



HAL
open science

Therapeutically useful mycobacteriophages BPs and Muddy require trehalose polyphleates

Morgane Illouz

► **To cite this version:**

Morgane Illouz. Therapeutically useful mycobacteriophages BPs and Muddy require trehalose polyphleates. Life Sciences [q-bio]. Université de Montpellier, 2023. English. NNT: . tel-04842158

HAL Id: tel-04842158

<https://hal.science/tel-04842158v1>

Submitted on 17 Dec 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Microbiologie

École doctorale CBS2

Unité de recherche Pathogénie Mycobactérienne et Nouvelles Cibles Thérapeutiques

Rôle des lipides de surface dans la spécificité des interactions entre *Mycobacterium abscessus* et les mycobactériophages

Présentée par Morgane ILLOUZ

Le 12 décembre 2023

Sous la direction de Wassim DAHER

Devant le jury composé de

Dr Laurent DEBARBIEUX, Directeur de recherche, Institut Pasteur Paris

Pr Geneviève HERY-ARNAUD, PU-PH, Unité de bactériologie, CHRU de Brest

Pr Chloé DUPONT, MCU-PH, CHU de Montpellier

Pr Jean-Louis HERRMANN, PU-PH, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Dr Laurent Kremer, Directeur de recherche, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier

Dr Wassim DAHER, Chargé de recherche, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les associations Vaincre la mucoviscidose et Grégory Lemarchal pour avoir financé mes travaux de thèse et sans qui ils n'auraient pu voir le jour.

Aux membres de mon jury de thèse,

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de thèse, Pr Geneviève Héry-Arnaud et Dr Laurent Debarbieux, mes rapporteurs, Pr Chloé Dupont et Pr Jean-Louis Herrmann, mes examinateurs. Je vous remercie de me faire l'honneur d'évaluer ce travail mené au cours des trois dernières années et j'espère que vous prendrez autant de plaisir à découvrir ces travaux que j'en ai pris à les réaliser.

Aux membres de mon comité de suivi individuel,

Je souhaite également remercier le Dr Stéphane Canaan, le Pr Jean-Philippe Lavigne et le Dr Laurent Marsollier, pour leurs conseils et les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces trois années.

Aux personnes ou équipes avec qui j'ai eu la chance de collaborer,

Je souhaite également remercier les Dr Yann Guerardel, Dr Louis-David Leclerc, Dr Christian Chalut, Pr Pablo Bifani, Jun Hao Liew, à l'équipe du Pr Graham Hatfull et en particulier Dr Katherine Wetzell et Pr Graham Hatfull.

A mes encadrants,

Je souhaite adresser un grand merci à mon directeur de thèse, Wassim, sans qui je n'aurais pu vivre cette expérience unique. Merci également pour la disponibilité dont tu as su faire preuve et pour ces discussions scientifiques ou non que nous avons pu partager durant ces trois années.

Je voudrais également remercier mon chef d'équipe, Laurent, pour m'avoir accepté dans l'équipe et avoir toujours su garder sa porte ouverte. Merci pour les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons pu partager et pour ta curiosité sans égal et inspirante.

Wassim, Laurent, merci pour la confiance que vous avez su m'accorder en me donnant l'opportunité de travailler sur un projet aussi stimulant et dans l'aire du temps qu'est la phagothérapie.

A mon équipe,

Un grand merci à l'équipe Pathogénie mycobactérienne et nouvelles cibles thérapeutiques pour leur soutien et les moments que nous avons pu partager...

Françoise pour m'avoir initiée à la culture de *M. abscessus* mais surtout pour ces discussions matinales (à mon goût) sous la hotte qui rendent les expériences un peu moins longues.

Claire pour avoir pris le temps de me former à travailler avec nos amis les poissons. La poissonnerie n'aurait pas été la même sans MAMICHa et nos petits monstres. Merci également de nous avoir engraisé avec ces brioches à la praline, ces bonbons et toutes ces choses que tu nous as apportés pour nous détendre et nous motiver !

Silke, Yara pour ses quelques moments partagés et toujours agréables (qui aurait cru qu'on danserait ensemble comme des zombies pour gagner la pipette d'or?). Merci pour votre aide expérimentale et les échanges scientifiques mais aussi personnels que nous avons pu avoir.

John pour ta bonne humeur et ton écoute, pour ces discussions tardives mais toujours extrêmement enrichissantes. Merci pour ces HappyHypo qui remontent toujours le moral. Sache que je n'aurais pas pu espérer un meilleur collègue de bureau malgré ton addiction à la caféine et au sucre !

BYM pour avoir répondu à TOUTES mes questions et on le sait, il y en a eu... Pour avoir partagé ton savoir car oui BYMBYM tu sais vraiment beaucoup de choses ! Mais aussi pour ces soirées au labo quand les manip n'en finissaient plus ou qu'il y avait sport derrière... Par contre BYM, fais attention ! Le sport ne te réussit pas je crois. Mais surtout, merci pour tout ce temps que nous avons pu partager à te chercher une voiture, à la réparer ou simplement à partager des pauses café, des repas ou des soirées. Tu as été et tu resteras à mes yeux un ami en or, d'un soutien sans faille, toujours de bon conseil et peut être des fois, un peu perché.

En parlant d'ami, Matthéo, et oui nous ne sommes plus des collègues à présent mais bien des amis et pas des moindres. Tu as été mon binôme dans cette expérience qui on le sait n'est pas un long fleuve tranquille. Je ne pourrai jamais te témoigner toute ma gratitude tant tu as fait de choses pour moi. Tu as été un ami exceptionnel en dehors et au sein de l'institut et un peu aussi mon partenaire pour découvrir les bonnes adresses de Montpellier. On nous avait prévenu, la thèse ça fait grossir et sur ce coup, on sait pourquoi. J'ai la chance que très peu ont de pouvoir dire qu'ils ont vécu leurs trois années de thèse du début à la fin avec une personne aussi formidable. Tu es celui qui n'a pas jugé mon stress, même en l'ayant vu sous toutes ses formes...D'ailleurs on m'a récemment dit « Morgane, la thèse t'a déstressée ». Non la thèse ça ne déstresse pas, soyons honnêtes, mais les personnes avec qui on la partage peuvent peut-être déteindre un peu. Alors pour tout ça, MERCI !

A l'IRIM,

Je voudrais également remercier toutes les personnes de l'IRIM et notamment,

Pascale sans qui l'institut ne tournerait pas, pour ton soutien sans faille et ton écoute, pour les nombreux services que tu as sus me rendre et qui ont parfois sauvé mes expériences... Pour le nombre incalculable de petits erlen que tu as pu me laver, j'en suis encore désolée. Alors au nom des Schtroumpfs, merci infiniment !

La team du beer hour : Dylan, Marie, Gui, Pauline, Fabien, Baptiste, Yonis, Mymy et tous les autres pour m'avoir permis de me vider la tête et sortir un peu le nez de la thèse. Pour ces discussions au détour d'un couloir ou à l'extérieur, merci.

Manon et Ludo, pour ces soirées jeux où David m'a un jour ramenée et dont je ne suis plus jamais repartie. Nous retiendrons que Manon n'est pas une bonne perdante mais sans ça, les parties de jeu n'auraient pas été les mêmes.

A mes amis,

Ellie et Laura, les meilleures amies que l'on puisse avoir et qui depuis dix ans me soutiennent et me font rire. Avec qui les voyages sont toujours une bouffée d'air frais et permettent de se détendre et d'oublier la thèse autour d'un bon vin et de fromage fondu. Merci de rester là, malgré la distance ! Et les filles, je crois qu'il nous reste quelques escape games à faire donc préparez-vous !

A Auriane, pour rester là malgré la distance et nos allers-retours non synchronisés sur Toulouse. Heureusement que le téléphone existe ! Mais on va y arriver, on va trouver un moment pour se voir !

A Cécile et Clotilde, merci pour les moments qu'on a pu passer depuis Pau, à Toulouse, à Bordeaux, à Paris ou à Montpellier. Merci de m'avoir fait rire en dansant et chantant et même quand il faut en payer le prix... Qui aurait cru qu'on se retrouverait trempées par la pluie à minuit la seule fois où on se retrouve toutes les trois sur Montpellier ?

A Kamoulox, ce groupe avec qui on ne s'ennuie jamais. Merci pour ces moments passés qui m'ont permis de déconnecter au détour d'un repas, d'un verre et parfois de week-ends. Merci pour ces brunchs de qualité qui remettent d'aplomb. Merci aussi à ceux qui sont venus me voir à Montpellier quand je ne pouvais pas bouger à cause des manips. Et bien entendu, vive le karaoké et les balades en taxi dans Paris !

David ou plutôt Dadou, mon binôme de sport, de rando, ou du moins de balades non programmées, de BK quand la flemme nous tient (en même temps il est vraiment juste à côté de la salle...). Celui avec qui les diapo ou les posters se critiquent dans la voiture et qui sait me faire rire même après la plus longue des journées au labo ! Bref cet ami rencontré à l'ENSCM par le plus grand des hasards (oui, m'assoir à côté de toi le premier jour de l'option était un pur hasard... en tout cas, c'est ce qu'on dira) et qui aura su me supporter pendant cinq années ! Et ce n'est que le début... Alors merci et bon courage !

A ma famille,

A mes parents, à mes grands-parents, à ma sœur et à Adrien ; d'un soutien sans faille, et qui m'ont appris à persévérer et à donner le meilleur de moi-même. A ces moments de détente et de repos que vous m'avez offerts avec nos soirées jeux loin de l'agitation de la thèse. Merci pour ces escape game que nous avons fait mais il faut bien l'admettre, le plus courageux c'est quand même Adrien.

A Brigitte pour tous les conseils que vous m'avez donnés, votre patience et votre bienveillance, merci beaucoup.

A Stéphane, je te remercie infiniment pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et surtout je te félicite pour avoir réussi à me supporter pendant les cinq dernières années. Tu as été et tu resteras mon pilier qui me soutient et me permet de ne pas m'effondrer. Celui qui trouve toujours le moyen de me reconforter et qui me fait rire sans arrêt. Merci de m'avoir écoutée raconter tous les moindres détails de mes journées, râler quand les manips ne fonctionnaient pas et parler sans fin de phages et de bactéries avec mes petits schémas pour te faire rentrer dans mon monde. Merci de me suivre dans mes délires quel qu'en soit le prix et juste pour me faire sourire, je sais combien ça te coûte quand je te fais danser dans l'appart... Et bien entendu, merci de m'attendre quand la côte est trop longue et que mon cardio ne suit pas, mais promis, je vais progresser ! Pour toutes ces petites choses et bien plus encore, MERCI !

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES.....	7
TABLE DES FIGURES	11
ABREVIATIONS.....	15
CHAPITRE I. <i>MYCOBACTERIUM ABSCESSUS</i> , UN PATHOGENE EMERGENT EN SANTE HUMAINE.....	23
1. Epidémiologie des mycobactéries non-tuberculeuses	23
a. Prévalence et incidence des mycobactéries non-tuberculeuses	23
b. Mode de transmission des mycobactéries non-tuberculeuses.....	25
c. Cycle infectieux des mycobactéries non-tuberculeuses.....	27
2. Classification et phylogénie	29
a. Identification de première intention	29
b. Nouvelles techniques d'identification des mycobactéries non-tuberculeuses.....	31
3. Pathogénicité de <i>M. abscessus</i>	33
a. Les réservoirs de <i>M. abscessus</i> sources d'infections	33
b. L'impact de <i>M. abscessus</i> chez les patients atteints de mucoviscidose	35
c. Transition du morphotype lisse vers le morphotype rugueux.....	37
d. Rôle des biofilms dans la survie de <i>M. abscessus</i>	41
4. Enveloppe mycobactérienne	43
a. Organisation de l'enveloppe mycobactérienne.....	43
b. Polyphléates de tréhalose.....	47
c. Glycopeptidolipides.....	51
5. Antibiothérapie et mécanismes de résistance de <i>M. abscessus</i>	57
CHAPITRE II. LES MYCOBACTERIOPHAGES EN THERAPIE.....	69
1. Histoire et découverte des bactériophages	69
2. Etablissement de la phagothérapie	73
a. Choix des phages thérapeutiques.....	75
b. Amplification des bactériophages	77
c. Purification.....	79
d. Administration du traitement phagique	79
e. Etapes supplémentaires pour optimiser le traitement	81
i. Mettre à profit les combinaisons (phages ou phage-antibiotique)	81
ii. Modifications génétiques des bactériophages	83
3. Utilisation de phages modifiés contre <i>M. abscessus</i>	85
a. Première thérapie phagique contre <i>M. abscessus</i>	85
b. Usage compassionnel de mycobactériophages thérapeutiques contre <i>M. abscessus</i>	91
i. Production d'anticorps neutralisants lors de la phagothérapie	91
ii. Vue d'ensemble et développement	93
c. Limites rencontrées.....	97
i. Spectre d'action des phages à disposition.....	97
ii. Les anticorps neutralisants	99
iii. Les voies d'administration	101
4. Modèles précliniques	103
a. Efficacité de la phagothérapie dans les modèles <i>in vivo</i>	103
b. Apparition de résistances aux phages <i>in vivo</i>	107
CHAPITRE III. LA DIVERSITE DES MYCOBACTERIOPHAGES	113
1. Diversité génomique des mycobactériophages	113
2. Variabilités morphologiques	113

a.	Morphotypes et structure de la queue.....	115
b.	Structure de la capside.....	117
3.	Généralités des cycles de vie.....	117
a.	Première étape: l'adhésion.....	119
b.	Éjection du génome phagique.....	121
c.	Intégration ou production des protéines du phage et assemblage.....	121
i.	Intégration du génome phagique et entrée dans le cycle lysogénique.....	121
ii.	Réplication du génome viral.....	125
iii.	Assemblage des protéines du phage.....	125
d.	Lyse mycobactérienne.....	127
4.	Mécanismes de résistance contre les mycobactériophages.....	129
a.	Inhibition des étapes précoces de l'infection.....	129
i.	Prévenir l'adhésion.....	129
ii.	Systèmes d'exclusion de la surinfection.....	131
b.	Inhibition de la réplication virale.....	133
i.	Acquisition de mutations dans les gènes de l'hôte.....	133
ii.	Immunité des bactériophages.....	135
iii.	Systèmes d'interruption de l'infection.....	135
OBJECTIFS.....	141	
Axe 1. Evaluer le rôle des polyphléates de tréhalose dans les interactions de <i>M. abscessus</i> avec le mycobactériophage BPsΔ33HTH_HRM10 et plus précisément dans les étapes précoces du cycle infectieux afin d'identifier un récepteur potentiel des mycobactériophages.....	145	
Axe 2. Etudier la contribution des glycopeptidolipides dans les interactions de souches S de <i>M. abscessus</i> avec un mycobactériophage récemment découvert.....	145	
RESULTATS.....	147	
Article 1. Therapeutically useful mycobacteriophages BPs and Muddy require trehalose polyphleates. Wetzel, K. S. *, Illouz, M*, Abad, L., Aull, H. G., Russell, D. A., Garlena, R. A., Cristinziano, M., Malmshemer, S., Chalut, C., Hatfull, G. F., & Kremer, L. (2023). Nature microbiology, 8(9), 1717–1731. https://doi.org/10.1038/s41564-023-01451-6	149	
Article 2. Multiple <i>Mycobacterium abscessus</i> O-acetyltransferases influence glycopeptidolipid structure and colony morphotype. Illouz, M. *, Leclercq, L. D. *, Dessenne, C., Hatfull, G., Daher, W., Kremer, L., & Guérardel, Y. (2023). The Journal of biological chemistry, 299(8), 104979. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104979	183	
DISCUSSION.....	227	
Rôle des polyphléates de tréhalose dans les étapes précoces de l'infection phagique.....	229	
Mise à disposition de nouveaux phages thérapeutiques au spectre d'action élargi.....	231	
Proposition du mécanisme d'adhésion des mycobactériophages.....	231	
Récepteur principal des mycobactériophages BPsΔ33HTH_HRM10 et Muddy.....	233	
Mise en lumière de divers mécanismes de résistance de <i>M. abscessus</i> face aux mycobactériophages.....	235	
Découverte d'un phage lytique au spectre d'action singulier.....	235	
Mise à profit des prophages de <i>M. abscessus</i>.....	237	
Détournement par <i>M. abscessus</i> de protéines codées par un prophage.....	237	
Reconnaissance du variant S de <i>M. abscessus</i> par le phage Jabs.....	239	
REFERENCES.....	243	



TABLE DES FIGURES

Figure 1. Cycle infectieux des mycobactéries non-tuberculeuses.....	24
Figure 2. Impact de la protéine « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » sur le transport mucociliaire.	36
Figure 3. Morphologie des souches lisses et rugueuses sur milieu gélosé.....	38
Figure 4. Voies de phagocytose de <i>M. abscessus</i> en fonction du morphotype étudié.	38
Figure 5. Formation d'un granulome mature contenant une infection à <i>M. abscessus</i>	40
Figure 6. Représentation schématique de l'enveloppe du morphotype lisse de <i>M. abscessus</i>	42
Figure 7. Structure des lipides dérivés de tréhalose.	44
Figure 8. Représentation de la voie de biosynthèse des polyphléates de tréhalose chez <i>M. abscessus</i>	46
Figure 9. Mode d'action de FadD23 dans la voie de synthèse des polyphléates de tréhalose.....	48
Figure 10. Élongation de l'acide gras catalysée par la polykétide synthase de type-I dans la voie de synthèse des polyphléates de tréhalose.	48
Figure 11. Structure du transporteur Mmpl10 prédite par le système d'intelligence artificielle AlphaFold DB.	50
Figure 12. Structures des glycopeptidolipides tri-glycosylés et di-glycosylés de <i>M. abscessus</i>	50
Figure 13. Locus gpl de <i>M. smegmatis</i> et <i>M. abscessus</i>	52
Figure 14. Rôle des glycopeptidolipides dans les interactions de <i>M. abscessus</i> avec les cellules hôtes via des récepteurs de l'immunité.	56
Figure 15. Histoire de la phagothérapie.	68
Figure 16. Stratégie thérapeutique.	74
Figure 17. Amplification à hôtes multiples.	78
Figure 18. Génération de mutants résistants <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	82
Figure 19. Mycobacteriophages.	86
Figure 20. Rôle du répresseur dans le cycle phagique, exemple du phage λ	86
Figure 21. Localisation et structure du complexe portail.	88



Figure 22. Cas clinique d'un patient atteint de mucoviscidose traité par phagothérapie contre une infection pulmonaire à <i>M. abscessus</i> et ayant développé des anticorps dirigés contre un des phages.	90
Figure 23. Cas de vingt patients infectés par une mycobactérie et traités par phagothérapie.	94
Figure 24. Proportion du morphotype lisse et du morphotype rugueux dans les isolats cliniques recensés.	96
Figure 25. Cas d'un patient en échec thérapeutique dû à la neutralisation des phages administrés par la production d'anticorps neutralisant.	98
Figure 26. Comparaison des modèles animaux à l'Homme.	106
Figure 27. Architecture mosaïque des génomes de mycobactériophages et échanges horizontaux.	112
Figure 28. Organisation conservée du génome des mycobactériophages, exemple du phage Taheera.	112
Figure 29. Diversité morphologique chez les mycobactériophages.	114
Figure 30. Structure de la queue des bactériophages de la famille des <i>Siphoviridae</i>	114
Figure 31. Structure de la capsidie des bactériophages.	116
Figure 32. Adhésion des bactériophages et initiation du cycle phagique, exemple du phage T5.	118
Figure 33. Mécanisme d'éjection de l'acide désoxyribonucléique par le phage T5.	120
Figure 34. Assemblage des bactériophages.	124
Figure 35. Lyse mycobactérienne par les enzymes du phage.	126
Figure 36. Mécanismes de résistance de la surinfection chez les mycobactéries.	130
Figure 37. Susceptibilité de mutants arborant des glycopeptidolipides tronqués face au phages Jabs.	226
Figure 38. (A à C) Stratégies envisageables afin d'étendre le repertoire de phages thérapeutiques chez <i>M. abscessus</i> . (1 et 2) Potentiels mécanismes de résistance de <i>M. abscessus</i> mis en évidence au cours de ces travaux de thèse.	230

ABREVIATIONS

ACP	Amplification en chaîne par polymérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMK	Amikacine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
AT	Acyltransférase
Atf	Acétyltransférase
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BRED	Recombinaison par bactériophage de l'ADN électroporé ou « Bacteriophage recombineering of electroporated DNA »
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFX	Céfoxitine
CFTR	« Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »
CLR	Clarithromycine
CR3	Récepteur du complément 3
Cryo-EM	Cryomicroscopie électronique
D-Ala	D-alanine
D-Glu	D-glutamate
DAT	Diacyltréhalose
DH	Déhydratase
Dit	Protéine distale de la queue (« distal tail protein »)
ADNdb	ADN double brin
EOP	« Efficiency of plating »
ER	Enoylréductase
EU	Unité d'endotoxine
ExPEC	« Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> »
FadD23	« Fatty acid degradation 23 »
Fmt	« Fatty-acid methyl transferase »
Gap	« GPL addressing protein »
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GPL	Glycopeptidolipides
GPL-2	Glycopeptidolipides di-glycosylés

GPL-3	Glycopeptidolipides tri-glycosylés
Gtf	Glycosyltransférase
HβD2	« Human β -defensin »
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTH	Hélice-coude-hélice ou « helix-turn-helix »
IL-8	Interleukine-8
IP	Intrapéritonéale
Kpb	Kilo paires de base
KR	Kétoréductase
KS	Kétosynthase
L-Ala	L-alanine
LAM	Lipoarabinomannane
LM	Lipomannane
LPS	Lipopolysaccharide
m-DAP	Acide méso-diaminopimélique
MALDI-TOF	« Matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight »
MmpL	« Mycobacterial membrane protein large »
MmpS	« Mycobacterial membrane protein small »
MNT	Mycobactérie non-tuberculeuse
Mps	« Mycobacterial peptide synthase »
MR	Récepteur au mannose
MurNAc	<i>N</i> -acétylmuramique
MurNGly	<i>N</i> -glycolymuramique
O_R	« Operator right »
PapA3	« Polyketide synthase associated protein A3 »
PAT	Polyacyltréhaloses
PEG	Polyéthylène glycol
PFU	« Plaque-forming unit »
Phage	Bactériophage
PIM	Phosphatidylinositol mannoside
PIM₂	Phosphatidylinositol dimannoside
Pks	Polykétide synthase de type-I
PP	« Phosphopantetheinylate acyl carrier protein » ou domaine protéine porteuse d'acyle contenant un bras phospho-pantéthéine
PRR	« Pattern-recognition receptor »

R	« Rough » ou rugueux/se
RBP	Protéine de liaison au récepteur (« receptor binding protein »)
RFB	Rifabutine
Rmt	Rhamnose méthyle transférase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
S	« Smooth » ou lisse
SEA-PHAGES	« Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science »
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SL	Sulfolipides
Tal	Lysine associée à la queue (« tail-associated lysin »)
TAT	Triacyltréhaloses
TDM	Dimycolates de tréhalose
TLR	Récepteur de type Toll ou « Toll-like receptor »
TMM	Monomycolates de tréhalose
Tn	Transposon
TNF	Facteurs de nécrose tumorale
TPP	Polyphléate de tréhalose
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ZF	Poisson zèbre
6-dTal	6-déoxy- α -talose



INTRODUCTION

Chapitre I. *Mycobacterium abscessus*, un pathogène émergent en santé humaine

La plus célèbre des mycobactéries, *Mycobacterium tuberculosis*, découverte en 1882 par Robert Koch représente depuis des décennies un problème de santé publique majeur [1]. Néanmoins, l'émergence des infections causées par des mycobactéries atypiques et généralement réfractaires aux traitements proposés telles que *Mycobacterium abscessus* est à prendre en considération.

1. Épidémiologie des mycobactéries non-tuberculeuses

a. Prévalence et incidence des mycobactéries non-tuberculeuses

Les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) sont des bactéries de l'environnement décrites, pour la majorité, comme non-pathogènes strictes de l'Homme ou comme des bactéries saprophytes [2,3]. De nos jours, on distingue environ 200 espèces différentes avec une forte hétérogénéité de virulence [2,4,5].

Au cours des dernières années, l'incidence des infections causées par des MNT n'a fait qu'augmenter, allant jusqu'à dépasser celle de la tuberculose dans les pays développés [6]. En Ecosse par exemple, le nombre de cas pour ce type d'infection a progressé de 3,4/100 000 cas à 6,5/100 000 cas en huit ans (2011 à 2019) [7]. Aux États-Unis, un bond a été observé de 1980 à 2013 passant de 2,4/100 000 cas à 15,2/100 000 cas recensés [8]. Cette tendance résulte, entre autres, des nombreux facteurs de risque (augmentation globale de l'âge de la population, maladies pulmonaires, immunosuppression, etc.) auxquels la population actuelle est confrontée [6]. La zone géographique semble également impacter les probabilités de contracter une infection causée par une MNT. En effet, des travaux menés en 2013 sur des isolats pulmonaires provenant de patients de différentes régions du monde ont permis d'évaluer la prévalence de diverses MNT [9]. Parmi les 91 espèces de MNT rencontrées lors de cette étude, six espèces se sont démarquées : le complexe *Mycobacterium avium* (47%), *Mycobacterium gordonae* (11%), *Mycobacterium xenopi* (8%), *Mycobacterium fortuitum* (7%), *Mycobacterium kansasii* (4%) et *M. abscessus* (3%). Le complexe *M. avium*, espèce majoritairement isolée, représente 71% des échantillons provenant d'Australie contre 31% de ceux isolés en Amérique [9]. Concernant les mycobactéries à croissance rapide telles que *M. abscessus* ou *M. fortuitum*, une prévalence supérieure en Asie de l'Est a été décrite [9].

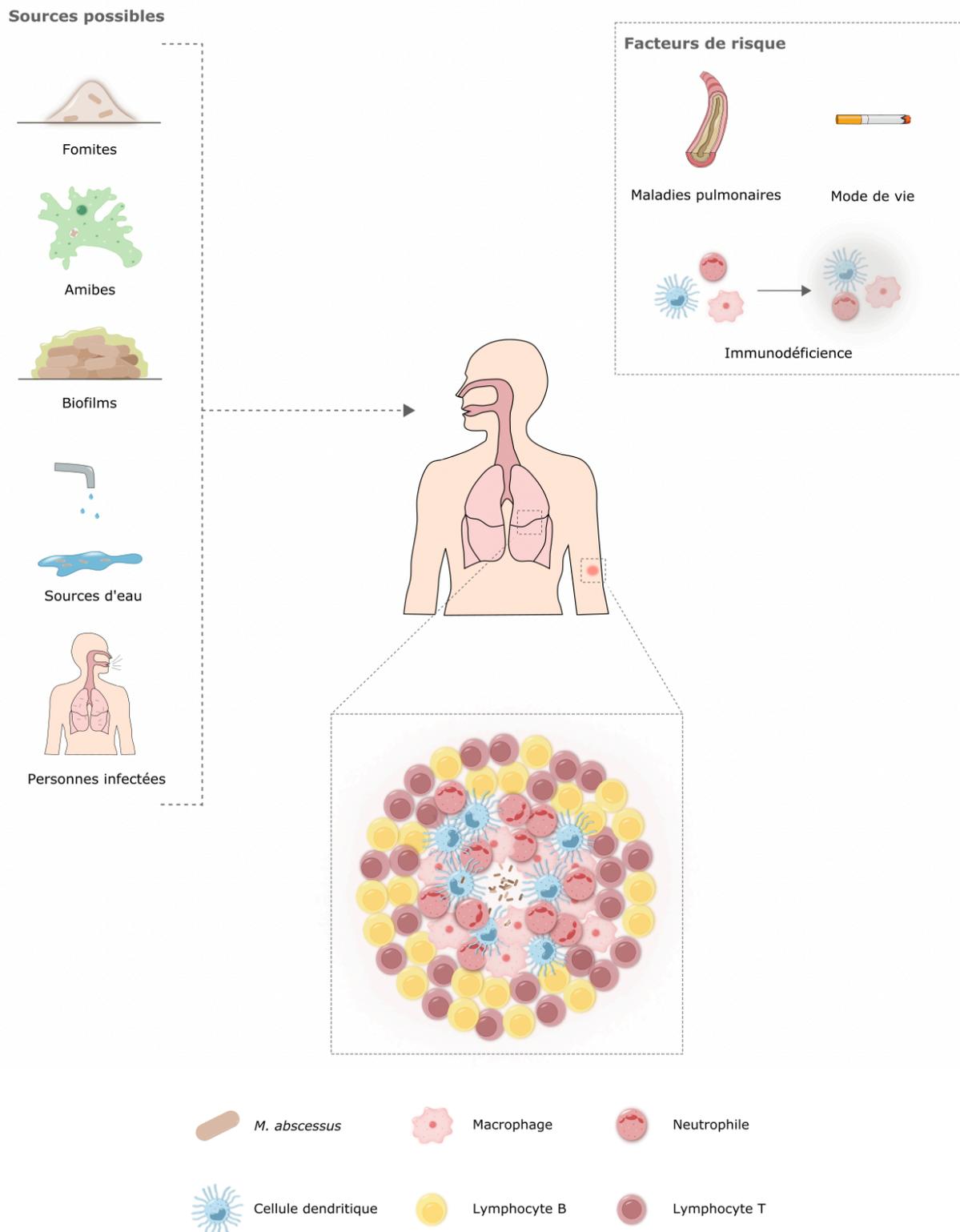


Figure 1. Cycle infectieux des mycobactéries non-tuberculeuses. Les mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) sont des pathogènes de l'environnement dont le mode de transmission reste méconnu. Peu d'échantillons contaminés sont isolés dans l'environnement des personnes infectées. Le contact avec

Ces études mettent en évidence une augmentation du nombre d'infections causées par les MNT à l'échelle planétaire en corrélation avec le vieillissement global de la population, mais qui pourrait aussi s'expliquer par les récentes améliorations des techniques de diagnostic.

b. Mode de transmission des mycobactéries non-tuberculeuses

Les risques de contracter une infection aux MNT diffèrent en fonction des personnes et de leurs habitudes de vie. Ces infections semblent majoritairement acquises par contact avec leur environnement (amibes, réservoirs d'eau, biofilms), bien que le mode de transmission reste pour le moment méconnu (**Figure 1.**) [6]. A ce jour, aucune étude ne prouve une transmission interhumaine des MNT à l'exception du pathogène opportuniste *M. abscessus* pour lequel de récents travaux menés par J. Bryant *et al.* suggèrent une possible transmission entre des patients atteints de mucoviscidose dans un centre de soin [10]. Dans cette étude, le suivi des infections à *M. abscessus* par séquençage a mis en lumière une variabilité génomique des souches plus importante au sein d'un seul individu en comparaison à celles isolées de différents patients, démontrant ainsi l'existence de groupes dominants. Par ailleurs, des patients présentaient des souches résistantes à certains antibiotiques résultant généralement d'une exposition prolongée à ces classes d'antimicrobiens, bien qu'ils n'aient été traités avec ces derniers. Les auteurs expliquent les similarités génomiques par une transmission (directe ou indirecte) entre patients au sein du centre de soin *via* des fomites ou des aérosols, malgré l'absence d'isolement des souches dans l'environnement des patients [10,11]. De plus, ces souches dominantes de *M. abscessus* semblent présenter des potentiels infectieux et de transmission élevés ainsi qu'une virulence accrue d'après des tests *in vivo* [11]. En 2021, C. Ruis *et al.* suggèrent le rôle de personnes extérieures dans la transmission de souches dominantes de *M. abscessus* et en particulier, celui des fumeurs qui représenteraient un des premiers acteurs dans la diffusion à l'échelle mondiale [12]. Cette hypothèse selon laquelle la transmission entre individus serait l'un des modes principaux de dissémination a été réfutée par différentes études épidémiologiques en 2014, 2017 et plus récemment en 2023 [13–15]. Cette dernière étude rappelle l'importance des nombreux facteurs à prendre en considération pour comprendre le mode de dissémination des souches [13]. Par exemple, le passage de la bactérie d'une source environnementale à l'hôte est un facteur limitant entraînant une faible diversité des souches isolées. De plus, l'avantage acquis lors de mutations génétiques induisant une virulence ou une résistance aux antibiotiques accrue va favoriser la survie de ces souches et par conséquent l'apparition de groupes dominants. Enfin, des changements dans le temps de génération des souches ou des variations génétiques peuvent influencer le taux de mutations et ainsi expliquer la prépondérance observée. D'après l'évolution ralentie de ces souches dominantes rapportée par N. Commins *et al.*, le taux de mutations est à privilégier pour expliquer

Figure 1. certaines sources semble être la cause la plus probable des infections recensées (panel de gauche). Les différents facteurs de risque (panel de droite) sont responsables de la sensibilité accrue de ces personnes aux infections aux MNT, entraînant des pathologies sévères et un taux de mortalité supérieur pour ces patients. Suite à l'établissement de l'infection, la structure caractéristique des infections aux MNT, nommée granulome (panel du bas), va se former sur le site de l'infection afin de contrôler la prolifération bactérienne. Adapté de Johansen, Herrmann, et Kremer 2020 [6].

ce regroupement génomique dense et contredit ainsi une transmission inter-personnes en tant que mode principal de diffusion [13].

Outre les sources de contagion auquel l'individu est confronté, ses caractéristiques individuelles peuvent fortement influencer les risques d'être infecté par une MNT. Les femmes et les personnes âgées (âge moyen de 66 ans), par exemple, sont statistiquement plus enclines à contracter ce type d'infection [16]. De plus, bien que l'élimination du pathogène soit possible pour des individus en bonne santé, certaines maladies, indépendamment de l'âge ou du sexe de l'individu, peuvent induire une susceptibilité accrue aboutissant régulièrement à des complications et pouvant mener au décès du patient. Les pathologies telles que les maladies pulmonaires structurelles génétiques ou acquises (mucoviscidose, bronchectasie, cancer du poumon, *etc.*) offrent des terrains propices à la prolifération bactérienne, faisant de ces personnes des hôtes de choix à coloniser. En plus d'un environnement favorable à la prolifération du pathogène, l'immunodéficience de certains individus induit une susceptibilité exacerbée aux infections opportunistes (**Figure 1.**) [6,17]. Des études rapportent, par exemple, un taux d'infection significativement plus élevé à *M. avium-intracellulare* chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) par rapport à des individus sains [18]. Bien que l'immunité réduite de ces patients puisse expliquer leur prédisposition à ces infections, une exposition plus fréquente aux MNT n'est cependant pas à exclure [19,20].

c. Cycle infectieux des mycobactéries non-tuberculeuses

Les MNT sont des pathogènes de l'environnement retrouvés dans l'eau ou les sols et dont le mode de transmission reste encore largement incompris. Dans un premier temps, l'exposition de l'individu à un réservoir de MNT peut entraîner une infection (**Figure 1.**). Après la rencontre avec le pathogène, le système immunitaire de l'hôte va s'activer et engendrer le recrutement de cellules de l'immunité [6,17]. Ce recrutement massif va induire la formation d'une structure caractéristique des infections aux mycobactéries nommée granulome [21]. Ce nodule dynamique composé de tissus, de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, *etc.*) et de bactéries joue un rôle primordial dans le contrôle de l'infection (**Figure 1.**). Par la suite, des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) vont être recrutées autour de la structure conduisant à la formation d'un granulome dit mature [22]. Au sein de ce dernier, les bactéries peuvent être détruites par les cellules immunitaires ou persister jusqu'à s'en échapper, contournant ainsi le système de défense de l'hôte. Ces infections (cutanées, osseuses, pulmonaires ou disséminées) à l'origine de diverses manifestations cliniques, engendrent des pathologies complexes et évolutives difficiles à éradiquer [23].

Groupes de Runyon	Caractéristiques	Espèce
I. Photochromogène	Croissance lente avec changement de pigmentation lors d'une exposition à la lumière en produisant un pigment jaune-orangé	<i>M. kansasii</i>
		<i>M. marinum</i>
II. Scotochromogène	Croissance lente avec production d'un pigment jaune-orangé dans le noir comme à l'exposition lumineuse	<i>M. goodii</i>
		<i>M. scrofulaceum</i>
III. Nonchromogène	Croissance lente sans production de pigment quelles que soient les conditions de culture	<i>M. avium</i>
IV. Mycobactéries à croissance rapide	Croissance en moins de 7 jours sans production de pigment	<i>M. abscessus</i>
		<i>M. smegmatis</i>

Tableau 1. Classification de Runyon.

C'est pourquoi, un diagnostic précoce occupe une place centrale dans la lutte contre ces infections persistantes. Cependant, les symptômes causés par des infections aux MNT étant très proches de ceux d'autres maladies pulmonaires, il peut être hasardeux d'obtenir un diagnostic fiable et rapide. S'ajoute à cela l'exposition des individus à l'environnement, niche des MNT, dont il faut distinguer les isolats colonisateurs des agents réellement responsables de la maladie [24]. Dans ce contexte de diagnostic difficile à établir, les sociétés américaines « American Thoracic Society » et « Infectious Diseases Society of America » ont publié une liste de critères afin de faciliter l'identification des infections pulmonaires causées par des MNT [17]. Des examens cliniques (atteinte pulmonaire visible par PET/CT scan) et des tests microbiologiques permettent d'identifier la ou les souches en cause dans ces infections et ainsi fournir le traitement adapté [17]. Toutefois, le développement récent de nouvelles méthodes d'identification moléculaire permet également une reconnaissance et classification des MNT plus précise.

2. Classification et phylogénie

Les mycobactéries, classées sous le phylum des Actinobactéries et formant le genre *Mycobacterium* nommé pour la première fois en 1896 par Lehmann et Neumann [25], sont des bactéries d'une grande diversité au niveau génomique et phénotypique. Le développement de nouvelles techniques d'identification a permis d'identifier de nouvelles espèces et d'en reclasser certaines, faisant ainsi évoluer leur nombre au cours des dernières années [15,26,27]. Ces espèces, malgré des caractéristiques communes telles qu'un génome riche en guanines et cytosines ou la présence d'une paroi bactérienne complexe, présentent des différences notoires qui permettent de les classer en groupes distincts.

a. Identification de première intention

Les mycobactéries étaient initialement divisées en deux groupes : le complexe *M. tuberculosis* et les MNT ou mycobactéries atypiques. En 1959, Runyon proposa une première classification des mycobactéries atypiques [28]. Cette classification distingue quatre grands groupes reposant sur des critères phénotypiques tels que la vitesse de croissance bactérienne et leur capacité ou incapacité à développer une pigmentation en fonction des conditions de croissance (**Tableau 1**). Bien que la classification de Runyon fut longtemps la seule utilisée, les caractéristiques qui y étaient proposées ne suffisaient pas à l'identification précise des différentes espèces.

En première intention, la coloration de Ziehl-Neelsen permet une identification des mycobactéries dans les expectorations de patients. Cette méthode rapide et peu coûteuse repose sur la capacité des

mycobactéries à résister à l'action combinée de l'alcool et d'un acide grâce à la richesse en lipides de leur paroi [29]. Elle consiste en une coloration à la fuchsine phéniquée suivie d'une décoloration avec une solution alcool-acide [30]. La structure de l'enveloppe des mycobactéries génère une couche lipidique imperméable et empêche la décoloration de la fuchsine [29]. S'en suit une contre-coloration permettant de discriminer le genre *Mycobacterium* des autres bactéries. Cette technique, toujours utilisée pour les diagnostics en milieu hospitalier, n'est cependant pas adaptée à l'identification précise de l'espèce contractée qui nécessite l'usage de méthodes complémentaires pour déterminer le traitement adéquat pour le patient [31].

b. Nouvelles techniques d'identification des mycobactéries non-tuberculeuses

Les MNT peuvent être différenciées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), technique permettant l'analyse des acides mycoliques (voir **Chapitre I. 4. a.**), lipides spécifiques des mycobactéries et présentant une grande diversité structurale inter-espèce [32]. Cette technique offre une identification très précise en permettant de différencier 95,6% des MNT [32].

La technique d'identification par séquençage basée sur l'amplification en chaîne par polymérase (ACP) est devenue la méthode de référence pour identifier les MNT. Cette caractérisation reposait initialement sur l'analyse du gène *rrs* codant l'ARNr 16S [33], méthode utilisée également pour l'ensemble des bactéries. Ce gène étant fortement conservé chez les mycobactéries, l'analyse d'un gène unique n'était pas suffisante pour une identification précise de l'espèce. Afin de pallier à ces erreurs, l'analyse combinée de plusieurs gènes tels que les gènes *rpoB* ou *hsp65*, en plus du gène *rrs*, a rendu possible la distinction d'espèces confondues précédemment et l'obtention d'une classification plus détaillée du genre *Mycobacterium* [34]. L'utilisation du séquençage du gène *hsp65* a notamment permis de distinguer *M. chelonae* de *M. abscessus* [35], regroupées en une seule espèce jusqu'en 1992 [36].

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (« matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight ») apporte également des avantages dans l'identification précise des MNT. Cette technique permet, tout comme le séquençage, de différencier de façon fiable et rapide les différentes sous-espèces du complexe *M. abscessus* [37]. Cependant, elle nécessite l'accès à un équipement onéreux et à une compétence technique particulière, limitant son utilisation dans certains pays.

En raison des erreurs d'identification qui viennent d'être abordées, près de 30 ans se sont écoulés avant de considérer *M. abscessus* en tant qu'espèce à part entière. En effet, *M. abscessus* fut isolée en 1953 par Moore et Frerichs d'une patiente présentant un abcès sous-cutané du genou, pathologie à l'origine du nom de la bactérie [38]. En 1972, *M. abscessus* fut reclassée comme sous-espèce de *M. chelonae* pour finalement être élevée au rang d'espèce 20 ans plus tard [36,39]. Grâce aux techniques d'identification énoncées précédemment, *Mycobacterium massiliense* et *Mycobacterium bolletii*, initialement décrites comme nouvelles espèces proches de *M. abscessus*, ont été regroupées avec cette dernière en un seul complexe. De ce fait, le complexe *M. abscessus* se compose de trois sous-espèces (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* et *M. abscessus* subsp. *bolletii*) pouvant être responsables d'infections cutanées, osseuses, pulmonaires ou disséminées [40,17].

3. Pathogénicité de *M. abscessus*

a. Les réservoirs de *M. abscessus* sources d'infections

Les MNT telles que *M. abscessus* sont décrites comme des pathogènes de l'environnement, généralement isolés de réservoirs d'eau ou des sols [3]. Néanmoins, ce n'est que récemment que la présence de *M. abscessus* dans des systèmes d'eau a été révélée. Pour preuve, M. Gomila *et al.* n'ont mis en évidence qu'en 2007 la présence de plusieurs MNT dont des souches de *M. abscessus* à partir d'eau d'hémodialyse et d'échantillons de patients [41]. Toutefois, une contamination préalable par les patients originellement infectés n'est pas à exclure. Une seconde étude publiée en 2013 fait état d'analyses d'eau prélevée entre 2007 et 2009 en Australie provenant de différentes sources (eau potable, réservoirs d'eau de pluie, piscine ou robinets domestiques). De 2007 à 2008, 74 isolats cliniques furent collectés et utilisés comme points de comparaison avec 15 isolats provenant d'environnements divers. Les souches isolées d'eau potable présentaient de fortes similarités génétiques avec celles provenant de patients [42] suggérant une contamination des individus par l'eau de leur environnement, probablement *via* la formation d'aérosols lors d'un usage domestique [43] (**Figure 1.**). Une étude publiée en 2023 rapporte la contamination d'un système de purification d'eau, alimenté par la municipalité, et ayant vraisemblablement provoqué l'infection de quatre patients au sein d'un hôpital [44]. La contamination d'autres systèmes d'eau avait pu être évitée par l'usage de méthodes de filtration, montrant que des moyens de prévention peuvent être mis en place [44]. Ainsi, les sources municipales, largement utilisées au quotidien, devraient faire l'objet d'analyse et de traitement précis afin de prévenir ce type d'infections.

