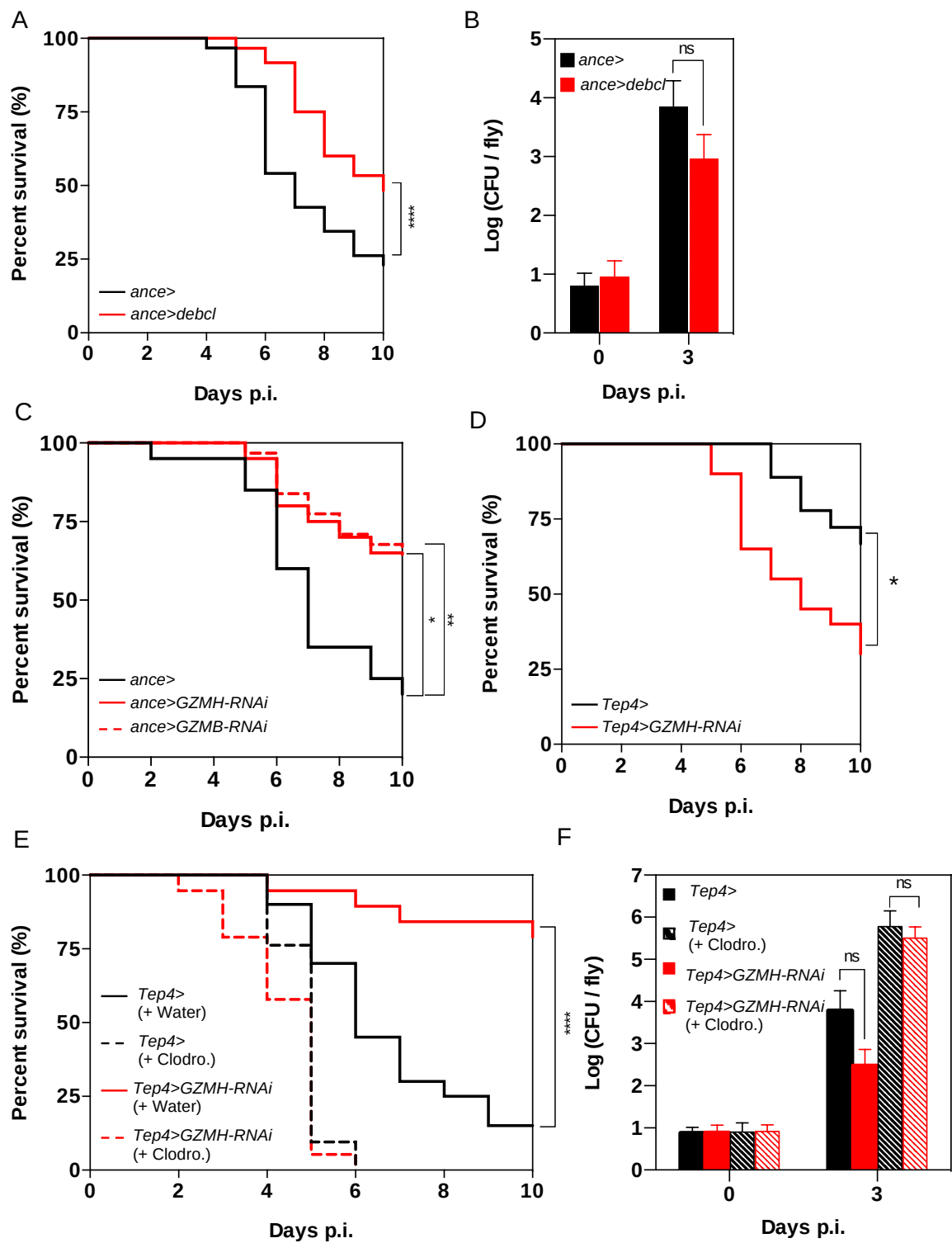
Survival curves of *crq;tub-gal80^{ts}* and *crq;tub-gal80^{ts}>p35* flies injected with 10 CFU (Colony Forming Unit) of *M. abscessus*. Survivals respectively were analyzed on 20 and 27 flies using long-rank test (* $p = 0.046$).