Cette mycobactérie à croissance rapide est capable de se développer dans d'autres niches environnementales que les sources d'eau et entraîner des infections [45]. L'exemple le plus courant est la contamination d'appareils médicaux ou d'aiguilles pour la création de tatouages. L'instrument, au préalable contaminé, va servir de vecteur à la bactérie pour infecter la peau ou les tissus mous, causant des abcès et des lésions cutanées [46]. Dans de rares cas, des infections disséminées sont observées et peuvent toucher tous types de patients [17]. Au contraire, les infections respiratoires, qui sont les plus généralement rencontrées, concernent essentiellement les patients vulnérables ayant déjà des pathologies pulmonaires sous-jacentes telles que la mucoviscidose, la bronchiectasie, une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou une infection mycobactérienne antérieure (tuberculose) [17]. Ces infections évoluent généralement progressivement et sans douleur engendrant des symptômes persistants et un déclin des fonctions pulmonaires. Une évolution rapide de l'infection peut être observée avec une insuffisance respiratoire aiguë, notamment chez des patients atteints de mucoviscidose [17].

b. L'impact de *M. abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose

La mucoviscidose, qui touchait environ 7500 personnes en France en 2021, constitue un facteur de risque important de contracter des infections pulmonaires telles que des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ou encore aux MNT [47]. Bien qu'elles ne soient pas majoritaires, les infections aux MNT constituent un des principaux problèmes rencontrés par ces patients au regard de leur sévérité et leur fréquence. Aux Etats-Unis, 10 à 20% des patients atteints de mucoviscidose sont infectés. Au sein même des différentes espèces de MNT, les complexes *M. avium* et *M. abscessus* sont les plus fréquemment isolés [48]. Au niveau mondial, les infections à *M. abscessus* représentent 5 à 10% des infections chez les patients atteints de mucoviscidose [49–51].

Par ailleurs, ces infections sont une des causes principales de morbidité et de mortalité chez ces patients et représentent une contre-indication aux transplantations pulmonaires souvent nécessaires [52,53]. En effet, la mucoviscidose est une maladie autosomique récessive qui affecte particulièrement les voies pulmonaires et digestives. Elle est causée par diverses mutations au niveau du gène codant pour la protéine CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator ») [54], la plus commune étant la délétion de la phénylalanine en position 508 (aussi notée F508del) qui touche en Europe environ 70% des patients [55]. Près de 2000 mutations sont à ce jour dénombrées mais moins de 150 sont réellement reconnues comme causes de maladie [54]. C'est pourquoi, une classification les différencie et les regroupe en six classes en fonction des altérations fonctionnelles induites telles que la réduction du nombre de protéines, la diminution de la fonction ou la combinaison des deux.

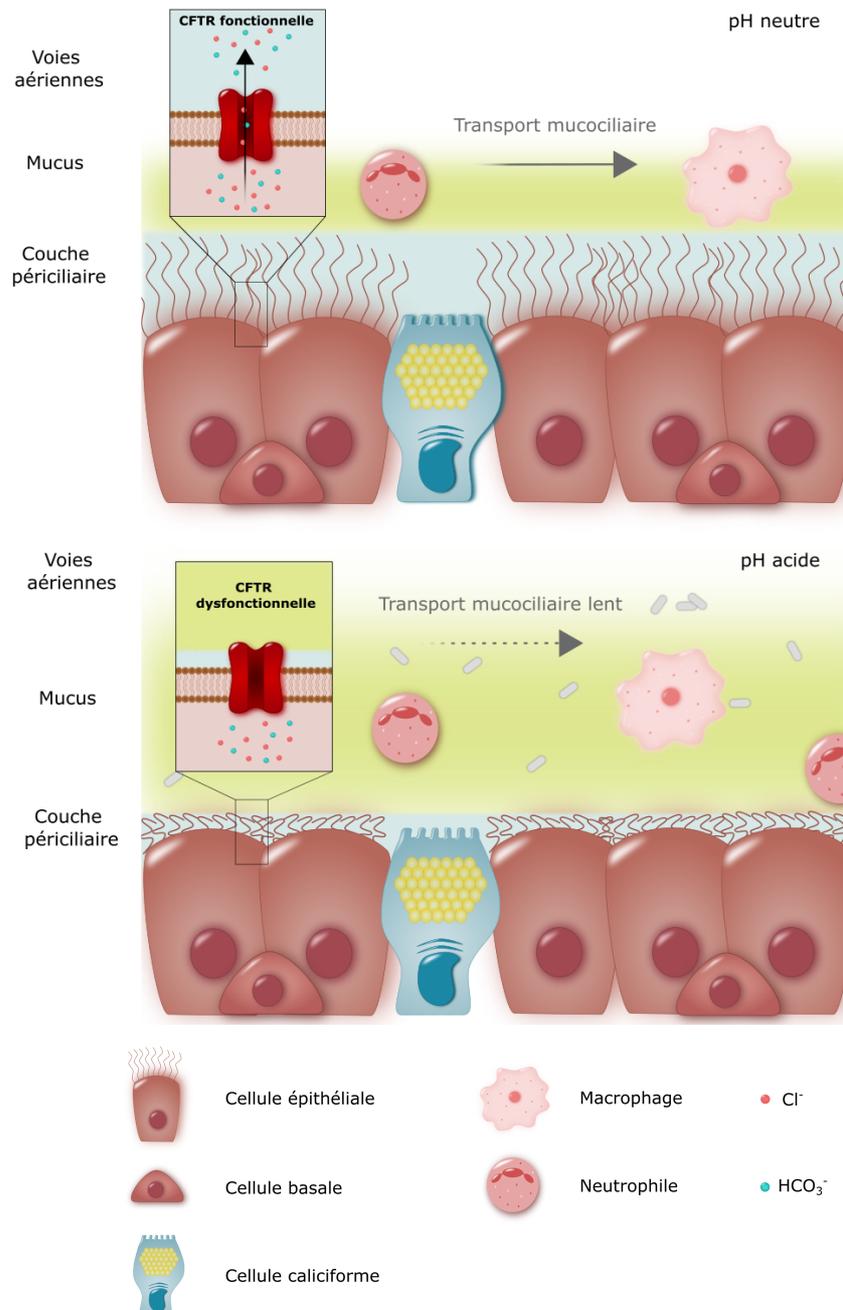


Figure 2. Impact de la protéine « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » sur le transport mucociliaire. Le panel du haut et le panel du bas représentent respectivement les voies respiratoires d'un individu possédant une protéine « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (CFTR) fonctionnelle et celles d'un patient atteint de mucoviscidose. Une protéine CFTR fonctionnelle va permettre l'export des ions chlorure et du bicarbonate par les cellules induisant la formation d'un mucus suffisamment fluide pour permettre la clairance mucociliaire. L'altération des fonctions de cette protéine chez les patients atteints de mucoviscidose a pour conséquence la présence d'un mucus épais favorisant la prolifération bactérienne et d'un pH acide délétère pour les cellules de l'immunité. Adapté de Ratjen *et al.* 2015 [54].

Cette protéine a pour fonction principale le transport des ions chlorure (**Figure 2. Panel haut**) au travers de la membrane apicale des cellules épithéliales de plusieurs organes tels que le foie, le pancréas, l'appareil génital ou encore les poumons [54,56]. Outre le transport des ions chlorure, ce canal a également la fonction d'inhiber le transport du sodium et de modifier la sécrétion de bicarbonate impactant alors la formation du mucus au niveau du système pulmonaire (**Figure 2.**) [54]. La régulation de la concentration en bicarbonate et du pH permettent, chez l'individu sain, la formation de mucus dit normal c'est-à-dire permettant la clairance mucociliaire (**Figure 2. Panel haut**). Le dysfonctionnement de la protéine CFTR va entraîner une diminution de l'hydratation de la surface des voies respiratoires induisant une formation de mucus plus épais et visqueux (**Figure 2. Panel bas**) [54], générant un terrain propice à la prolifération bactérienne (**Figure 2. Panel bas**). Par ailleurs, l'absence de sécrétion du bicarbonate va entraîner une acidification de l'environnement et peut expliquer que les cellules de l'immunité, extrêmement sensibles au pH, puissent échouer dans l'éradication des infections bactériennes [54].

La protéine CFTR se situe également au sein même des macrophages et va permettre la régulation du pH des organites de la cellule. D'après une étude de 2006, la délétion du gène *cftr* dans le modèle murin pourrait induire un défaut d'acidification des lysosomes et phagosomes des macrophages engendrant l'augmentation de la survie bactérienne dans le phagosome et conférant ainsi un avantage aux bactéries [57]. Concernant plus spécifiquement *M. abscessus*, la délétion du gène *cftr* dans des larves de poisson zèbre (ZF) induit une déficience de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la NADPH oxydase NOX2. Cette modification de la production de ROS va altérer l'élimination de *M. abscessus* par les macrophages et engendrer une augmentation de la charge bactérienne intracellulaire ainsi que la mort des cellules. De plus, la délétion de la protéine CFTR chez le ZF induit une altération du chimiotactisme des neutrophiles vers les granulomes en cours de formation. La destruction des macrophages couplée à la déficience des neutrophiles à rejoindre le site infectieux va affecter le maintien du granulome et induire une propagation incontrôlée des mycobactéries. Quel que soit le morphotype de *M. abscessus* étudié (voir **Chapitre I. 3. c.**), une infection aiguë va se mettre en place et conduire à la mort prématurée des larves de ZF infectées [58].

c. Transition du morphotype lisse vers le morphotype rugueux

Un déterminant clé de la virulence de *M. abscessus* réside dans l'existence de deux morphotypes dits lisse (S, de l'anglais « smooth ») et rugueux (R, de l'anglais « rough »). Le morphotype S, d'aspect rond et crémeux sur milieu gélosé, est considérée comme la forme environnementale et colonisatrice tandis que

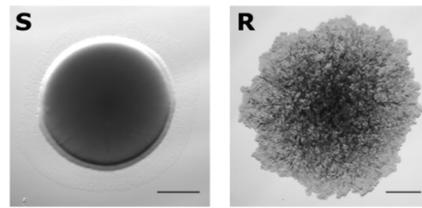


Figure 3. Morphologie des souches lisses et rugueuses sur milieu gélosé. Echelle : 1 mm.

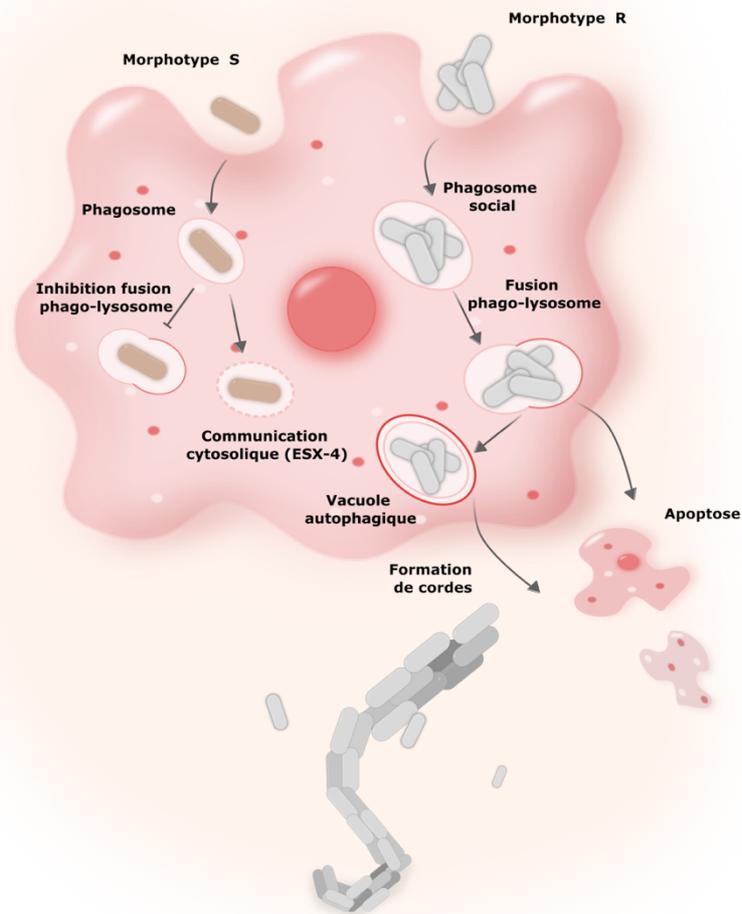


Figure 4. Voies de phagocytose de *M. abscessus* en fonction du morphotype étudié. Le morphotype lisse (S) (panel de gauche) est phagocyté individuellement par le macrophage avant d'être adressé au phagosome. En inhibant la maturation du phagosome, ce variant va survivre au sein des macrophages avant d'induire une communication cytosolique *via* le système de sécrétion ESX-4. Quant au morphotype rugueux (R) (panel de droite), il peut être phagocyté par petits agrégats générant ainsi des phagosomes sociaux, c'est-à-dire contenant plusieurs bacilles, au sein du macrophage. Contrairement au variant S, le variant R ne va pas inhiber la fusion phago-lysosomale mais plutôt survivre en induisant la formation de

le variant R, organisé en structures dites « en corde », présente une virulence accrue chez l'hôte [59] (**Figure 3.**).

Lors du processus de dissémination, le morphotype S va être phagocyté individuellement par le macrophage, aboutissant à la présence d'un bacille unique par phagosome (**Figure 4.**) [60]. Les souches S, tout comme les pathogènes stricts *M. tuberculosis* ou *Mycobacterium marinum*, ont la capacité de bloquer la maturation du phagosome et d'induire une communication phagosome-cytosol *via* un mécanisme impliquant probablement le système de sécrétion de type VII, ESX-4 [60,61]. Au cours de l'infection, l'induction d'une transition irréversible du morphotype S vers le morphotype R va permettre à la bactérie de persister dans son hôte. Les causes de cette transition, décrite *in vivo* au cours d'infections de souris ou de patients [62,63] et jouant un rôle central dans la virulence de *M. abscessus*, demeurent pour le moment inconnues [6]. Le passage au morphotype R va permettre à la bactérie d'être phagocytée par petits agrégats induisant la présence de phagosomes sociaux (**Figure 4.**) [60]. De plus, les macrophages activés lors de la phagocytose de ce morphotype vont libérer des facteurs de nécrose tumorale (TNF). Ces derniers vont régir la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ainsi induire la mort des bacilles intracellulaires [22]. En revanche, et ce malgré une acidification rapide du phagosome, la bactérie a la capacité de survivre et de rejoindre l'environnement extracellulaire en induisant la formation de vacuoles autophagiques et de cellules apoptotiques (**Figure 4.**) [60,64]. Ce variant pro-apoptotique, à la différence du variant S, a également la capacité de former des cordes, structures composées de bacilles parallèlement alignés, mis bout à bout et côte à côte (**Figure 4.**). Elles permettent à *M. abscessus*, grâce à leur taille qui excède celle des macrophages, d'échapper à la phagocytose mais également de détruire les macrophages lors de leur formation intracellulaire [64,65]. Ces structures conduisent à une augmentation de l'inflammation mais aussi à la formation caractéristique d'abcès et de dommages tissulaires [66–68].

En effet, la phagocytose de *M. abscessus* par les macrophages va induire la libération de TNF et d'interleukine-8 (IL-8) responsables du recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection (**Figure 5.**) [22,69]. Ce recrutement va aboutir à la formation de granulomes dans le but de contrôler la prolifération bactérienne (**Figure 5.**). Toutefois, le modèle ZF adulte a permis de mettre en évidence une formation plus précoce de granulomes lors d'infections par le variant R en comparaison au variant S [69]. Outre l'importance du recrutement des neutrophiles, cette étude rapporte la contribution cruciale des lymphocytes T pour contrôler les infections par le variant R dans le ZF adulte [69]. Le rôle des lymphocytes T mais également celui des lymphocytes B dans les infections à *M. abscessus* avaient déjà préalablement été rapportés grâce au modèle murin (**Figure 5.**) [70]. Le recrutement de ces différentes

Figure 4. vacuoles autophagiques et l'apoptose des cellules. La formation de cordes, caractéristique du morphotype R, peut lui permettre de s'échapper de la cellule en créant des dommages tissulaires mais également d'éviter la phagocytose.

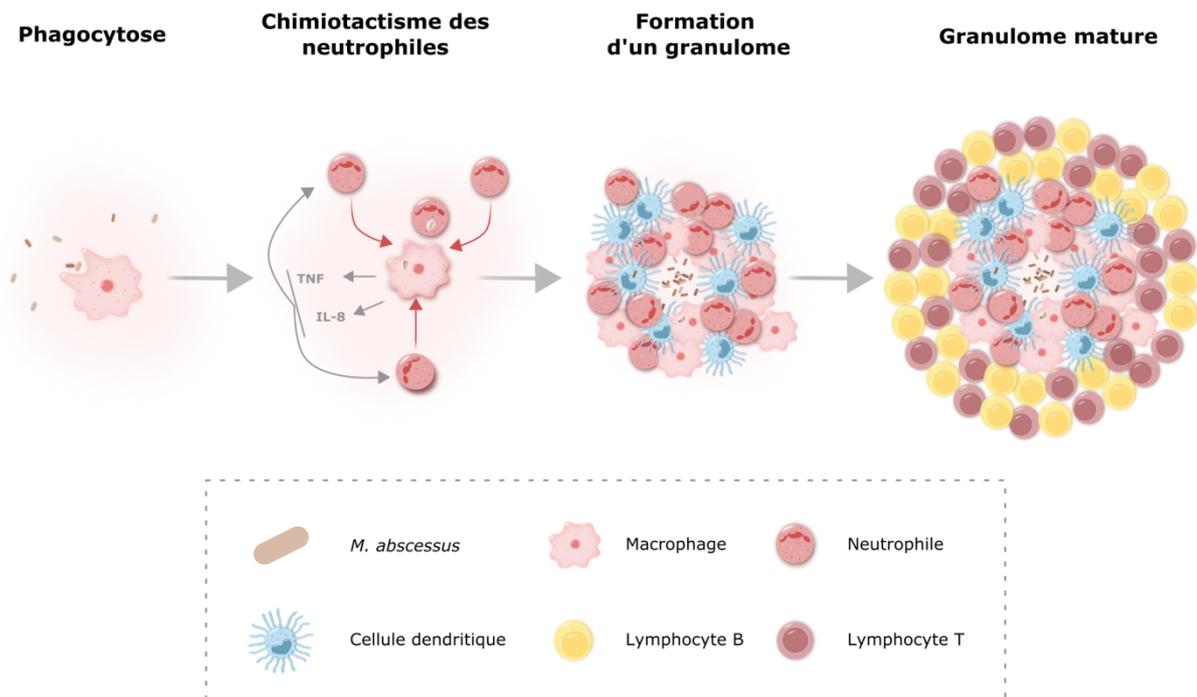


Figure 5. Formation d'un granulome mature contenant une infection à *M. abscessus*. La phagocytose de *M. abscessus* par les macrophages va induire la libération de facteurs de nécrose tumorale (TNF) et d'interleukine-8 (IL-8) aboutissant au recrutement des neutrophiles sur le site de l'infection et à la formation d'un granulome. S'en suit l'activation du système immunitaire adaptatif qui va induire le recrutement de lymphocytes B et T permettant de maintenir l'intégrité de la structure et de former le granulome mature.

cellules va permettre de maintenir l'intégrité de la structure et ainsi confiner les bactéries pour prévenir toute dissémination de l'infection. Cependant, les capacités du morphotypes R à former des cordes et à induire l'apoptose ou l'autophagie des cellules pourraient, en partie, être responsables de la rupture des granulomes et finalement aboutir à une infection incontrôlée [6,60,64,69].

d. Rôle des biofilms dans la survie de *M. abscessus*

M. abscessus possède un arsenal de stratégies de pathogénèse afin de coloniser son hôte, parmi lesquelles on distingue son aptitude à former des biofilms dans divers environnements [71–73]. Elle est capable de former des biofilms à l'interface air-solide ou air-liquide grâce à la composition de la matrice qu'elle produit et à sa membrane unique, riche en lipides [71]. Ces structures complexes se composent de bactéries entourées d'une matrice extracellulaire responsable de leur agrégation, de leur adhésion à une surface, de la rétention d'eau et de l'apport de nutriments [74]. Cette matrice joue aussi un rôle de barrière physique permettant aux bactéries de résister considérablement aux antibiotiques, aux produits détergents et aux défenses innées et adaptatives de l'hôte afin de mieux le coloniser [74].

La diminution de la susceptibilité *in vitro* de *M. abscessus* au sein de ces biofilms à des antibiotiques de première intention tels que l'amikacine (AMK), la céfoxitine (CFX) ou la clarithromycine (CLR) [75] pourrait expliquer les difficultés de traitement rencontrées chez certains patients. En effet, la présence de micro-colonies ressemblant à un biofilm dans des coupes de poumons d'individus suggère la présence de telles structures complexes et protectives lors de thérapies [76–79].

Le variant S, connu pour être le variant colonisateur, fut longuement décrit comme le seul variant de *M. abscessus* capable de former des biofilms, probablement grâce à la présence spécifique de glycopeptidolipides (GPL) à sa surface. Les GPL ont été décrits chez *Mycobacterium smegmatis* comme essentiels à l'attachement de la bactérie à des surfaces solides lors de la formation de biofilms [80]. Cependant, G. Clary *et al.* remettent en cause le dogme selon lequel le variant R ne pourrait être à l'origine de la formation de biofilms et démontrent des phénotypes distincts (agrégation des bactéries) en fonction du variant étudié [81].

Grâce notamment aux biofilms et aux cordes, *M. abscessus* est capable de s'adapter à son environnement afin d'évoluer et de coloniser son hôte tout en se protégeant des attaques extérieures (antibiotiques, détergents, système immunitaire). Cependant, en dehors de la formation de ces structures, les

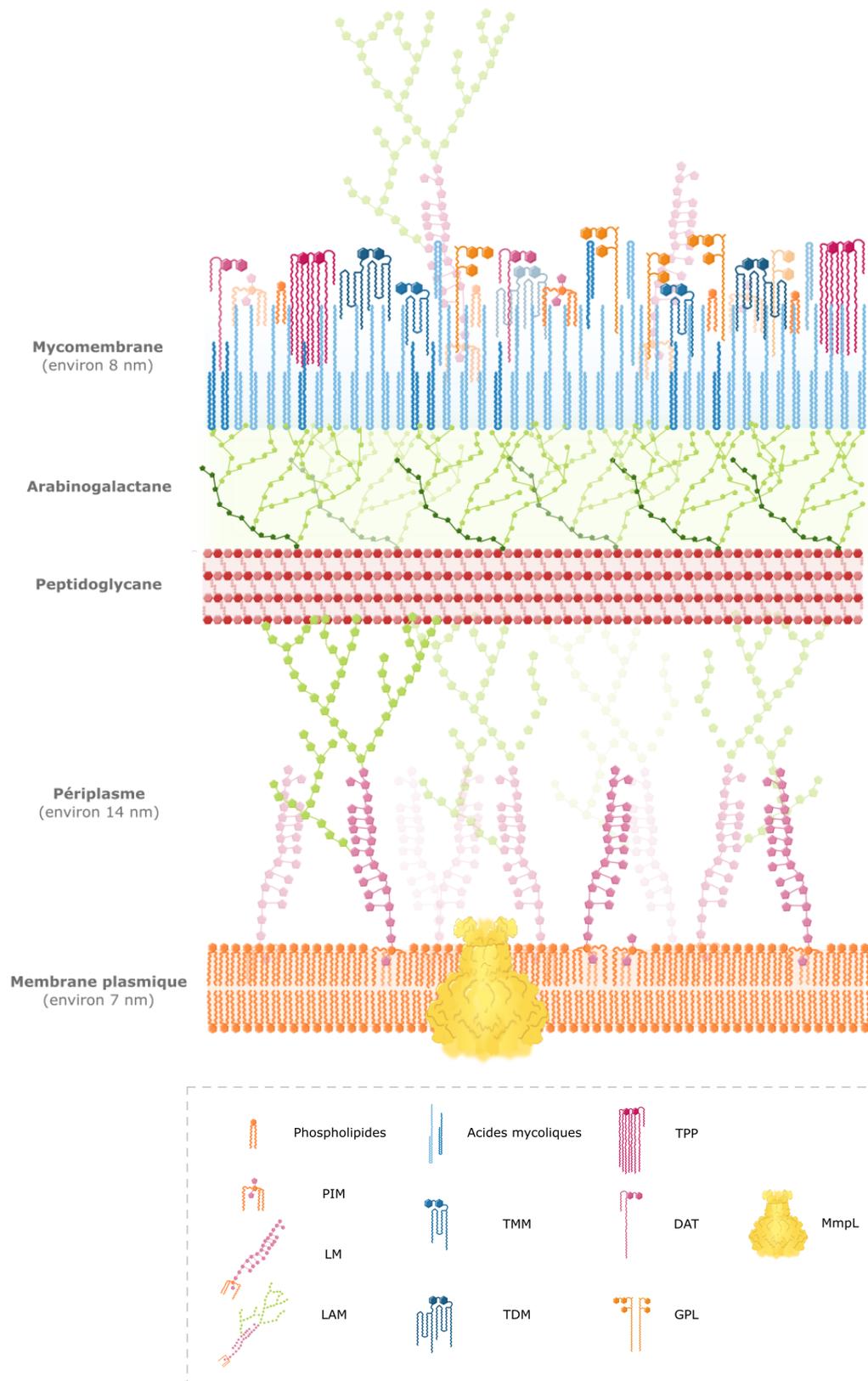


Figure 6. Représentation schématique de l'enveloppe du morphotype lisse de *M. abscessus*. L'enveloppe mycobactérienne se compose d'une membrane plasmique (couche la plus interne) formée d'une bicouche lipidique représentée en orange et contenant majoritairement des phospholipides, des phosphatidylinositol mannosides (PIM), du lipomannane (LM) et du lipoarabinomannane (LAM). Des

mycobactéries présentent une forte résistance intrinsèque aux antibiotiques permise par leur enveloppe mycobactérienne.

4. Enveloppe mycobactérienne

L'enveloppe mycobactérienne est une barrière conférant aux mycobactéries une protection contre les environnements hostiles et les agressions extérieures telles que l'action d'antibiotiques, de désinfectants ou encore d'enzymes lytiques [82]. Les possibilités pour l'hôte d'endommager cette enveloppe complexe au pouvoir pathogène sont limitées, notamment grâce à sa composition singulière [82]. En effet, l'enveloppe des mycobactéries est unique en son genre, puisqu'à la différence des autres bactéries, celle-ci présente une membrane externe, ou mycomembrane, extrêmement riche en lipides. Malgré sa visualisation par cryo-microscopie CEMOVIS chez plusieurs corynebactéries, la quantité de données concernant son organisation et la fonction de certains composants reste limitée [83].

a. Organisation de l'enveloppe mycobactérienne

La membrane plasmique des mycobactéries est la couche la plus interne de leur enveloppe (**Figure 6.**). Elle se compose majoritairement de phospholipides et de protéines s'assemblant pour former une bicouche lipidique [84]. Au vu de sa composition et de ses fonctions métaboliques, elle semble similaire à celle des autres bactéries [83]. Un des composants notoires de cette membrane sont les phosphatidylinositol mannosides (PIM) qui participent grandement à la faible perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne et à la résistance aux antibiotiques [85,86]. Les PIM ainsi que ses dérivés, le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM), également présents à la surface de la bactérie jouent un rôle principal dans l'intégrité de l'enveloppe et peuvent, selon des études menées sur *M. tuberculosis*, interagir avec le système immunitaire de l'hôte [87–89].

Séparé de la membrane plasmique par l'espace périplasmique se trouve le peptidoglycane (**Figure 6.**), polymère rigide permettant le maintien de la forme des cellules et renforçant la membrane plasmique contre la pression osmotique du cytoplasme [90]. Cette structure protectrice se compose des couches semblables à des nids d'abeilles constituées d'une alternance d'acides *N*-acétylmuramiques (MurNAc) et de *N*-acétylglucosamines (GlcNAc) liés entre eux par des ponts peptidiques [91,92]. Une spécificité du peptidoglycane des mycobactéries, et de quelques autres espèces bactériennes, est la présence d'acides

Figure 6. transporteurs de la famille des MmpL permettent l'export de lipides au travers de la membrane plasmique. Un espace périplasmique vient séparer la membrane plasmique du peptidoglycane (rosé) covalamment lié à l'arabinogalactane (vert). La couche la plus externe (bleue) représente la mycomembrane. Son feuillet interne est composé d'acides mycoliques estérifiés à l'arabinogalactane tandis que son feuillet externe contient divers lipides : monomycolates de tréhalose (TMM), dimycolates de tréhalose (TDM), polyphléates de tréhalose (TPP), diacyltréhaloses (DAT) ou encore glycopeptidolipides (GPL).

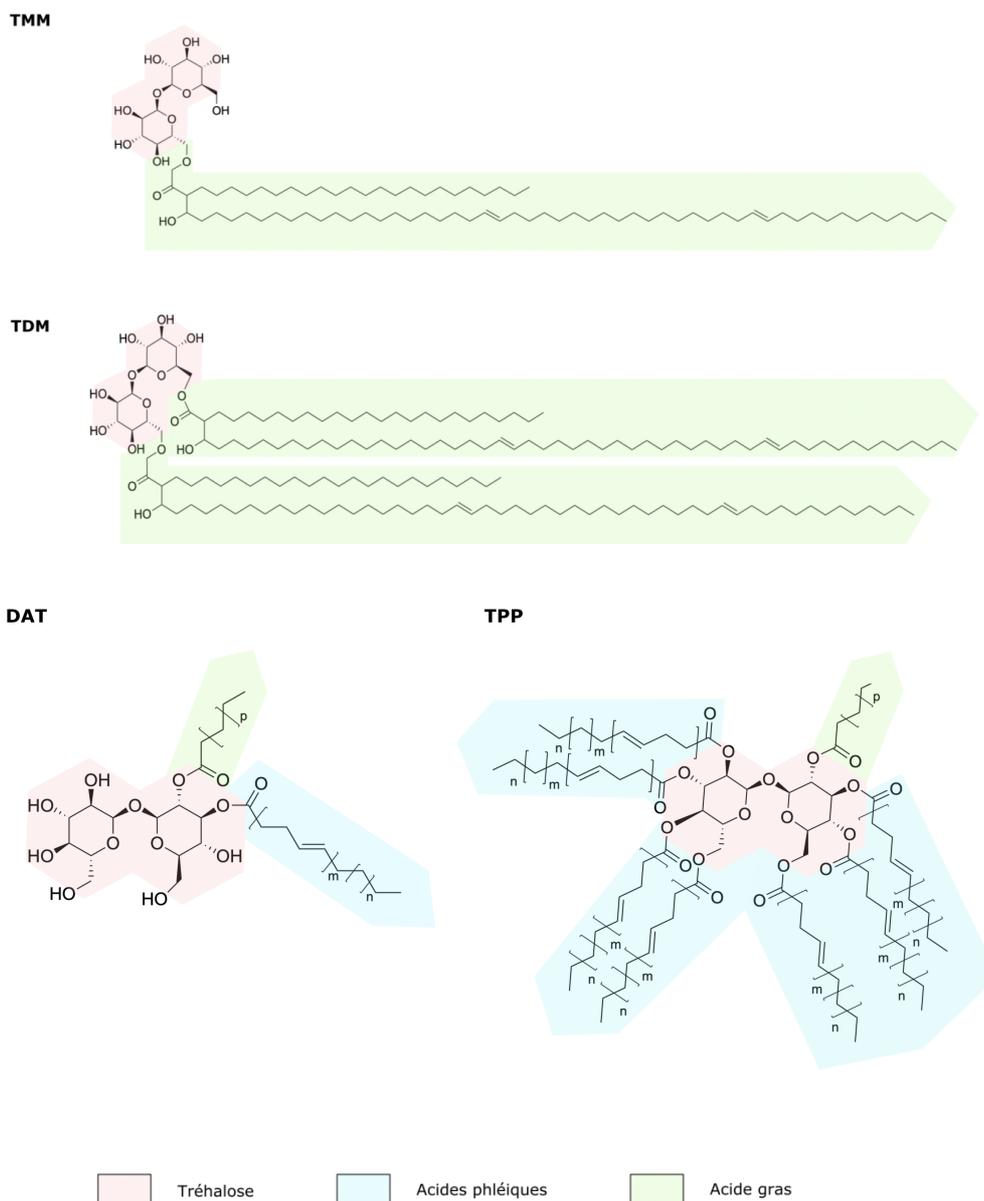


Figure 7. Structure des lipides dérivés de tréhalose. Les monomycolates de tréhalose (TMM) et les dimycolates de tréhalose (TDM) sont composés d'un tréhalose (fond rose) acylé respectivement par un ou deux acides mycoliques en positions 6 ou 6' (fonds verts). Les diacyltréhaloses (DAT), précurseurs

N-glycolylmuramiques (MurNGly) suite à la modification de MurNAc par une enzyme codée par le gène *namH* [93,94]. Une étude publiée en 2005 démontre que l'absence de cette enzyme va induire une sensibilité accrue de la souche aux antibiotiques de la classe des β -lactamines et aux lysozymes [93]. Ce polymère confère à la bactérie, en plus du maintien de sa structure, une résistance à certains antibiotiques faisant de lui un élément essentiel à la survie bactérienne. Un second polymère indispensable décrit chez les mycobactéries est l'arabinogalactane lié covalamment au peptidoglycane *via* une liaison rhamnose-GlcNAc-P (P : phosphorylé) (**Figure 6.**) [95]. Cette structure se compose de deux parties : une partie arabinane (polymère d'arabinoses) et une partie galactane (polymère de galactoses), et est rattachée à la mycomembrane [96].

La mycomembrane, constituée de deux feuillets, forme la dernière couche solide de l'enveloppe mycobactérienne (**Figure 6.**). Son feuillet interne se compose d'acides mycoliques, des acides gras à longues chaînes (60 à 90 atomes de carbone) essentiels aux mycobactéries, estérifiés aux motifs glucidiques terminaux de l'arabinogalactane. Plus précisément, ce lipide possède une chaîne alkyl de 24 à 26 atomes de carbones branchée en α et une chaîne d'acide méromycolique pouvant aller de 42 à 62 atomes de carbone [97,98]. Ces structures essentielles aux mycobactéries confèrent, de par leur diversité, une signature spécifique à l'espèce permettant de les distinguer. *M. abscessus*, par exemple, synthétise uniquement des α - et α' -mycolates, les α -mycolates étant les plus abondants (**Figure 5.**) [99,100]. Ces lipides peuvent affecter la fluidité et la perméabilité de la mycomembrane et ainsi expliquer les différents niveaux de sensibilité aux inhibiteurs lipophiles observés chez plusieurs mycobactéries [101]. Néanmoins, les acides mycoliques, de par leur nature hydrophobe, représentent aussi une barrière importante aux solutés hydrophiles. Les acides mycoliques sont connus pour permettre à *M. tuberculosis* de persister au sein des phagolysosomes des macrophages, de résister à des dommages chimiques et à la déshydratation [97]. Ces acides gras, puisqu'essentiels, sont donc une cible de choix pour l'antibiothérapie contre des infections mycobactériennes [102–105].

Tandis que le feuillet interne de la mycomembrane est homogène car principalement constitué d'acides mycoliques, son feuillet externe se compose d'une grande variété de lipides extractibles, de lypoglycanes et de protéines (**Figure 6.**) [85]. En opposition aux acides mycoliques du feuillet interne liés à l'arabinogalactane, le feuillet externe présente des acides mycoliques libres ou estérifiés à des tréhaloses (monomycolates de tréhalose (TMM) et dimycolates de tréhalose (TDM)) (**Figure 7.**) [85]. D'autres lipides dérivés de tréhalose tels que les diacyltréhaloses (DAT) et les polyphléates de tréhalose (TPP) (**Figure 7.**) ainsi que des lipides structurellement différents comme les GPL sont arborés par *M. abscessus*.

Figure 7. des polyphléates de tréhalose (TPP), sont constitués d'un tréhalose (fond rose) acylé en position 2 par un acide gras (fond vert) et en position 3 par un acide phléique (fond bleu). Les TPP présentant la même structure initiale que les DAT sont également acylés en positions 4, 6, 2', 3', 4' et 6' (fonds bleus).
 $m = 5,6$; $n = 12, 14$; $p = 10, 12, 14$.

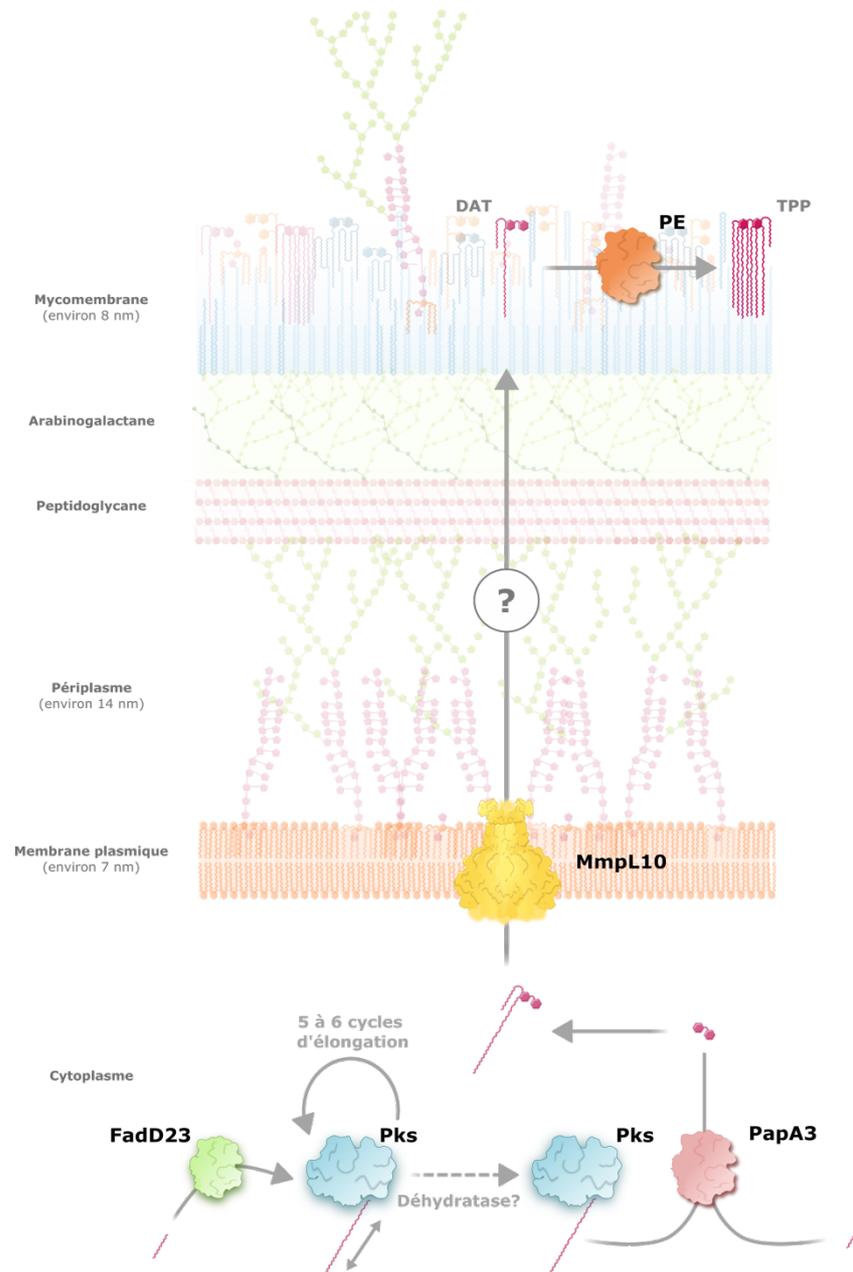


Figure 8. Représentation de la voie de biosynthèse des polyphléates de tréhalose chez *M. abscessus*. Suite à l'activation et au transfert d'un acide gras C16 par FadD23, la Pks va permettre l'allongement de la chaîne carbonée en 5 à 6 cycles itératifs. Une déhydratase non-identifiée serait responsable de la polyinsaturation et formerait ainsi les acides phléiques. Les acides phléiques nouvellement synthétisés ainsi qu'un acide gras (C14-19) sont transférés par l'enzyme PapA3, respectivement en positions 3 et 2 du

b. Polyphléates de tréhalose

Les TPP, initialement décrits chez *Mycobacterium phlei* d'où ils tirent leur nom, sont des lipides complexes de surface retrouvés chez diverses MNT telles que *M. phlei*, *M. smegmatis* ou *M. abscessus* [106,107]. Ces glycolipides se composent d'un tréhalose acylé par un acide gras de 14 à 19 atomes de carbone et d'au maximum sept acides phléiques, chaînes carbonées polyinsaturées comprenant une quarantaine d'atomes de carbone (**Figure 7.**) [106,107]. Cet imposant lipide de surface est synthétisé *via* l'action de plusieurs enzymes et d'un transporteur, codés par des gènes regroupés au sein d'un même locus. En 2016, les travaux de S. Burbaud *et al.* ont permis de décortiquer la voie de synthèse de ce lipide de surface, suggérant une action concertée d'une « fatty acid degradation 23 » (FadD23), d'une « polyketide synthase associated protein A3 » (PapA3) et d'une polykétide synthase de type-I (Pks) dans la synthèse des DAT, précurseurs des TPP (**Figure 7.**) [107].

Dans un premier temps, la protéine FadD23 va activer l'acide gras composé de 16 atomes de carbone en acyl-AMP avant de le transférer à la Pks (**Figure 8., Figure 9.**). Cette dernière va catalyser l'élongation de l'acide gras en acide phléique par formation de liaisons carbone-carbone. La création de ces liaisons, lors de réactions de condensation d'un groupe acyle (malonyl-CoA) avec un groupe α -carboxyacyl, est chaperonnée par l'action des différents domaines constituant la Pks.

En effet, les Pks sont des enzymes multifonctionnelles composées *a minima* de trois domaines : un domaine kétosynthase (KS), un domaine acyltransférase (AT) et un domaine protéine porteuse d'acyle (« acyl carrier protein ») contenant un bras phospho-pantéthéine (PP) [108]. Des domaines additionnels, tels que des domaines kéto-reductase (KR), déshydratase (DH) ou encore énoylréductase (ER), peuvent être contenus dans la Pks et contribuer à l'élongation de la chaîne. Plus spécifiquement, la Pks impliquée dans la synthèse des TPP est constituée de deux modules : le premier composé d'un domaine KS, d'un domaine AT, d'un domaine KR et d'un domaine PP ; le second constitué d'un domaine KS, d'un domaine AT, d'un domaine DH, d'un domaine ER, d'un domaine KR et d'un domaine PP (**Figure 10.**).

L'unité d'élongation (malonyl-CoA) va être ainsi activée et liée de façon covalente au bras phospho-pantéthéine du domaine PP (**Figure 10.**). Dans un second temps, la chaîne d'acide gras va être allongée par une réaction de condensation avec l'unité d'acyl-CoA puis subir une réduction du groupement cétone en groupement hydroxyle catalysé par le domaine KR. Le nouveau produit est ensuite transféré sur le domaine KS du second module pour suivre une nouvelle réaction de condensation suite à laquelle les domaines KR, DH et ER vont respectivement mener à la réduction de la fonction cétone en fonction alcool, à la déshydratation de cette dernière générant une insaturation (double liaison) et à la réduction de cette double liaison en liaison simple (**Figure 10.**). Cette Pks étant itérative, le produit nouvellement formé va

Figure 8. résidu de tréhalose formant ainsi les diacyltréhaloses (DAT). Les DAT sont par la suite transportés par le transporteur MmpL10 au travers de la membrane plasmique avant d'être adressés au feuillet externe de la mycomembrane par un processus à ce jour méconnu. Au sein de la mycomembrane, l'acyltransférase PE va catalyser l'acylation des DAT en positions 4, 6, 2', 3', 4' et 6' par des acides phléiques formant ainsi les polyphléates de tréhalose (TPP). Adapté de Burbaud *et al.* 2016 [107].

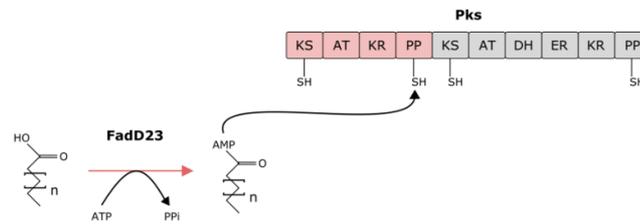


Figure 9. Mode d'action de FadD23 dans la voie de synthèse des polyphléates de tréhalose. Activation d'acides gras en acyl-AMP et transfert au domaine PP de la Polykétide synthase de type-I (Pks) par l'action de FadD23. $n = 12, 14$.

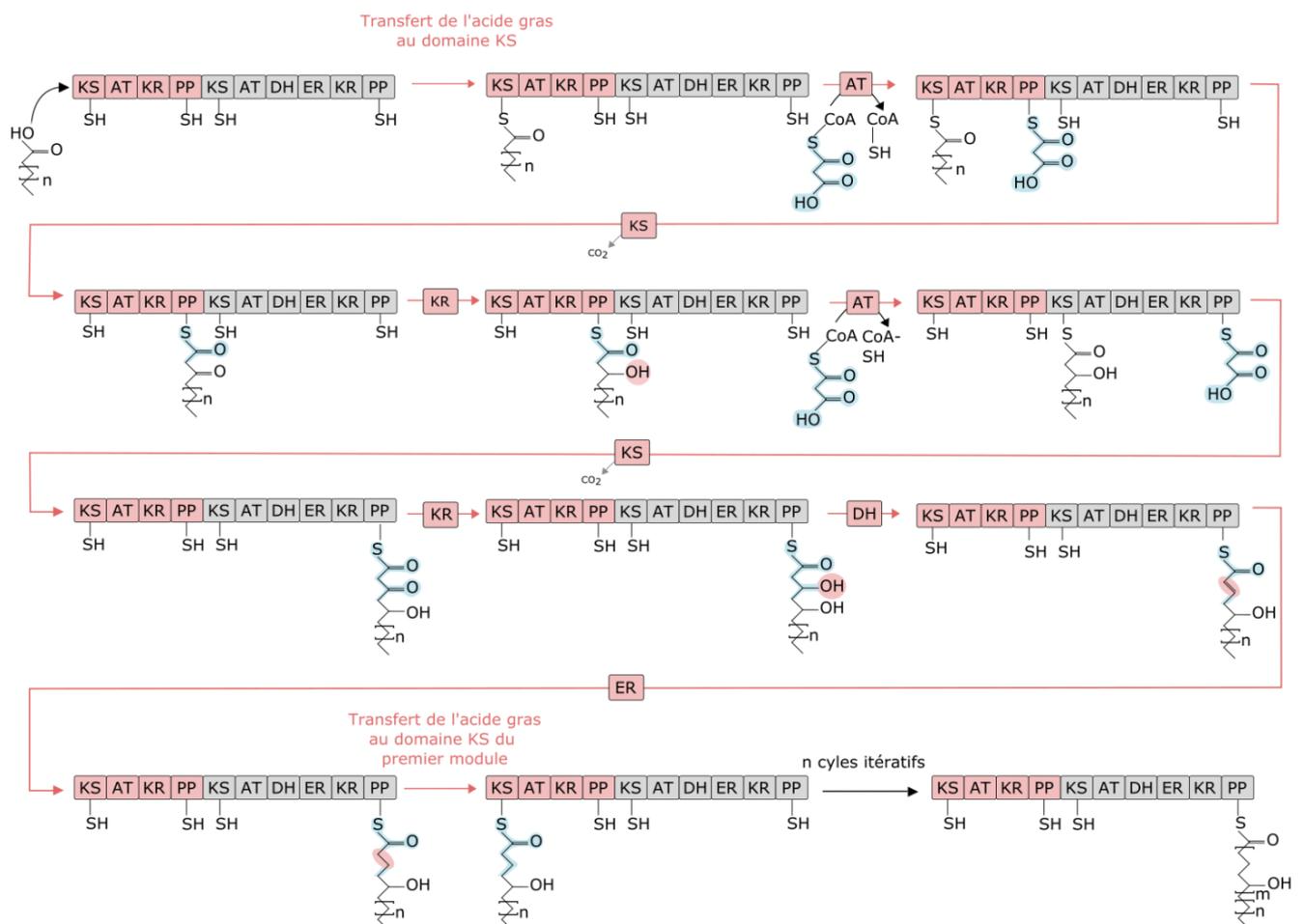


Figure 10. Élongation de l'acide gras catalysée par la polykétide synthase de type-I dans la voie de synthèse des polyphléates de tréhalose. Le premier et le second module de la Polykétide synthase de

être transféré au domaine KS du premier module et suivre un cycle identique (5-6 cycles au total) jusqu'à obtention de la chaîne attendue [108] (**Figure 8.**, **Figure 10.**).

D'après l'absence du domaine déhydratase dans le premier module de la Pks, S. Burbaud *et al.* suggèrent la participation d'une déhydratase additionnelle et non identifiée lors de l'étape de polyinsaturation afin de produire les acides phléiques [107] (**Figure 8.**). La protéine PapA3 est ensuite nécessaire au transfert de l'acide phléique et d'un acide gras C14-19 respectivement en positions 3 et 2, d'un résidu glucose du tréhalose afin de former les DAT (**Figure 7.**, **Figure 8.**). Ce nouveau lipide formé au sein du cytoplasme va être transporté au travers de la membrane plasmique par le « Mycobacterial membrane protein large » 10 (MmpL10) [107]. Ce transporteur, tout comme les autres transporteurs de la famille des MmpL, est une protéine à 12 hélices transmembranaires et arborant deux boucles périplasmiques (**Figure 11.**) [109]. Au vu de la position de MmpL10 dans l'enveloppe mycobactérienne, il semble probable que d'autres protéines coopèrent avec celle-ci afin d'acheminer les DAT jusqu'au feuillet externe de la mycomembrane et permettent l'action de l'acyltransférase PE [110]. Une fois adressés au feuillet externe de la mycomembrane, les DAT vont être transacylés par PE avec des acides phléiques pour former les TPP (**Figure 8.**) [110]. Une étude publiée en 2020 sur *M. smegmatis* a démontré la présence du domaine catalytique de PE en dehors de la membrane plasmique ainsi que la présence d'un peptide signal et d'un site de clivage protéolytique [110]. Cette étude suggère qu'une fois la protéine PE clivée, sa forme mature serait excrétée dans la mycomembrane afin de catalyser de façon spécifique la transacylation des DAT chez les différentes espèces de MNT arborant des TPP à leur surface, processus conservé au sein des MNT au vu de la présence du motif de clivage AXA dans les séquences orthologues à PE [110].

Bien que la voie de synthèse soit en partie élucidée, le rôle de ces lipides reste pour le moment incompris et controversé. Une étude publiée en 2017 propose la participation des TPP dans l'agrégation et la formation de cordes par le variant R [111]. Elle suggère également leur présence uniquement à la surface de ces souches, malgré une démonstration inverse dans des travaux antérieurs [107,111]. Bien que les TPP soient les seuls lipides visiblement extraits lors de l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM), il n'est pas à exclure la présence d'un lipide minoritaire et non visible sur CCM qui pourrait être responsable de l'agrégation et de la formation des cordes. De plus, aucun mutant déficient en TPP n'a au cours de cette étude été généré afin de vérifier l'impact sur la formation de ces structures. Les auteurs démontrent également la non-toxicité des TPP vis-à-vis de macrophages murins J774 grâce à l'utilisation de billes enrobées de lipides purifiés [111]. Malgré le fait que la structure des TPP et leur voie de synthèse soient très proches de celles de lipides retrouvés chez *M. tuberculosis* tels que les polyacyltréhaloses (PAT), triacyltréhaloses (TAT) ou les sulfolipides (SL), leur rôle semble bien distinct. Les PAT et TAT semblent jouer un rôle dans la virulence des bacilles du fait de leur présence exclusive chez les espèces

Figure 10. type-I (Pks) sont respectivement représentés en rose et en gris. Ces modules sont composés de plusieurs domaines : KS, kétoynthase ; AT, acyltransférase ; KR, kétoréductase ; DH, déhydratase ; ER, énoylréductase ; PP, « phosphopantetheinylate acyl carrier protein ». L'acyl-CoA est surligné de bleu et un surlignage rose indique les fonctions modifiées à chaque étape. Le 1^{er} cycle catalysé par la Pks est constitué de différentes étapes qui peuvent être suivies à l'aide des flèches roses. $m = 5, 6$; $n = 12, 14$.



Figure 11. Structure du transporteur MmpL10 prédite par le système d'intelligence artificielle AlphaFold DB [114]. Protéine composée de 12 hélices transmembranaires arborant deux boucles périplasmiques.

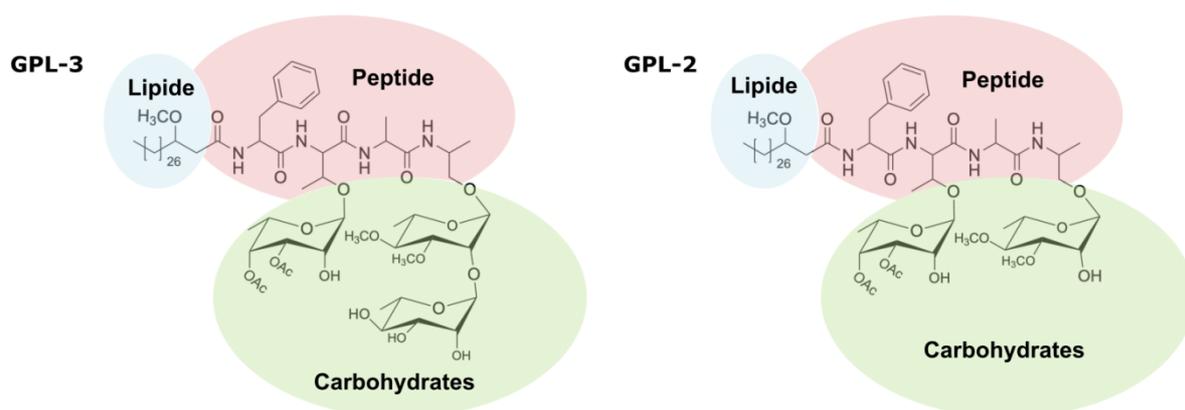


Figure 12. Structures des glycopeptidolipides tri-glycosylés et di-glycosylés de *M. abscessus*. La chaîne lipidique (bulle bleue) est méthoxylée en troisième position et liée à la chaîne peptidique (bulle rose)

pathogènes et de leur rôle dans le contrôle de l'infection [98,112]. Les SL, lipides retrouvés uniquement chez *M. tuberculosis* et *Mycobacterium canetti*, vont favoriser la maturation des phagosomes [113]. Bien que le rôle éventuel des TPP dans la virulence de *M. abscessus* demeure inconnu, le développement récent de nouveaux outils génétiques laisse entrevoir la possibilité d'évaluer la pathogénèse de mutants déficients dans le transport ou la synthèse des TPP.

c. Glycopeptidolipides

Tout comme les TPP, les GPL sont des lipides de surface uniquement retrouvés chez certaines MNT telles que *M. avium*, *M. chelonae*, *M. smegmatis* ou encore *M. abscessus*. Les GPL produits par ce dernier sont composés d'une chaîne lipidique de 26 à 33 atomes de carbone qui peut être méthoxylée ou hydroxylée en troisième position et liée à une chaîne peptidique composée de quatre acides aminés (D-phénylalanine-D-allo-thréonine-D-alanine-L-alanine) (**Figure 12.**) [115]. Cette chaîne peptidique présente sur la thréonine un 6-deoxy- α -talose (6d-Tal) et un α -L-rhamnose sur l'alanine terminal. Ces GPL diglycosylés (GPL-2) sont di-*O*-acétylés en positions 3 et 4 du 6-dTal et peuvent être di- ou tri-*O*-méthylés en positions 3 et 4 ou 2, 3 et 4 du rhamnose. *M. abscessus* produit également des GPL plus polaires et triglycosylés (GPL-3) suite à l'addition d'un rhamnose 2,3,4-tri-hydroxylé sur le rhamnose précédemment mentionné (**Figure 12.**) [115].

La synthèse et le transport de ces lipides sont menés par différents acteurs codés par les gènes du locus *gpl* (**Figure 13**) et demeurent partiellement caractérisés chez *M. abscessus*. Dans ce contexte, de récents travaux ayant pour but de mieux appréhender la voie métabolique et d'initier des études de type structure-activité devraient, à terme, permettre de déterminer l'implication des divers éléments structuraux dans les fonctions biologiques des GPL.

Une étude menée par W. Daher *et al.* a démontré l'action spécifique et indépendante d'une *O*-méthyltransferase des acides-gras ou « fatty-acid *O*-methyltransferase » (Fmt) dans l'ajout d'un groupement méthoxy en position 3 de la chaîne lipidique (**Tableau 2, Figure 12.**) [116]. Au vu de la production par le mutant *M. abscessus* Δ *fmt* (souche de référence S) de GPL sauvages dépourvus du groupement méthoxy de la chaîne lipidique, l'action de cette enzyme ne semble pas impacter le reste de la synthèse des GPL [116].

A cette chaîne lipidique est liée une chaîne peptidique préalablement synthétisée *via* l'action de deux peptides synthases mycobactériennes ou « mycobacterial peptide synthases » (Mps) et désignées Mps1

Figure 12. composée de quatre acides aminés. Le second acide aminé est substitué par un résidu talose acétylé en positions 3 et 4 tandis que le dernier acide aminé peut être glycosylé par un ou deux rhamnoses, respectivement glycopeptidolipides di-glycosylés (GPL-2) et glycopeptidolipides tri-glycosylés (GPL-3), le premier rhamnose pouvant être di- ou tri-méthylé en positions 3, 4 ou 2, 3, 4 respectivement. Adapté de Johansen *et al.* 2020 [6].

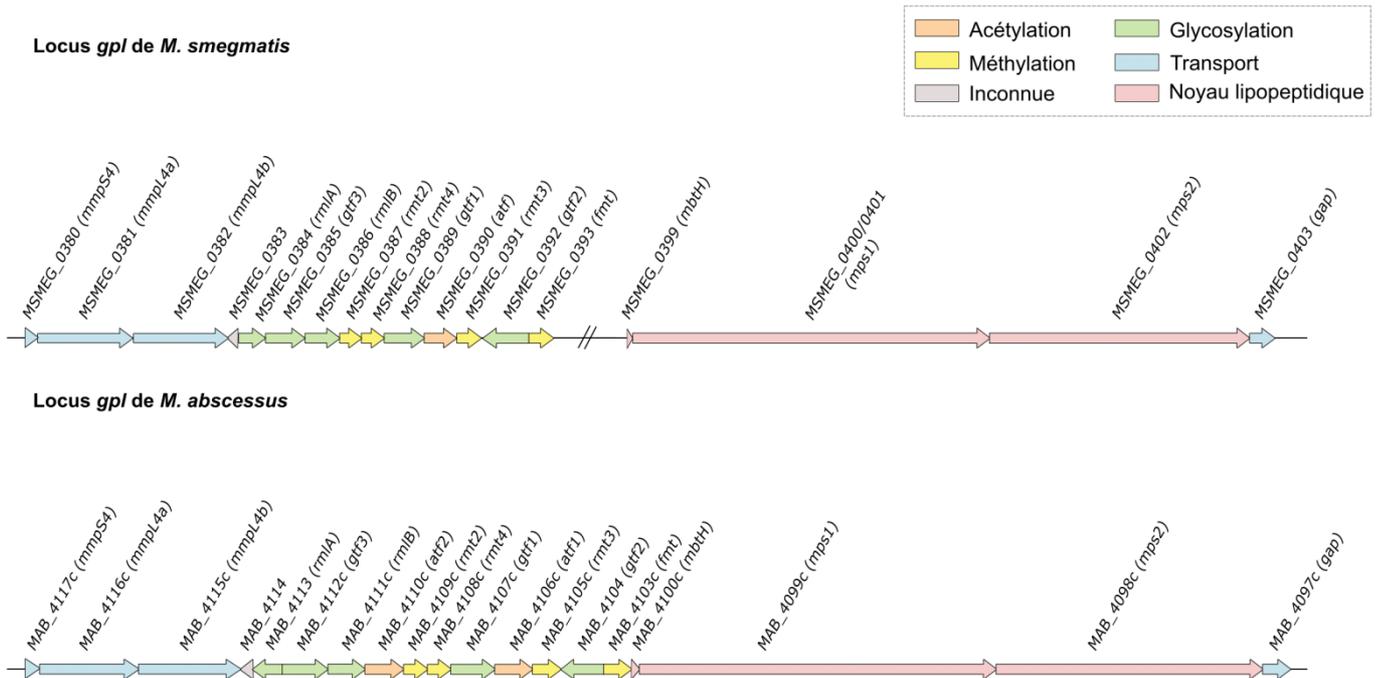


Figure 13. Locus *gpl* de *M. smegmatis* et *M. abscessus*. Chaque couleur correspond à la fonction de la protéine codée par le gène. Adapté de Gutiérrez *et al.* 2018 [117].

et Mps2 chez *M. abscessus* (**Tableau 2**) [117,118]. Une troisième enzyme, l'enzyme MbtH pourrait également être impliquée dans cette synthèse [119].

La chaîne peptidique ainsi formée peut ensuite être glycosylée par trois glycosyltransférases (Gtf) (**Tableau 2**); Gtf1 responsable du transfert du 6d-Tal sur le second acide aminé, Gtf2 du transfert du premier rhamnose sur le dernier acide aminé et Gtf3 catalysant le transfert du second rhamnose sur le premier rhamnose (**Figure 12.**) [120]. En 2022, des travaux menés par W. Daher *et al.* au sein de notre équipe ont démontré chez *M. abscessus* la nécessité de l'ajout du premier rhamnose avant celui du second et du 6-dTal, suggérant ainsi un haut degré de spécificité de ces enzymes et une action concertée des Gtf selon un ordre préétabli [120].

En amont de ces Gtf, l'intervention de Rml (RmlA et RmlB) (**Tableau 2**) dans l'activation et l'épimérisation des monosaccharides est probable, bien qu'une validation expérimentale reste nécessaire.

Comme mentionné précédemment, le 6d-Tal présent sur le résidu de thréonine arbore en positions 3 et 4 des groupements acétyles qui seraient, au regard des résultats obtenus chez *M. smegmatis*, ajoutés par deux acétyltransférases non-redondantes, Atf1 et Atf2 (**Tableau 2, Figure 12.**) [121]. En effet, un mutant Δatf généré chez *M. smegmatis*, c'est-à-dire dépourvu de son unique acétyltransférase (**Figure 13.**), et complémenté par Atf1 et Atf2 de *M. abscessus* a permis de mettre en évidence l'action séquentielle de ces enzymes [121]. La complémentation par Atf1 de *M. abscessus* du mutant Δatf de *M. smegmatis* a induit la production de GPL mono-O-acétylés tandis que la complémentation par Atf2 a conduit à un produit non-acétylé. Finalement, l'action combinée des deux enzymes a permis de restaurer la production de GPL sauvages montrant une action d'Atf2 dépendante de l'action préalable d'Atf1 [121].

Concernant le premier rhamnose situé sur l'alaninol terminal, celui-ci serait méthylé en positions 3 et 4 ou 2, 3 et 4 grâce à l'action des rhamnose méthyle transférases Rmt2, Rmt3 et Rmt4 (**Tableau 2**) [117], dont la spécificité d'action reste à déterminer.

Une fois synthétisés, les GPL totaux sont transportés au travers de la membrane plasmique par une machinerie composée de trois protéines membranaires des familles des « Mycobacterial membrane protein Large » et des « Mycobacterial membrane protein Small » (MmpL4a, MmpL4b, MmpS4) [117] (**Tableau 2**). Une protéine d'adressage des GPL ou « GPL addressing protein » (Gap) (**Tableau 2**) a également été décrite chez *M. smegmatis* pour participer au transport des GPL [122].

Enfin, il existe un petit gène présent au sein de ce locus, *MAB_4114*, dont le rôle éventuel dans la synthèse ou le transport des GPL est à ce jour inconnu (**Figure 13**).

	Nom en anglais	Fonction	Gène
Synthèse	Mycobacterial peptide synthase	Synthèse de la chaîne peptidique	<i>mps1 (MAB_4099c)</i> <i>mps2 (MAB_4098c)</i>
	-	Synthèse de la chaîne peptidique	<i>mbtH (MAB_4100c)</i>
	GPL addressing protein	Transport des GPL	<i>gap (MAB_4097c)</i>
Transport	Mycobacterial membrane protein small	Transport des GPL au travers de la membrane plasmique	<i>mmpS4 (MAB_4117c)</i>
	Mycobacterial membrane protein large		<i>mmpL4a (MAB_4116c)</i> <i>mmpL4b (MAB_4116c)</i>
Glycosylation	Glycosyltransferase	Transfert du 6-deoxy- α -L-talose	<i>gtf1 (MAB_4107c)</i>
		Transfert du premier rhamnose	<i>gtf2 (MAB_4104)</i>
		Transfert du second rhamnose	<i>gtf3 (MAB_4112c)</i>
	-	Activation et épimérisation des monosaccharides	<i>rmlA (MAB_4113)</i> <i>rmlB (MAB_4111c)</i>
Méthylation	Rhamnose methyltransferase	O-méthylation du rhamnose	<i>rmt2 (MAB_4109c)</i> <i>rmt3 (MAB_4105c)</i> <i>rmt4 (MAB_4108c)</i>
	Fatty-acid methyltransferase	O-méthylation en position 3 de la chaîne lipidique	<i>fmt (MAB_4103c)</i>
	Acetyltransferase	Acétylation du 6-deoxy- α -L-talose en positions 3 et 4	<i>atf1 (MAB_4106c)</i> <i>atf2 (MAB_4110c)</i>
-	-	-	<i>MAB_4114</i>

Tableau 2. Acteurs de la synthèse et du transport des glycopeptidolipides chez *M. abscessus*. Les différents gènes sont classés en fonction de leur principale fonction connue ou supposée. GPL, glycopeptidolipides.

Bien que la route soit encore longue pour comprendre le rôle des divers constituants des GPL, la fonction principale de ce lipide a été décortiquée au cours des dernières années. Les GPL sont connus chez les mycobactéries pour induire différents morphotypes en fonction de leur présence ou de leur absence à la surface de la bactérie [123]. Le morphotype R présente généralement des mutations (petites insertions ou délétions) au sein du locus codant pour la synthèse (*mps1* ou *mps2*) et le transport (*mmpL4a* ou *mmpS4*) des GPL [124,125]. Le morphotype S, arborant à sa surface des GPL regroupés en nanodomains, est très mobile grâce à ses capacités de glissement sur des surfaces telles que les milieux gélosés (« sliding motility ») [126,127]. Cette mobilité pourrait en partie expliquer le pouvoir colonisant de ce morphotype au sein des individus infectés [120,127,123]. De plus, ces lipides de surface semblent impacter les interactions de la bactérie avec l'hôte en masquant d'autres lipides tels que les phosphatidylinositols dimannoside (PIM₂) ou des lipoprotéines de surface connus pour être des agonistes du récepteur TLR-2 (« Toll-like receptor ») (**Figure 14.**) [67,128]. La reconnaissance de ces agonistes par TLR-2, récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires ou « Pattern-recognition receptor » (PRR), va stimuler l'expression de TNF- α et l'inflammation *in cellulo* [67,128,129]. L'activation du récepteur TLR-2 pourra également engendrer la production d'IL-8 et l'expression de « Human β -defensin » (H β D2) [68], les IL-8 étant notamment impliquées dans le recrutement des neutrophiles circulants vers le(s) site(s) d'activation des TLR [68]. En masquant les différents agonistes de TLR-2 *via* les GPL, le morphotype S de *M. abscessus* a le pouvoir de coloniser les voies respiratoires tout en réduisant la réponse inflammatoire, lui conférant ainsi un avantage en comparaison au morphotype R.

De plus, de récentes études menées dans le but d'élucider le rôle des différents constituants des GPL [116,120] ont permis de mettre en exergue le rôle central des sucres vis-à-vis des caractéristiques que ce lipide confère au variant S. Des travaux publiés en 2022 démontrent l'impact de la glycosylation des GPL et notamment la présence du 6-dTal ou du premier rhamnose sur la morphologie mais également sur l'agrégation des souches [120]. Plus spécifiquement, ils attestent de l'implication directe du rhamnose dans l'internalisation des souches S par les macrophages et suggèrent l'initiation de ce processus par une interaction des rhamnoses avec le récepteur au mannose (MR) et le récepteur du complément 3 (CR3), tous deux connus pour favoriser la phagocytose (**Figure 14.**) [120].

Par conséquent, les propriétés principales des GPL s'avèrent être régulées par la présence des différents sucres bien que la présence des groupements acétyles et méthyles pourraient également modifier les propriétés conférées aux GPL. Chez *M. smegmatis*, l'acétylation du 6-dTal semble impacter les capacités de glissement sur milieu gélosé (« sliding motility ») des souches ainsi que l'aptitude de celles-ci à former des biofilms [80]. Ces groupements, d'après une étude de 2017 utilisant des GPL purifiés et chimiquement

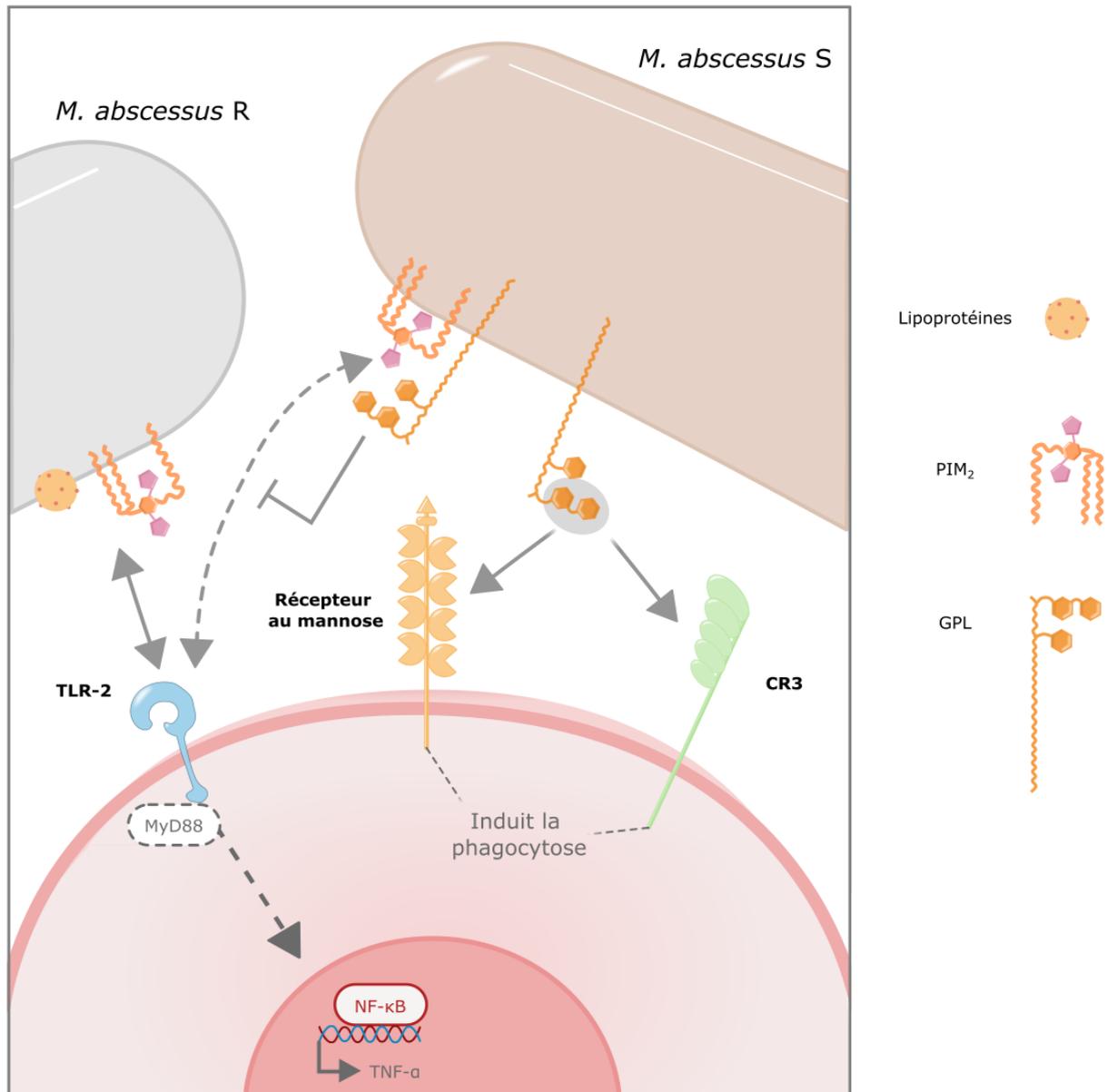


Figure 14. Rôle des glycopeptidolipides dans les interactions de *M. abscessus* avec les cellules hôtes via des récepteurs de l'immunité. Le variant rugueux (R) *M. abscessus* par interaction directe avec le récepteur de type Toll-2 (TLR-2) via les phosphatidylinositols dimannoside (PIM₂) et les lipoprotéines de surface va induire la libération de facteurs de nécrose tumorale- α (TNF- α) par activation de la voie NF- κ B. Cette activation, chez le variant lisse (S), est inhibée par la présence de glycopeptidolipides (GPL) qui vont masquer les agonistes de TLR-2. Les GPL via les deux groupements rhamnose (fond gris) vont interagir avec le récepteur au mannose et le récepteur du complément 3 (CR3) et induire la phagocytose du bacille.

déacétylés, permettraient d'inhiber l'activité des GPL et leur interaction avec la cyclophiline D, régulateur de la perméabilité des pores de la paroi des mitochondries des cellules, modulant ainsi l'apoptose [130].

L'enveloppe mycobactérienne, et en particulier certains lipides, confèrent des caractéristiques diverses à la bactérie impactant ainsi sa virulence et ses interactions avec les cellules hôtes. Cette barrière protectrice permet aux mycobactéries de manipuler leur hôte et de résister aux antibiotiques, principal outil dans la lutte contre les infections bactériennes.

5. Antibiothérapie et mécanismes de résistance de *M. abscessus*

M. abscessus étant résistante à la majorité des antibiotiques proposés en thérapie, il est pour le moment difficile d'éradiquer ces infections. Malgré cela, l'antibiothérapie reste le traitement le plus courant pour ce type d'infection. La section suivante aura pour but de décrire les principaux antibiotiques utilisés en clinique dans le traitement des infections à *M. abscessus* ainsi que ses principaux mécanismes de résistance innée et acquise vis-à-vis de plusieurs classes d'antibiotiques. Cette partie est présentée sous la forme d'une Synthèse publiée dans Médecine/Sciences (Illouz *et al.* 2021. *Mycobacterium abscessus*, un modèle de résistance aux différentes classes d'antibiotiques. *Med. Sci.* **37**: 993-1001).

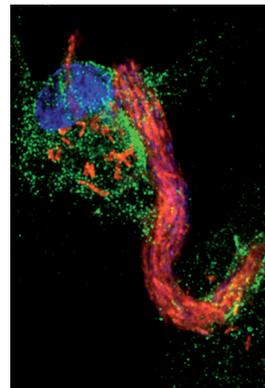
> *Mycobacterium abscessus* est une bactérie non tuberculeuse, environnementale, à croissance rapide, qui est responsable d'infections pulmonaires sévères, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement actuel combine l'utilisation d'une β -lactamine et d'un aminoglycoside associés à un macrolide. Cette bactérie est polyrésistante à la plupart des antibiotiques utilisés en clinique. Les mécanismes de résistance, innés ou acquis, qu'elle a développés, conduisent fréquemment à des échecs thérapeutiques, ce qui limite considérablement les moyens de lutte disponibles pour le clinicien. Une compréhension globale des mécanismes de résistance de cette bactérie s'avère ainsi nécessaire pour contrer les infections pulmonaires qu'elle provoque. <

Mycobacterium abscessus a été isolée pour la première fois en 1950, par Morris Moore et John B Frerichs, chez une patiente de 63 ans ayant consulté pour divers troubles dont un abcès situé au niveau du genou, résultant d'un traumatisme survenu 48 ans plus tôt [1]. Cette mycobactérie non tuberculeuse (MNT) à croissance rapide est classée dans le phylum des Actinobactéries (Figure 1A). *M. abscessus* regroupe en fait trois sous-espèces bactériennes : *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* et *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Celles-là diffèrent par leur profil génétique mais aussi par leur susceptibilité à certains antibiotiques [2]. *M. abscessus* est un pathogène opportuniste intracellulaire (Figure 1B) qui est souvent assimilé à d'autres mycobactéries. Confondue avec ces autres espèces, sa prévalence propre pourrait ainsi être largement sous-estimée. Son mode de transmission reste encore largement incompris. Néanmoins, une étude réalisée en 2016 suggère une transmission interhumaine possible chez les patients atteints de mucoviscidose [3]. *M. abscessus* est responsable de manifestations cliniques très étendues. Outre des infections cutanées, osseuses, disséminées et, voire, dans de rares cas, lorsque la barrière

Vignette (Photo © Wassim Daher).

***Mycobacterium abscessus*, un modèle de résistance aux différentes classes d'antibiotiques**

Morgane Illouz^{1,*}, Matthéo Alcaraz^{1,*},
Françoise Roquet-Banères¹, Laurent Kremer^{1,2}



¹CNRS UMR 9004, Institut de recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier, France.
²Inserm, IRIM, 34293 Montpellier, France.
*Contribution équivalente
laurent.kremer@irim.cnrs.fr

hémato-encéphalique est altérée, d'atteintes du système nerveux central, *M. abscessus* est responsable d'infections pulmonaires sévères, en particulier chez les patients souffrant de troubles pulmonaires comme la mucoviscidose [4]. On estime en effet que 10 à 20 % de ces patients, qui présentent une susceptibilité accrue aux infections bactériennes, sont infectés par une MNT (principalement *M. abscessus* et *Mycobacterium avium*). L'infection par *M. abscessus* est l'une des infections bactériennes les plus difficiles à traiter : elle est en effet multi-résistante aux antibiotiques, et le taux d'échec des traitements atteint près de 60 % [5]. Sa place de pathogène émergent s'explique par son incidence, qui peut surpasser, dans certains pays industrialisés, celle de *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose [4]. Le séquençage complet du génome de *M. abscessus* a révélé la présence de plusieurs gènes codant des facteurs de virulence spécifiques de *M. tuberculosis* ainsi que de nombreux facteurs de virulence non mycobactériens, caractéristiques d'autres pathogènes souvent associés à la mucoviscidose, tels que *Pseudomonas aeruginosa* [6, 7]. La grande plasticité du génome de *M. abscessus* et les nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques que déploie cette bactérie témoignent de sa capacité d'adaptation à son environnement.

***M. abscessus*, une menace croissante pour les patients atteints de mucoviscidose ?**

La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire causée par une mutation du gène codant la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) [8] (→).

(→) Voir la Synthèse de C. Ferec, m/s n° 6-7, juin-juillet 2021, page 618

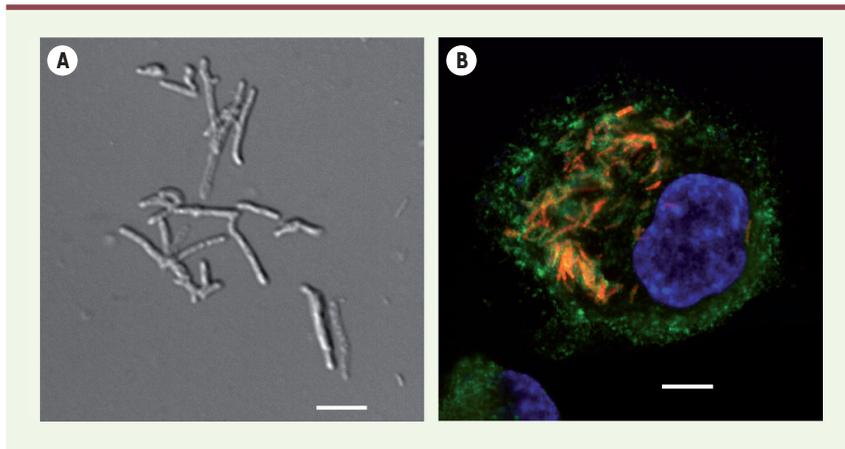


Figure 1. *M. abscessus*, un bacille intracellulaire. **A.** Image de microscopie en contraste de phase de *M. abscessus*. L'échelle représente 5 μ m. **B.** Image d'immunofluorescence d'un macrophage infecté par *M. abscessus* exprimant Tdtomato (rouge). Les macrophages sont détectés grâce à un anticorps anti-CD63 (vert) et les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). L'échelle représente 10 μ m.

Cette maladie autosomique récessive affecte, en particulier, les fonctions digestives et respiratoires. La protéine CFTR est en effet une protéine transmembranaire qui joue un rôle de canal ionique localisé au pôle apical des cellules épithéliales pulmonaires, permettant l'échange d'ions chlorure et sodium au travers de la membrane des cellules [9]. Des mutations du gène *CFTR* entraînent un dysfonctionnement à l'origine d'une mauvaise hydratation du mucus bronchique, qui, de ce fait, devient de plus en plus épais et visqueux, favorisant ainsi l'établissement d'infections polymicrobiennes chroniques. *M. abscessus* représente, avec *M. avium*, la MNT la plus fréquemment retrouvée dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, pouvant induire un déclin rapide de leurs fonctions pulmonaires [10]. Le dysfonctionnement de CFTR réduit, entre autre, l'activité bactéricide des macrophages en raison d'une diminution de leur production de radicaux oxydants en réponse aux infections [11]. À l'incapacité du système immunitaire inné à contrôler efficacement les infections bactériennes, s'ajoute la difficulté, pour le clinicien, à traiter ces infections et à éradiquer le bacille responsable [12]. La présence de *M. abscessus* peut aussi représenter une contre-indication à la greffe pulmonaire, un recours souvent nécessaire chez les patients atteints de mucoviscidose.

L'antibiothérapie comme traitement des infections à *M. abscessus*

La majorité des molécules utilisées en clinique dans le traitement contre *M. abscessus* ont un effet bactériostatique : elles ne font que stopper la prolifération bactérienne, sans induire la mort des bactéries. Ces molécules ne montrent également que peu ou pas d'activité vis-à-vis des biofilms, constructions complexes formées de colonies bactériennes, ce qui pourrait expliquer la relative inefficacité des régimes thérapeutiques actuellement appliqués [13]. Pendant plusieurs années, les recommandations thérapeutiques ont été fondées sur une trithérapie, associant une β -lactamine (imipénème ou céfoxitine), un aminoglycoside (amikacine), administrés par voie parentérale pendant 12 mois, et un macrolide (clarithromycine ou azithromycine), par voie orale. Afin d'optimiser cette thérapie chez les personnes atteintes de mucoviscidose, un

consortium regroupant l'*US Cystic Fibrosis Foundation* et l'*European Cystic Fibrosis Society*, préconise maintenant une première phase de thérapie dite intensive (durant au moins un mois), suivie d'une phase de prolongation (de 12 mois) (Figure 2). Cette stratégie prend en compte le profil de résistance aux antibiotiques de la souche à l'origine de l'infection. Il est donc important de différencier les isolats cliniques de *M. abscessus* qui sont sensibles ou résistants aux antibiotiques, dont les macrolides. L'action combinée de plusieurs antibiotiques permet de cibler différentes voies métaboliques utilisées par la bactérie afin de l'éradiquer (Figure 3) [14].

Les classes d'antibiotiques

Les β -lactamines regroupent une large classe d'antibiotiques (dont les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes). Elles agissent en inhibant la synthèse d'un composant essentiel de la paroi des mycobactéries, le peptidoglycane, formé d'une épine dorsale alternant des chaînons N-acétyl glucosamine - acide N-acétyl muramique, et de chaînes tétrapeptidiques (L-Alaninyl-D-isoGlutaminyL-meso-diaminopimelyl-D-Alanine) liées à l'acide muramique. Lors de l'étape finale de la synthèse de cet hétéropolymère, des liaisons covalentes se forment entre les chaînes latérales des peptides monomères qui le composent, produisant la macromolécule qui englobera la membrane plasmique. La réticulation du peptidoglycane est assurée par des transpeptidases bactériennes qui appartiennent à la famille des protéines liant la pénicilline (PBP), les D,D-transpeptidases (DDT) et les L,D-transpeptidases (LDT), qui catalysent respectivement des liaisons de type 4 \rightarrow 3 et 3 \rightarrow 3 entre ces chaînes peptidiques latérales [15]. Les β -lactamines agissent sur ces transpeptidases en entrant en compétition, par mimétisme, avec le substrat de ces enzymes, bloquant ainsi la biosynthèse du peptidoglycane. Les céphalosporines et les

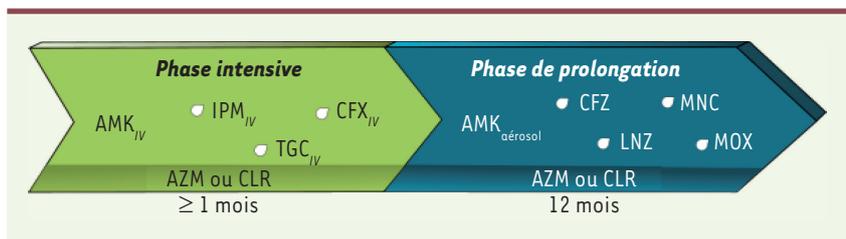


Figure 2. Régime thérapeutique dans le cadre d'infections à *M. abscessus*. La phase intensive, d'une durée pouvant excéder un mois, comporte une dose quotidienne d'amikacine injectée par voie intraveineuse (AMK_{IV}), d'un antibiotique choisi parmi l'imipénème (IPM), la tigécycline (TGC) ou la céfoxitine (CFX), ainsi qu'un macrolide (azithromycine (AZM)

ou clarithromycine (CLR)). La phase de prolongation, d'une durée d'environ 12 mois, comprend un macrolide, de l'AMK en aérosol ainsi que 2 à 3 antibiotiques choisis parmi la clofazimine (CFZ), le linézolide (LNZ), la minocycline (MNC) ou la moxifloxacine (MOX), dont le choix est dépendant du profil de résistance de chaque isolat clinique.

carbapénèmes présentent des activités différentes sur les deux types de transpeptidases : plus efficaces contre les DDT pour les céphalosporines, supérieures contre les LDT pour les carbapénèmes [16].

Les macrolides représentent une autre classe d'antibiotiques. Ils ciblent, quant à eux, la synthèse protéique en interagissant avec l'ARN ribosomique (ARNr) 23S de la grande sous-unité du ribosome (50S). Ces antibiotiques empêchent ainsi l'allongement de la chaîne peptidique en bloquant le tunnel de sortie par lequel les peptides nouvellement synthétisés s'éloignent du centre peptidyltransférase [17]. Les macrolides, tels que la clarithromycine ou l'azithromycine ont un effet bactériostatique auquel malheureusement *M. abscessus subsp. abscessus* et *M. abscessus subsp. bolletii* sont souvent résistantes [18].

Les aminoglycosides sont des molécules hydrophiles qui inhibent la synthèse des protéines en se liant au site A de l'ARNr 16S constituant la petite sous-unité des ribosomes [19]. Cette interaction est à l'origine d'une mauvaise lecture du codon lors de la délivrance de l'ARN de transfert (ARNt) des aminoacyls et, par conséquent, provoquent une traduction erronée de l'ARN messager (ARNm).

Les tétracyclines inhibent également la synthèse protéique des bactéries mais en prévenant l'association des aminoacyl-ARNt aux ribosomes bactériens [20]. Les membres de cette famille, comme la minocycline, ne présentent généralement qu'une activité modeste contre *M. abscessus*. Dérivée de la minocycline, la tigécycline fait exception. Elle est la seule tétracycline à présenter une chaîne 2-tert-butylglycylamino liée au carbone C-9 du cycle aromatique du squelette de la molécule (Figure 3). Ce substituant augmente l'affinité de la molécule pour le ribosome, lui conférant une forte activité inhibitrice ainsi que la capacité d'échapper aux mécanismes de résistance aux tétracyclines les plus couramment développés par les bactéries [21].

Le traitement de l'infection par *M. abscessus* par ces antibiotiques, dont la durée excède souvent 12 mois, s'accompagne néanmoins d'effets secondaires notoires, ce qui conduit, malgré leur efficacité, à de nombreuses impasses thérapeutiques.

La polyrésistance de *M. abscessus* aux diverses classes d'antibiotiques

Une résistance innée de la bactérie

La paroi mycobactérienne, une barrière naturelle

Si les mécanismes de résistance développés par *M. abscessus* sont nombreux et variés, la paroi mycobactérienne, unique en son genre par

la diversité des lipides qui la constituent, joue le rôle de première barrière à l'encontre de nombreuses molécules exogènes, dont certains antibiotiques. Comme toute cellule, la bactérie est bordée d'une membrane constituée d'une bicouche lipidique : la membrane interne (MI) (Figure 4A). Ancrés dans cette bicouche, se trouvent une grande variété de glycoconjugués : des glycolipides et des lipoglycannes, tels que le phosphatidyl-*myo*-inositol mannoside, le lipomannane ou le lipoarabinomannane [22] (→).

Entourant cette membrane interne, l'espace périplasmique est constitué du peptidoglycane, un hétéropolymère lié de manière covalente à une couche d'arabinogalactane, elle-même estérifiée par des acides mycoliques, des acides gras à longues chaînes carbonées. Ces acides mycoliques, caractéristiques des mycobactéries, constituent le feuillet interne de la mycomembrane. Dans le feuillet externe de cette dernière viennent s'insérer des lipides et glycolipides, tels que le tréhalose monomycolate, le tréhalose dimycolate, le tréhalosepolyphléate mais aussi des glycopeptidolipides [23]. Cette vaste panoplie de lipides participe grandement aux propriétés de résistance de la paroi, par exclusion de taille des molécules exogènes, mais aussi par son caractère hydrophobe, conférant une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophiles.