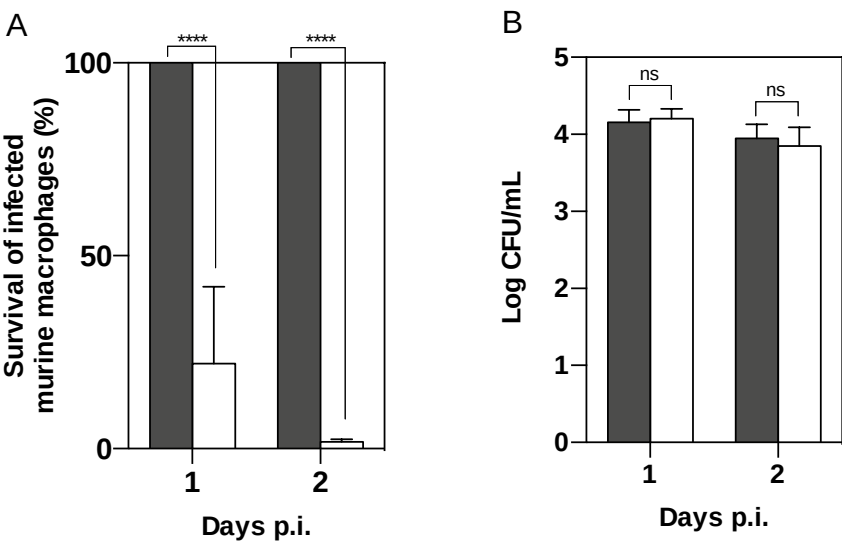


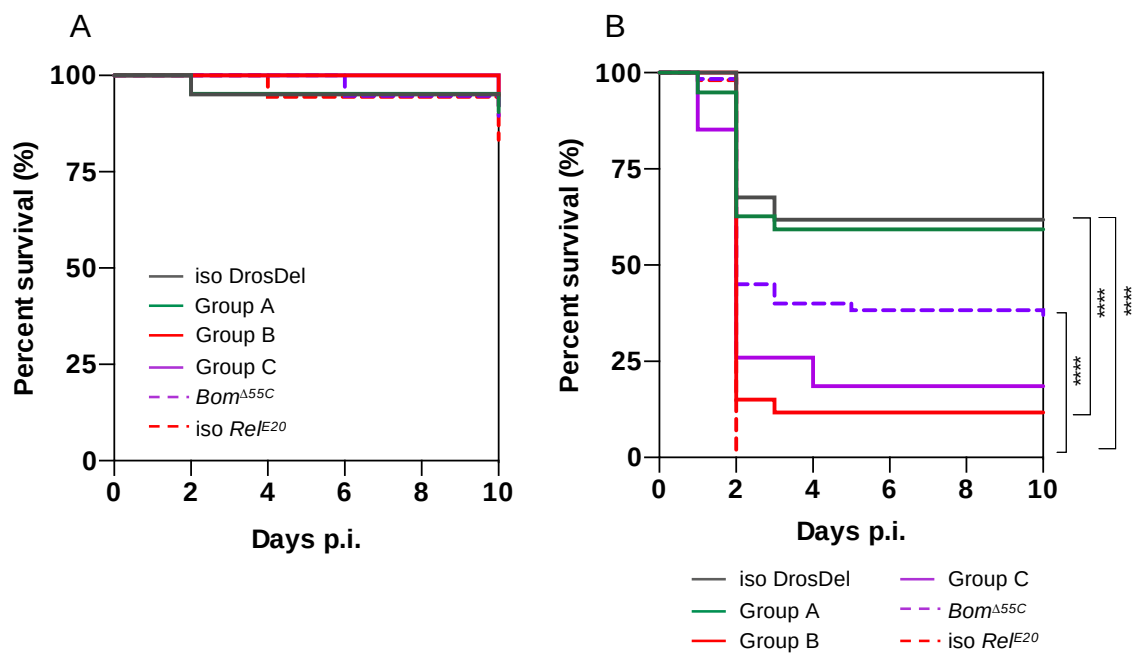




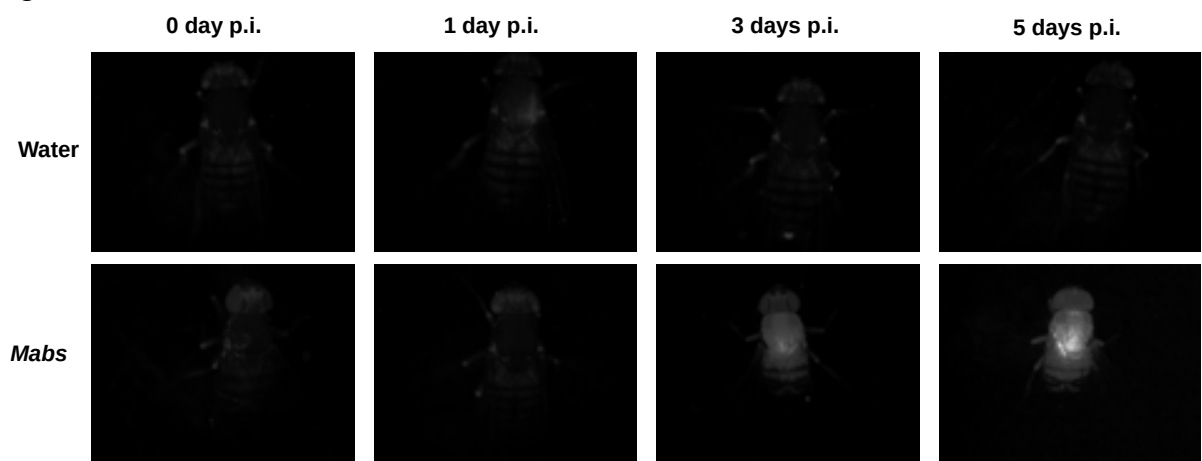