L'export actif à travers la membrane

Dans la membrane interne, de nombreuses protéines jouant le rôle de pompes à efflux sont insérées (Figure 4B). Parmi celles-ci, les protéines de la famille MmpL (*Mycobacterial membrane protein Large*) [24] permettent de maintenir l'homéostasie de la bactérie. Elles sont également responsables d'une balance physiologique permettant l'export de toxines et de métabolites produits par la bactérie. Ces protéines membranaires ont une grande variété de substrats, comme les facteurs de virulence, mais elles ont aussi un rôle indispensable dans le transport de lipides et dans l'élaboration de la paroi bactérienne. Dans certains cas, les

(→) Voir la Synthèse de L. Kremer et al., m/s n° 6-7, juin-juillet 1999, page 842

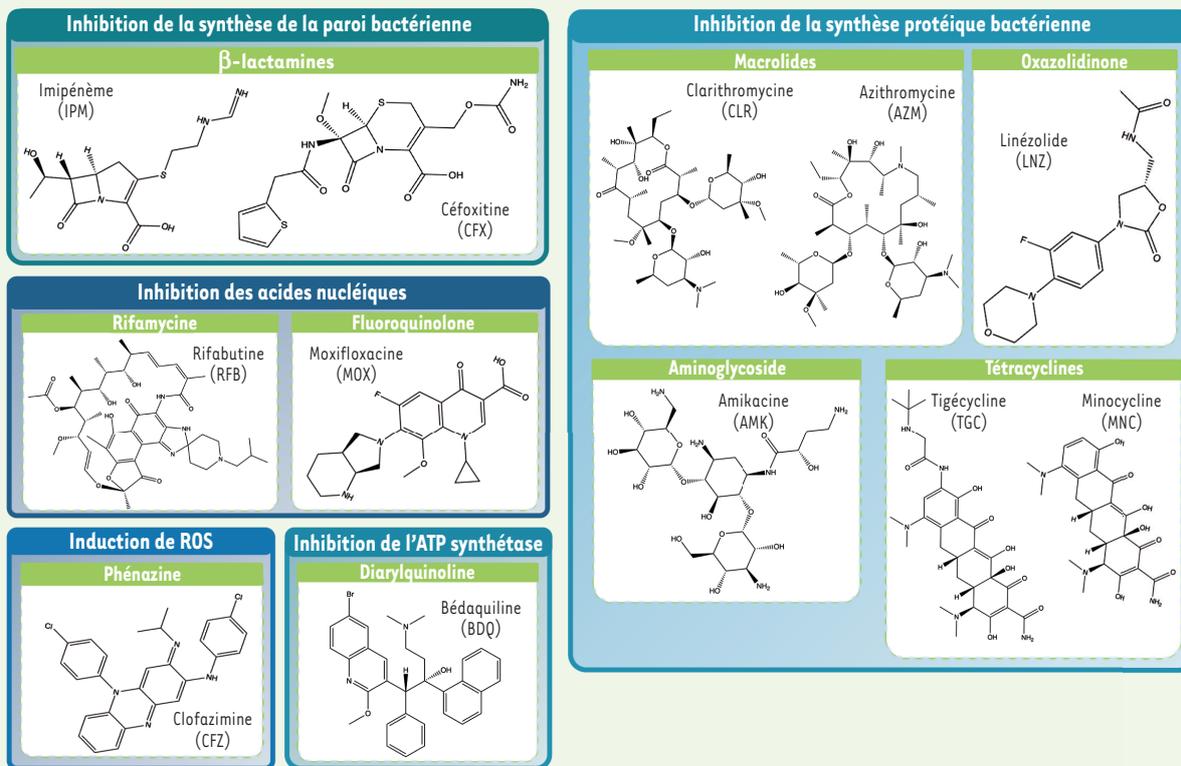


Figure 3. Structure chimique des principaux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections pulmonaires à *M. abscessus*. Les principales classes d'antibiotiques préconisées dans le traitement ainsi que leur mode d'action sont indiqués. ROS : *reactive oxygen species*.

pompes à efflux peuvent participer à l'export, du cytoplasme vers le milieu extérieur, de substances exogènes (telles que les antibiotiques) qui auraient pénétré dans la cellule. Certaines de ces protéines MmpL agissent de concert avec des protéines MmpS (*Mycobacterial membrane protein Small*), dont les gènes sont adjacents à ceux codant les MmpL. Le cluster de gènes *MAB_2300/MAB_2301*, codant les protéines MmpS/MmpL, est ainsi impliqué dans l'export d'antibiotiques comme la bédaquiline (BDQ) et la clofazimine (CFZ) (Figure 4B). Leur capacité d'export n'induit toutefois pas de résistances importantes [25] (Tableau 1). Une protéine apparentée à la pompe à efflux LmrS (*lincomycin resistance protein of Staphylococcus aureus*), ainsi que MmpL9, participent à la résistance au linézolide (LNZ) chez *M. abscessus*. En effet, des niveaux élevés de transcrits du gène codant MmpL9 ont été décrits chez des souches résistantes au linézolide, témoignant de l'implication probable de cette molécule dans l'export de l'antibiotique [26] (Figure 4B). La résistance de *M. abscessus* aux analogues du thiacétazone (TAC) s'explique également par l'export actif de ces antibiotiques par le système *MAB_4383c/MAB_4382c*, homologue de *mmpS5/mmpL5* chez *Mycobacterium tuberculosis* [27].

Si l'ensemble de ces transporteurs confèrent une perméabilité ajustable à la paroi bactérienne et représentent ainsi des mécanismes de résistance intrinsèque aux antibiotiques chez *M. abscessus*, nos connaissances sur l'implication d'autres systèmes de transport poten-

tiels dans la résistance aux antibiotiques de la bactérie restent encore limitées. Toutefois, diverses études sont actuellement menées dans le but d'identifier des inhibiteurs spécifiques de ces pompes à efflux afin de potentialiser l'efficacité des traitements [28].

Les enzymes modifiant/inactivant les antibiotiques

À côté de ces systèmes d'export, *M. abscessus* regorge d'une grande variété d'enzymes capables de modifier chimiquement de nombreux antibiotiques, et ainsi de les rendre inopérants. Ces enzymes, qui limitent donc considérablement les options de traitement, constituent un pan non négligeable du « résistome » de *M. abscessus* (Tableau 1). Parmi celles-là, une seule, ciblant les β -lactamines, a été identifiée chez *M. abscessus* : la β -lactamase Bla_{MAB} (Figure 4C). Codée par le gène *MAB_2875*, elle hydrolyse le noyau β -lactame de nombreuses molécules antibiotiques, comme les pénicillines, les carbapénèmes ou les céphalosporines. En clinique, l'utilisation de certains antibiotiques, comme l'imipénème et la céfoxitine, reste néanmoins possible. La Bla_{MAB} ne les dégradent en effet que très lentement, leur conférant une certaine efficacité [29]. L'avibactam, développé par AstraZeneca, un inhibiteur spéci-

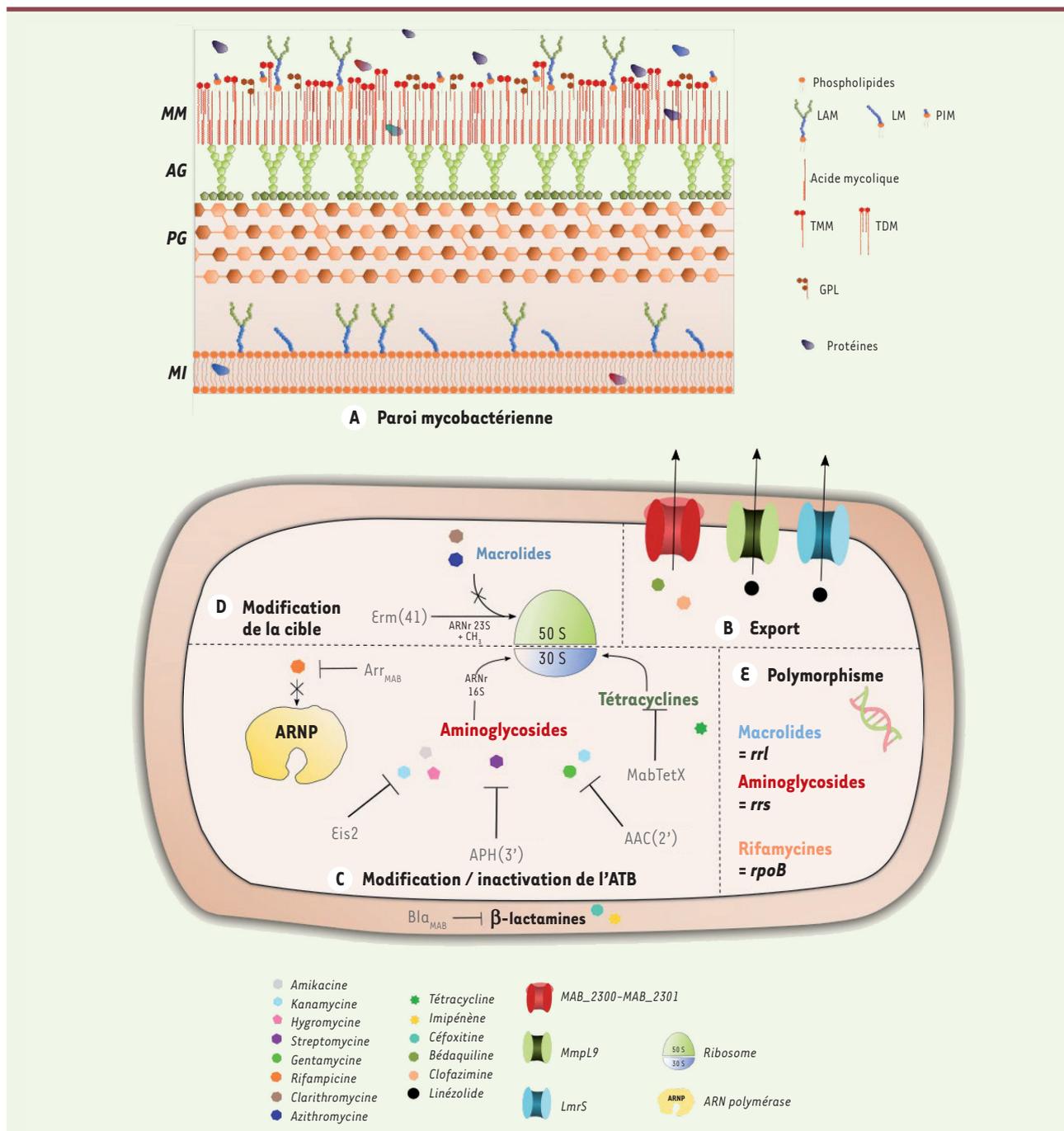


Figure 4. Mécanismes de résistances innée et acquise chez *M. abscessus* vis-à-vis des principales classes d'antibiotiques. **A.** La paroi mycobactérienne riche en lipides représente la première ligne de défense contre certains antibiotiques, de par sa forte hydrophobicité et l'exclusion de taille qu'elle provoque. **B.** L'export d'antibiotiques, tels que la bédacouline, la clofazimine ou encore le linézolide, implique des protéines transmembranaires, incluant par exemple les transporteurs de type MmpL. **C.** *M. abscessus* exprime de nombreuses enzymes capables de modifier et d'inactiver directement les antibiotiques. Arr_{MAB} (une ADP ribosyltransférase) inhibe l'action de la rifampicine tandis que AAC(2') et Eis2 (des N-acétyltransférases) ainsi que APH(3') (une 3''-O-phosphotransférase) neutralisent l'activité des aminoglycosides. MabTetX (une monoxygénase) inactive l'activité des tétracyclines. **D.** D'autres enzymes modifient la cible des antibiotiques. La méthyltransférase Erm(41) inhibe l'action des macrolides en méthylant l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome, diminuant ainsi l'affinité de l'antibiotique vis-à-vis du ribosome. **E.** Le polymorphisme génétique est impliqué dans la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, incluant notamment les macrolides, les aminoglycosides ou les rifamycines. MM : mycomembrane ; AG : arabinogalactane ; PG : peptidoglycane ; MI : membrane interne ; LAM : lipoarabinomannane ; LM : lipo-mannane ; TMM : tréhalose monomycolate ; TDM : tréhalose dimycolate ; GPL : glycopeptidolipide ; PIM : phosphatidyl-*myo*-inositol mannoside.

Antibiotique	Voie métabolique/cible	Gène(s) impliqué(s)	Réf.
Isoniazide	Synthèse des acides mycoliques /énoyl ACP réductase InhA	Polymorphisme du gène <i>katG</i> codant l'enzyme d'activation de l'INH	[31]
Rifampicine	Transcription/ARN polymérase	ADP-ribosylation de la rifampicine par Arr _{MAB}	[35]
Aminoglycosides	Synthèse protéique/ARNr 16S	Inactivation par AAC(2') Inactivation par APH(3'')	[31] [33]
β-lactamines	Synthèse du peptidoglycane/Penicillin-binding protein	Inactivation par Bla _{MAB}	[53]
Tétracycline	Synthèse protéique/empêche l'attachement de l'aminoacyl-ARNt au ribosome	Inactivation par MabTetX	[34]
Macrolides	Synthèse protéique/ARNr 23S	Modification de la cible par le produit du gène <i>erm(41)</i>	[18]
Analogues du thiacétazone	Synthèse des acides mycoliques /déshydratases HadABC	Pompe à efflux de type MmpS/MmpL codée par <i>MAB_4383c/4382c</i>	[54]
Bédaquiline	Production d'énergie/ATP synthase	Pompes à efflux de type MmpS/MmpL codées par <i>MAB_2300/2301</i> et <i>MAB_1135c/1134c</i>	[25,55]
Clofazimine	Production de radicaux oxydants produits par la NADH:quinone oxydoréductase de type 2	Pompes à efflux de type MmpS/MmpL codées par <i>MAB_2300/2301</i> et <i>MAB_1135c/1134c</i>	[25,55]

Tableau I. Résistance innée et acquise aux antibiotiques chez *M. abscessus*. ACP : acyl carrier protein ; Inh : isoniazid ; KatG : catalase/peroxidase ; MmpL : Mycobacterial membrane protein Large ; MmpS : Mycobacterial membrane protein Small.

fique de la Bla_{MAB}, permet, également de réduire considérablement la concentration minimale inhibitrice de certaines β-lactamines. Cette molécule augmente ainsi l'efficacité de ces antibiotiques, ouvrant la voie vers de nouvelles approches thérapeutiques, et donc à l'utilisation de cette famille d'antibiotiques [30].

La résistance de *M. abscessus* aux aminoglycosides s'explique par la présence chez cette bactérie de trois enzymes (deux acétyltransférases et une phosphotransférase) capables de neutraliser cette classe d'antibiotiques. Les deux N-acétyltransférases, AAC(2') et Eis2, sont codées respectivement par les gènes *MAB_4395* et *MAB_4532c*. AAC(2') acétyle le groupement amine situé en position 2' de certains aminoglycosides tels que la kanamycine ou la gentamycine [31], deux antibiotiques qui ne sont pas utilisés dans les traitements cliniques. Eis2, quant à elle, inactive l'amikacine, la kanamycine ou l'hygromycine, en acétylant le premier groupement amine de ces molécules [32]. L'inactivation des gènes codant ces enzymes entraîne une sensibilité accrue des bactéries aux aminoglycosides [31]. La 3''-O-phosphotransférase (APH(3'')), codée par le gène *MAB_2385*, est, elle, déterminante dans la résistance à la streptomycine [33]. Les modifications chimiques que ces enzymes produisent sur les aminoglycosides, diminuent leur affi-

nité pour l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome, ce qui les rend inopérantes (Figure 4C).

Bien qu'efficaces contre *M. tuberculosis*, les tétracyclines n'ont que peu d'effet sur *M. abscessus*. En effet, *M. abscessus* exprime une monoxygénase, la MabTetX [34], qui inactive les tétracyclines (Figure 4C). La délétion du gène *MAB_1496c* qui code cette enzyme, entraîne chez la souche mutée, une sensibilité accrue à ce type d'antibiotique, vingt fois plus élevée par rapport à la souche parentale, confirmant l'importance de cette enzyme dans la résistance aux tétracyclines.

La rifampicine est une molécule utilisée en première intention pour le traitement de la tuberculose. *M. abscessus* reste cependant insensible à l'action de cet antibiotique. La raison de cette résistance repose sur la présence chez *M. abscessus* d'une ribosyltransférase, l'ADP ribosyltransférase Arr_{MAB}, codée par le gène *MAB_0591*. Cette enzyme est capable d'ADP ribosyler la rifampicine, l'empêchant d'agir au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase [35] (Figure 4C). La décou-

verte de dérivés de la rifamycine, plus réfractaires à l'ADP-ribosylation par Arr_{MAB}, représente néanmoins une piste de recherche prometteuse dans la lutte contre *M. abscessus* [36].

Les enzymes protégeant la cible des antibiotiques

M. abscessus possède également une enzyme capable de protéger les protéines ciblées par les macrolides (Tableau I). La méthyltransférase Erm(41), codée par le gène *MAB_2997*, est en effet capable de méthylater l'adénine en position 2058 de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome [18] (Figure 4D). Par cette méthylation, cette enzyme produit un encombrement stérique qui réduit l'affinité des macrolides pour le tunnel de sortie du polypeptide. Il existe un polymorphisme du gène *erm(41)* codant cette méthyltransférase, sur le nucléotide en position 28 : thymine ou cytosine. Selon ce polymorphisme, les souches cliniques de *M. abscessus* présentent une résistance à la clarithromycine ou à l'azithromycine : le sequevar (ou variant) T28 (correspondant à un résidu tryptophane [Trp] en position 10 de la protéine) est en effet associé à une résistance inductible, alors que le sequevar C28 (correspondant à un résidu arginine [Arg10]) est associé à une sensibilité de la bactérie aux macrolides [37]. Le niveau de résistance de la bactérie, qui augmente progressivement en fonction du temps d'exposition à la clarithromycine ou à l'azithromycine, est inductible et directement lié à l'activateur de transcription WhiB7 [38]. Sachant que les macrolides représentent la pierre angulaire de la thérapie anti-*M. abscessus*, cette résistance aux macrolides inductible, observée dans 40 à 60 % des souches cliniques [37], rend compte du problème majeur de santé publique que représente l'infection par cette bactérie.

Polymorphisme nucléotidique et résistance acquise

Aux mécanismes de résistance innée que nous avons décrits, s'ajoutent des résistances acquises par *M. abscessus*. Ces résistances, fruit de modifications génétiques qui sont retrouvées dans les isolats cliniques, sont le résultat d'une exposition prolongée de la bactérie aux antibiotiques. Des mutations spontanées surviennent ainsi au sein des gènes codant les cibles protéiques des antibiotiques (Tableau I et Figure 4E), mais d'autres mécanismes additionnels, tels que le transfert génétique entre espèces bactériennes, sont probablement impliqués.

Résistance acquise aux macrolides

Des mutations du gène *rml*, qui code l'ARNr 23S [39], touchant les adénines en position 2058 et 2059 de l'ARNr 23S, sont induites au décours des expositions aux antibiotiques. Celles-ci réduisent l'activité des macrolides, et sont retrouvées dans les isolats de *M. abscessus*, comme c'est le cas pour d'autres espèces mycobactériennes, telles que *M. avium* [39].

Résistance acquise aux aminoglycosides

Des mutations du gène *rrs*, qui code l'ARNr 16S et qui induisent une résistance aux aminoglycosides, ont été décrites. Quatre mutations, affectant l'ARNr 16S (T1406A, A1408G, C1409T et G1491T)¹, ont été

associées à de hauts niveaux de résistance de *M. abscessus* aux aminoglycosides [40]. Deux nouvelles mutations (C1496T et T1498A)² ont été identifiées récemment [41].

Résistance acquise aux rifamycines

M. abscessus est réfractaire à l'action de la rifampicine qui est inactivée par l'action de la Arr_{MAB}. Toutefois, la rifabutine, de la famille des rifamycines, fait exception. Dans un modèle d'infection chez le poisson-zèbre (*zebrafish*) [42, 43] (→) ainsi que dans un modèle murin d'infection par *M. abscessus* [44], cet antibiotique présente des effets

(→) Voir la Synthèse de A. Bernut et al., m/s n° 6-7, juin-juillet 2015, page 638

bactéricides. Ces données confirment la capacité de la rifabutine à inhiber la transcription chez *M. abscessus*, à l'instar de la rifampicine. Des mutations du gène *rpoB* qui code la sous-unité β de l'ARN polymérase (H447Y, H447D et S452L)³ sont cependant à l'origine de la résistance de la bactérie à la rifabutine [43].

Conclusion et perspectives

Les nombreux mécanismes de résistance de *M. abscessus*, conjugués à l'émergence de souches multi-résistantes, limitent considérablement les outils mis à la disposition du clinicien pour traiter les infections pulmonaires causées par cette mycobactérie atypique. Le traitement actuel recommandé ne permet pas, dans la plupart des cas, d'éradiquer des infections à *M. abscessus*. Face à ce problème de santé publique en progression constante, des efforts doivent être faits pour encourager et favoriser des études ayant pour but d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour lutter contre les infections persistantes à *M. abscessus*, avec en particulier, l'identification de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique et le développement de molécules auxquelles cette bactérie serait sensible. Depuis plusieurs années, la recherche se concentre sur la découverte et le repositionnement de molécules actives vis-à-vis de *M. abscessus* comme, par exemple, la rifabutine [43, 44], la bédaciline [45, 46], le tédizolide [47] ou les inhibiteurs du transporteur des acides mycoliques MmpL3 [48, 49] (→). D'autres molécules ou formulations sont actuellement testées dans des essais cliniques, comme l'inhalation d'amikacine liposomale ou le monoxyde d'azote [50]. Des approches

(→) Voir la Nouvelle de C. Raynaud et L. Kremer, m/s n° 8-9, août-septembre 2020, page 691

¹ Thymine 1406 > adénine ; adénine 1408 > guanine ; cytosine 1409 > thymine ; guanine 1491 > thymine.

² Cytosine 1496 > Thymine ; thymine 1498 > adénine.

³ Ou c.1339C>T ; c.1339C>G ; c.1355C>T

alternatives à l'antibiothérapie sont également en cours d'étude. La phagothérapie, par exemple, très utilisée au début du xx^e siècle, est remise au devant de la scène dans la lutte contre les infections par les MNT [51] (→).

Ainsi, l'administration d'un cocktail de mycobactériophages spécifiques à une souche multirésistante de *M. abscessus*, dans le cadre du traitement d'une infection disséminée chez une jeune patiente atteinte de mucoviscidose, a amélioré l'état clinique de la patiente et a suscité beaucoup d'espoir [52]. Si la phagothérapie reste encore anecdotique dans les pays occidentaux, elle pourrait néanmoins permettre d'établir des traitements personnalisés avec une toxicité moindre, notamment chez les patients particulièrement réfractaires à l'antibiothérapie classique. ♦

SUMMARY

Mycobacterium abscessus, a model of resistance to multiple antibiotic classes

Mycobacterium abscessus is an environmental fast-growing, non-tuberculous mycobacterium responsible for severe lung infections, especially in patients with underlying lung disorders such as cystic fibrosis. The standard chemotherapy combines a β -lactam (imipenem or ceftazidime), an aminoglycoside (amikacin) and a macrolide (clarithromycin or azithromycin). However, resistance of this bacterium to most antibiotic classes, including nearly all anti-tubercular drugs, leads frequently to treatment failure and considerably reduces the therapeutic arsenal available to the clinician. A comprehensive understanding of the innate and acquired resistance mechanisms is thus necessary to counteract *M. abscessus* lung infections. ♦

REMERCIEMENTS

Morgane Illouz est bénéficiaire d'une bourse de thèse de l'Association Grégory Lemarchal et de Vaincre la Mucoviscidose (RF20200502678). Matthéo Alcaraz bénéficie d'une bourse de thèse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Moore M, Frerichs JB. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region. *J Invest Dermatol* 1953 ; 20 : 133-69.
2. Minias A. Subspecies-specific sequence detection for differentiation of *Mycobacterium abscessus* complex. *Sci Rep* 2020 ; 10 : 16415.
3. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* 2016 ; 354 : 751-7.
4. Johansen MD, Herrmann J-L, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol* 2020 ; 18 : 392-407.
5. Kwak N, Dalcolmo MP, Daley CL, et al. *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease: individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* 2019 ; 54 : 1801991.
6. Choo SW, Wee WY, Ngeow YF, et al. Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary potential. *Sci Rep* ; 4 : 4061.
7. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* 2009 ; 4 : e5660.
8. Férec C. La mucoviscidose : du gène à la thérapeutique. *Med Sci (Paris)* 2021 ; 37 : 618-24.
9. Davies JC, Alton EFW, Bush A. Cystic fibrosis. *BMJ* 2007 ; 335 : 1255-9.

(→) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, m/s n° 10, octobre 2019, page 806

10. Catherinot E, Roux AL, Macheras E, et al. Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Microbiol* 2009 ; 47 : 271-4.
11. Bernut A, Dupont C, Ogryzko NV, et al. CFTR Protects against *Mycobacterium abscessus* infection by fine-tuning host oxidative defenses. *Cell Rep* 2019 ; 26 : 1828-40.
12. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* 2012 ; 67 : 810-18.
13. Yam YK, Alvarez N, Go ML, et al. Extreme drug tolerance of *Mycobacterium abscessus* persists. *Front Microbiol* 2020 ; 11 : 359.
14. Haworth CS, Banks J, Capstick T, et al. British thoracic society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax* 2017 ; 72 : ii1-64.
15. Lavollay M, Fourgeaud M, Herrmann JL, et al. The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases. *J Bacteriol* 2011 ; 193 : 778-82.
16. Dubée V, Triboulet S, Mainardi JL, et al. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* L,D-transpeptidase LdtMt1 by carbapenems and cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 ; 56 : 4189-95.
17. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2014 ; 12 : 35-48.
18. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; 53 : 1367-76.
19. Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; 44 : 3249-56.
20. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001 ; 65 : 232-60.
21. Schedlbauer A, Kaminishi T, Ochoa-Lizarralde B, et al. Structural characterization of an alternative mode of tetracycline binding to the bacterial ribosome. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 ; 59 : 2849-54.
22. Kremer L, Besra G, Brennan P, et al. Le lipoarabinomannane : structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse. *Med Sci* 1999 ; 15 : 842-50.
23. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995 ; 4 : 29-63.
24. Viljoen A, Dubois V, Girard-Misguich F, et al. The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments: MmpL structure and diversity in mycobacteria. *Mol Microbiol* 2017 ; 104 : 889-904.
25. Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen A, et al. Mutations in the MAB_2299c TetR regulator confer cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019 ; 63 : e01316-18.
26. Ye M, Xu L, Zou Y, et al. Molecular analysis of linezolid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018 ; 63 : e01842-18.
27. Halloum I, Viljoen A, Khanna V, et al. Resistance to thiacetazone derivatives active against *Mycobacterium abscessus* involves mutations in the MmpL5 transcriptional repressor MAB_4384. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61 : e02509-16.
28. Vianna JS, Ramis IB, Bierhals D, et al. Tetrahydropyridine derivative as efflux inhibitor in *Mycobacterium abscessus*. *J Glob Antimicrob Resist* 2019 ; 17 : 296-9.
29. Soroka D, Dubee V, Soulier-Escrihueta O, et al. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2014 ; 69 : 691-6.
30. Dubee V, Bernut A, Cortes M, et al. β -Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 2015 ; 70 : 1051-8.
31. Rominski A, Selchow P, Becker K, et al. Elucidation of *Mycobacterium abscessus* aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2017 ; 72 : 2191-2200.
32. Ung KL, Alsarraf HMAB, Olieric V, et al. Crystal structure of the aminoglycosides N-acetyltransferase Eis2 from *Mycobacterium abscessus*. *FEBS J* 2019 ; 286 : 4342-55.
33. Dal Molin M, Gut M, Rominski A, et al. Molecular mechanisms of intrinsic streptomycin resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 62 : e01427-17.

RÉFÉRENCES

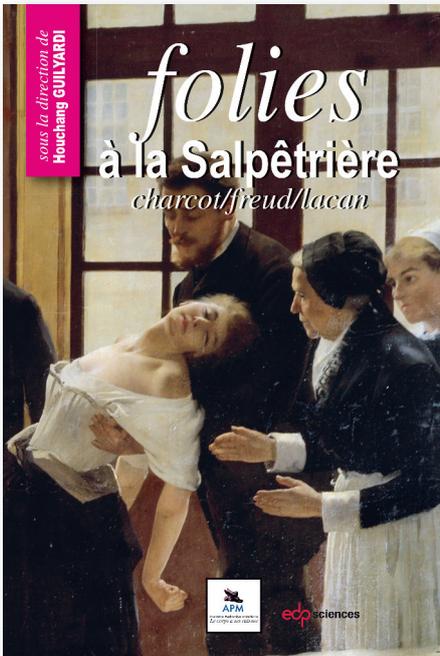
34. Rudra P, Hurst-Hess K, Lappierre P, et al. High levels of intrinsic tetracycline resistance in *Mycobacterium abscessus* are conferred by a tetracycline-modifying monoxygenase. *Antimicrob Agents Chemother* 2018 ; 62 : e00119-18.
35. Rominski A, Roditschke A, Selchow P, et al. Intrinsic rifamycin resistance of *Mycobacterium abscessus* is mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591. *J Antimicrob Chemother* 2017 ; 72 : 376-84.
36. Combrink KD, Ramos AR, Spring S, et al. Rifamycin derivatives active against pathogenic rapidly-growing mycobacteria. *Bioorg Med Chem Lett* 2019 ; 29 : 2112-5.
37. Bastian S, Veziris N, Roux A-L, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm* (41) and *rri* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 ; 55 : 775-81.
38. Richard M, Gutiérrez AV, Kremer L. Dissecting *erm*(41)-mediated macrolide-inducible resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020 ; 64 : e01879-19.
39. Wallace RJ, Meier A, Brown BA, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 ; 40 : 1676-81.
40. Nessar R, Reyra JM, Murray A, et al. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 2011 ; 66 : 1719-24.
41. Kim SY, Kim DH, Moon SM, et al. Association between 16S rRNA gene mutations and susceptibility to amikacin in *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. *Sci Rep* 2021 ; 11 : 6108.
42. Bernut A, Lutfalla G, Kremer L. Regard à travers le danois pour mieux comprendre les interactions hôte/pathogène. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 638-46.
43. Johansen MD, Daher W, Roquet-Banères F, et al. Rifabutin is bactericidal against intracellular and extracellular forms of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020 ; 64 : e00363-20.
44. Dick T, Shin SJ, Koh WJ, et al. Rifabutin is active against *Mycobacterium abscessus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2019 ; 64 : e01943-19.
45. Philley JV, Wallace RJ, Benwill JL, et al. Preliminary results of bedaquiline as salvage therapy for patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. *Chest* 2015 ; 148 : 499-506.
46. Dupont C, Viljoen A, Thomas S, et al. Bedaquiline inhibits the ATP synthase in *Mycobacterium abscessus* and is effective in infected zebrafish. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61 : e01225-17.
47. Le Run E, Arthur M, Mainardi J-L. *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with tedizolid, rifabutin, and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019 ; 63 : e01915-8.
48. Dupont C, Viljoen A, Dubar F, et al. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*: Inhibiting mycolic acid transport in *M. abscessus*. *Mol Microbiol* 2016 ; 101 : 515-29.
49. Raynaud C, Kremer L. Vers un nouvel espoir pour traiter les infections persistantes à *Mycobacterium abscessus* ? *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 691-4.
50. Wu ML, Aziz DB, Dartois V, et al. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discov Today* 2018 ; 23 : 1502-19.
51. Jordan B. Cent ans après, le retour de la phagothérapie ? *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 806-9.
52. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* 2019 ; 25 : 730-3.
53. Dubée V, Soroka D, Cortes M, et al. Impact of β -lactamase inhibition on the activity of ceftazidime against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2015 ; 59 : 2938-41.
54. Richard M, Gutiérrez AV, Viljoen AJ, et al. Mechanistic and structural insights into the unique TetR-dependent regulation of a drug efflux pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol* 2018 ; 9 : 649.
55. Gutiérrez AV, Richard M, Roquet-Banères F, et al. The TetR family transcription factor MAB_2299c regulates the expression of two distinct MmpS-MmpL efflux pumps involved in cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019 ; 63 : e01000-19.

TIRÉS À PART

L. Kremer



Possédées du Malin au Moyen-Âge, les sorcières hystériques sont vouées au bûcher. Enfermées au XVIII^e siècle, maltraitées, elles rejoignent la Cour des Miracles de l'Hospice de la Vieillesse-Femmes à la Salpêtrière... Jusqu'à ce que le Dr Jean-Martin Charcot (1825-1893) mène le combat qui transforme l'ancien hospice en hôpital : l'École de la Salpêtrière de Paris est née, qui devient lieu de recherche, d'enseignement et de soins, de renommée internationale.



ISBN : 978-2-7598-1268-4

240 pages

20 €

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex, France
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Folies à la Salpêtrière : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° _____

Date d'expiration : ____/____/____ N° de contrôle au dos de la carte : ____/____ Signature :

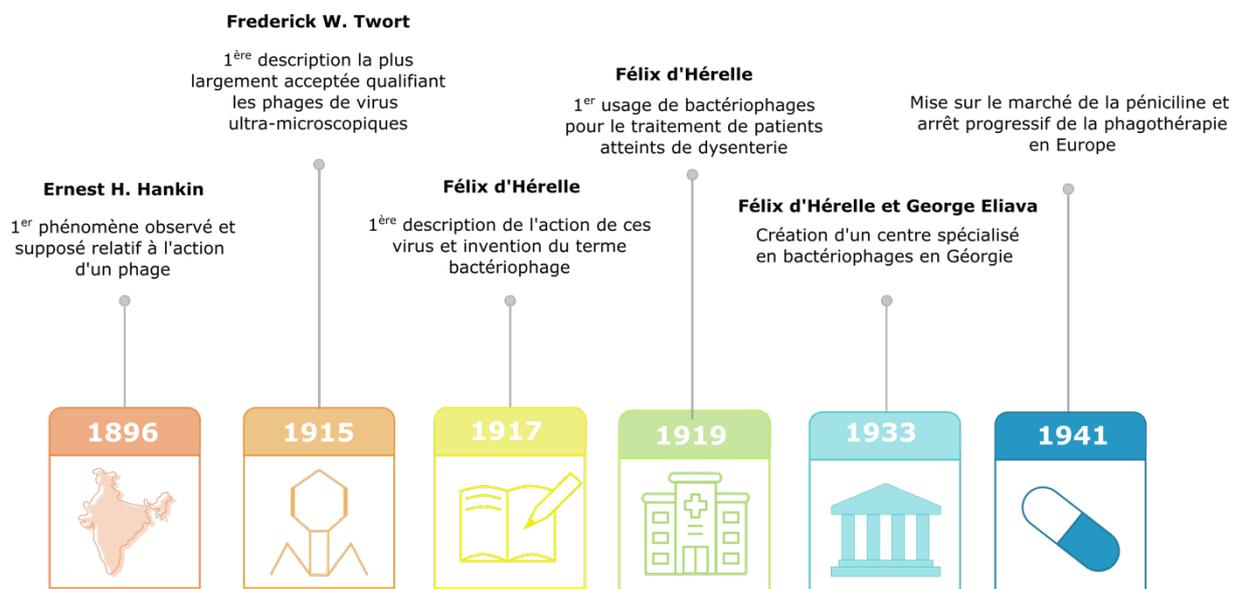


Figure 15. Histoire de la phagothérapie. Adapté de Petrovic Fabijan *et al.* 2023 [131].

Chapitre II. Les mycobactériophages en thérapie

L'utilisation massive d'antibiotiques au cours des dernières décennies a conduit à une augmentation drastique de l'antibiorésistance. Ce phénomène, couplé au manque alarmant de nouveaux antibiotiques, témoigne de la nécessité d'enrichir et de diversifier les approches thérapeutiques [132]. L'usage de bactériophages (ou phages), des virus capables d'infecter et de lyser spécifiquement les bactéries, représente une alternative prometteuse à l'antibiothérapie de longue durée à large spectre et malgré tout trop inefficace contre certains germes. Grâce à leur diversité, les bactériophages représentent un des plus grands réservoirs d'agents antibactériens (plus de 10^{31} phages estimés à la surface de la Terre et comptant 10^8 génomes différents) laissant espérer une découverte perpétuelle de nouveaux phages afin de traiter l'ensemble des infections réfractaires à l'antibiothérapie classique [133,134].

1. Histoire et découverte des bactériophages

La phagothérapie a connu durant les 15 dernières années un essor considérable avec un nombre de cas cliniques en nette augmentation. Toutefois, la découverte de ces virus ainsi que leur utilisation en thérapie ne datent pas d'hier et remontent à la fin du 19^{ème} siècle. Tout commença en 1896 lorsqu'un bactériologiste anglais, Ernest H. Hankin, décrivit l'effet bactéricide des eaux de deux fleuves indiens (Jumna et Ganges) contre l'agent étiologique du choléra (**Figure 15.**) [135]. Il en déduisit la présence d'une substance antiseptique suffisamment petite pour échapper à la filtration des eaux qui, d'après le recul que nous avons à ce jour, pourrait correspondre à la présence d'un ou plusieurs bactériophages spécifiques de *Vibrio cholerae* [135]. Néanmoins, le bactériologiste remarqua une inhibition de l'effet antibactérien lorsque l'eau était portée à ébullition dans des contenants non hermétiques mais une conservation de cet effet lors d'utilisation de tubes hermétiquement fermés. Ces observations, contrairement aux connaissances actuelles sur les bactériophages connus pour être généralement inactivés à de fortes températures, remettent en question la découverte des bactériophages au cours de cette étude [136,137].

Quelques années plus tard, en 1915, Frederick W. Twort décrivit la présence de virus non-pathogènes suffisamment petits pour passer au travers d'un filtre, observations en accord avec celles d'Ernest H. Hankin réalisées près de vingt ans auparavant (**Figure 15.**) [138]. Malheureusement, Twort, qui évoqua ces virus comme ultra-microscopiques, ne put mener son étude à terme par manque de financement [138].

Finalement, c'est à un microbiologiste français, Félix d'Hérelle, que nous devons l'invention du terme bactériophage en 1917, après avoir constaté une corrélation entre la disparition du bacille dysentérique et l'apparition d'un microbe qu'il ne pouvait observer (**Figure 15.**) [139]. Ce microbe présentait des propriétés antagonistes ainsi qu'une spécificité d'action vis-à-vis du pathogène. Ce microbiologiste caractérisa le bactériophage d'obligatoire, au vu de sa dépendance à la bactérie pour se répliquer, et suggéra la possibilité de le faire évoluer, *via* un entraînement connu aujourd'hui sous le nom de « phage training » [139]. F. d'Hérelle proposa alors leur utilisation dans le traitement de patients atteints de dysenterie et contacta, en 1919, le chef de service de pédiatrie de l'hôpital Necker dans le but de traiter les enfants malades (**Figure 15.**) [140]. Une amélioration de l'état global de tous les enfants traités avec les bactériophages fut observée, donnant ainsi naissance à la phagothérapie. Le succès de cet essai initia l'évolution de ce traitement dans le but de cibler différents types d'infections. Ainsi, en association avec les laboratoires Robert et Carrière, F. d'Hérelle mit en vente des ampoules contenant des bactériophages purifiés contre différentes espèces bactériennes (bacté-intesti-phage, bacté-coli-phage, bacté-rhino-phage, bacté-pyo-phage, bacté-staphy-phage) [140]. En 1933, après avoir rencontré de nombreux problèmes de production et de qualité des produits proposés, le microbiologiste répondit favorablement à la demande de son ancien étudiant, George Eliava, souhaitant développer un institut à Tbilissi en Géorgie (**Figure 15.**) [140]. Ce centre, spécialisé en bactériophages, est connu à ce jour comme le centre Eliava et permit à l'époque de développer la production de bactériophages thérapeutiques à plus grande échelle.

Au cours de la seconde guerre mondiale, la phagothérapie continua de gagner du terrain en se développant également en Allemagne et en Amérique [140]. L'année 1941 marqua la fin progressive de la phagothérapie en Europe et le début de l'antibiothérapie avec la mise sur le marché de la pénicilline (**Figure 15.**) [141]. Cet antibiotique, découvert en 1928 par Alexander Fleming, d'une efficacité redoutable sur certaines infections, relaya les phages au second rang [142]. La facilité de production à grande échelle, le large spectre d'action permettant une généralisation du traitement ainsi que la stabilité de la pénicilline confortèrent les pays du bloc de l'Ouest dans leur choix de favoriser l'antibiothérapie [141]. De l'autre côté du rideau de fer, les moyens n'étaient pas suffisants pour développer l'usage des antibiotiques et la phagothérapie continua de se développer, notamment avec la production de phages dans le centre Eliava [143].

En Europe de l'ouest, l'antibiothérapie a remplacé ces virus inobservables aux caractéristiques encore inconnues et semblait être le traitement miracle pour éradiquer les infections bactériennes [140]. Cependant, l'abus et le mauvais usage des antibiotiques a conduit à l'émergence de souches multirésistantes, générant un taux élevé d'échecs thérapeutiques et pouvant aller jusqu'au décès du

patient [144]. Une première évaluation publiée en 2022 aborda l'impact de la résistance aux antimicrobiens sur la santé humaine et estima qu'en 2019, 4,95 millions de décès dans le monde y étaient associés, dont 1,2 millions directement imputables [144]. Dès lors, la quête vers de nouvelles stratégies thérapeutiques a débuté afin de contourner ces résistances et pallier au manque de nouveaux antibiotiques, remettant au goût du jour l'usage thérapeutique des bactériophages.

2. Etablissement de la phagothérapie

A la différence de la phagothérapie pour tous initiée par Félix d'Hérelle, la phagothérapie actuelle a pour objectif de traiter les patients en échecs thérapeutiques en leur fournissant une médecine personnalisée [145]. Un des piliers de la phagothérapie réside dans l'ultra-spécificité des phages vis-à-vis de l'espèce, voire de la souche bactérienne, avec pour principal avantage de limiter l'impact néfaste du traitement sur la flore du patient [143]. Néanmoins, cet atout représente également un frein au développement de traitements généralisés qui pourrait être contourné par l'usage d'association de phages dans certains cas. Diverses banques regroupant des bactériophages préalablement caractérisés commencent à voir le jour afin de proposer de manière optimale ces cocktails thérapeutiques.

Chaque phagothèque est unique de par les phages qu'elle contient et possède une taille variable dépendante de paramètres tels que la diversité génétique des protagonistes (phages et pathogènes à traiter) ou les déterminants de leurs interactions [145]. Concernant le pathogène *S. aureus* multirésistant aux antibiotiques et responsable d'infections nosocomiales, 20 à 30 phages suffiraient pour constituer une banque active contre la majorité des souches cliniques [146]. A l'inverse, les bactériophages identifiés contre *Acinetobacter baumannii* présentent une action bien plus limitée qui doit être contrebalancée par une population de virions plus variée au sein de la banque [147]. Par conséquent, l'utilisation de cocktails thérapeutiques établis a été proposée pour des espèces ciblées par des phages à large spectre [145]. Cependant, pour des espèces ciblées par des phages au spectre d'action limité (ex : *A. baumannii* ou *M. abscessus*) ou contre les infections polymicrobiennes la mise en place d'un traitement généralisé ne semble pas être possible pour le moment et souligne l'importance d'un travail en amont afin d'adapter continuellement le traitement proposé.

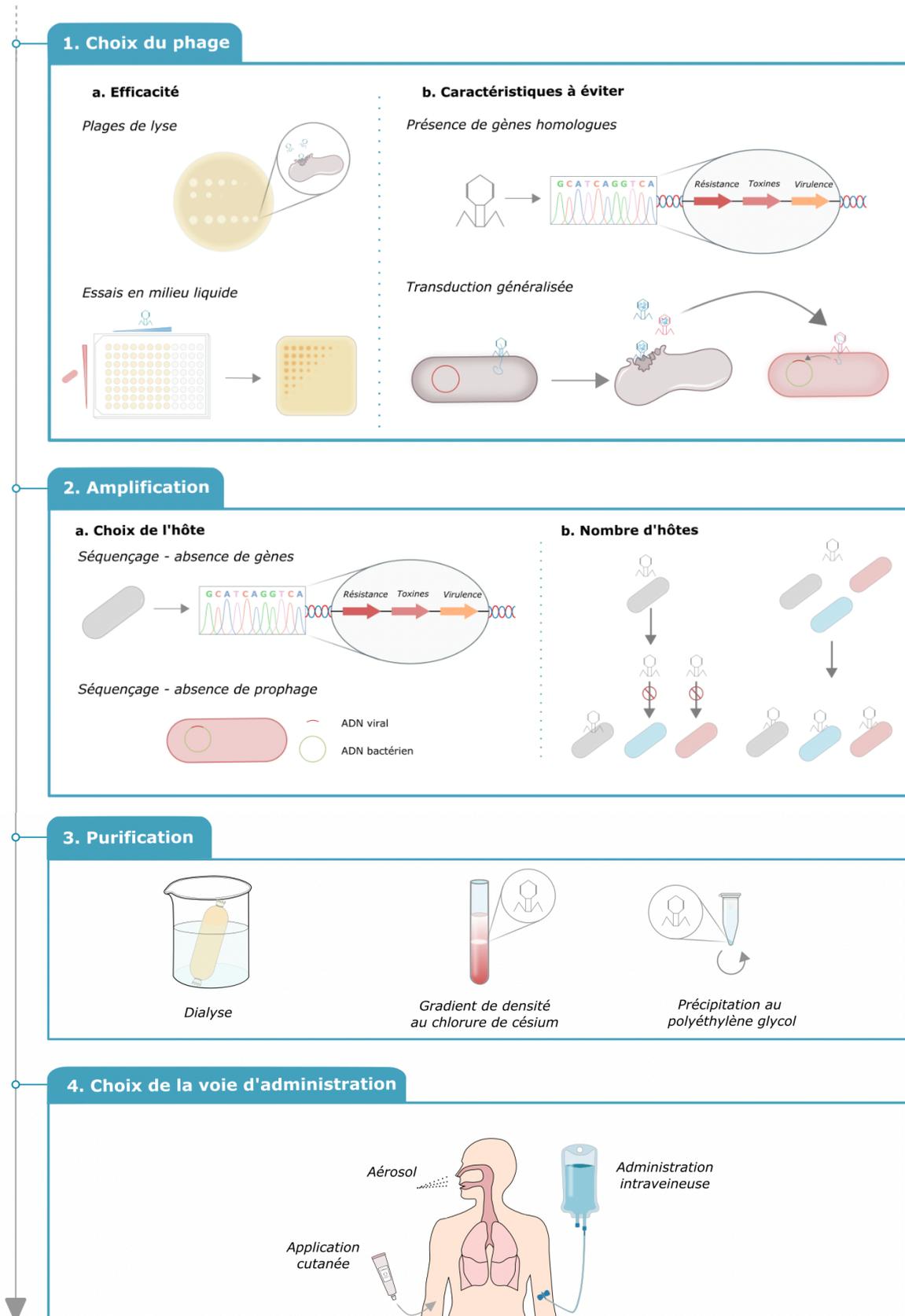


Figure 16. Stratégie thérapeutique. Quatre étapes principales sont nécessaires pour mener à bien une

a. Choix des phages thérapeutiques

Dès lors, la mise au point de techniques rigoureuses et reproductibles pour prédire l'efficacité du phage en conditions d'infection, bien qu'elle n'en soit qu'à ses prémices, doit devenir une priorité. En premier lieu, la caractérisation et le choix des phages vis-à-vis de la bactérie sont des éléments clés à prendre en considération lors de l'établissement du traitement (**Figure 16.**) [148]. Il est important de déterminer si un phage est lytique, c'est-à-dire capable d'infecter et de lyser la bactérie, ou s'il est lysogénique (phage tempéré) et par conséquent, intégrera son génome au sein de celui de la bactérie [143]. Pour ce faire, la méthode des plages de lyse sur milieu gélosé (dilutions en série de phages déposées à la surface d'un tapis bactérien en croissance dans un « top agar ») ou les essais en milieu liquide sont les méthodes les plus couramment utilisées afin de vérifier l'activité de phages sur la souche pathogène (**Figure 16.**) [149]. La première technique, bien qu'associée à une lecture purement subjective, présente l'intérêt d'être rapide, peu onéreuse et permet d'évaluer l'efficacité du phage (« efficiency of plating » ou EOP). Elle offre la possibilité d'étendre la batterie de bactériophages à disposition en induisant, au sein d'une plage de lyse, la génération de mutants résistants spontanés [149]. Ces souches devenues résistantes (voir **Chapitre III. 4.**) obligent le phage à évoluer afin de contrecarrer la propagation de la bactérie [150]. Ce phénomène de co-évolution, qualifié de « course à l'armement » et largement rencontré dans l'environnement, permet généralement une lyse efficace de la souche parentale et du mutant résistant par le phage au champ d'action ainsi élargi [150]. En dépit des nombreux avantages qu'elles présentent, ces méthodes sont critiquables du fait de l'absence de normalisation de divers paramètres (milieu utilisé, température d'incubation, densité d'inoculum de la bactérie, etc.) pouvant induire un biais dans l'interprétation des résultats [145].

En outre, des méthodes supplémentaires doivent être exploitées pour valider le phage en tant qu'agent thérapeutique, l'efficacité de ce dernier n'étant pas suffisante pour en faire un bon candidat. Des séquençages du génome entier permettent de vérifier l'absence de séquences homologues à des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques, des toxines ou encore des facteurs de virulence au sein du génome phagique (**Figure 16.**) [151–153]. Ces analyses visent à éviter le choix de phages induisant la production de substances toxiques lors de leur amplification, ce qui irait à l'encontre de la thérapie et pourrait être délétère pour le patient.

Dans ce sens, la capacité du phage à effectuer une transduction généralisée, c'est-à-dire le transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par recombinaison homologue [154], est également à écarter lors de sa sélection en tant qu'agent thérapeutique. Lors d'infections polymicrobiennes, par exemple, ce phénomène pourrait conduire à des transferts de gènes codant pour la résistance ou la virulence des souches et complexifier l'infection (**Figure 16.**) [155]. Ce processus, bien que peu probable pour des

Figure 16. phagothérapie chez un patient. La première étape consiste à choisir le phage selon son efficacité *via* la méthode des plages de lyse (tapis bactérien sur lequel des dilutions en série de phages sont déposées) ou des essais en milieu liquide (incubation de bactéries et de phages à différentes concentrations qui sont par la suite déposées sur milieu gélosé) ou selon certaines caractéristiques intrinsèques au phage à bannir. Un séquençage global doit être réalisé pour s'assurer de l'absence de gènes pouvant coder la production de substances toxiques. L'incapacité du phage à réaliser des transductions généralisées est également à vérifier. La seconde étape repose sur l'amplification du phage avec un hôte de choix permettant de limiter la production de toxines ou de débris immunogènes lors de la lyse bactérienne pour faciliter la suite du processus de production. Pour ce faire, un séquençage du génome entier va permettre de déterminer la présence de certains gènes ou de prophages qui doivent être proscrits. Par simplicité, une souche saprophyte est conseillée même si l'utilisation d'un unique hôte semble limiter le champ d'action du phage. Ainsi, le nombre d'hôtes d'amplification est également à adapter lors de la recherche d'un phage à large spectre. La troisième étape repose sur une purification du lysat produit selon différentes méthodes après amplification servant à éliminer les débris bactériens. Enfin, la suspension phagique peut être administrée aux patients *via* une des trois voies d'administration utilisées et à adapter en fonction de la pathologie.

phages lytiques, a toutefois été observé dans certaines conditions d'infection [155]. Théoriquement, lors de l'action d'un phage lytique, le génome de l'hôte est fortement dégradé jusqu'à être lysé, inhibant alors la production de bactéries ayant intégré ce gène au sein de leur génome. Cependant, des travaux sur le phage T4, spécifique des souches d'*Escherichia coli*, ont démontré une augmentation de l'aptitude du phage à effectuer des transductions généralisées suite à l'acquisition de mutations [156,157]. Bien que les risques soient mineurs et dépendants des conditions, l'évolution du phage aboutissant à des complications n'est pas à exclure et montre l'importance de vérifier régulièrement l'évolution des phages utilisés.

b. Amplification des bactériophages

Après sélection, les phages sont soumis à une amplification basée sur le processus de réplication des phages au sein de l'hôte bactérien, qui sera détaillée par la suite (voir **Chapitre III. 3.**). Le choix de l'hôte d'amplification, comme celui du phage, va être décisif et doit répondre à différents critères. Lorsque cela est possible, un séquençage global est réalisé afin d'éviter la présence de prophages, c'est-à-dire de génomes phagiques intégrés au sein de celui de l'hôte, ou de gènes codants pour des facteurs de virulence, par exemple. Leur présence pourrait engendrer la contamination du lysat par la libération, lors de l'étape de lyse bactérienne, de particules dérivées du prophage ou d'endotoxines nuisibles pour la thérapie [158–160]. L'utilisation d'une souche saprophyte telle que *M. smegmatis* est donc à favoriser et a fait ses preuves pour l'isolation et l'amplification de la majorité des mycobactériophages recensés et utilisés à ce jour en thérapie contre *M. abscessus*. Cette espèce présente également l'avantage d'être facile à cultiver avec un temps de génération plus court que les souches à traiter [161].

Néanmoins, certaines études suggèrent que l'utilisation d'un hôte unique lors de l'isolation et l'amplification du phage serait à l'origine de son spectre d'action limité (nombre d'espèces ou de souches efficacement lysées par un même phage), bien que la possibilité d'isoler des phages à large spectre à partir d'un seul hôte ait été également démontrée [162–165]. Ainsi, ces travaux proposent l'utilisation d'hôtes multiples afin d'accroître les chances d'isoler des phages à large spectre et soulignent l'importance du mode d'isolation et d'amplification [165]. Au vu des résultats variables générés par ces méthodes, P. Yu *et al.* ont cherché à démêler le vrai du faux en comparant la diversité des hôtes infectés en fonction de trois méthodes d'isolation et d'amplification des bactériophages [166,167]. Les auteurs ont montré l'importance de séparer les hôtes lors d'amplifications à hôtes multiples pour amplifier les phages de manière séquentielle. Ils suggèrent également la nécessité d'une séquence circulaire d'hôtes afin de conserver l'EOP initiale, les séquences linéaires semblant réduire l'EOP finale (**Figure 17.**) [167]. En dépit du fait que l'utilisation d'hôtes multiples présente l'avantage d'élargir la gamme d'action du phage, cette méthode génère un risque supérieur de libérer dans le lysat des substances à éliminer lors de l'étape de



Figure 17. Amplification à hôtes multiples. A. Amplification à partir d'une séquence circulaire d'hôtes.

Le stock de phages est déposé sur un tapis bactérien et les plages de lyse ainsi formées sont utilisées pour isoler le phage amplifié. Ce phage, capable d'infecter efficacement et de lyser le premier hôte (vert), est incubé en milieu liquide avec un second hôte (marron) puis sera déposé sur un tapis bactérien de ce même hôte pour isoler les phages efficaces. Ce processus peut être répété autant de fois que souhaité jusqu'à utiliser le premier hôte comme dernier hôte d'amplification. **B. Amplification à partir d'une séquence linéaire.** Processus similaire à l'amplification sur une séquence circulaire à la différence de l'utilisation d'un nouvel hôte pour l'isolation finale. Adapté de Yu *et al.* 2016 [167].

purification. Par conséquent, le choix du ou des hôtes sont des étapes à entreprendre au préalable afin d'avoir à portée de main un protocole établi permettant de limiter les contraintes et les risques tout en réduisant le coût de production.

c. Purification

Bien que toutes les précautions soient prises pour limiter la présence de substances potentiellement immunogènes (débris ou toxines libérés lors de la lyse), une étape de purification est nécessaire et doit répondre à des normes essentielles de pureté et de stérilité pour produire des phages à usage thérapeutique sans pour autant affecter leur efficacité ou leur concentration [168]. Différentes méthodes sont disponibles, telles que la purification par dialyse, par gradient de densité au chlorure de césium ou la précipitation au polyéthylène glycol (PEG) (**Figure 16.**) [169]. Le choix de la méthode à utiliser doit être fait en tenant compte de ses avantages et de ses inconvénients, de l'usage souhaité et des recommandations, la FDA (« Food and Drug Administration ») ayant établi une limite maximale de 5 EU/kg/h (EU : Unité d'endotoxine) lors d'administration intraveineuse [169,170]. La famille du phage peut également influencer le résultat (diminution du taux d'endotoxines, concentration finale de phages), expliquant la variabilité qui peut être observée lors de la purification de deux phages ciblant un même pathogène [169]. Parmi les différentes techniques existantes, le gradient de densité au chlorure de césium est proposé comme la méthode la plus prometteuse (pureté obtenue et faible impact sur la concentration en phage), bien qu'elle présente l'inconvénient de laisser, au sein de la préparation, des résidus de césium délétères à fortes doses [169]. Une étude *in vitro* avait mis en évidence une diminution de l'efficacité virale après son usage [171]. Toutefois, cette méthode a permis la purification de phages ayant éradiqué des souches de *M. abscessus* chez des patients qui valide son utilisation pour la préparation de phages thérapeutiques [172–174].

d. Administration du traitement phagique

Au terme de cette préparation, le traitement est prêt à être délivré selon une voie d'administration adaptée à la pathologie rencontrée [175]. Comme tous les antimicrobiens, un adressage au plus proche du site infectieux va permettre d'éviter leur dégradation [176,177]. A ce jour, différentes voies d'administration bien tolérées sont proposées : applications locales favorisées lors d'infections cutanées, aérosols pour des infections pulmonaires ou encore injections intraveineuses autorisant un adressage aux sites infectieux difficiles d'accès (**Figure 16.**) [145,178,179]. La diversité des voies d'administration couplée à la capacité unique de multiplication des phages au centre du foyer bactérien va permettre de réduire, voire d'éradiquer l'infection [178]. Toutefois, cette production intense et concentrée de phages

va entraîner une lyse bactérienne dense qui risque, à terme, de libérer un taux anormalement élevé d'endotoxines. Cet évènement, rapporté lors de l'action de certains antibiotiques bactéricides et aboutissant à des chocs toxiques, n'a cependant jamais été rencontré lors de phagothérapies [180]. L'absence de ce phénomène pourrait s'expliquer par la multiplication séquentielle des bactériophages produisant un effet bactériolytique sur la durée et donc une libération moindre d'endotoxines sur un court laps de temps, en comparaison aux antibiotiques bactéricides [181].

Par conséquent, ces différentes étapes clés que nous venons d'évoquer constituent les bases de la mise en place d'une phagothérapie et devront, au cours des prochaines années, faire l'objet de standardisations et de recherches approfondies dans le but d'élargir le panel de bactériophages thérapeutiques à disposition du clinicien.

e. Etapes supplémentaires pour optimiser le traitement

i. Mettre à profit les combinaisons (phages ou phage-antibiotique)

Des précautions supplémentaires peuvent également être envisagées afin d'optimiser le traitement proposé. Parmi celles-ci, la préparation de cocktails phagiques est suggérée pour limiter l'induction de résistance, augmenter dans certains cas l'efficacité et cibler un spectre d'hôtes plus large, en particulier lors d'infections polymicrobiennes [182–184]. Lors de l'utilisation de plusieurs phages, des effets antagonistes peuvent être rencontrés et sont à proscrire par des vérifications préalables en laboratoire [185]. Par ailleurs, la combinaison de traitements telle que l'antibiothérapie couplée à la phagothérapie est proposée pour améliorer l'action indépendante de chacun bien que des interactions antagonistes puissent aussi exister [186–188]. L'antibiotique, par exemple, pourrait cibler un élément de la bactérie essentiel pour l'adhésion ou la réplication du phage. Dans ce contexte, l'action synergique de la kanamycine (inhibiteur de la synthèse des protéines) pouvant altérer la réplication des phages avec le phage Φ HP3 contre une souche d'*E. coli* était inattendue et démontre l'importance de vérifications préalables en laboratoire [189].

La classe de l'antibiotique, bien qu'importante, ne régirait pas l'effet synergique ou antagoniste que peut générer ce type d'association. Ainsi, pour deux antibiotiques de la même classe, leur combinaison avec un même bactériophage pourrait déboucher sur des effets en opposition (synergie pour l'un et antagonisme pour l'autre), la difficulté de prévoir ces derniers ne se limitant pas seulement au choix du couple phage-antibiotique [189]. En effet, la concentration de chaque protagoniste jouerait un rôle central dans la réponse observée et ainsi, pour un même couple, plusieurs effets pourraient être

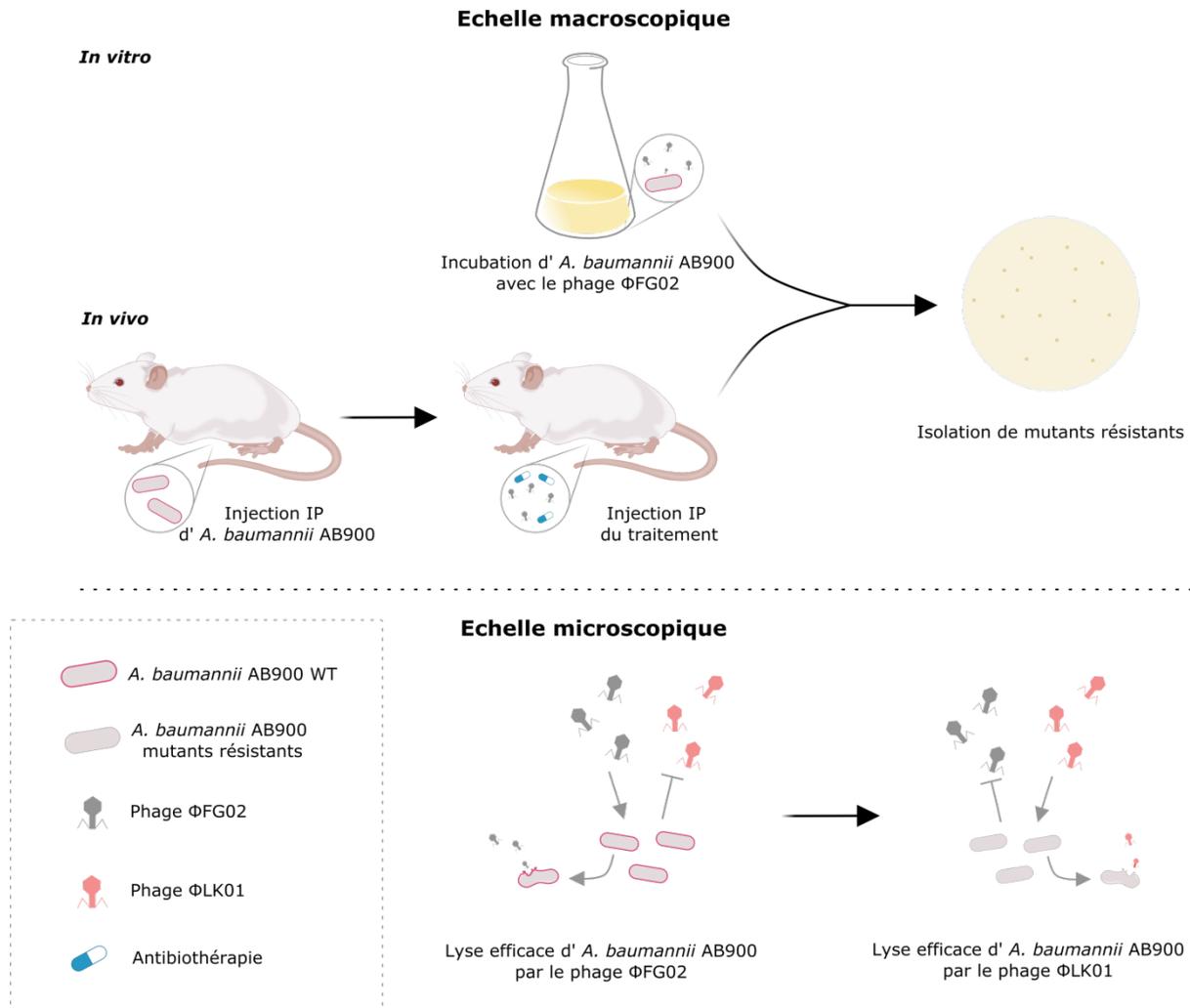


Figure 18. Génération de mutants résistants *in vitro* et *in vivo*. Echelle macroscopique. La souche *A. baumannii* AB900 est incubée en culture liquide avec le phage Φ FG02. La culture est ensuite étalée sur boîte pour isoler les résistants. En parallèle, AB900 est inoculée chez la souris par voie intrapéritonéale (IP) suivie d'injections IP d'antibiotiques et du phage Φ FG02. Les bactéries sont ensuite extraites et déposées sur milieu gélosé pour isoler les résistants. Ces résistants sont similaires (mutations au sein de mêmes gènes) que l'isolation soit réalisée *in vitro* ou *in vivo*. **Echelle microscopique.** La souche initialement sensible au phage Φ FG02 lors de leur mise en contact est résistante au phage Φ LK01. Suite à l'incubation en culture ou chez le modèle murin, la souche mute dans des gènes codants pour la synthèse ou le transport de la capsule (contour rose). Ce défaut de production de capsule (absence du contour rose) entraîne une résistance de la souche au phage Φ FG02 mais une nouvelle sensibilité au phage Φ LK01.

rencontrés [189]. Pour illustration, le traitement de la souche *E. coli* JJ2528 par le phage Φ HP3 avec la ciprofloxacine peut induire des effets synergiques tout comme des effets antagonistes en fonction des concentrations utilisées [189]. Il a également été rapporté que cette association permettrait d'atténuer certaines résistances aux antibiotiques et inhiberait des résistances intrinsèques à la souche parentale [189,190]. Par exemple, une souche d'*A. baumannii* a montré une résistance au phage Φ FG02 *in vitro* et *in vivo* suite à l'acquisition de mutations spontanées induisant la perte de production et d'export de la capsule (**Figure 18.**) [190,191]. Ces mutants ont exhibé une sensibilité accrue à certains antibiotiques (ceftazidime et imipénème) ainsi qu'au phage Φ LK01, inefficace contre la souche parentale (**Figure 18.**). Ces travaux dénoncent l'importance de la combinaison des traitements et laissent envisager un cocktail thérapeutique utilisant les phages Φ FG02 et Φ LK01 contre *A. baumannii* AB900 afin de contrecarrer un potentiel échec dû à l'émergence de résistances [190].

Ces différents exemples exposent l'importance d'expériences préalables en laboratoire et suggèrent qu'une résistance propre à la souche parentale ne détermine pas les résistances de la souche émergente.

ii. Modifications génétiques des bactériophages

La quête perpétuelle d'optimisation dans le but de fournir un traitement efficace pour le plus grand nombre et avec un minimum d'effets secondaires ne s'arrête pas là. De récentes études se sont penchées sur la possibilité de modifier génétiquement des phages et notamment leur queue afin d'augmenter leur spectre d'hôtes et de limiter l'émergence de résistances [192]. Concernant le phage T3, par exemple, les auteurs ont suggéré le clonage d'un gène codant pour une protéine de la queue déterminante dans la spécificité des interactions entre le phage et ses souches cibles [192]. L'usage d'oligonucléotides dégénérés pour l'amplification par ACP de ce gène a permis d'induire des mutations aléatoires et ainsi de produire une batterie de plasmides contenant des versions mutées du gène en question. Après transformation des plasmides dans la souche d'*E. coli* et recombinaison dans le génome du phage T3 suite à l'infection, une large diversité de nouveaux virions a été obtenue [192]. Cette étude a révélé la possibilité d'accroître le nombre de phages à disposition par des modifications génétiques s'inspirant des mécanismes d'évolution naturels. Les auteurs proposent également qu'un nombre limité de cocktails de phages modifiés pourrait suffire à éradiquer les résistances dues à la modification du récepteur par la bactérie.

En somme, la phagothérapie pour certaines bactéries telles que *E. coli* semble en bonne voie, grâce à la découverte de phages à large spectre et à des outils d'amélioration constamment rapportés [193,192].

Ces avancées doivent, par conséquent, inspirer des futures recherches sur des pathogènes émergents ou pour lesquels les recherches sont limitées. En effet, l'usage de phages contre les mycobactéries n'en est qu'à ses débuts et est marqué par l'absence de mycobactériophages à large spectre ainsi que par le nombre de phages à disposition, notamment concernant *M. abscessus* qui sera détaillé par la suite [158,174]. Dans ce contexte, le développement de techniques de modifications moléculaires est nécessaire pour élargir la gamme de mycobactériophages disponibles et a déjà fait ses preuves dans le traitement de patients au cours de récents travaux.

3. Utilisation de phages modifiés contre *M. abscessus*

a. Première thérapie phagique contre *M. abscessus*

La publication en 2019 d'une étude princeps rapportant l'usage de mycobactériophages génétiquement modifiés dans le traitement d'une patiente infectée par une souche de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, marque les premiers pas de la phagothérapie contre *M. abscessus* [174]. Cette patiente âgée de 15 ans et atteinte de mucoviscidose (homozygote pour la mutation $\Delta F508$) présentait les comorbidités suivantes : une insuffisance pancréatique, du diabète et une maladie hépatique liée à la mucoviscidose. Au cours de sa vie, la patiente a été chroniquement infectée par des souches de *P. aeruginosa* et *M. abscessus* pour lesquelles elle a été traitée pendant huit années. Malgré la prescription d'un modulateur CFTR, ses capacités respiratoires ont décliné, ce qui entraîna, six mois plus tard, l'ajout de la patiente sur la liste d'attente pour une greffe. A la suite d'une transplantation pulmonaire bilatérale, des immunosuppresseurs ont été prescrits afin d'éviter un rejet, ainsi qu'une antibiothérapie par voie intraveineuse pour contrer les infections bactériennes. L'apparition d'importants effets secondaires amena les médecins à arrêter l'administration d'antibiotiques, laissant place au développement d'une infection à *M. abscessus* (rougeurs au niveau des incisions chirurgicales et isolation de la souche dans les expectorations). Malgré la reprise rapide d'un régime antibiotique renforcé, la dissémination de l'infection après la transplantation n'a pas été empêchée. L'état de la patiente déclinant quotidiennement a conduit sa famille à demander, à titre compassionnel, l'ajout d'une phagothérapie n'ayant jamais fait ses preuves contre *M. abscessus*. La souche GD01 isolée chez la patiente a été utilisée pour cribler une large banque de mycobactériophages établie avec la participation d'étudiants dans un programme de recherche nommé SEA-PHAGES (« Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science ») [194]. Ce programme, dont le but est d'initier des étudiants du monde entier à des techniques variées de microbiologie (isolation et caractérisation), a permis de constituer au cours du

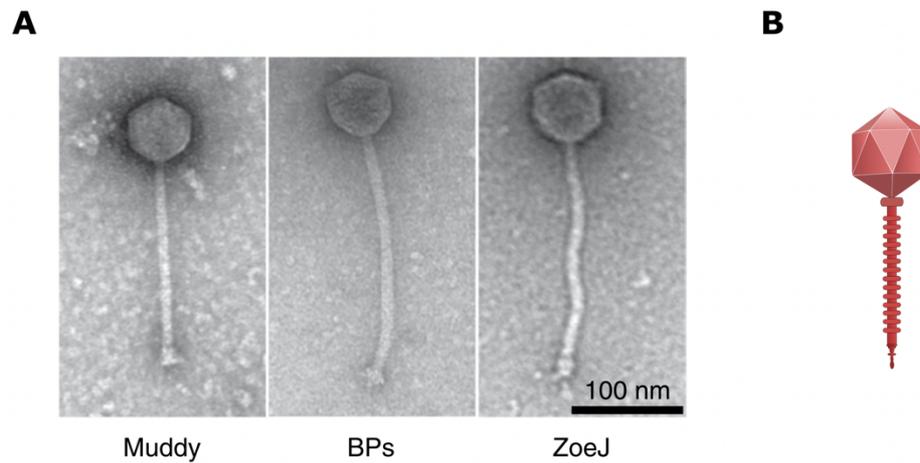
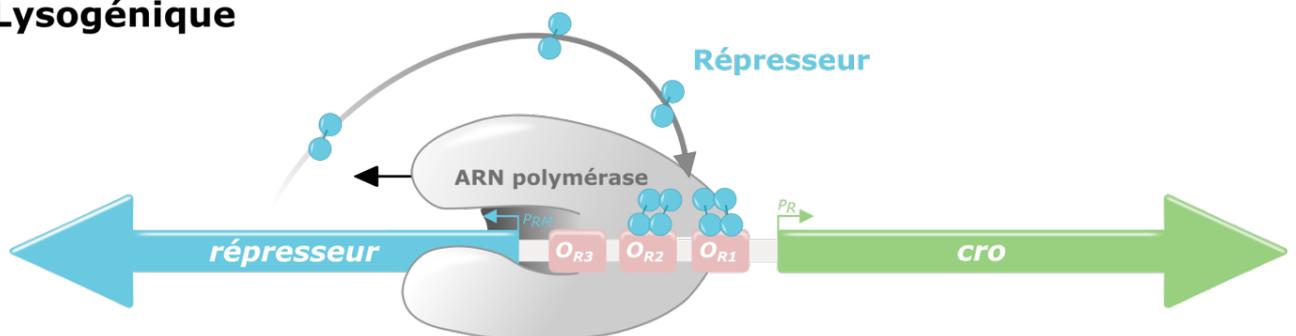


Figure 19. Mycobacteriophages. A. Microscopie électronique de trois mycobactériophages thérapeutiques. D'après *Dedrick et al.* 2019 [174]. B. Représentation schématique d'un mycobactériophage.

Lysogénique



Lytique

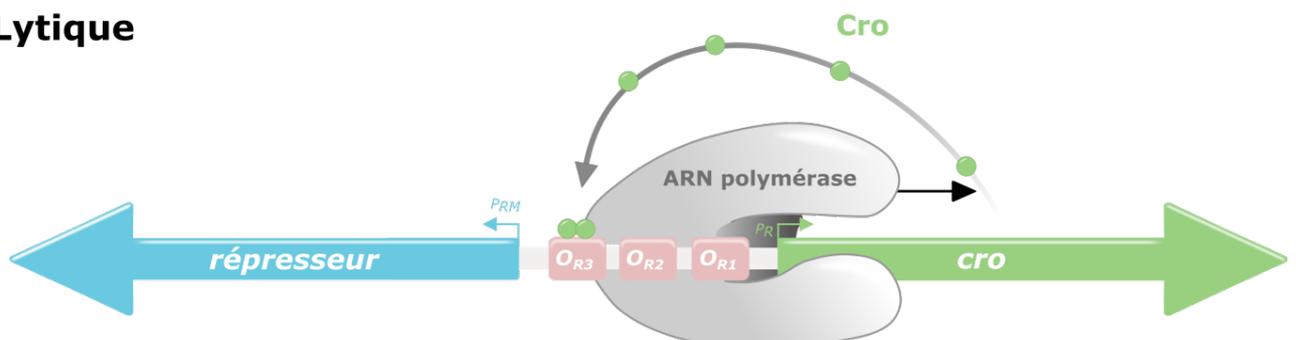


Figure 20. Rôle du répresseur dans le cycle phagique, exemple du phage λ . Lors d'un cycle lysogénique, le répresseur va occuper préférentiellement deux opérateurs adjacents (« operator right » ou O_{R1} et O_{R2})

temps une phagothèque comptant plus de 23 000 mycobactériophages génétiquement divers (<https://phagesdb.org>). Parmi les phages actifs vis-à-vis de la souche GD01, un premier phage désigné Muddy a été sélectionné par la méthode des plages de lyse (voir **Chapitre II. 2**) (**Figure 19.**) [174]. Découvert en 2010 à la suite d'un prélèvement sur une aubergine en décomposition et isolé à partir de la souche saprophyte *M. smegmatis* mc²155 (<https://phagesdb.org>), Muddy présente une activité lytique [174]. Au contraire, deux autres phages également isolés à partir de la souche *M. smegmatis* mc²155, ZoeJ et BPs, présentent la capacité d'infecter sans pour autant lyser GD01. Ces phages formant des plages turbides sur milieu gélosé, caractéristiques des phages lysogéniques, ont été rendus lytiques par des modifications génétiques en laboratoire [174].

La méthode de recombinaison par bactériophage de l'ADN électroporé (« Bacteriophage Recombineering of Electroporated DNA » ou BRED) a été utilisée dans le but de générer, par recombinaisons homologues, un dérivé lytique nommé ZoeJ Δ 45 [195,196]. Cette approche, reposant sur la co-électroporation de l'ADN du phage avec un substrat préalablement synthétisé, au sein d'une souche *M. smegmatis* induite pour des fonctions recombinantes, a permis la délétion non marquée du gène 45 [195,196]. Ce gène code pour le répresseur contrôlant le passage d'un cycle lysogénique à un cycle lytique (**Figure 20.**) [197,198]. Cette délétion oblige le phage à suivre un cycle lytique entraînant ainsi une infection et une lyse efficace de GD01 [174,195].

Comme ZoeJ, un dérivé lytique de BPs avait préalablement été généré avec la méthode BRED par mutation au sein du gène 33 codant pour le répresseur transcriptionnel [196,199]. Toutefois, en opposition à la délétion totale du gène chez ZoeJ, une mutation ciblée du motif hélice-coude-hélice (« helix-turn-helix » (HTH)) a été suffisante pour produire un phage lytique. Ce motif, responsable de la liaison du répresseur à l'ADN lors de la transcription, inhibe l'induction du phage dans un cycle lysogénique [200]. Néanmoins, au vu de sa capacité d'infection modeste vis-à-vis de l'isolat clinique GD01, l'optimisation en laboratoire ne s'arrêta pas là. Les auteurs mirent à profit les mécanismes de co-évolution rapportés précédemment (voir **Chapitre II. 2.**) pour générer des mutants de la gamme d'hôte capables de pallier ces défauts d'infection [174]. Ces nouveaux phages, BPs Δ 33HTH_HRM1 et BPs Δ 33HTH_HRM10, ont montré une efficacité de lyse accrue en comparaison au phage parental BPs Δ 33HTH vis-à-vis de GD01. Le séquençage de ces mutants a révélé la mutation d'une base dans le gène portail 3 (C2083T chez BPs Δ 33HTH_HRM1 et A2695G chez BPs Δ 33HTH_HRM10), induisant une substitution d'acide aminé dans la protéine du même nom (R66W et N270D). Douze copies de cette protéine, ordonnées en forme d'anneau, composent un complexe situé à une extrémité de la capsid (enveloppe protéique aussi appelée tête du phage) (**Figure 21.**), indispensable du fait de sa directe implication dans toutes les étapes de l'assemblage du

Figure 20. et va ainsi activer la transcription de son propre gène et inhiber celle du gène *cro*. Dans un cycle lytique en revanche, la protéine Cro va se lier à O_{R3} afin d'inhiber la transcription du répresseur et ainsi favoriser celle du gène *cro*. Adapté de Ptashne 2011 [198].

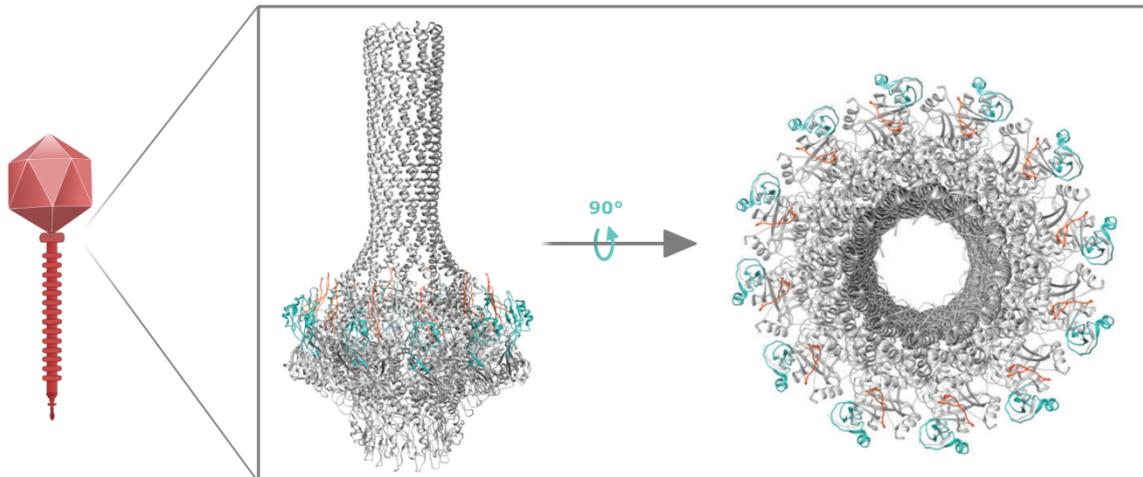


Figure 21. Localisation et structure du complexe portail. Ce complexe se compose de douze copies de la protéine portail et sert à la jonction entre la capsid (tête) et la queue du phage. Visualisation de profil/extérieur (gauche) ou de l'intérieur (droite) du complexe. Structures tirées de Dedeo, Cingolani, et Teschke 2019 [201].

phage (voir **Chapitre III. 3. c. iii.**) [201]. Ainsi, l'introduction de ces mutations spontanées chez le phage BPs Δ 33HTH renforcent son activité lytique bien qu'aucune étude supplémentaire n'ait été menée pour décortiquer ce mécanisme [174,201].

Par conséquent, le phage BPs Δ 33HTH_HRM10 vient s'ajouter aux phages Muddy et ZoeJ Δ 45 sur la liste des candidats thérapeutiques pour traiter ce cas d'infection [174]. En revanche, indépendamment de leur efficacité d'infection et de lyse, ces phages ont fait l'objet d'une caractérisation approfondie afin d'établir le traitement adapté à la pathologie de la patiente et éviter, entre autres, des interactions antagonistes (voir **Chapitre II. 2**). Lors d'expériences *in vitro*, les phages ZoeJ Δ 45 et BPs Δ 33HTH_HRM10 se sont montrés inefficaces à faibles concentrations tandis qu'une virulence importante du phage Muddy face à la souche pathogène a été observée, en dépit de la concentration choisie [174]. Ces expériences ont également pointé de possibles résistances de la souche bactérienne en présence du cocktail phagique, inhibant l'action de BPs Δ 33HTH_HRM10 et ZoeJ Δ 45 et induisant une sensibilité partielle de GD01 à Muddy. Malgré ces résultats nuancés, les trois phages, de par leurs différentes natures et leurs facultés à lyser GD01, représentaient des candidats prometteurs pour l'établissement d'un protocole thérapeutique.

S'en est suivie une administration quotidienne par voie intraveineuse d'une dose de 10^9 PFU (« plaque-forming unit » c'est-à-dire nombre de particules virales capables de lyser leur hôte et former des plaques par unité de volume) de phages, en complément de l'antibiothérapie. Les deux premiers jours qui suivirent la première administration, le traitement généra sueurs et rougeurs chez la patiente mais aucun épisode fébrile ou changement à l'examen physique ne fut remarqué. Aucun effet secondaire important ne vint s'ajouter et les premiers effets favorables apparurent un mois après le début de la thérapie. L'unique lésion cutanée ayant reçue, en addition de l'administration intraveineuse, une application topique de phages présenta une guérison plus avancée. Les bénéfices de cette application amenèrent les praticiens à ajouter cette voie de traitement aux autres lésions. Six mois plus tard, des améliorations des fonctions pulmonaires et hépatiques furent constatées et couplées à l'absence de *M. abscessus* dans les expectorations de la patiente.

Malgré de faibles concentrations de phages identifiées dans différents échantillons biologiques (expectorations, écouillons de plaies, fèces), une augmentation des taux dans le sang fut observée, concordant avec les capacités de répllication des virus lors de l'infection et confirmant ainsi leur efficacité thérapeutique. Cette importante quantité de phages dans le sang n'a induit qu'une très faible proportion d'anticorps dirigés contre des protéines de phage (sous-unités de la capsidie ou de la queue), sans pour autant être neutralisants. De plus, l'absence de résistance aux phages des divers isolats prélevés au cours

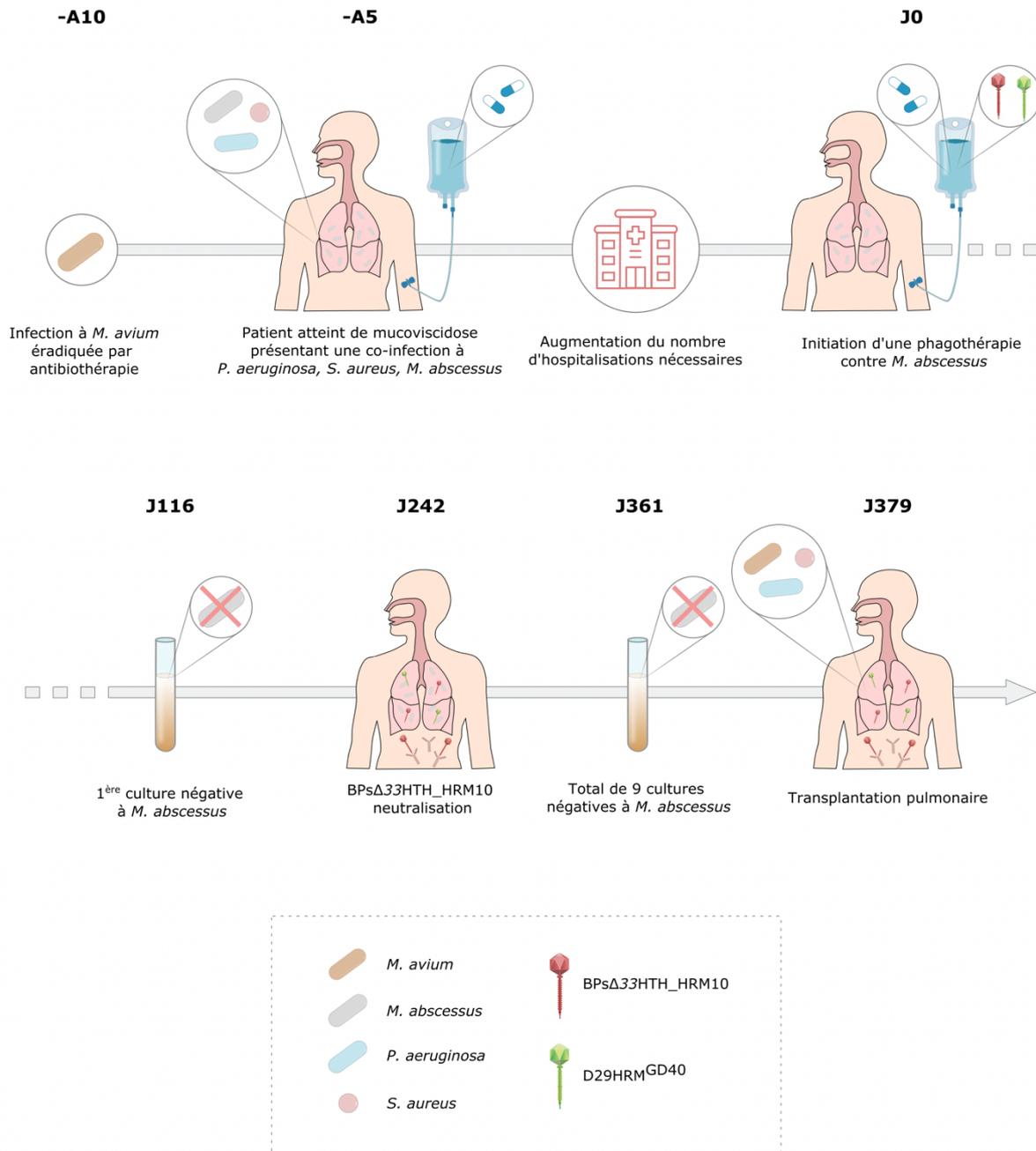


Figure 22. Cas clinique d'un patient atteint de mucoviscidose traité par phagothérapie contre une infection pulmonaire à *M. abscessus* et ayant développé des anticorps dirigés contre un des phages. Dix ans avant le début de la phagothérapie (-A10), le patient avait favorablement été traité par antibiothérapie contre une infection à *M. avium*. Cinq ans plus tard (-A5), le patient présentait une

du traitement, contrairement aux observations *in vitro*, conforta le rôle de ces virus dans cette amélioration clinique inespérée [174]. Par conséquent, malgré le succès de ce cas clinique, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les risques d'échec liés aux différents phénomènes observés (production d'anticorps et émergence de résistances). De nouvelles études cliniques doivent également permettre d'appuyer ou de contredire les résultats de ces premiers travaux afin de faire évoluer cette voie thérapeutique pour contrer les infections aux MNT réfractaires à l'antibiothérapie.

b. Usage compassionnel de mycobactériophages thérapeutiques contre *M. abscessus*

i. Production d'anticorps neutralisants lors de la phagothérapie

Une étude publiée en 2022 a relaté le cas d'un patient de 26 ans atteint de mucoviscidose (mutation H199Y/2184insA du gène codant pour la protéine CFTR) avec une bronchiectasie avancée [202]. Le patient présentait des infections chroniques de souches multirésistantes aux antibiotiques de *P. aeruginosa* ainsi que de *S. aureus* résistantes à la méthicilline, auxquelles est venue s'ajouter une infection pulmonaire causée par une souche rugueuse de *M. abscessus* subsp. *abscessus* (**Figure 22.**). Cinq ans auparavant, le patient avait déjà été la cible d'une infection à une MNT (*M. avium*) efficacement traitée par antibiothérapie (**Figure 22.**). Par conséquent, l'établissement d'un régime thérapeutique similaire semblait tout indiqué pour tenter d'éradiquer l'infection à *M. abscessus*. Néanmoins, cette souche, isolée en 2016 d'une expectoration du patient et présentant un gène *erm(41)* intact (voir **Chapitre I. 5.**), resta réfractaire au traitement et persista dans les poumons. Le déclin des fonctions pulmonaires et l'aggravation des signes radiologiques couplés à l'impossibilité d'avoir recours à la transplantation conduisirent à une demande de phagothérapie à titre compassionnel (**Figure 22.**) [202]. Le phage BPsΔ33HTH_HRM10, utilisé dans le cocktail auparavant mentionné, et le phage D29_HRM^{GD40}, un dérivé du phage lytique D29 isolé de la souche clinique *M. abscessus* GD40, furent sélectionnés au vu de leur aptitude à lyser efficacement la souche *in vitro* (**Figure 22.**) [174,202]. Bien que des clones soumis aux phages persistent sur milieu gélosé, aucune résistance ne fut constatée, justifiant leur choix en tant qu'agents thérapeutiques. Après 116 jours de phagothérapie, la première culture négative fut prélevée, à laquelle huit autres vinrent s'ajouter au cours des 245 jours de traitement qui suivirent (**Figure 22.**). Neuf cultures négatives sur les dix échantillons récoltés furent obtenues bien que des co-infections à *S. aureus* et *P. aeruginosa*, connues pour réduire la sensibilité de détection de *M. abscessus*, puissent remettre en cause leur validité. Après initiation de la phagothérapie, la quantification moléculaire de l'ADN de *M. abscessus* par rapport à l'ADN total contenu dans les expectorations du patient ainsi que la détection du LAM (voir **Chapitre I. 4. a.**) [87] dans les urines du patient comme indicateur de lyse

Figure 22. co-infection à *P. aeruginosa* (bleu), *S. aureus* (rose) et *M. abscessus* (gris) pour laquelle il fut traité par antibiothérapie (voie intraveineuse). L'antibiothérapie ne fonctionnant pas, le nombre d'hospitalisations du patient augmenta fortement et amena à une réévaluation du traitement. A l'antibiothérapie furent ajoutés deux mycobactériophages, BPsΔ33HTH_HRM10 (rouge) et D29HRM^{GD40} (vert), administrés par voie intraveineuse. Après 116 jours de traitement (J116), la première culture négative à *M. abscessus* fut obtenue. Suite à 242 jours de traitement (J242), le phage BPsΔ33HTH_HRM10 fut considérablement neutralisé *in vitro* par des anticorps spécifiques produits par le patient au cours du traitement. Ces anticorps n'ont cependant pas altéré l'efficacité du traitement. Finalement, neuf cultures sur les dix récoltées après 361 jours de traitement (J361) furent négatives pour *M. abscessus*, autorisant le recours à la transplantation pulmonaire.

bactérienne confortèrent les observations précédentes. En accord avec les recommandations de la « CF foundation » et « European CF Society » [203], l'obtention récurrente de cultures négatives confortée par des analyses supplémentaires initia l'ajout du patient sur liste d'attente pour une transplantation pulmonaire.