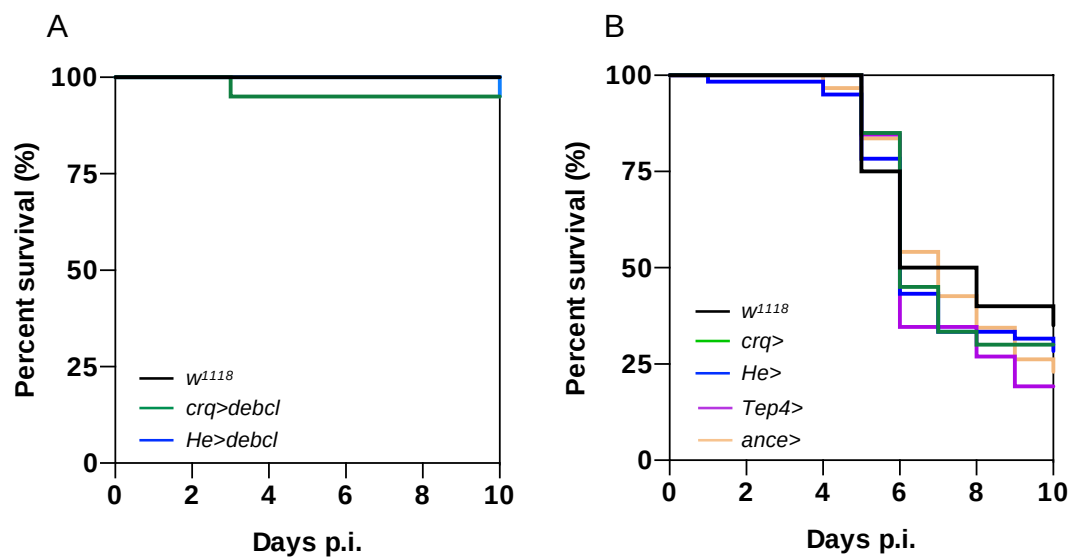




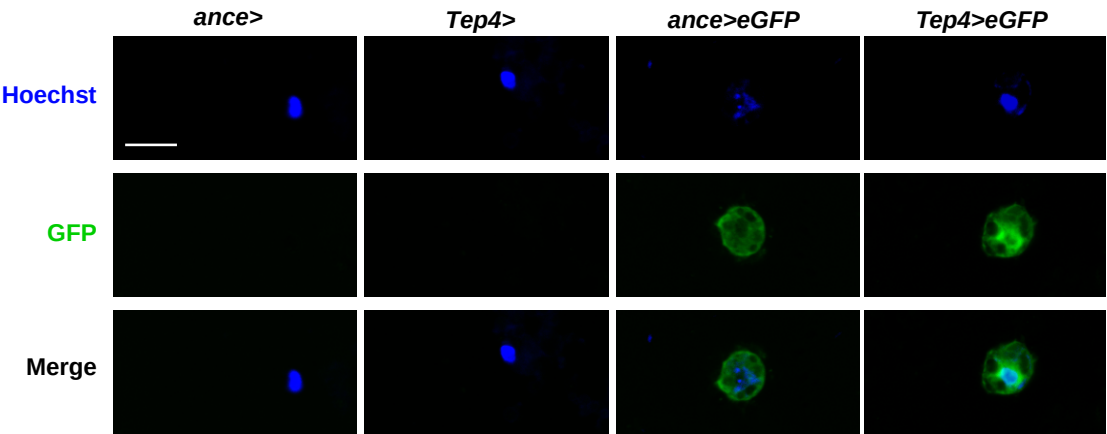
777 **Figure S2**



778



781 **Figure S4**



782