Environ un an après avoir débuté l'usage de phages thérapeutiques, le patient reçut sa greffe. L'analyse de l'organe remplacé mit en évidence la présence de souches de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et de *M. avium* tandis qu'aucune souche de *M. abscessus* ne fut décelée (**Figure 22.**). En outre, aucun signe d'une infection disséminée à *M. abscessus* ne fut rapporté au cours des examens, suggérant une éradication totale de l'infection malgré la présence non négligeable d'anticorps anti-phages dans le sérum du patient. Étonnamment, au vu de leur détection avant l'initiation de la phagothérapie, l'existence de ces anticorps serait la conséquence d'un contact antérieur de l'individu avec un phage relativement similaire à ceux composant le cocktail. Néanmoins, la production tardive d'anticorps spécifiques au phage BPs Δ 33HTH_HRM10 et limitant considérablement son action *in vitro* ne fut pas suffisante pour altérer l'efficacité du traitement. Dans ce sens, l'évolution des souches au cours de la thérapie n'eut également aucun impact sur les performances des phages. En dépit d'une augmentation non négligeable de la résistance aux antibiotiques avant la phagothérapie, celle-ci stagna à l'ajout du traitement phagique et aucune résistance vis-à-vis de ces nouveaux acteurs n'émergea, en accord avec les résultats préliminaires obtenus *in vitro*.

Par conséquent, le succès rencontré dans le traitement de ces deux cas d'infections à *M. abscessus* suggère que tous les ingrédients sont à portée de main pour développer et tenter de généraliser cette stratégie thérapeutique contre des infections aux MNT persistantes. Toutefois, les méconnaissances actuelles sur les diverses interactions des phages avec la bactérie ou encore avec l'hôte entravent grandement les prédictions d'efficacité du traitement. L'observation de certains voyants au rouge lors de l'établissement de la stratégie thérapeutique, telle la faible concentration d'anticorps neutralisant dans le sérum du patient, ne devrait pas, au vu du cas précédent, brider la mise en place d'une phagothérapie [202]. D'autres cas sont toutefois nécessaires pour valider ces observations et mieux comprendre le rôle de l'immunité tout en dévoilant des limites potentielles à surpasser pour faire évoluer les traitements.

ii. Vue d'ensemble et développement

Le cas princeps de 2019 traité par trois phages thérapeutiques semble avoir déclenché un nouvel engouement pour la phagothérapie qui revient au-devant de la scène et ouvre de nouvelles perspectives d'espoir pour les nombreux patients infectés par des MNT et en échecs thérapeutiques. Par conséquent,

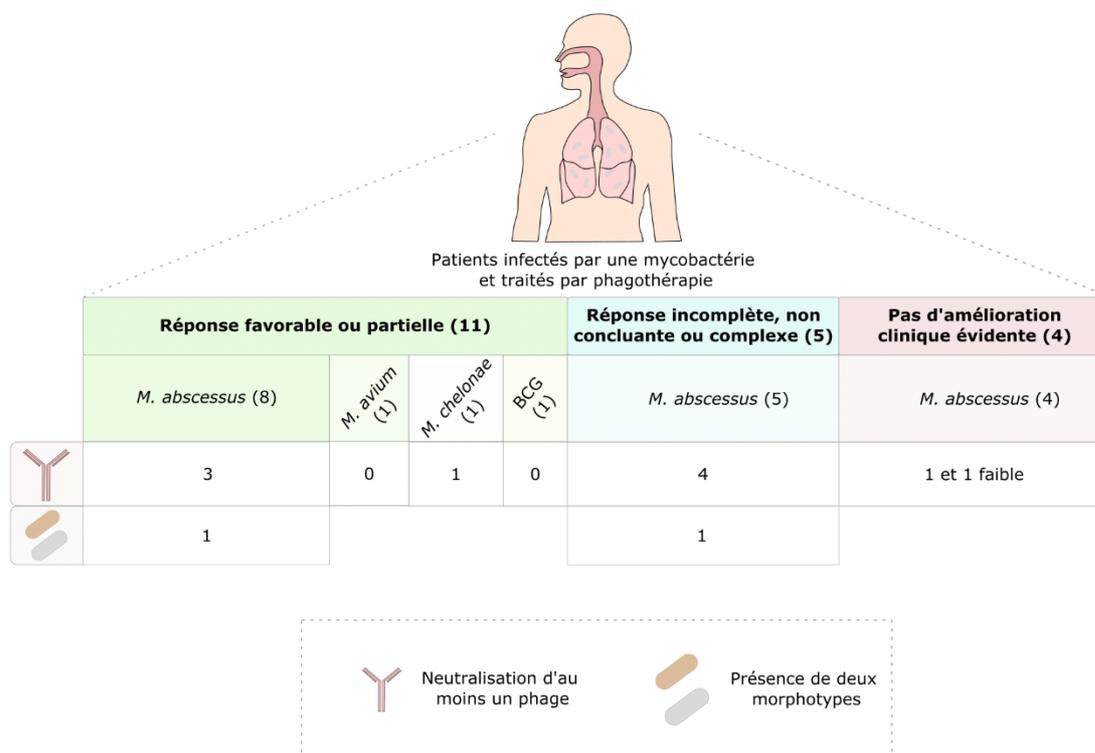


Figure 23. Cas de vingt patients infectés par une mycobactérie et traités par phagothérapie. Parmi les 20 cas évalués, 11 présentèrent une réponse favorable ou partielle au traitement proposé dont huit pour des infections à *M. abscessus*, un pour une infection à *M. avium*, un pour une infection à *M. chelonae* et un pour une infection au Bacille de Calmette et Guérin (BCG). Quatre patients (trois cas de *M. abscessus* et un cas de *M. chelonae*) exhibèrent une production d'anticorps neutralisant contre au moins un phage administré sans altération de l'efficacité du traitement. Un seul cas d'infection avec deux morphotypes (lisse et rugueux de *M. abscessus*) fut rapporté chez ces 11 patients. Parmi ces 20 patients, cinq individus infectés par *M. abscessus* affichèrent une réponse incomplète au traitement dont quatre cas de neutralisation d'au moins un phage par des anticorps du patient qui pourraient expliquer le manque d'efficacité du traitement. Un cas de population mixte avec les variants R et S isolés fut recensé. Enfin, quatre patients ne montrèrent aucune amélioration clinique à la suite du traitement bien qu'un seul présenta une production d'anticorps neutralisant contre au moins un phage. Un patient présenta également une faible réponse à au moins un phage.

les auteurs des études précédentes reçurent, au cours des trois années qui suivirent la parution de l'étude princeps, pas moins de 200 demandes de phagothérapie à usage compassionnel. Toutefois, la personnalisation de chaque traitement n'offre qu'un accès limité aux patients répondant à des critères préétablis [173]. Seulement 20 patients, dont 17 cas d'infections à *M. abscessus* (incluant les deux cas précédemment mentionnés), un cas d'infection à *M. chelonae*, un cas d'infection à *M. avium* et un cas d'infection au Bacille de Calmette et Guérin (BCG), ont été inclus dans une nouvelle étude [173]. Parmi eux, 11 patients présentèrent une réponse favorable ou partielle au traitement phagique : une conversion négative des cultures couplée à des améliorations sur le plan clinique ou radiologique après six à huit semaines de phagothérapie pour une réponse favorable, ou la validation d'un seul de ces critères pour une réponse partielle (**Figure 23.**). Malgré ces résultats encourageants ou positifs, quatre patients succombèrent à des co-infections rappelant l'importance d'en évaluer les risques et de poursuivre les traitements adaptés aux autres pathogènes.

Néanmoins, la présence de populations mixtes (plusieurs morphotypes d'une même souche) lors d'infections aux MNT peut également freiner le succès de la thérapie. Une étude publiée en 2023 rapporte, parmi les 11 cas favorablement traités, celui d'un patient infecté par *M. abscessus* (**Figure 23.**) pour lequel les morphotypes R et S ont été isolés, la souche R dérivant de la S suite à l'acquisition d'une mutation dans un gène codant pour la synthèse des GPL. Malgré les fortes probabilités d'isoler une souche arborant un morphotype S (voir **Chapitre II. 3. c. i.**), un seul cas parmi les 11 positifs mentionnés présenta une infection par une population mixte (S et R). Pour ce cas minoritaire, un seul phage, qui plus est, inactif contre la souche responsable de l'infection chronique fut sélectionné sur l'isolat R tandis qu'aucun phage efficace contre la S n'a été découvert. Cet unique phage permit tout de même des améliorations cliniques et une conversion négative des cultures de la souche virulente malgré une persistance de la souche S. Cet exemple semble néanmoins être un cas à part et non généralisable au vu de l'échec thérapeutique rencontré chez un autre patient infecté par une population mixte de *M. abscessus* subsp. *massiliense* [173]. La stratégie thérapeutique, reposant sur une antibiothérapie associée à l'usage d'un phage dirigé contre la souche R, aboutit à un isolement constant de cultures positives et dévoila une des limites actuelles de la phagothérapie chez *M. abscessus*. En effet, l'inefficacité rencontrée contre les souches S lors du traitement des patients associée à la capacité de ces souches à passer du morphotype S au morphotype R met en avant un obstacle considérable. Une meilleure appréhension de l'importance de ce phénomène (insensibilité des souches S aux phages actuellement à disposition) ainsi que la découverte de nouveaux phages sera par conséquent déterminante pour la mise au point d'une thérapie efficace.

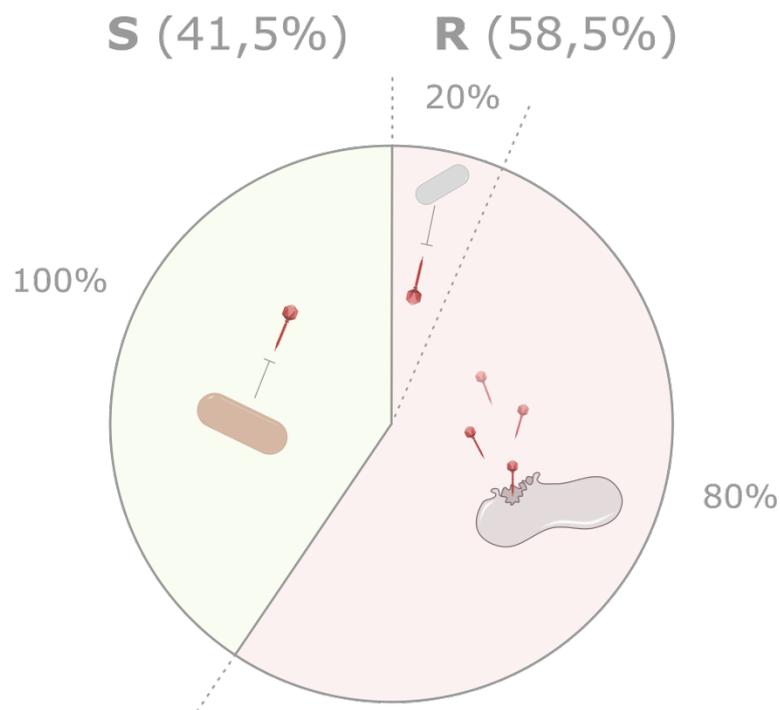


Figure 24. Proportion du morphotype lisse et du morphotype rugueux dans les isolats cliniques recensés. 41,5% des isolats présentent un morphotype lisse (S) (vert) et aucun de ces isolats n'est sensible aux phages testés. Pour les souches rugueuses (R) (rose), seulement 20% ne sont pas efficacement lysées par un phage tandis que 80% des souches sont sensibles à au moins un phage. Pourcentages de souches R et S d'après Dedrick, Smith, *et al.* 2021 [158].

c. Limites rencontrées

i. Spectre d'action des phages à disposition

Une étude menée sur 82 isolats cliniques provenant de 78 patients de nationalités différentes montra, malgré la virulence accrue décrite pour les souches R, une proportion non-négligeable d'infections causées par des souches S (41,5% des souches analysées) (**Figure 24.**) [158]. Les capacités d'infection et de lyse de huit phages, dont certains avaient déjà fait leurs preuves en tant qu'agents thérapeutiques, ont été évaluées sur ces souches montrant une capacité des virus à infecter 80% des souches cliniques R [173,174,202]. A l'inverse, aucune souche S ne montra de sensibilité à l'action lytique des phages bien que 23% d'entre elles étaient infectables par les phages Faith1 et Itos. Par conséquent, la découverte de nouveaux mycobactériophages pour contrer les infections mixtes ou chroniques causées par des variants S est à promouvoir et devrait faire l'objet de recherches actives au cours des prochaines années. Une hypothèse avancée quant à l'absence de phages actifs contre ce morphotype est l'utilisation d'une espèce distincte, avec la souche *M. smegmatis* utilisée comme souche de référence pour isoler les phages [204]. Cette hypothèse exige des études plus approfondies pour comprendre les raisons expliquant l'absence de phages dirigés contre la forme environnementale *M. abscessus* S bien que la souche saprophyte utilisée présente également à sa surface des GPL. Le traitement des souches arborant un morphotype R présente aussi certaines difficultés. L'éradication de ces infections peut être complexifiée et retardée par le manque de phages à disposition ainsi que l'absence de phages à large spectre d'hôte. Malgré l'efficacité des phages utilisés dans les différentes études, leur ultra-spécificité et leur faible nombre représentent un frein considérable à la généralisation des traitements [174]. Pour exemple, aucun phage isolé sur la souche *M. smegmatis* mc²155 n'avait permis de traiter un patient infecté par une souche de *M. abscessus* désignée GD02 réfractaire à l'antibiothérapie. Toutefois, une nouvelle tentative d'isolation de phages, cette fois-ci réalisée sur GD02, avait permis de découvrir le phage Elmo. Un mutant présentant une efficacité supérieure, Elmo_HRM^{mc2155}, avait pu être généré lors de travaux ultérieurs sur *M. smegmatis* mc²155. Malheureusement, le patient décéda le temps d'établir le protocole de traitement [174]. Cet exemple, rarement rapporté mais souvent rencontré, dénonce la nécessité d'un travail de fond à l'aide d'isolats cliniques existants pour entraîner les phages déjà isolés mais aussi afin d'en découvrir de nouveaux dirigés contre les souches encore réfractaires à la phagothérapie et ainsi élargir le traitement à davantage de patients.

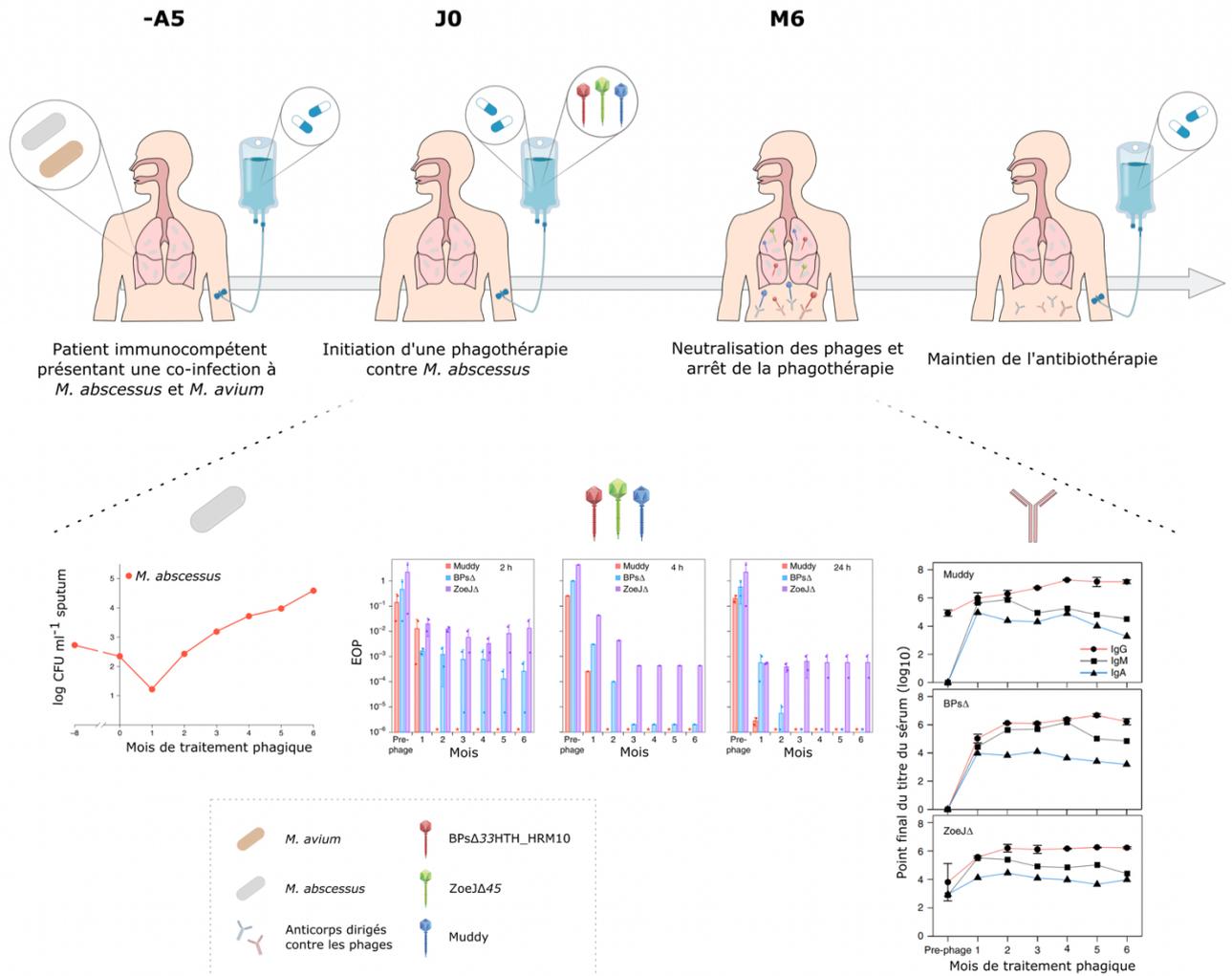


Figure 25. Cas d'un patient en échec thérapeutique dû à la neutralisation des phages administrés par la production d'anticorps neutralisant. Un patient immunocompétent avait contracté une co-infection à *M. avium* et *M. abscessus* pour laquelle il fut traité par antibiothérapie durant cinq ans (-A5). L'antibiothérapie étant en échec, une phagothérapie composée de trois phages fut initiée. Muddy (bleu), ZoeJΔ45 (vert) et BPsΔ33HTH_HRM10 (rouge) furent administrés quotidiennement par voie intraveineuse. Au cours du premier mois, une importante baisse de la charge bactérienne fut observée (graphique situé à gauche) mais l'infection reprit, allant jusqu'à dépasser la charge bactérienne initiale au bout de six mois de traitement. Au cours de la thérapie, une importante production d'anticorps fut observée contre les trois phages (graphiques situés à droite) induisant leur neutralisation (graphiques au centre). La neutralisation des phages rendant le traitement inefficace entraîna l'arrêt de la phagothérapie. L'antibiothérapie bien qu'inefficace fut poursuivie. Graphiques tirés de Dedrick *et al.* 2021 [205].

ii. Les anticorps neutralisants

Les échecs thérapeutiques rapportés durant des phagothérapies contre *M. abscessus* ont mis en exergue des mécanismes de défense intrinsèques à l'individu (production d'anticorps neutralisants). En effet, bien que la production faible et tardive d'anticorps dirigés contre les phages n'ait pas eu de conséquences alarmantes pour les cas précédents, l'évaluation de la réaction immunitaire sur le sérum de 17 patients a montré une neutralisation importante d'au moins un phage chez neuf patients, après une administration par voie intraveineuse (**Figure 23.**) [173,174,202]. Cette neutralisation des phages, plus ou moins rapide, semble avoir contribué, pour certains patients, à une baisse d'efficacité du traitement sans pour autant l'altérer en totalité.

Néanmoins, l'inhibition totale de la thérapie avec une action antagoniste du système immunitaire a été rapportée pour un patient âgé de 81 ans, immunocompétent et atteint de bronchiectasie (**Figure 25.**) [205]. Ce dernier avait expérimenté cinq années d'antibiothérapie pour contrer une co-infection à *M. avium* et *M. abscessus*. La résistance des souches à ce type d'antimicrobien nécessita de consolider le traitement existant avec l'ajout d'une phagothérapie. Les fortes similarités de séquence entre l'isolat R de *M. abscessus* subsp. *massiliense* désigné GD82 et la souche GD01 (cas princeps) facilitèrent le choix des phages, au regard des sensibilités comparables au traitement ayant fait ses preuves en 2019 (**Figure 25.**) [174,205].

Durant le premier mois, le régime antibiotique fut modifié afin d'abroger les effets secondaires rencontrés et d'améliorer l'activité antimicrobienne contre la souche de *M. avium* insensible aux phages utilisés. Sur cette période, une réduction d'un facteur dix de la charge bactérienne liée à l'infection par *M. abscessus* fut observée dans les expectorations du patient, soulignant la force de ce traitement (**Figure 25.**). Une reprise importante de l'infection engendra une augmentation de la charge bactérienne six mois après le début de la phagothérapie (**Figure 25.**). Les échantillons prélevés présentèrent la même sensibilité vis-à-vis des phages Muddy et BPs Δ 33HTH_HRM10 que le premier isolat et seulement une faible résistance occasionnelle à ZoeJ Δ 45, écartant la possibilité d'une évolution de la bactérie pour contrer l'attaque phagique. Aucune résistance supplémentaire aux antibiotiques ne vint s'ajouter, excluant l'inaction des traitements comme source d'échec.

Finalement, une forte réponse humorale associée à la production d'anticorps spécifiques dirigés contre les phages fut décelée, pouvant expliquer l'inefficacité du traitement (**Figure 25.**). Avant de le débiter, le patient ne présentait aucune réponse à BPs Δ 33HTH_HRM10. Cependant, une production faible à modérée d'IgG dirigés contre des protéines de Muddy et ZoeJ Δ 45 avait été observée, suggérant la possibilité d'un contact antérieur du patient avec des phages similaires à Muddy et ZoeJ Δ 45. Au cours des

deux ou trois mois suivants, la réponse immunitaire dirigée contre les phages s'accroît, avec une augmentation des taux d'IgG, d'IgM et d'IgA sériques. Cette production d'anticorps fut suffisante pour réduire, au moins partiellement, l'activité lytique des phages après seulement deux heures d'incubation avec *M. abscessus* (**Figure 25.**). Des durées d'incubation supérieures entraînent une réduction accrue de l'efficacité du phage BPsΔ33HTH_HRM10 qui s'explique par la forte affinité de certains anticorps pour sa protéine gp17, protéine mineure de la queue qui serait impliquée dans l'interaction du phage avec la bactérie. De la même façon, la production d'anticorps spécifiques des protéines mineures de la queue du phage ZoeJΔ45, gp18 et gp21, fut observée (**Figure 25.**). Enfin, Muddy, troisième acteur du cocktail et exhibant la plus forte efficacité lytique *in vitro*, fut drastiquement inhibé en moins de deux heures d'incubation par des IgG dirigés contre le tube de la queue, des sous-unités de liaison de la capsid ou encore des protéines mineures de la queue (**Figure 25.**). En conséquence, au vu du statut immunitaire du patient et du manque d'efficacité des phages, la phagothérapie fut suspendue et le régime antibiotique maintenu.

Cette étude présente un cas rare dont l'évolution n'aurait, d'après l'expérience passée, pu être prédite. L'adolescente infectée par GD01 n'avait montré aucun signe de neutralisation des phages par des anticorps qui pourrait s'expliquer par sa mise sous immunosuppresseurs pour empêcher le rejet de la greffe pulmonaire [174]. Considérant ces premiers résultats, les traitements immunosuppresseurs utilisés suite à des transplantations pourraient prévenir l'émergence d'anticorps neutralisant anti-phage ce qui contribuerait à réduire les échecs thérapeutiques malgré les risques de favoriser la progression de l'infection.

iii. Les voies d'administration

La voie d'administration peut également impacter la réponse de l'hôte aux phages. Par exemple, la voie intraveineuse est décrite comme favorisant le développement d'une forte réponse immunitaire en comparaison à une application topique [206]. Bien qu'il s'agisse d'une voie de choix pour administrer le traitement de manière prolongée et permettre un apport aux zones difficiles d'accès, il serait préférable, lors d'utilisation de cocktails de phages, de les administrer en série ou de manière discontinue afin d'éviter leur neutralisation synchrone [205]. Comme mentionné précédemment, les patients immunocompétents semblent être plus enclins à développer une réponse neutralisante vis-à-vis des phages, ce qui contribue à l'échec thérapeutique [205]. La mise en place d'études préalables est essentielle pour développer et adapter les traitements afin de limiter leurs risques. Cependant, la présence antérieure au traitement de faibles concentrations d'anticorps dirigés contre les phages ne devra en aucun cas représenter un frein à

l'établissement de la thérapie comme l'ont montré les différents cas cliniques abordés précédemment [173].

Enfin, le bon déroulement du traitement peut également être mis à mal et être impacté de manière encore inconnue par de nombreuses variabilités telles que le régime antibiotique prescrit, les doses ou encore la voie d'administration. Par conséquent, l'usage encore nouveau et limité des mycobactériophages en thérapie requiert une analyse poussée des déterminants d'une phagothérapie efficace afin de mieux appréhender les limites pouvant être rencontrées. C'est pourquoi, cette branche de recherche nécessite également le développement de modèles précliniques pertinents.

4. Modèles précliniques

Dans le but de répondre aux nombreuses questions en suspens sur les facteurs régissant l'efficacité de la phagothérapie contre les infections bactériennes, diverses études, développant et utilisant des modèles animaux connus pour mimer les symptômes rencontrés chez l'Homme, ont récemment vu le jour [207]. La majorité des données disponibles sur la phagothérapie proviennent de ces travaux bien qu'elles ne puissent remplacer les observations faites chez l'Homme, au regard des nombreuses caractéristiques propres à chaque individu [208]. Ces méthodes doivent être exploitées afin de valider *in vivo* l'efficacité thérapeutique des traitements proposés, préalablement ou simultanément à l'administration chez le patient et, ainsi, permettre d'optimiser perpétuellement le traitement en dévoilant de potentiels facteurs limitant [208].

a. Efficacité de la phagothérapie dans les modèles *in vivo*

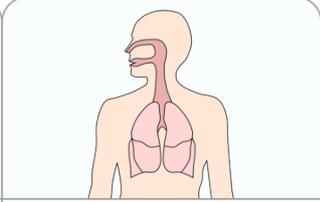
Différents modèles invertébrés tels que le nématode (*Caenorhabditis elegans*), la mouche commune des fruits (*Drosophila melanogaster*) et la teigne de cire (*Galleria mellonella*), ou des modèles vertébrés comme la poule (*Gallus gallus*), le lapin (*Oryctolagus cuniculus*), le hamster (*Mesocricetus auratus*), le ZF (*Danio rerio*) et la souris (*Mus musculus*) sont à ce jour utilisés pour déterminer l'efficacité de la phagothérapie *in vivo* [209].

Parmi eux, le modèle murin représente le modèle le plus répandu et de prédilection au vu des fortes similarités qu'il partage avec l'Homme. Toutefois, il ne peut convenir à l'évaluation de la virulence et, par conséquent, de l'efficacité des traitements contre tous les pathogènes en raison de sa résistance naturelle

à certains [210,211]. Lors d'infections à *S. aureus*, par exemple, ce modèle est naturellement insensible. En revanche, le lapin est, tout comme l'Homme, sensible à ce pathogène et semble, par conséquent, être un modèle plus représentatif de ces infections [212]. Des lignées transgéniques peuvent également être utilisées afin d'adapter le modèle et mimer davantage les conditions rencontrées chez les patients [210]. De ce fait, la vaste diversité des modèles disponibles aujourd'hui, avec leurs différences physiologiques ou anatomiques, doit être exploitée afin d'ajuster le choix du modèle au pathogène à traiter, au but de l'étude (rôle de l'immunité innée ou adaptative, sensibilité à l'infection, etc.) ou encore aux fonds mis à disposition [210,213].

Une étude menée sur le modèle murin a permis de comparer l'efficacité de trois voies d'administration (intramusculaire, sous-cutanée, intrapéritonéale) d'une même dose de phages pour contrer une infection à *P. aeruginosa* [214]. Les souris, préalablement fragilisées par brûlure et infectées par une injection sous-cutanée de *P. aeruginosa*, sont plus efficacement traitées par l'administration intrapéritonéale (100% de survie des souris après 48h d'infection) en comparaison des deux autres voies (56% de survie suite à 48h d'infection), en dépit de l'absence de toxicité des phages quelle que soit la voie d'administration [214,215]. Néanmoins, la voie intrapéritonéale, bien que routinière pour des expériences chez la souris, semble plus délicate pour une injection quotidienne chez les patients et illustre une limite quant à la transposition chez l'Homme des résultats obtenus [216].

L'utilisation de ces modèles a pour principal but de confirmer ou de réfuter des résultats provenant d'expériences *in vitro* afin de les extrapoler et permettre, lorsque cela est possible, de prédire le succès de la phagothérapie chez l'Homme. Des études portant spécifiquement sur l'établissement de traitements et la coopération phage-antibiotique dans l'éradication de l'infection ont été menées sur différents pathogènes et modèles. Parmi celles-ci, une étude publiée en 2021 a rapporté une augmentation de l'activité du phage Muddy et d'antibiotiques contre la souche clinique *M. abscessus* GD01 lors de leur combinaison *in vitro* [217]. Un antibiotique de la classe des rifamycines, la rifabutine (RFB), est la molécule qui a montré la plus forte efficacité *in vitro* en combinaison avec Muddy contre la souche GD01 et dont l'efficacité a également été évaluée dans le modèle ZF [65,217]. Des larves CFTR déficientes, mimant les mécanismes d'immunopathogénèse rencontrés dans la mucoviscidose, furent infectées par injection de la souche GD01 dans la veine caudale puis traitées quotidiennement *via* une administration intraveineuse de phages et/ou une balnéation pour l'antibiothérapie [217]. La combinaison des traitements montra une efficacité supérieure aux thérapies prises séparément confirmant les résultats obtenus *in vitro* et confortant ceux obtenus lors du traitement d'une jeune patiente (voir **Chapitre II. 3. a.**) [174]. D'autres études ont également démontré des actions synergiques lors d'expériences *in vitro* et lors du traitement *in vivo* d'une infection à *P. aeruginosa* avec la combinaison d'un cocktail de phages et de ciprofloxacine

		
	Grande diversité des voies d'administration en fonction du modèle	Trois voies d'administration courantes (IV, cutanée, aérosol)
	Inoculum connu	Charge bactérienne inconnue
	Dose unique calculée par rapport à l'inoculum bactérien	Dose standard, généralement 1 à 2 par jour
	Variable selon le modèle (uniquement innée pour le ZF)	Réponse immunitaire innée et adaptative (propre au patient)

	Modèles animaux		Homme
	Charge bactérienne		Dose administrée de phages
	Réponse immunitaire		Voies d'administration

Figure 26. Comparaison des modèles animaux à l'Homme. IV : intraveineuse.

[218,219]. Ces différents exemples suggèrent que la coopération entre phages et antibiotiques *in vitro* serait transposable aux modèles animaux.

Néanmoins, l'utilisation de ces animaux dans le contexte des infections bactériennes se confronte à de nombreuses limites rappelant l'importance d'utiliser ces modèles pour accroître notre compréhension des risques sans pour autant accepter naïvement tous les résultats obtenus [209]. L'évolution de la charge bactérienne et celle de l'infection chez l'Homme demeurent des paramètres incertains avec lesquels il faut traiter (**Figure 26.**) [208]. La présence d'une infection déjà bien établie et difficile à éradiquer lors de l'usage compassionnel de phages est complexe à retranscrire expérimentalement et éthiquement à l'aide d'un modèle animal [208]. La phagothérapie chez l'Homme repose sur une concentration unique et standardisée, s'appuyant sur la capacité des phages à se répliquer pour s'autodoser, en opposition aux modèles animaux où la quantité est généralement préétablie en fonction de l'inoculum bactérien (**Figure 26.**) [208]. Toutefois, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'usage de doses trop importantes de phages sélectionnerait régulièrement des souches résistantes soulignant l'importance d'un équilibre entre phage et pathogène [220,221].

L'immunité innée de l'hôte pourrait également agir en synergie avec le traitement phagique et assurer ainsi le succès de la phagothérapie dans des modèles *in vivo*. L'infection du modèle murin par une souche de *P. aeruginosa*, par exemple, a indiqué une inaction du traitement phagique lorsque l'immunité innée de l'hôte était altérée [222]. Plus précisément, les neutrophiles se sont montrés essentiels dans le contrôle de l'infection en agissant en synergie avec le phage et pourraient également être impliqués dans l'inhibition de l'émergence de résistances [222,223].

b. Apparition de résistances aux phages *in vivo*

Les modèles animaux peuvent également être mis à profit afin d'appréhender davantage l'émergence de résistance lors de thérapie, mais aussi d'anticiper ce risque potentiel chez les patients (voir **Chapitre II. 2.**). Toutefois, ce processus de co-évolution entre le phage et le pathogène cible peut également être vu comme une constante voie d'amélioration des phages à disposition, permettant, grâce aux résultats obtenus *in vitro*, de faire évoluer les traitements au cours de l'infection en produisant des phages à plus large spectre (capables de lyser aussi efficacement la souche parentale que le mutant résistant) [150].

Une étude publiée en 2021 a comparé l'apparition de résistances dans un modèle *in vitro* et un modèle *in vivo* [224]. Lors de ces travaux, trois souches cliniques ExPEC (« Extraintestinal pathogenic *Escherichia*

coli ») isolées de différents patients furent défiées par le phage Φ HP3 sur des boîtes de Pétri ou dans un modèle murin de septicémie. Comme observé lors des travaux menés par F. L. Gordillo Altamirano *et al.*, les souches résistantes aux phages, isolées *in vitro* ou *in vivo*, ont présenté des mutations similaires (gènes identiques mutés), suggérant la mise en place d'un faible nombre de mécanismes de résistance par ces souches [190,224]. Bien que la majorité des résistances semblent être le fruit de mutations au sein de gènes codant pour des composants de surface, généralement utilisés par le phage pour interagir ou adhérer à la bactérie, ces modifications peuvent également être liées à la perte de virulence ou d'aptitude (« fitness ») de cette dernière.

Une étude menée par K. Salazar *et al.* a démontré une augmentation de la survie ainsi qu'une diminution des symptômes des souris infectées par les souches résistantes aux phages (0% de mortalité) en comparaison aux souris infectées par la souche parentale (80% de mortalité) [224]. Les résultats de cette étude démontrent la possibilité de sélectionner un phage dérivé de Φ HP3, nommé Φ HP3.1, capable de lyser efficacement les souches résistantes suite à l'acquisition de deux mutations, l'une au sein du gène codant la protéine Spike et la seconde dans le gène codant la longue fibre de la queue. Étonnamment, seulement trois souches résistantes à ce phage ont pu être isolées *in vitro* et aucune *in vivo*, suggérant un impact de la faible virulence de ces souches sur leur possibilité à résister au phage dans un contexte infectieux [224]. La convergence des mutations observées *in vitro* et *in vivo* des bactéries pour résister aux phages suggère qu'il est possible d'anticiper des résistances et donc d'éviter de futurs échecs thérapeutiques. Dans ce sens, il faut tirer profit des méthodes pour entraîner le phage afin de produire *in vitro* des virus efficaces contre les résistants et proposer, si nécessaire, ce nouveau phage en thérapie [224]. Sa combinaison avec le phage parental est également avancée pour prévenir l'émergence de ce type de résistances [225,226]. Néanmoins, cette pratique semblerait promouvoir l'apparition de résistances généralisées face aux phages rendant alors le traitement plus ardu [227].

Il faut aussi rappeler que l'observation de résistances lors d'études *in vitro* n'est pas suffisante pour supposer leur émergence *in vivo*. Les risques d'impacter les aptitudes et la perte de virulence des souches semblent, certaines fois, forcer ces dernières à subir l'infection par le phage. Aucune résistance n'a été observée suite au traitement de rats atteints d'endocardite aortique par un cocktail de 12 phages anti-*Pseudomonas*, tandis que l'apparition de mutants résistants à ce cocktail a été constatée *in vitro* [218]. Ces résistants présentaient exclusivement des mutations dans les gènes *pilT* et *galU* impliqués, respectivement, dans la motilité des pili et la formation du lipopolysaccharide (LPS), composant important de la paroi des bactéries Gram négatives [218]. En outre, ces éléments sont connus pour être des facteurs de virulence majeurs chez *P. aeruginosa*, leur mutation pouvant induire des défauts de virulence des souches [228,229]. De fait, il ne fut pas surprenant de constater des capacités d'infection réduites de ces

mutants, pouvant expliquer l'absence d'apparition de résistance dans un modèle animal infectieux malgré une vitesse de croissance de ces mutants préservée *in vitro*.

En résumé, ces études suggèrent que la présence d'un composant à la surface bactérienne jouant un double rôle, à la fois en tant que récepteur pour le phage mais aussi en tant que facteur de virulence chez la bactérie, va moduler, en fonction des risques encourus, l'acquisition de mutations. Dans ce sens, l'absence d'émergence de résistance aux phages lors des diverses phagothérapies rapportées contre les MNT laisse à penser que les mycobactériophages pourraient utiliser des composants de la paroi mycobactérienne impliqués dans la pathogénicité. Afin d'identifier des récepteurs de mycobactériophages et valider ou invalider cette hypothèse, des travaux approfondis *in vitro* sont nécessaires.

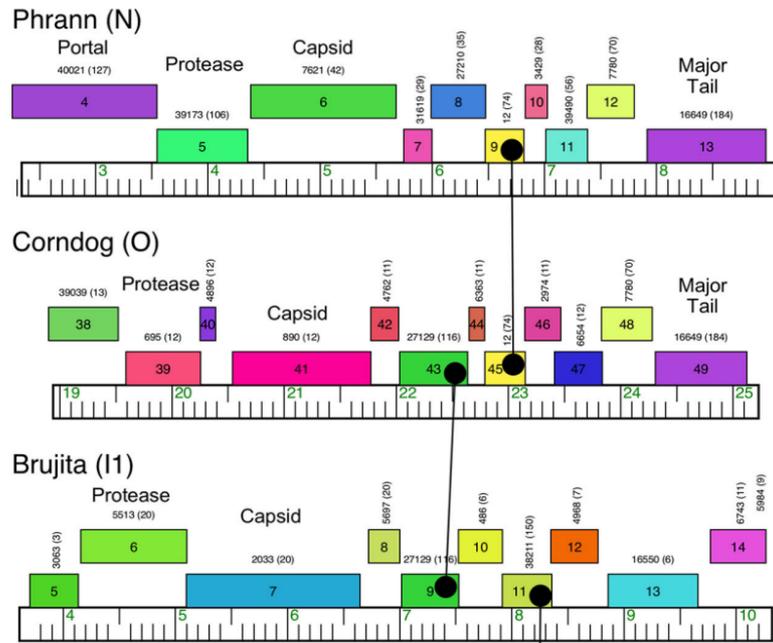


Figure 27. Architecture mosaïque des génomes de mycobactériophages et échanges horizontaux. Les segments de génomes de cinq mycobactériophages (Phrann, Corndog et Brujita) sont représentés et montrent le partage de gènes homologues par les liens en noir. Les gènes sont illustrés sous formes de carrés colorés et montrent un partage de gènes uniques par paire de phages. Le nom du groupe auquel est attribué le phage est mentionné entre parenthèses. D'après Hatfull, 2018 [161].

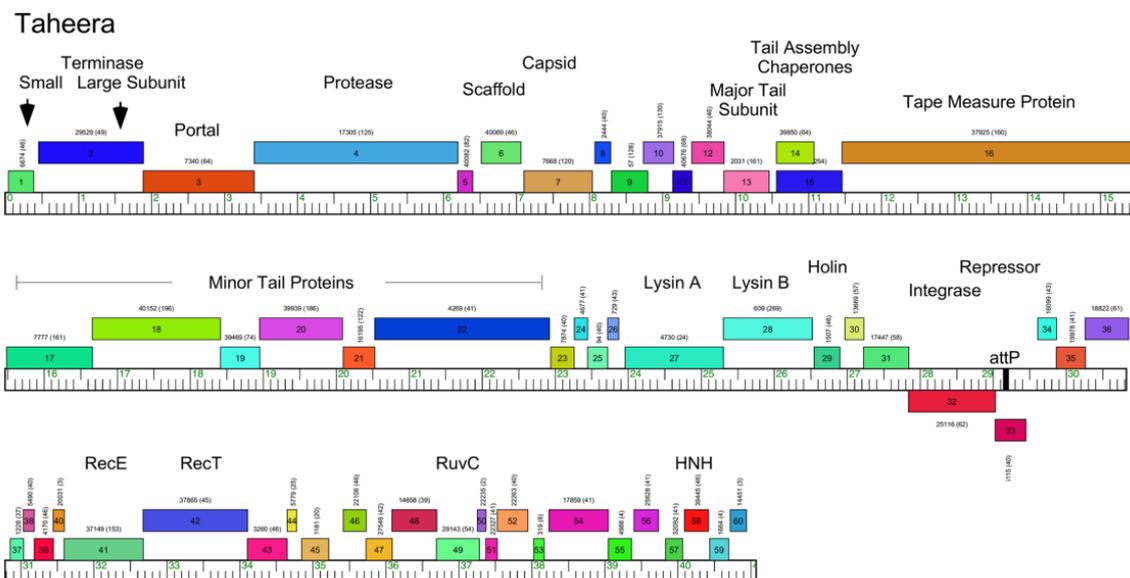


Figure 28. Organisation conservée du génome des mycobactériophages, exemple du phage Taheera. Les gènes de structure se situent à l'extrémité gauche du génome phagique et sont transcrits vers la droite. D'après Hatfull, 2018 [161].

Chapitre III. La diversité des mycobactériophages

1. Diversité génomique des mycobactériophages

Afin d'approfondir les connaissances sur les mycobactériophages, plus de 4000 génomes ont été séquencés et analysés (<https://phagesdb.org>). Les analyses ont montré une importante diversité génomique marquée par des tailles de génome variables allant de 17,3 kpb (kilo paires de base) à 97,7 kpb [230]. Un contenu irrégulier en guanine et cytosine variant de 51,4% à 71,4% a été mis en évidence [230]. Une certaine hétérogénéité dans leur diversité est à l'origine d'un classement en groupes ou « cluster » et en sous-groupes [231]. Au sein d'un même ensemble, ces phages doivent partager sur la totalité de leur génome plus de 50% de similarités de séquences nucléotidiques [231,232]. Les phages ne répondant pas à ces critères sont référencés en tant que « singletons » sous leur propre nom [231,232].

D'après les séquences étudiées, les mycobactériophages d'un même groupe présenteraient des caractéristiques communes telles que la présence de systèmes de régulation, la répétition de séquences ou des gènes codant l'acide ribonucléique de transfert (ARNt) [233–236]. Ces travaux contribuent à mieux appréhender l'évolution des mycobactériophages au sein des groupes et ont permis de démontrer une construction des génomes phagiques à partir d'échanges horizontaux, expliquant leur architecture en mosaïque (**Figure 27.**) [237–239].

Ce mosaïcisme conserve néanmoins une organisation génétique globale commune à la majorité des mycobactériophages, à l'exception d'une population minoritaire (**Figure 28.**) [161].

2. Variabilités morphologiques

Outre un regroupement génomique, les bactériophages peuvent également être différenciés par leurs morphologies [161]. Les mycobactériophages composant le groupe C, évoqués précédemment comme une population minoritaire, se classent dans la famille des *Myoviridae* et se caractérisent par une queue courte et contractile (**Figure 29.**). Ils se distinguent du second type connu de mycobactériophages, les *Siphoviridae* qui arborent une longue queue flexible et non-contractile (**Figure 29.**). A la différence d'autres bactériophages spécifiques des actinobactéries telles que *Streptomyces* ou *Arthrobacter*, aucun phage de la famille des *Podoviridae* (queue courte et non-contractile) n'a, à ce jour, été décrit contre les mycobactéries [240,241]. L'inexistence apparente de cette famille laisse suggérer un blocage physique dû

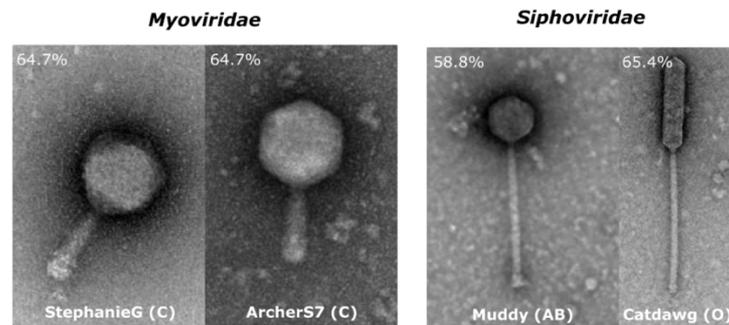


Figure 29. Diversité morphologique chez les mycobactériophages. Les mycobactériophages se classent en deux familles, celle des *Myoviridae* et celle des *Siphoviridae*, se distinguant par la structure de leur queue. Les *Myoviridae*, tels que StephanieG ou ArcherS7, possèdent une queue courte et contractile et sont, chez les mycobactériophages, exclusivement classés dans le groupe C (mentionné entre parenthèse). A l'inverse, les *Siphoviridae* arborent une queue longue et non contractile et sont classés dans divers ensembles (par exemple, AB et O pour les phages Muddy et Catdawg, respectivement). Les mycobactériophages possèdent des capsides ou têtes icosaédriques pouvant être isométriques (Muddy) ou allongées (Catdawg). Le pourcentage de GC dans les génomes des différents mycobactériophages est mentionné dans le coin supérieur gauche des images et est compris entre 51 et 71% chez l'ensemble des mycobactériophages actuellement décrits. Microscopie électronique de <https://phagesdb.org/>.

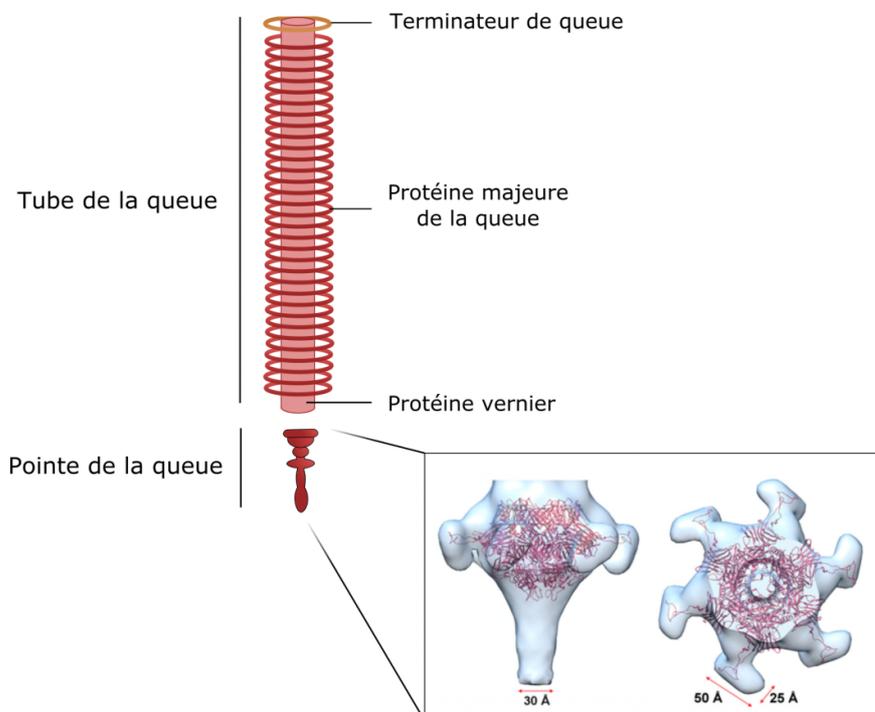


Figure 30. Structure de la queue des bactériophages de la famille des *Siphoviridae*. La queue des

à la complexité de la paroi mycobactérienne plutôt qu'à une évolution sélective des deux autres familles [161].

a. Morphotypes et structure de la queue

La queue des bactériophages constitue un élément central dans les interactions avec leur hôte et présente une vaste diversité tant dans sa morphologie que dans son mode d'action. Au regard du peu d'études portant sur la structure des mycobactériophages, la suite du manuscrit se concentrera exclusivement sur la famille majoritaire, les *Siphoviridae*. La première structure détaillée d'un mycobactériophage de cette famille fut établie sur le phage lysogénique Araucaria actif contre des souches de *M. abscessus* subsp. *bolletii* [242].

La queue des *Siphoviridae* se compose majoritairement d'un empilement de protéines majeures de la queue (33 protéines hexamériques pour le phage Araucaria) sur lesquelles se trouve, à l'extrémité proximale, le terminateur (**Figure 30.**) [242]. L'assemblage de ces protéines forme le tube de la queue au sein duquel est abrité la protéine vernier (« tape-measure protein »), connue pour contrôler la longueur de la queue lors de l'étape d'assemblage (**Figure 30.**) [243–245]. Ce tube va établir la liaison entre la tête et la base ou pointe de la queue du phage composée de protéines mineures et servant à l'interaction spécifique avec l'hôte (**Figure 30.**) [243,246].

D'après une reconstruction bioinformatique, la pointe de la queue du phage Araucaria a une structure en forme d'entonnoir et présente six bulbes sur la partie la plus large (**Figure 30.**) [242]. Ces bulbes latéraux corrélerent avec l'extension d'une partie de la protéine distale de la queue (Dit) du phage p2 présentant de fortes similarités avec la protéine ORF70 du phage Araucaria (**Figure 30.**) [242,247]. La protéine Dit est connue pour jouer un rôle dans la liaison de la pointe de la queue avec le tube de la queue et, dans certains cas, fournirait le site d'attachement des protéines de liaison au récepteur (RBP) [248]. Cette protéine formerait avec la lysine associée à la queue (Tal) un complexe capable de s'ouvrir et de se fermer pour laisser apparaître un canal reliant l'extrémité du phage à la capsid au travers du tube de la queue [247].

Certains phages, tels que le bactériophage p2, possèdent au niveau de la pointe de la queue plusieurs protéines de liaison au récepteur spécifiques de la reconnaissance et de l'attachement de l'hôte [247]. Toutefois, l'absence de ces protéines chez Araucaria montre l'existence d'autres protéines pouvant jouer ce rôle afin d'activer l'éjection du génome bactérien (voir **Chapitre III. 3. b.**) [242].

Figure 30. *Siphoviridae* est formée de deux parties principales, la pointe et le tube. La longueur de la queue est conférée par la protéine vernier (rose) autour de laquelle vont s'assembler les protéines majeures du tube de la queue. Le terminateur de queue va s'ajouter à l'extrémité proximale tandis que l'extrémité distale sera composée de la pointe de la queue. Cette dernière comprend des protéines mineures de la queue et possède une forme d'entonnoir pour le mycobactériophage *Araucaria*. Au sein de la représentation de la pointe de la queue du mycobactériophage *Araucaria*, le complexe Dit-Tal du phage p2 a été intégré montrant une corrélation de l'extension d'une partie de la protéine (Dit) avec la présence des protubérances. Encadré d'après Sassi *et al.*, 2013 [242].

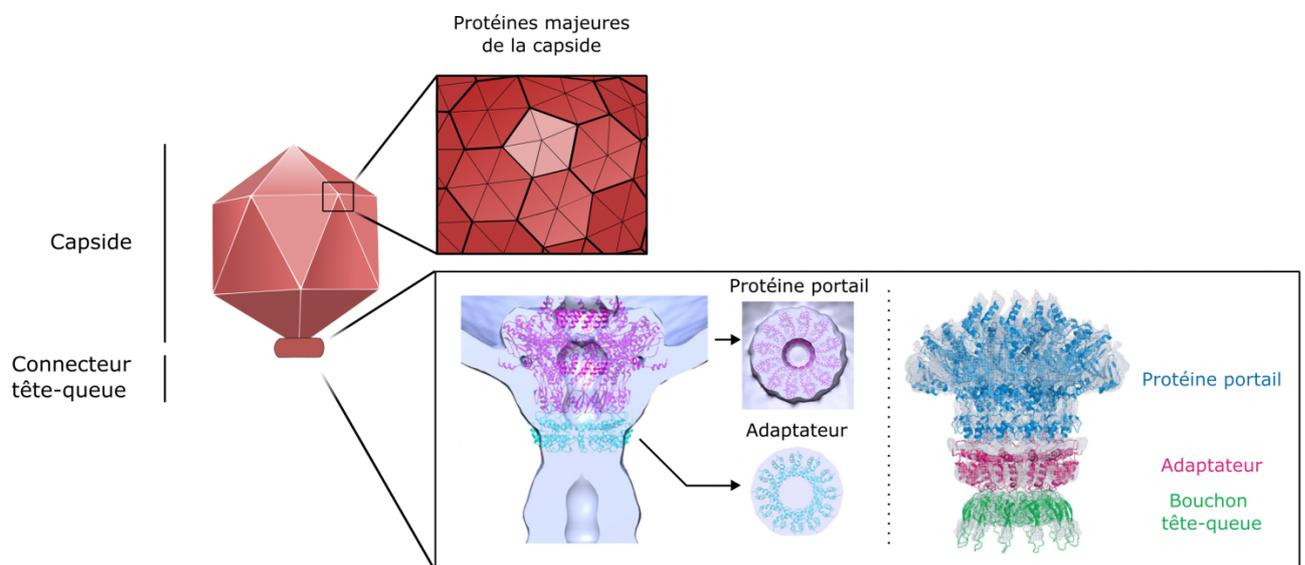


Figure 31. Structure de la capsid des bactériophages. La capsid des phages a pour rôle de protéger le génome emballé en son sein. Chez le mycobactériophage *Araucaria*, elle se compose de protéines majeures de la capsid pentamériques (rose) ou hexamériques (rouge) (zoom dans le cadre supérieur). La capsid est liée au connecteur tête-queue qui se compose de la protéine portail, de l'adaptateur ainsi que du bouchon tête-queue (structure du connecteur du phage SPP1 à la droite du cadre inférieur, d'après Lhuillier *et al.*, 2009). La structure du phage SPP1 semble s'intégrer parfaitement dans la reconstruction du connecteur du mycobactériophage *Araucaria* (partie gauche du cadre inférieur, d'après Sassi *et al.*, 2013 [242]).

b. Structure de la capsid

La capsid, ou tête, a pour rôle de contenir et protéger le génome à ADN double brin (ADNdb) des mycobactériophages de manière condensé, aucun mycobactériophage à ADN simple brin ou à acide ribonucléique (ARN) n'ayant pour le moment été découvert [250,161]. Des travaux de caractérisation des mycobactériophages ont mis en évidence une prédominance des phages à capsid icosaédrique isométrique avec un diamètre variable (entre 40 nm et 80 nm) et dépendant de la taille du génome (**Figure 29.**). Néanmoins, quelques mycobactériophages se distinguent en arborant une capsid icosaédrique allongée (**Figure 29.**) [161].

Ces capsides, malgré leur diversité, semblent présenter des compositions protéiques grandement conservées chez les mycobactériophages (<https://phagesdb.org>). Pour exemple, 60 hexamères et 11 pentamères de la protéine majeure de la capsid organisés selon une symétrie T=7 constituent la structure de la tête du phage *Araucaria* (**Figure 31.**) [242]. Cette structure est reliée à la queue par le connecteur tête-queue composé de la protéine portail suivi de l'adaptateur tête-queue puis du bouchon tête-queue organisés en couches d'anneaux juxtaposés (**Figure 31.**). Ce complexe sert non seulement à l'intégrité du phage mais surtout à l'emballage de l'ADN durant l'étape d'assemblage (protéine portail), à maintenir l'ADN au sein de la capsid (bouchon tête-queue) et à libérer l'ADN lors de l'infection (protéine portail) [251–253,249].

3. Généralités des cycles de vie

Comme l'a décrit Félix d'Hérelle il y a plus d'un siècle, les bactériophages sont des virus obligatoires du fait de leur dépendance à leur hôte pour se répliquer selon deux cycles de vie principaux (cycle lytique ou lysogénique) [139,143]. Au cours du cycle lytique de nouveaux virions sont produits et seront libérés de la bactérie suite à une étape de lyse bactérienne [143]. En revanche, durant le cycle lysogénique le phage va entrer dans un état de dormance stable pendant lequel l'ADN viral sera ou non intégré au sein du génome bactérien et répliqué [254]. Ces virus peuvent également introduire de nouvelles fonctions ou faciliter leur transfert par transduction et ainsi disséminer des gènes de virulence ou de résistance [255]. Par la suite, le passage du cycle lysogénique au cycle lytique pourra être provoqué par un signal afin d'aboutir à la lyse bactérienne [199]. Une fois la bactérie lysée, les nouveaux phages produits pourront réitérer un nouveau cycle infectieux. Bien que ce processus n'ait à ce jour jamais été décrit chez les mycobactériophages, il est supposé que ces derniers suivent des cycles de vie similaires à ceux décrits chez les bactériophages.

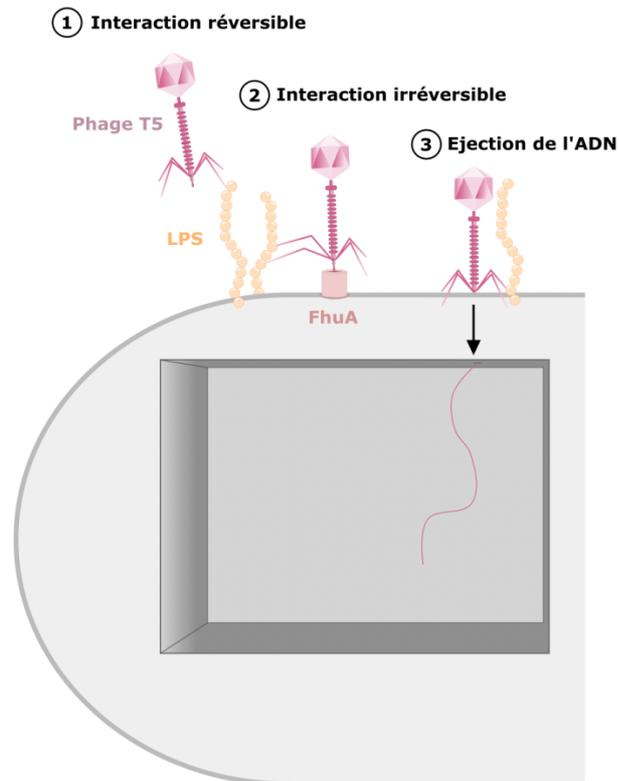


Figure 32. Adhésion des bactériophages et initiation du cycle phagique, exemple du phage T5. Les bactériophages interagissent avec leur hôte *via* des récepteurs de surface. Certains bactériophages tels que le phage T5 utilisent également un co-récepteur. Le phage T5 va tout d'abord interagir avec le lipopolysaccharide (LPS) de manière réversible grâce à ses protéines composant les longues fibres de la queue. Cette interaction va faciliter le positionnement et la rencontre de la protéine mineure de la queue avec la protéine FhuA, activant alors le processus d'éjection de l'ADN au travers de la membrane pour rejoindre le cytoplasme bactérien.

a. Première étape: l'adhésion

L'infection de la bactérie va débiter par une étape d'adhésion au cours de laquelle le phage va reconnaître son hôte [256]. Celle-ci a pour but de faciliter le positionnement du phage à la surface de la bactérie en vue d'y injecter son ADN, faisant suite à une série d'interactions avec un ou plusieurs récepteurs bactériens [256]. Dans un premier temps, des collisions aléatoires vont entraîner l'interaction réversible du phage *via* les protéines mineures de sa queue avec un premier récepteur (**Figure 32.**) [257,258,256]. Le virus va alors se lier à ce dernier et pouvoir s'en dissocier de manière viable, restant ainsi proche de la surface de la bactérie pour faciliter le contact avec un second récepteur (**Figure 32.**) [259]. Ces points d'interaction sont de nature très diverses, allant de séquences peptidiques à des motifs polysaccharidiques [260,261,258]. Le phage T5, par exemple, va interagir de façon réversible avec le LPS de la bactérie *E. coli* *via* ses longues fibres de la queue pour ensuite se lier irréversiblement à la protéine FhuA grâce à une des protéines de sa queue [262,263]. De fait, le couple protéine du phage/récepteur de l'hôte impliqué dans l'interaction réversible peut grandement différer de celui engagé dans la liaison irréversible du même hôte [264]. Des variabilités dans le mécanisme d'action du phage peuvent être rencontrées en fonction de la structure de sa queue et du nombre de protéines servant à son interaction avec l'hôte [247,265]. Enfin, ces liaisons, et plus spécifiquement celle avec le second récepteur, vont régir l'activation du phage et l'éjection de son génome au sein du cytoplasme de l'hôte débutant alors le cycle de réplication virale (**Figure 32.**) [258]. Néanmoins, ce processus peut être limité en raison du faible nombre de récepteurs secondaires actifs rendant la liaison et donc l'activation du phage complexe [266].

Ce mécanisme multi-étapes bien connu pour les bactériophages, tels les phages de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ou le phage SPP1, pourrait être transposable aux mycobactériophages mais reste à être démontré [267,268,242]. En effet, seulement quelques très rares récepteurs de mycobactériophages ont été identifiés, tels les GPL utilisés par le mycobactériophage I3 chez *M. smegmatis* [269]. De plus, le séquençage du génome de nombreux mycobactériophages a révélé la présence de domaines additionnels au sein de la protéine vernier, similaires à ceux impliqués chez d'autres bactériophages dans la production d'enzymes dégradant le peptidoglycane [270]. Ces enzymes serviraient à frayer un chemin au travers de la paroi bactérienne lors de l'éjection de l'ADN viral pour faciliter l'accès au cytoplasme de la bactérie [271,272].

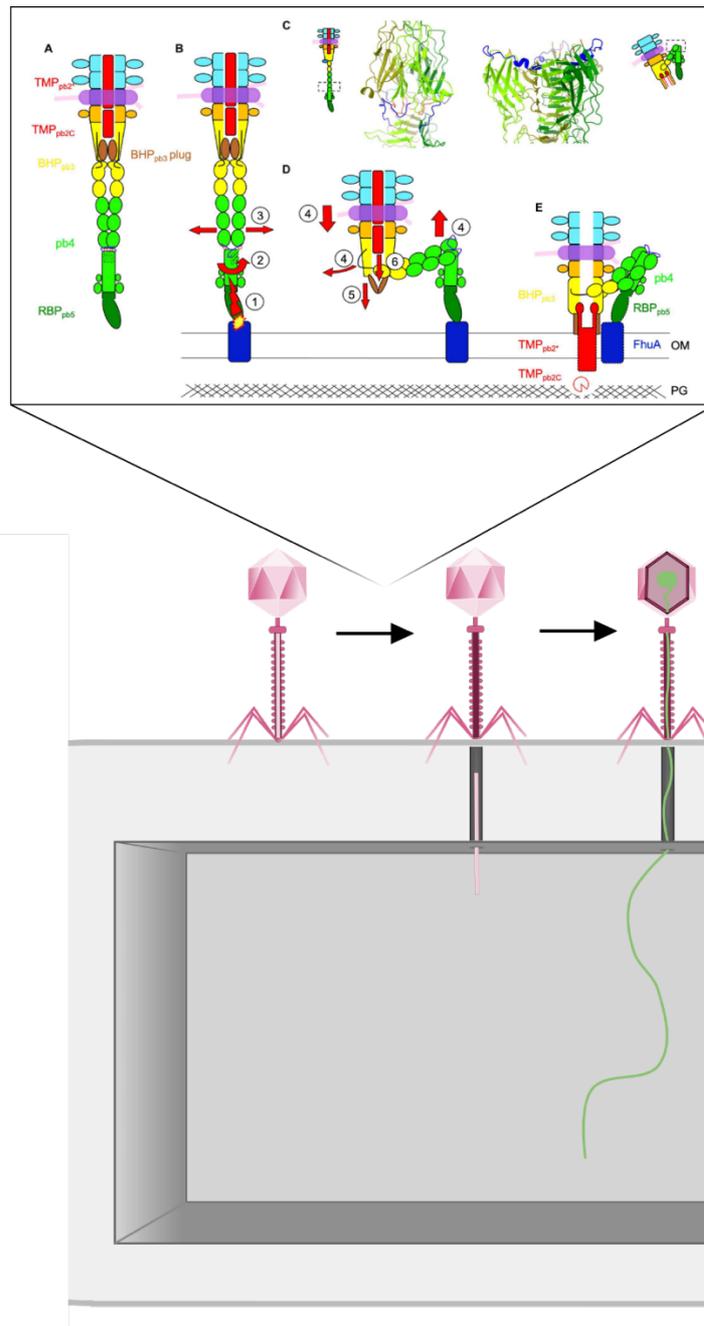


Figure 33. Mécanisme d'éjection de l'acide désoxyribonucléique par le phage T5. La liaison irréversible du phage T5 à la bactérie va induire un changement conformationnel de la queue du phage (A. à D.) induisant un signal, probablement au travers de la protéine vernier, et libérer cette dernière (E.) qui, pour le phage T5, va perforer la membrane bactérienne et permettre à l'acide désoxyribonucléique (ADN) viral d'atteindre le cytoplasme. Encadré d'après Linares *et al.* 2023 [273].

b. Éjection du génome phagique

L'éjection de l'ADN du phage est un mécanisme complexe encore partiellement compris. Des études par cryo-EM (cryomicroscopie électronique) menées sur les phages T5 ou 80 α de la famille des *Siphoviridae* ont mis en évidence des ressemblances et différences de structure avant et après éjection de l'ADN permettant de suggérer un mécanisme d'action pour ces phages [248,274]. Suite à l'interaction spécifique et irréversible du phage avec l'hôte, sa queue va subir un changement conformationnel (phage dépendant) induisant la propagation d'un signal et ainsi la libération de l'ADN viral (**Figure 33.**) [273,275]. D'après l'absence de mouvement du tube de la queue du phage T5, une hypothèse fut proposée selon laquelle la transmission de ce signal se ferait grâce à la protéine vernier. Cette protéine serait parfaitement adaptée à ce processus d'après sa localisation centrale et établirait la liaison entre la capsid et la pointe de la queue [274].

Ainsi, le changement conformationnel (**Figure 33.**) généré par l'interaction de certains phages avec leur hôte engendrerait la libération de cette protéine qui perforerait alors la paroi bactérienne afin de faciliter le passage de l'ADN (**Figure 33.**) [273]. D'autres bactériophages libéreraient également des enzymes afin de dégrader des composants de la paroi et adresseraient ainsi leur ADN au cytoplasme bactérien [242]. Finalement, le signal préalablement émis induirait l'ouverture du connecteur tête-queue autorisant le transfert de l'ADN depuis la capsid jusqu'à la bactérie [276]. Bien que ce mécanisme soit encore peu décrit, différents modèles quant aux forces permettant à l'ADN d'être éjecté sont à ce jour proposés [277]. Les caractéristiques moléculaires de la queue pourraient contribuer à potentialiser la vitesse de sortie de l'ADN une fois que l'impulsion initiale provoquée par la pression au sein de la capsid commence à s'estomper [278].

c. Intégration ou production des protéines du phage et assemblage

Une fois l'ADN viral éjecté, différents mécanismes vont intervenir et pouvoir dicter la suite du cycle de vie du phage. Lors de cette étape, les phages dits tempérés vont pouvoir entrer soit dans un cycle lysogénique et se répliquer passivement, soit dans un cycle lytique et produire de nouveaux phages actifs [143].

i. Intégration du génome phagique et entrée dans le cycle lysogénique

L'entrée ou non dans un cycle lysogénique va dépendre de divers paramètres tels que la compatibilité génétique (présence de sites d'intégration) ou l'état physiologique de l'hôte [279]. Un phage tempéré

répondant aux différents critères suivra les trois étapes clés composant le cycle lysogénique [280]. Tout d'abord, l'ADN viral va être intégré ou non au sein de sites spécifiques ou de manière aléatoire [281,254,282]. Les prophages non-intégrés ou extrachromosomiques possèdent des gènes spécifiques leur permettant de persister au sein de l'hôte et de se répliquer [283]. Pour les prophages intégrés, des enzymes, telles que les intégrases (à tyrosine ou à sérine) chez les mycobactériophages, vont insérer le génome phagique par un site d'attachement *attP* au niveau d'un site d'attachement de la bactérie (*attB*) formant les sites *attL* et *attR* [254,284].

Les systèmes d'intégration des bactériophages tels que celui du phage λ ont largement été étudiés et leur mécanisme d'action décrits [285,286]. Néanmoins, l'alignement du génome du phage λ avec ceux de mycobactériophages a mis en lumière l'absence d'un domaine de liaison de type bras des intégrases chez ces derniers et démontre ainsi une organisation atypique pour ces mycobactériophages [199]. Cette absence entraîne des interrogations sur la façon dont le prophage est intégré dans un sens défini [287,199].

Par la suite, le prophage sera maintenu dans un état de dormance au cours duquel il sera passivement répliqué en tant que partie du génome bactérien [254]. Ce processus correspond à la seconde étape du cycle lysogénique, majoritairement contrôlée par deux composants : le répresseur qui promeut la lysogénie et la protéine Cro, responsable de la croissance selon un cycle lytique [288]. Lors de l'infection, les promoteurs P_R et P_{REP} vont être tous deux activés provoquant la synthèse des protéines Cro, de l'intégrase et du répresseur [199]. La stabilité de l'intégrase va être déterminante pour la poursuite du cycle. En effet, l'activité élevée de cette protéine va induire l'intégration du génome dans celui de l'hôte ainsi que la production de la forme active du répresseur abrogeant celle des protéines Cro [199]. D'un point de vue structurel, les répresseurs encodés par des mycobactériophages et ceux produits par le phage λ sont fortement similaires mais semblent présenter des divergences fonctionnelles [289]. Les répresseurs des mycobactériophages se lieraient à des opérateurs multiples asymétriques contrairement à des opérateurs symétriques chez le phage λ [231].

L'expression insuffisante de l'intégrase active va provoquer le passage du cycle lysogénique au cycle lytique en raison de l'accumulation des protéines Cro et de l'arrêt de la synthèse du répresseur [199]. Le prophage va alors pouvoir être excisé, spontanément ou suite à des événements tels qu'un stress extérieur (modifications dans les nutriments, du pH ou de la température) ou une exposition à certaines substances (antibiotiques, peroxyde d'hydrogène, agents endommageant l'ADN, etc.) [292–294]. La libération du prophage va provoquer l'entrée dans un cycle lytique et ainsi induire la production de nouveaux phages actifs [143].

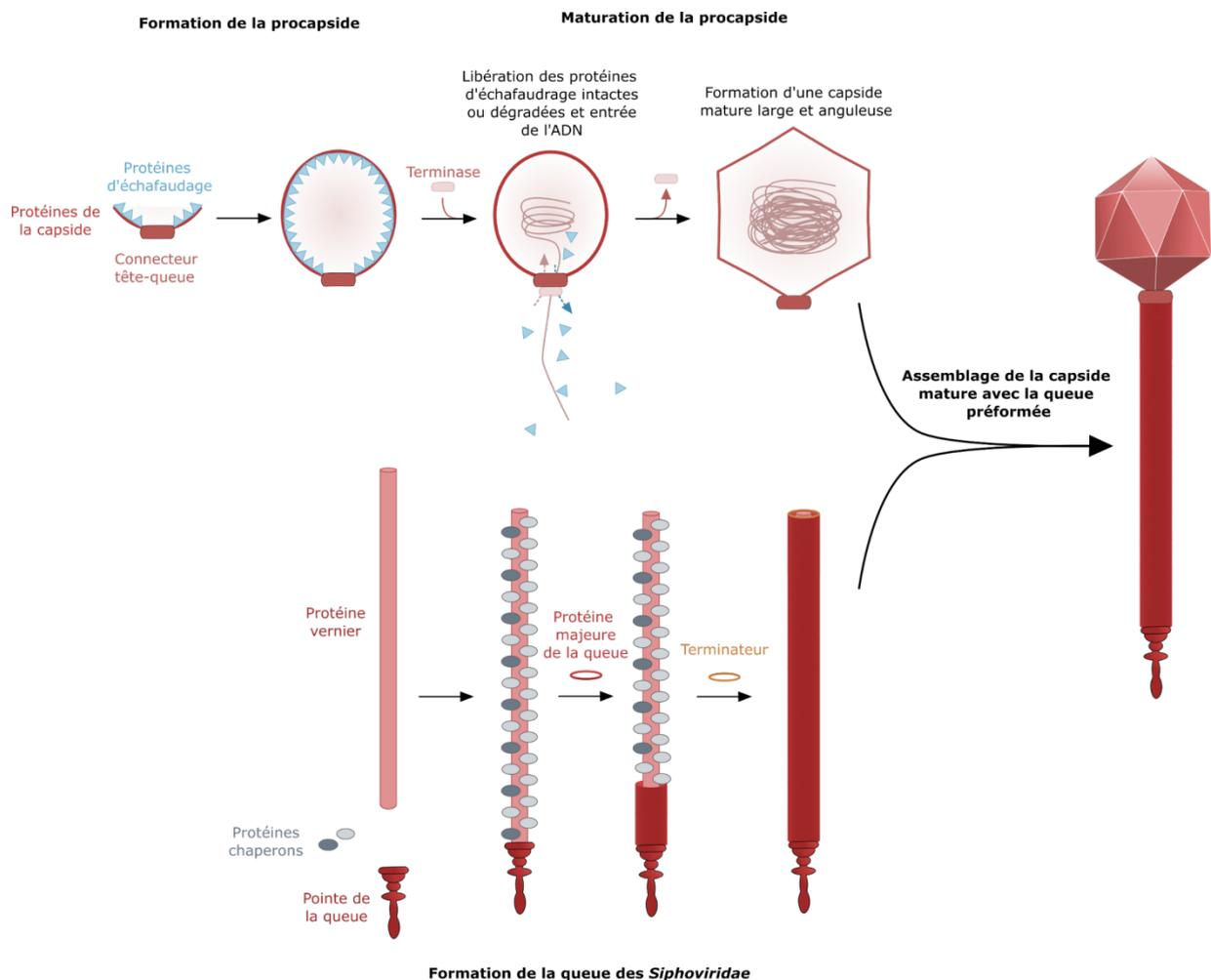


Figure 34. Assemblage des bactériophages. Des copies de la protéine d'échafaudage vont servir, avec la protéine portail, de base à la formation de la procapside. La terminase est ensuite recrutée pour permettre l'entrée de l'acide désoxyribonucléique (ADN) simultanément ou suite à la sortie des copies de la protéine d'échafaudage initiant la maturation de la procapside et les modifications structurales. Une fois le génome emballé, la terminase va se dissocier et la capside mature va pouvoir être assemblée à la queue. La formation de la queue débute par l'assemblage de sa pointe de la queue avec la protéine vernier. Des protéines chaperons vont ensuite venir se lier à la protéine vernier pour ajouter les unités de la protéine majeure de la queue. Pour finir, le termineur va être associé au-dessus du tube de la queue ainsi formé. L'assemblage est achevé par la liaison de la capside à la queue. Adapté de Steven *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2014 [290,291] .

ii. Réplication du génome viral

Suite à l'éjection de l'ADN par le phage lytique ou à la libération d'un prophage, les machineries de l'hôte et du phage vont être mises à profit afin de répliquer le génome viral au sein de la bactérie [295]. La diversité des mécanismes proposés et spécifiques à chaque phage démontre l'absence d'un processus général [295].

Certains phages, tels que le phage $\phi 29$, sont constitués de protéines permettant de déstabiliser l'extrémité de leur ADNdb et ainsi d'initier le processus de réplication de l'ADN par un complexe comprenant l'ADN polymérase du phage [296,297]. D'autres phages, tels que le phage T7, ont besoin de l'ARN polymérase de la bactérie pour débiter leur réplication et transcrire leur ADN en ARN messager (ARNm) [298]. La traduction de cet ARNm précoce va notamment induire la production de l'ARN polymérase du phage (gp1 pour le phage T7) [299,300]. Enfin, cette ARN polymérase va servir à la transcription de gènes nécessaires dans la réplication de son ADN, tels ceux de l'ADN ligase gp1.3, de l'hélicase gp4 ou encore de l'exonucléase gp6 pour le phage T7 [301,302]. D'autres mécanismes plus ou moins complexes sont à ce jour connus et permettent une réplication de l'ADN du phage, suivie de l'étape de production des protéines constituant sa structure.

Concernant les mycobactériophages, le processus de réplication du génome n'a à ce jour pas été détaillé. Certains d'entre eux semblent posséder des gènes codant pour des ADN polymérases bien qu'il n'ait pour le moment pas été démontré qu'elles soient essentielles à la réplication du phage [303]. A l'inverse, plusieurs mycobactériophages n'encodent pas leur propre ADN polymérase suggérant, dans ce cas, l'utilisation de celles produites par l'hôte [303].

iii. Assemblage des protéines du phage

Une fois le génome répliqué, les protéines composant le phage vont être produites puis assemblées (**Figure 34.**). Ce dernier processus va suivre quatre étapes distinctes et débiter avec la formation de la procapside à partir d'un complexe formé par la protéine portail et la protéine d'échafaudage (**Figure 34.**) [304]. Ce complexe va servir de noyau autour duquel les protéines de la capsid vont copolymériser avec la protéine d'échafaudage (**Figure 34.**) [304,305]. Bien qu'à ce stade la forme icosaédrique connue de la capsid ne soit pas observable, des études ont montré que l'absence de la protéine d'échafaudage générerait des structures aberrantes de la capsid [306–308].

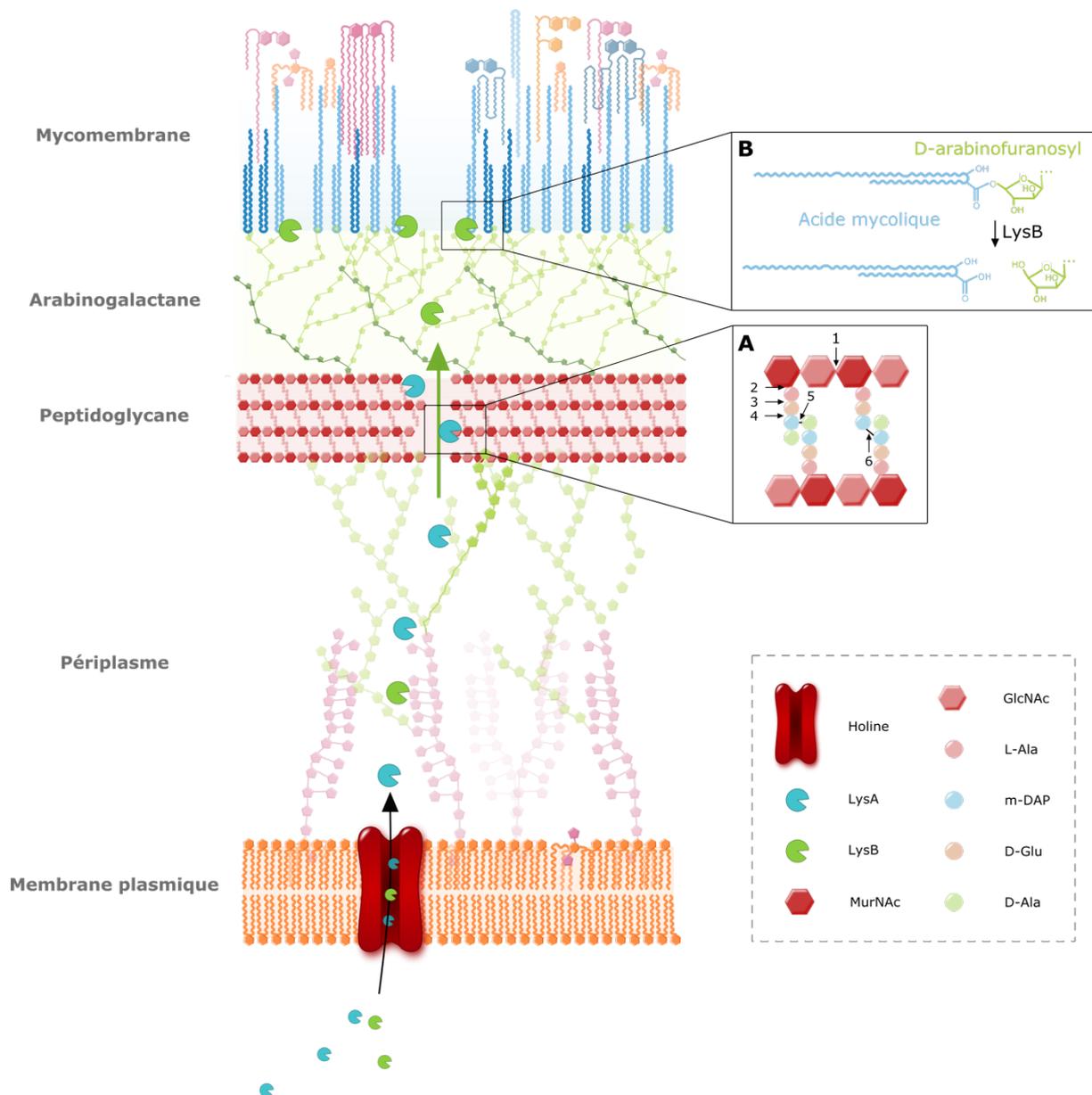


Figure 35. Lyse mycobactérienne par les enzymes du phage. Afin de rejoindre l'environnement extérieur, les mycobactériophages vont devoir déstructurer la paroi de leur hôte. Des holines, produites par le phage, vont perméabiliser la membrane plasmique de la bactérie pour autoriser le passage des endolysines, enzymes responsables du clivage de divers composants de la paroi. Dans un premier temps, différentes liaisons du peptidoglycane peuvent être hydrolysées par l'endolysine A (LysA) (liaisons signalées par des numéros dans l'encadré A ; (1) liaison 1,4- β entre l'acide N-acétylmuramique (MurNAc) et le N-acétylglucosamine (GlcNAc), (2) liaison N-acétylmuramoyl-L- alanine entre le squelette glucidique

Dans un second temps et faisant suite à l'assemblage de la procapside, l'ADN va être emballé en passant au travers de la protéine portail grâce à la terminase permettant sa translocation (**Figure 34.**) [251,309]. Préalablement ou au cours de ce processus, la protéine d'échafaudage va sortir de la procapside ou alors être clivée par une protéase codée par le phage (**Figure 34.**). Ce mécanisme, combiné à l'emballage du génome du phage, va initier la maturation de la procapside. Dès lors, des modifications structurelles vont induire un agrandissement de la tête, la formation d'angles et une structure plus stable (**Figure 34.**) [310,311]. Une fois l'ADN emballé, la terminase va se dissocier pour laisser place à l'assemblage de la capsid avec la queue (**Figure 34.**) [201,251].

En parallèle, la queue va être assemblée avec pour première étape la formation de l'appareil d'adsorption (**Figure 34.**) [312]. Les protéines vernier, Dit et Tal vont former un complexe initiateur [313]. Par la suite, des protéines chaperons vont se lier à la protéine vernier servant d'échafaudage pour l'ajout des sous-unités majeures de la queue [244,314]. Les copies de la protéine majeure vont constituer un cylindre auquel va finalement se lier le terminateur de queue, arrêtant ainsi l'assemblage (**Figure 34.**) [315]. Pour finir, la queue préformée va se lier à la capsid clôturant alors le processus d'assemblage (**Figure 34.**) [279].

d. Lyse mycobactérienne

Les nouveaux phages produits suite à l'étape d'assemblage vont devoir s'échapper de la bactérie les enfermant afin d'entrer dans un nouveau cycle répliatif. Pour ce faire, les bactériophages emploient un système holines-endolysines pour lyser la paroi bactérienne [316,317]. Les holines servant à perméabiliser la membrane plasmique vont permettre aux endolysines d'accéder à leur substrat (**Figure 35.**) [316]. Néanmoins, en raison de la paroi complexe des mycobactéries (voir **Chapitre I. 4. a.**), certains mycobactériophages ont besoin de l'action de deux types d'endolysines pour lyser la bactérie [318]. Les protéines LysA, conservées chez la globalité des bactériophages, sont composées de combinaisons de motifs amidase, glycosidase et peptidase et sont supposées hydrolyser le peptidoglycane (**Figure 35.**) [232,318,196]. Les protéines LysB, spécifiques des mycobactériophages, sont des estérases impliquées dans le clivage de la liaison ester entre l'arabinogalactane et les acides mycoliques, essentiels à la survie des mycobactéries (**Figure 35.**) [318,320,321]. L'action combinée de ces enzymes permet la libération des mycobactériophages nouvellement produits dans l'environnement et laisse envisager leur utilisation en tant qu'agent thérapeutique. En effet, l'efficacité de LysB du mycobactériophage D29 a été démontrée

Figure 35. et les réticulations peptidiques, (3) liaison interpeptidique L-Ala-D-Glu, (4) liaison 4→3 entre le D-Glu et m-DAP, (5) liaison interpeptidique 4→3 D-Ala-m-DAP, (6) liaison interpeptidique 3→3 m-DAP-m-DAP). Cette désorganisation du peptidoglycane va permettre le passage de l'endolysine B (LysB), capable d'hydrolyser la liaison ester liant les acides mycoliques aux motifs D-arabinofuranosyls terminaux de l'arabinogalactane. L-Ala, L- alanine ; m-DAP, acide méso-diaminopimélique ; D-Glu, D-glutamate, D-Ala, D-alanine. Encadré A adapté de K. M. Payne et Hatfull, 2012 représentant le peptidoglycane de *M. tuberculosis* et encadré B adapté de K. Payne *et al.*, 2009 [319,320].

in vitro et *in vivo* lors d'une infection par *M. abscessus* chez la souris. Cette protéine également efficace sur les souches S pourrait représenter une nouvelle alternative thérapeutique pour ces infections [322].

4. Mécanismes de résistance contre les mycobactériophages

Au cours du cycle de multiplication phagique, les diverses interactions entre le phage et sa bactérie hôte vont permettre aux deux partenaires de développer une pléthore de mécanismes de résistance destinés à favoriser la survie bactérienne ou la survie phagique. Néanmoins, ces processus peuvent avoir un coût pour la bactérie se retrouvant dans l'incapacité d'encoder la totalité des mécanismes de défense [323]. Par conséquent, le recours à des transferts de gènes horizontaux, par exemple, va permettre un partage des mécanismes acquis entre des souches parentes [154]. Phages et bactéries développent de nombreuses stratégies assurant leur survie dont certaines ont été décrites chez les mycobactériophages ou les mycobactéries.

a. Inhibition des étapes précoces de l'infection

i. Prévenir l'adhésion

Le pathogène opportuniste, *M. abscessus*, existe sous deux morphotypes distinguables par la présence ou non à leur surface de lipides, les GPL (voir **Chapitre I. 4. c.**) [117]. Hormis la virulence des souches, ces morphotypes semblent également s'opposer aux mycobactériophages par leur susceptibilité (voir **Chapitre II. 3. c.**) [158]. Dedrick *et al.* ont évalué l'activité de différents mycobactériophages sur quatre isolats cliniques, présentant chacun les deux morphotypes [158]. Leur analyse a démontré une activité lytique des phages exclusivement dirigée contre les souches R et suggère que les GPL produits par les souches S seraient responsables de la résistance observée, par exemple, en masquant les récepteurs impliqués dans l'adhésion phagique [158]. Toutefois, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer l'incapacité des mycobactériophages Faith1 et Itos à lyser les isolats cliniques S en dépit d'une infection efficace [158]. Dans ce sens, des études approfondies doivent être menées afin de mieux appréhender ces phénomènes et d'élargir le champ d'action des phages à visée thérapeutique.

D'autres mécanismes de résistance contre des mycobactériophages thérapeutiques ont été rapportés chez des isolats cliniques de *M. abscessus* et nécessitent une attention particulière. L'incubation *in vitro* de souches cliniques avec des mycobactériophages a conduit à l'émergence de résistances *via* l'acquisition de mutations spontanées au sein de gènes codants pour des protéines impliquées dans la synthèse

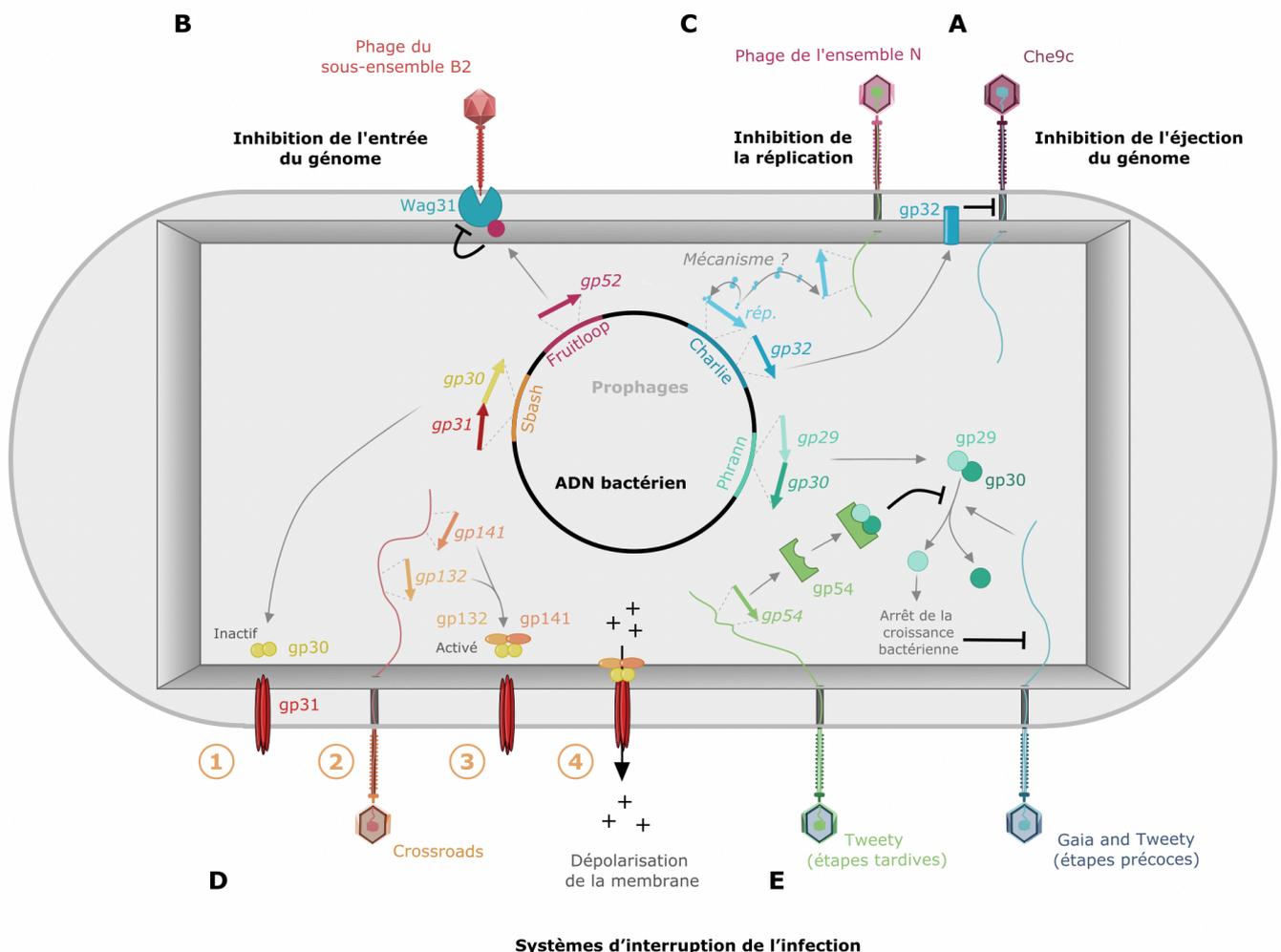


Figure 36. Mécanismes de résistance de la surinfection chez les mycobactéries. **A.** Lors de l'infection par le phage Che9c d'une souche lysogénique enfermant le prophage Charlie, la protéine transmembranaire gp32, produite par Charlie, va inhiber l'éjection du génome par Che9c. **B.** L'interaction de gp52, produite par Fruitloop, avec la protéine mycobactérienne Wag31 induirait de façon encore inconnue une résistance aux phages du sous-ensemble B2 en inhibant l'entrée de leur génome. **C.** L'immunité phagique, conférée par des répresseurs homologues, chaperonne un mécanisme encore non-décrit chez les mycobactériophages inhibant la réplication des phages lytiques. **D.** **(1)** Le phage lysogénique Sbash produit la protéine membranaire gp31, alors inactive en tant que canal ionique, et la protéine gp30. **(2 et 3)** Suite à l'infection par le phage Crossroads, les protéines gp132 et gp141 de ce dernier vont agir

lipidique : la Mps1 participant à la synthèse des GPL et la Pks connue pour intervenir dans la synthèse des DAT et des TPP (voir **Chapitre I. 4.b. et c.**) [117,107,158]. Ces mutations furent proposées comme étant à l'origine d'une altération de la composition de la paroi et pourraient, par conséquent, modifier le processus d'interaction des phages avec la bactérie [158].

ii. Systèmes d'exclusion de la surinfection

Suite à l'adhésion, le génome du phage doit pénétrer au sein de la bactérie pour permettre la réplication virale (voir **Chapitre III. 3.**). A ce stade précoce de l'infection, des mécanismes de défense ciblant la surface bactérienne peuvent être mis en place afin d'inhiber la translocation du génome viral au sein du cytoplasme [324]. Ces mécanismes, développés par les phages contre leurs congénères, servent autant à protéger l'hôte bactérien que les prophages résidents contre l'infection par un phage tiers. Les prophages sont connus pour avoir une influence sur la bactérie hôte [325]. Bien que l'expression de la majorité des gènes soit réprimée au cours de la lysogénie, les gènes de prophages mycobactériens situés entre ceux codant pour l'intégrase et ceux codant pour la lyse ont été démontrés pour être exprimés [326]. Par conséquent, l'expression de ces gènes va aboutir à la production de protéines responsables de mécanismes de résistance tels que les systèmes d'exclusion de la surinfection [327]. Ainsi, les prophages, en codant des protéines capables de s'ancrer à la membrane ou aptes à interagir avec des protéines liées à celle-ci, vont bloquer l'injection de l'ADN par le phage lytique [328,329].

Ce processus, décrit chez les bactériophages, semble également être utilisé par des mycobactériophages tels que Charlie (**Figure 36.A.**) [326]. Ce dernier code pour une protéine (gp32) qui serait localisée à la membrane bactérienne grâce à son domaine transmembranaire putatif [326]. Elle conférerait à Charlie une résistance hétérotypique (c'est-à-dire contre des phages non apparentés) spécifique du phage Che9c en inhibant l'éjection de son ADN au travers de la membrane bactérienne [326].

Le prophage Fruitloop encode une protéine capable de se lier directement à la protéine Wag31, notamment connue pour réguler la biosynthèse du peptidoglycane aux pôles en croissance et ainsi la croissance mycobactérienne (**Figure 36.B.**) [330–332]. Cette liaison induisant l'inactivation de la protéine essentielle Wag31 bloquerait l'action de différents phages utilisant cette dernière dans leur processus d'infection (**Figure 36.B.**) [330]. L'inaction de cette protéine serait responsable de l'inhibition spécifique de l'entrée du génome des phages du sous-ensemble génomique B2, bien que ce mécanisme puisse ne pas leur être exclusif [330]. L'appartenance de ces phages à un sous-ensemble distinct de celui de Fruitloop

Figure 36. avec gp30, de façon directe ou indirecte, afin d'activer le canal. A ce jour, aucune étude ne permet de dire si les protéines gp30 et gp31 interagissent à l'état actif ou inactif. **(4)** Cette activation entraîne une perte du potentiel membranaire, l'interruption de la synthèse de macromolécules et une diminution de la viabilité de la bactérie. **E.** Le phage lysogénique Phrann code pour un système toxine-antitoxine permettant de résister à la surinfection de certains phages. La protéine gp29, une potentielle (p)ppGpp synthétase produite par Phrann, est gardée inactive par gp30 *via* un mécanisme non-décortiqué. L'infection par un phage lytique va induire un mécanisme de défense médié par gp29, potentiellement causé par sa dissociation de gp30 qui induirait une accumulation de (p)ppGpp et ainsi l'arrêt de la croissance bactérienne. Néanmoins, le phage Tweety a montré des capacités à contrer cette défense grâce à la production de la protéine gp54 qui pourrait empêcher la dissociation et ainsi l'activation de la synthèse de (p)ppGpp. Lors d'étapes précoces d'expression génique, la bactérie va montrer une résistance à Tweety qui sera par la suite abrogée. Adapté de Dedrick *et al.*, 2017; Ko et Hatfull, 2018; Gentile *et al.*, 2019 [326,330,333].

suggère une exclusion de la surinfection hétérotypique ainsi qu'une dépendance partagée à l'égard de Wag31 lors de leur cycle infectieux [330]. L'inhibition de l'interaction du phage avec son hôte peut être médiée par divers mécanismes [327] et semble être une cible de choix pour la bactérie ou les prophages afin d'empêcher l'intrusion d'un phage lytique. Ces mécanismes, concernant généralement la paroi bactérienne, risquent d'entraîner des pertes d'aptitude (« fitness ») de la bactérie pouvant lui être délétère ou de modifier sa virulence. L'inhibition d'étapes plus tardives du cycle phagique telles que la réplication du génome viral ou l'assemblage va offrir d'autres opportunités à la bactérie ou aux prophages pour éviter leur destruction massive.

b. Inhibition de la réplication virale

i. Acquisition de mutations dans les gènes de l'hôte

Comme nous l'avons vu précédemment (voir **Chapitre III. 3. c. ii.**), les bactériophages et, potentiellement, les mycobactériophages utilisent la machinerie de l'hôte au cours de leur cycle de vie afin de se répliquer. La bactérie peut donc tourner ce processus à son avantage en résistant à de nombreux phages par des mutations au sein de gènes non essentiels pour sa survie [158,334].

La délétion de la protéine associée aux nucléoïdes Lsr2 dans la souche de référence de *M. smegmatis* semble altérer la réplication de l'ADN du phage et conduire à une propagation virale déficiente [329]. Cette protéine, conservée chez les mycobactéries [335] et essentielle chez *M. tuberculosis* [336], est notamment connue pour protéger physiquement l'ADN bactérien et établir des liaisons entre différents segments d'ADN [337,338]. Lsr2 est aussi un régulateur transcriptionnel principal de plusieurs gènes acquis par des transferts horizontaux de gènes chez *M. tuberculosis* ou impliqués dans la biosynthèse de la paroi, sa délétion dans une souche de *M. smegmatis* ayant induit des modifications morphologiques [339,337,340]. Elle participe également à l'organisation et au maintien des systèmes de réplication de l'ADN de l'hôte et pourrait être impliquée dans l'organisation des zones de réplication des phages [329].

De manière intéressante, de nombreux mycobactériophages présentent au sein de leur génome des homologues de Lsr2 [238,341] laissant penser que les phages peuvent contrer la résistance des souches avec la protéine qu'ils produisent [334]. Néanmoins, ces protéines ne semblent pas compenser l'absence de la protéine de l'hôte et pourraient plutôt être impliquées dans la compétition entre les phages lors de surinfections, bien que ce postulat nécessite d'être démontré [334]. Cette résistance, constatée contre plusieurs mycobactériophages, présente de faibles chances d'être rencontrée chez un patient au vu du

caractère essentiel de Lsr2 chez *M. tuberculosis* et de son implication dans la virulence de *M. abscessus* [342]. D'autres gènes conférant des résistances contre des mycobactériophages ont pu être identifiés suite à l'acquisition spontanée de mutations par des isolats cliniques. Ces derniers nécessitent une attention particulière afin d'évaluer les risques encourus dans le cadre de la thérapie phagique. L'analyse de ces mutants spontanés générés *in vitro* a montré la présence de mutations dans des gènes codants pour une hélicase présumée, UvrD2, ainsi que pour RpoZ, une sous-unité oméga d'une ARN polymérase [158]. Bien que le mécanisme de résistance n'ait pas été décrit, il est probable que ces protéines soient utilisées lors du cycle de vie du phage et demandent des études approfondies pour mieux comprendre leur implication dans le processus de réplication des mycobactériophages [158].

ii. Immunité des bactériophages

Au cours du cycle lysogénique, les prophages codent pour des répresseurs nécessaires au maintien de cet état [285]. Néanmoins, les souches lysogènes (contenant un prophage) peuvent toujours être la cible d'infections par des phages plus ou moins apparentés à celui déjà intégré. Lors de fortes homologies, le répresseur exprimé par le prophage résident va pouvoir se lier au génome éjecté par un phage lytique (voir **Chapitre III. 3. b.**). Par ce biais, le prophage va arrêter le cycle de réplication du phage infectant et promouvoir la survie bactérienne grâce à l'immunité phagique (**Figure 36. C.**) [324].

A ce titre, l'ensemble N des mycobactériophages regrouperait des phages tempérés et dits homoimmuns en raison des fortes similarités protéiques de leurs répresseurs (plus de 80% d'identité des acides-aminés) [326]. Le répresseur du mycobactériophage Charlie, exprimé dans une souche de *M. smegmatis*, a permis de démontrer cette immunité contre la surinfection sans pour autant décrire le mécanisme impliqué (**Figure 36. C.**) [326].

iii. Systèmes d'interruption de l'infection

Contrairement aux mécanismes de résistance qui ont pour but d'inhiber la surinfection lors des étapes précoces, les systèmes d'interruption de l'infection vont permettre de résister à l'attaque phagique par la mort bactérienne [324]. Ce système peut, en théorie, être rencontré à n'importe quelle étape de l'infection et correspond au sacrifice de la bactérie, qualifié de suicide altruiste, pour sauver sa communauté en éliminant le phage infectieux et empêcher sa dissémination à l'ensemble de la population.

Un des premiers systèmes de ce type fut décrit chez le prophage λ lors de l'infection de son hôte par le

phage T4 [343]. Suite à la détection de l'ADN du phage lytique par la protéine RexA, le canal ionique RexB serait activé et induirait la dépolarisation membranaire aboutissant à la mort bactérienne [343].

Un mécanisme similaire semble être adopté par le mycobactériophage Sbash bien qu'il fut montré que ce dernier n'utiliserait pas le génome viral comme activateur mais deux protéines (gp132 et gp141) encodées par le phage Crossroads venant infecter l'hôte (**Figure 36.D.**) [333]. Il est envisagé que les protéines de Crossroads interagissent directement avec gp30, protéine cytosolique, afin de stimuler l'activité du canal ionique gp31. Néanmoins, il n'est actuellement pas décrit si les protéines gp30 et gp31 interagissent à l'état actif ou inactif, laissant une ombre sur le mécanisme chaperonnant cette activation [333]. Ce processus aboutit à la mort bactérienne et, par conséquent, à l'interruption de l'infection. Il semble toutefois spécifique de l'infection par le phage Crossroads, aucun phage apparenté à Crossroads n'ayant pour le moment montré de déficience d'infection causée par ce mécanisme [333].

Similairement au phage Sbash, le prophage Butters encoderait une protéine cytoplasmique gp30 retenue par une protéine transmembranaire gp31 intégrée dans la membrane interne [344]. Lors de l'infection de la souche par un phage hétérotypique spécifique, gp30 serait libérée du complexe et exercerait une activité antiphage. Malgré des similarités structurelles faibles entre ce système et le système d'interruption de l'infection RexAB du phage λ , leurs mécanismes d'action semblent analogues [343,344]. De plus, gp30 et gp31 présentent des orthologues chez les Actinobactéries et notamment chez des souches cliniques confortant un système à deux composants qui serait répandu chez divers isolats bactériens.

Un second mécanisme induisant la mort cellulaire des mycobactéries fut décrit chez le mycobactériophage Phrann [326]. Celui-ci code pour un système toxine-antitoxine pour lequel un déséquilibre peut induire l'arrêt de la croissance bactérienne (**Figure 36.E.**) [326,345]. Le prophage Phrann va produire activement la protéine gp29 codant pour une (p)ppGpp synthétase et la protéine gp30 qui servirait à réguler l'action de gp29, une interaction directe étant suggérée (**Figure 36.E.**) [326]. Cependant, l'infection par un phage tiers va induire un mécanisme de dissociation induisant l'inhibition de la croissance cellulaire tout en bloquant la réplication phagique [326]. Certains phages, tels que le mycobactériophage Tweety, sont confrontés à cette résistance durant l'expression des gènes lytiques précoces. Toutefois, Tweety semble ensuite contourner cette résistance en synthétisant une protéine empêchant la dissociation de la toxine à l'antitoxine (**Figure 36.E.**) [326].

En résumé, la bactérie tout comme les phages ont développé de nombreux mécanismes de résistance décrits chez les bactériophages dont certains n'ont pour le moment pas été décrits pour les phages spécifiques des mycobactéries. Différents processus de défense semblent médiés par les prophages

(prévenir l'adsorption, prévenir la réplication, système d'infection avorté, etc.) pour protéger des surinfections [326]. Toutefois, le manque de connaissance sur les résistances induites directement par la bactérie et pouvant, selon des travaux menés sur une souche d'*A. baumannii* [190], être prédites, doivent faire l'objet d'une attention particulière afin d'éviter leur émergence chez des patients traités par phagothérapie et également élargir la panoplie de mycobactériophages à disposition du clinicien.

OBJECTIFS

Découverte par Moore et Frerichs en 1953, *M. abscessus* apparaît à ce jour comme un pathogène émergent responsable d'infections pulmonaires ou extra-pulmonaires sévères. Cette MNT fréquemment isolée d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose peut provoquer un important déclin des fonctions respiratoires. Les infections qu'elle occasionne représentent une contre-indication aux transplantations pulmonaires et sont, en présence de co-morbidités, d'une complexité rare à traiter en raison de la multirésistance aux antibiotiques des souches. A ce jour, le traitement de ces infections se heurte à un important taux d'échec dénonçant le besoin de développer un arsenal thérapeutique plus performant dans le but de les éradiquer.

La combinaison d'une antibiothérapie avec une phagothérapie offre une alternative prometteuse pour contrer les infections mycobactériennes en échec thérapeutique et, plus particulièrement, les infections au pathogène opportuniste *M. abscessus*. Ce traitement phagique, proposé par Félix d'Hérelle en 1919, a fait l'objet d'un regain d'attention au cours des dernières années et exploite la capacité de ces virus à lyser la bactérie hôte. Toutefois, l'ultra-spécificité des phages vis-à-vis du pathogène exige la personnalisation du traitement ne pouvant, par conséquent, être proposé qu'à des cas isolés. Cette stratégie a permis, au cours des quatre dernières années, d'améliorer l'état de santé global de 11 patients infectés par une mycobactérie, bien que le traitement de neuf autres patients ait rencontré des limites entravant son efficacité.

Parmi celles-ci, l'existence de deux morphotypes, désignés S et R et divergents, respectivement, par la présence ou l'absence de GPL à leur surface semble représenter un frein à la phagothérapie contre *M. abscessus*. D'après les travaux menés par Dedrick *et al.* en 2021, les souches arborant un morphotype R, connues pour être plus virulentes que les souches S dont elles dérivent, représenteraient 60% des souches isolées lors d'infections à *M. abscessus* et seraient, pour 80% d'entre elles, sensibles à au moins un mycobactériophage thérapeutique. En revanche selon cette même étude, le variant S, caractéristique des infections chroniques, reste une menace importante puisqu'il représenterait 40% des isolats cliniques, pour lesquels aucun phage à ce jour isolé n'a montré d'efficacité lytique. La spécificité des phages vis-à-vis des souches R suggère un rôle (direct ou indirect) de ce lipide de surface (GPL) dans le mécanisme d'action des phages qu'il sera nécessaire de décrypter.

Un second type de lipide de surface, les TPP, dont la fonction biologique est encore inconnue, paraît également contribuer à la spécificité de certains phages pour les souches R de *M. abscessus*. Plusieurs souches cliniques ont démontré, lors d'expériences *in vitro*, une résistance au mycobactériophage thérapeutique BPs Δ 33HTH_HRM10 suite à l'acquisition de mutations dans un gène codant pour une Pks impliquée dans la synthèse des TPP. Cette mutation, potentiellement à l'origine de modifications de la

surface bactérienne, préviendrait l'action du phage par un mécanisme restant à déterminer et pourrait être responsable d'échecs thérapeutiques.

Au vu de la capacité potentielle de *M. abscessus* à modifier la composition de sa paroi pour contrer les infections phagiques, mes travaux de thèse ont eu pour but d'évaluer l'importance et le rôle de ces lipides de surface, non-essentiels pour la croissance bactérienne, dans les interactions entre des mycobactériophages et *M. abscessus*. Les objectifs de mes travaux se déclinent en deux axes principaux :

Axe 1. Evaluer le rôle des polyphléates de tréhalose dans les interactions de *M. abscessus* avec le mycobactériophage BPs Δ 33HTH_HRM10 et plus précisément dans les étapes précoces du cycle infectieux afin d'identifier un récepteur potentiel des mycobactériophages.

Plus particulièrement, nous avons souhaité :

- Etudier l'implication directe ou indirecte des TPP dans le processus infectieux du phage, en tant que récepteur potentiel.
- Attribuer un premier rôle biologique à ce lipide de surface.
- Décrypter et évaluer, pour la première fois, l'importance d'un mécanisme de résistance lié à un lipide de surface chez *M. abscessus*.

Axe 2. Etudier la contribution des glycopeptidolipides dans les interactions de souches S de *M. abscessus* avec un mycobactériophage récemment découvert.

Dans ce contexte, nous avons cherché à :

- Evaluer l'impact des différents composants des GPL dans les interactions du phage avec la souche S grâce à la génération d'une collection de mutants bien définis et produisant des GPL tronqués.
- Appréhender le rôle biologique de motifs décorant les GPL, en particulier, les groupements acétyles, en générant et caractérisant divers mutants.

RESULTATS

L'usage des mycobactériophages, à titre compassionnel et en combinaison à l'antibiothérapie, est proposé comme une alternative possible pour éradiquer les infections persistantes chez des patients en situation d'échec thérapeutique. Néanmoins, cette stratégie, longtemps oubliée par la médecine moderne, rencontre des limites du fait de l'inaction des phages sur certaines souches ou de l'émergence de résistants spontanés lors d'une exposition prolongée de l'agent pathogène au phage. Le manque de connaissances sur le mécanisme d'action et sur l'identité des éléments (bactériens ou phagiques) nécessaires à l'interaction phage-hôte peut entraver l'approche thérapeutique, en particulier lors d'un usage combiné de mycobactériophages partageant leur voie d'entrée. En effet, les récepteurs, de nature inconnue pour les mycobactériophages spécifiques de *M. abscessus*, représentent pour la bactérie un élément de choix à inhiber afin d'empêcher l'invasion du phage et sa réplication.

Dans ce sens, la découverte de mutations dans des gènes codant pour une protéine impliquée dans la synthèse d'un lipide de surface, le TPP, pourrait s'apparenter à un mécanisme de résistance inhibant la voie d'entrée du phage. Les résultats des travaux en rapport avec cet axe de recherche sont présentés dans la publication suivante :

Article 1. Therapeutically useful mycobacteriophages BPs and Muddy require trehalose polyphleates.

Wetzel, K. S.*, Illouz, M*, Abad, L., Aull, H. G., Russell, D. A., Garlena, R. A., Cristinziano, M., Malmsheimer, S., Chalut, C., Hatfull, G. F., & Kremer, L. (2023). *Nature microbiology*, 8(9), 1717–1731. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01451-6>

*Ces auteurs ont contribué à parts égales

Afin de répondre à la problématique posée, le criblage d'une banque de mutants transpositionnels par les phages thérapeutiques BPs Δ 33HTH_HRM10 et Muddy nous a confirmé l'importance des TPP dans l'action de ces mycobactériophages. L'inhibition de la production de ce lipide induite par l'insertion de transposons (Tn), exclusivement au sein du locus encodant la synthèse des TPP, démontre un mécanisme de résistance principal de *M. abscessus* vis-à-vis de certains mycobactériophages. Des résultats similaires obtenus sur des mutants spontanés résistants, confortent ces premières observations. De fait, les différentes souches déficientes en TPP ont été employées afin d'isoler des phages capables d'outrepasser la résistance causée par l'absence de ce lipide, permettant ainsi d'étendre le répertoire des mycobactériophages thérapeutiques à disposition du clinicien. Par ailleurs, l'usage d'un fluorophage a servi à mettre en évidence une inhibition du cycle phagique préalable à l'étape de traduction en absence de TPP. Enfin, des tests d'adhésion nous ont permis de démontrer l'implication des TPP dans l'étape précoce d'infection en tant que co-récepteur, laissant une interrogation sur la nature du récepteur principal. Dans cette optique, le second criblage réalisé avec les phages échappant à la résistance n'a pas

abouti, suggérant l'implication de composants bactériens essentiels dans l'interaction du phage avec son hôte.

Au cours de cette étude menée avec le Dr Katherine S. Wetzel, ma contribution expérimentale a été d'établir le profil lipidique des différentes souches, de compléter les mutants défectueux dans la synthèse et le transport des TPP, de comparer la croissance des souches en présence ou absence du phage BPs Δ 33HTH_HRM10, de réaliser des plages de lyse, de mener des expériences de microscopie à fluorescence et de cytométrie en flux avec le fluorophage, de déterminer la susceptibilité aux antibiotiques des souches cliniques et de vérifier que l'absence de TPP n'altérerait pas le caractère alcool-acide des souches cliniques par la coloration Ziehl-Neelsen.

Therapeutically useful mycobacteriophages BPs and Muddy require trehalose polyphleates

Received: 14 March 2023

Accepted: 17 July 2023

Published online: 24 August 2023

 Check for updates

Katherine S. Wetzel ^{1,5}, Morgane Illouz ^{2,5}, Lawrence Abad¹, Haley G. Aull¹, Daniel A. Russell ¹, Rebecca A. Garlena¹, Madison Cristinziano¹, Silke Malmshaimer², Christian Chalut ³, Graham F. Hatfull ¹ ✉ & Laurent Kremer ^{2,4} ✉

Mycobacteriophages show promise as therapeutic agents for non-tuberculous mycobacterium infections. However, little is known about phage recognition of *Mycobacterium* cell surfaces or mechanisms of phage resistance. We show here that trehalose polyphleates (TPPs)—high-molecular-weight, surface-exposed glycolipids found in some mycobacterial species—are required for infection of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium smegmatis* by clinically useful phages BPs and Muddy. TPP loss leads to defects in adsorption and infection and confers resistance. Transposon mutagenesis shows that TPP disruption is the primary mechanism for phage resistance. Spontaneous phage resistance occurs through TPP loss by mutation, and some *M. abscessus* clinical isolates are naturally phage-insensitive due to TPP synthesis gene mutations. Both BPs and Muddy become TPP-independent through single amino acid substitutions in their tail spike proteins, and *M. abscessus* mutants resistant to TPP-independent phages reveal additional resistance mechanisms. Clinical use of BPs and Muddy TPP-independent mutants should preempt phage resistance caused by TPP loss.

Non-tuberculous mycobacteria include several important human pathogens such as *Mycobacterium abscessus* and *M. avium*^{1,2}. These infections are often refractory to effective antibiotic treatment due to both intrinsic and acquired resistance mutations, and new treatment options are needed³. The therapeutic application of mycobacteriophages shows some promise for the treatment of pulmonary infections in persons with cystic fibrosis^{4–6}, disseminated infection following bilateral lung transplantation⁴ and disseminated *M. chelonae* infection⁷. However, broadening therapy beyond single-patient compassionate use applications will require expansion of the repertoire of therapeutically useful

phages and increasing host range such that a higher proportion of clinical isolates can be treated^{5,8,9}. Clinical administration of bacteriophages is anticipated to give rise to phage-resistant mutants and disease recurrence¹⁰, but the frequency and mechanisms of mycobacteriophage resistance are poorly understood¹¹. Very few mycobacteriophage receptors are known, although glycopeptidolipids (GPLs) are proposed as receptors for mycobacteriophage I3 in *M. smegmatis*¹².

Over 12,000 individual mycobacteriophages have been described, with most having been isolated on *M. smegmatis*¹³. The genome sequences of 2,200 of these show them to be highly diverse genetically

¹Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. ²Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, Montpellier, France. ³Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France. ⁴INSERM, IRIM, Montpellier, France. ⁵These authors contributed equally: Katherine S. Wetzel, Morgane Illouz. ✉e-mail: gfh@pitt.edu; laurent.kremer@irim.cnrs.fr

and pervasively mosaic^{14,15}. They can be sorted into groups of genomically related phages (for example, Cluster A, B, C and so on), some of which can be readily divided into subclusters (for example, Subcluster A1, A2, A3 and so on) on the basis of sequence variation^{16,17}. Seven of the sequenced phages currently have no close relatives and are designated as ‘singletons’¹⁸. A subset of these phages have relatively broad host range and are also able to efficiently infect *M. tuberculosis*, including phages in Clusters/Subclusters A2, A3, G1, K1, K2, K3, K4 and AB^{19,20}. A similar subset of phages also infect some clinical isolates of *M. abscessus*, although it is noteworthy that phage host ranges on these strains are highly variable (even for related phages within clusters/subclusters) and are highly variable among different clinical isolates^{4,9}. There is also substantial variation in the outcomes of phage infection of *M. abscessus* strains, with notable differences between rough and smooth colony morphotypes⁹. For example, a smaller proportion of smooth isolates are susceptible to phage infection compared with rough strains, as determined by plaque formation, and none of the smooth strains is efficiently killed by any phage tested⁹.

Mycobacterial cell walls characteristically have a mycolic acid-rich outer layer referred to as the mycobacterial outer membrane or mycomembrane²¹. In addition to abundant mycolic acids, there are numerous other types of complex molecule including multiple acylated lipids such as di- and polyacyltrehalose (DAT and PAT), phthiocerol dimycocerosate and sulfoglycolipids, although not all are found in all *Mycobacterium* species. Smooth strains of *M. abscessus* have abundant GPLs, whereas these are lacking or greatly less abundant in rough strains^{22,23}. Recently, it has been shown that some mycobacterial species, including *M. abscessus*, have trehalose polyphosphates (TPPs), which are high-molecular-weight, surface-exposed glycolipids, in their cell walls^{24,25}. These TPPs may be important for *M. abscessus* virulence and are associated with clumping and cording²⁵. A five-gene cluster, including a polyketide synthetase (Pks), is required for TPP biosynthesis and TPP precursor (DAT) transport to the outer surface of the cell by MmpL10 (ref. 26). TPPs are not present in *M. tuberculosis* although DAT and PAT are²⁶. The specific roles of TPPs are not known, but their position on the outer surface makes them candidates for use as phage receptors.

Here we show that TPPs are required for the binding and infection of *M. abscessus* by phages BPs and Muddy. These phages share little or no nucleotide similarity but both have been used therapeutically, sometimes in combination with each other^{4,27}. *M. abscessus* transposon insertion mutants that are resistant to these phages map in all five genes involved in TPP synthesis, all have lost TPPs from their cell walls and phage adsorption is lost. Spontaneous phage-resistant mutants of some *M. abscessus* clinical isolates also have mutations in the known TPP synthesis genes, and some *M. abscessus* clinical isolates that are insensitive to BPs and Muddy are naturally defective in TPPs. However, the TPP requirement can be readily overcome by mutations in phage

tail spike proteins, suggesting that TPPs are acting as a co-receptor, and the cell wall binding target of the phages is probably essential for mycobacterial viability. *M. abscessus* strains resistant to BPs and Muddy TPP-independent mutants reveal new mechanisms of phage resistance.

Results

Transposon mutagenesis of *M. abscessus* clinical isolates

M. abscessus GD01 (subspecies *massiliense*) was selected for transposon mutagenesis as it is the first clinical isolate treated therapeutically⁴ and is killed well by phages Muddy, ZojΔ45 and BPsΔ33HTH_HRM10, mapping in Clusters AB, K2 and G1, respectively. Muddy is a lytic phage and ZojΔ45 and BPsΔ33HTH_HRM10 are engineered lytic derivatives of Zoj²⁸ and BPs²⁹, respectively. Because GD01, similar to many *M. abscessus* isolates, is kanamycin resistant (minimum inhibitory concentration (MIC) > 128 μg ml⁻¹)³⁰, we re-engineered the extant Kan^R MycoMarT7 transposon using CRISPY-BRED³¹ to include an Hyg^R cassette, constructing derivatives both with and without the existing R6Kγ origin of replication (Fig. 1a). The shorter transposon (MycoMarT7-Hyg2) transduced strain GD01-100 times more efficiently than the longer MycoMarT7-Hyg1 transposon; this efficiency difference was not observed for *M. smegmatis*. We transduced strain GD01 with MycoMarT7-Hyg2 and selected Hyg-resistant transductants on solid media to yield a random mutagenesis library (Fig. 1b). We note that the parent of the transposon delivery phages, TM4, does not form plaques on any *M. abscessus* strain⁹ but efficiently delivers DNA to *M. abscessus* cells³².

Phage-resistant mutants are defective in TPPs

To identify *M. abscessus* GD01 phage-resistant mutants, the Tn library was plated on solid media seeded with either BPsΔ33HTH_HRM10 or Muddy. Single colonies were recovered at a frequency of ~10⁻³ and 20 individual colonies were picked from each selection, rescreened and characterized (Fig. 1, Extended Data Fig. 1 and Extended Data Table 1). Eighteen of the 20 BPsΔ33HTH_HRM10-resistant candidates were mapped, all of which have transposon insertions in a gene cluster involved in TPP synthesis; some appear to have secondary transposon insertions mapping elsewhere (Extended Data Table 1 and Fig. 1c,d). Thirteen of the 20 Muddy resistant candidates were mapped and surprisingly, all also contain insertions in TPP synthesis genes (Extended Data Table 1 and Fig. 1c,d). TPP synthesis has previously been reported to be non-essential³³ and these observations suggest that loss of TPPs is the primary mechanism of resistance to both BPsΔ33HTH_HRM10 and Muddy. Further analysis showed that all of the mutants tested have similar phenotypes, with a large reduction in the efficiency of plaquing of BPsΔ33HTH_HRM10 and a more modest reduction in the efficiency of plaquing of Muddy, but with formation of very turbid plaques (Fig. 1e). Complementation of a *fadD23* Tn mutant confirmed that phage resistance results from TPP loss (Fig. 1f). All of the strains

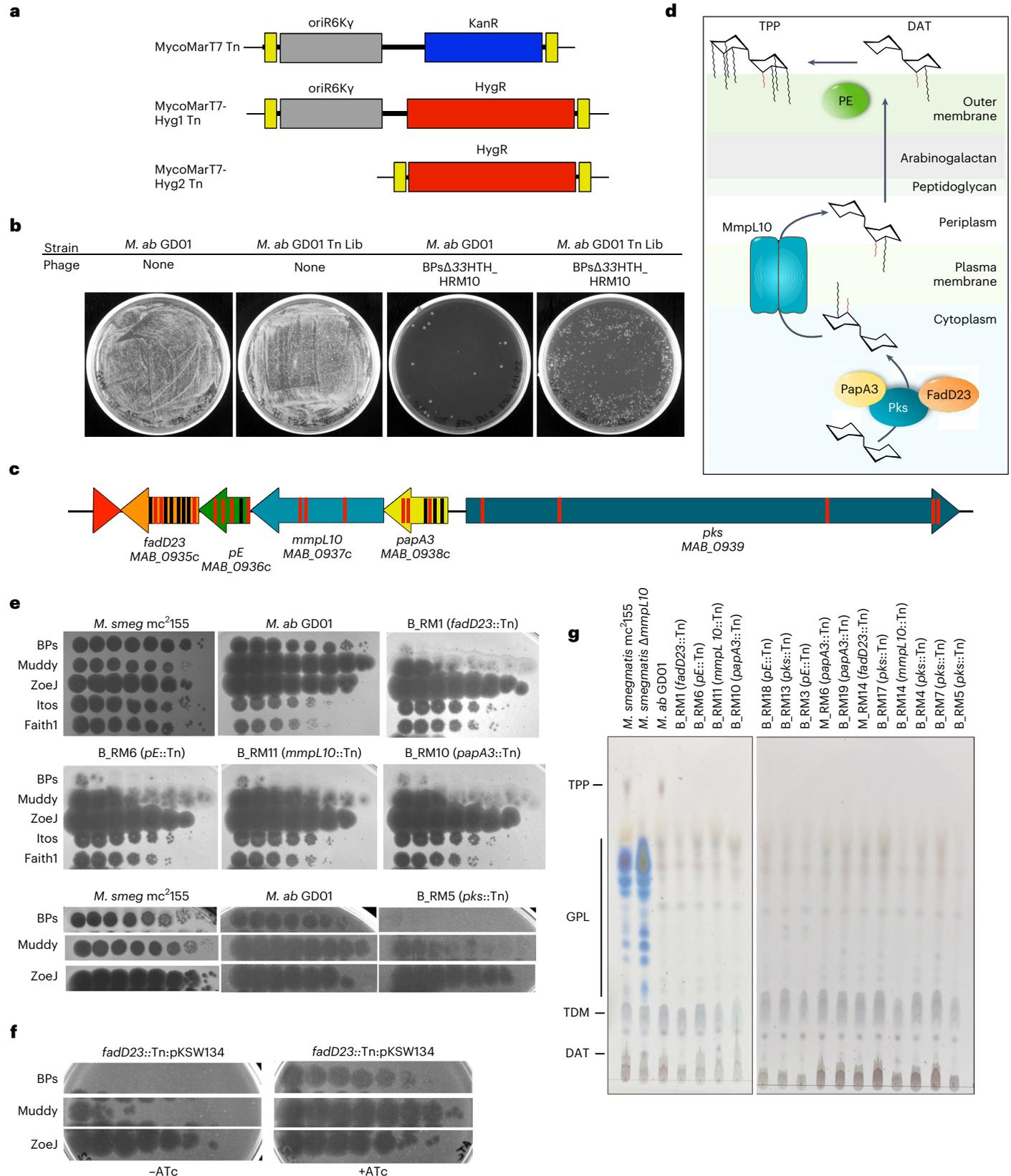
Fig. 1 | Identification of phage-resistant transposon insertion mutants of *M. abscessus* GD01. **a**, Construction of MycoMarT7-Hyg1 and MycoMarT7-Hyg2. Transposon delivery phage phiMycoMarT7 delivers a transposon containing *Escherichia coli* ori6Kγ (grey) and a kanamycin resistance cassette (blue), flanked by inverted repeats (yellow boxes). CRISPY-BRED³¹ was used to create phiMycoMarT7-Hyg1 and phiMycoMarT7-Hyg2, which deliver transposons containing ori6Kγ (grey box) and a hygromycin resistance cassette (red box), or only a hygromycin resistance cassette. **b**, *M. abscessus* GD01 or a transposon library of *M. abscessus* strain GD01 (*M. ab* GD01 Tn Lib) was plated on solid media or solid media seeded with phage BPs_Δ33HTH_HRM10. **c**, Locations of transposon insertions in the TPP locus in phage-resistant mutants. Red and black bars show the locations of insertions in strains isolated as resistant to BPsΔ33HTH_HRM10 and Muddy, respectively. **d**, Proposed roles of Pks, PapA3, FadD23, MmpL10 and PE in the synthesis and transport of TPPs and DAT. **e**, Tenfold serial dilutions of phages were spotted onto solid media with *M. smegmatis* mc²155, *M. abscessus* GD01 or representative *M. abscessus* GD01

transposon insertion mutant strains: GD01Tn_BPs_HRM10_RM1 (B_RM1); GD01Tn_BPs_HRM10_RM6 (B_RM6); GD01Tn_BPs_HRM10_RM11 (B_RM11); GD01Tn_BPs_HRM10_RM10 (B_RM10); GD01Tn_BPs_HRM10_RM5 (B_RM5). The locations of Tn insertions are indicated in parentheses. Phages used are: BPsΔ33HTH_HRM10 (‘BPs’), Muddy, ZojΔ43–45 (‘Zoj’), Itos and Faith1Δ38–40 (‘Faith1’). Plaque assays were performed at least twice with similar results. **f**, Tenfold serial dilutions of phages were spotted onto solid media with strain GD01*fadD23*::Tn (GD01Tn_BPs_HRM10_RM1) containing plasmid pKSW134 with gene *fadD23* under expression of an ATc-inducible promoter. FadD23 is not expressed in the absence of ATc (left panel) but is induced by ATc (right panel). Plaque assays were performed at least twice with similar results. **g**, Thin-layer chromatography (TLC) analysis of total lipids extracted from *M. abscessus* GD01 and mutants with transposon insertions in the TPP synthesis and transport genes. *M. smegmatis* mc²155 and a Δ*mmpL10* mutant strain of *M. smegmatis* are also included as controls.

that we tested remain sensitive to ZoeJ Δ 43–45, Itos and Faith1 Δ 38–40 (Fig. 1e and Extended Data Fig. 1).

Analysis of cell wall lipids shows that all of the mutants tested have lost TPPs (Fig. 1g). Interruption of TPP precursor transport (as in an *mmpL10* mutant; Fig. 1d), or loss of PE protein needed for the

final step of TPP synthesis (Fig. 1d) can result in accumulation of the DAT precursor^{24,26}, and our *mmpL10* transposon insertion mutants did accumulate DAT. Our *pE* mutants did not accumulate DAT and the Tn insertions may be polar, interrupting *fadD23* expression and DAT synthesis (Fig. 1c,d,g). No defects in trehalose dimycolate synthesis



were observed, trehalose dimycolate being transported by MmpL3 (ref. 34) (Fig. 1g).

Phage BPs tail spike mutants are TPP independent

Although BPs Δ 33HTH_HRM10 does not efficiently infect *M. abscessus* TPP synthesis mutants, plaques were observed at high phage titres that are candidates for TPP-independent mutants (Fig. 1e). Five individual plaques were purified, shown to have heritable infection of *M. abscessus* TPP mutants and were further characterized. Two were isolated on *M. abscessus* GD01 *fadD23::Tn* (phKSW2 and phKSW3), two on GD01 *pE::Tn* (phKSW4 and phKSW5) and one on GD180_RM2 (BPs_REM1; see below); an additional mutant (phKSW1) was isolated on *M. smegmatis* Δ MSMEG_5439 (Extended Data Table 2; see below). These mutants form clear plaques on all TPP synthesis pathway mutants tested (Fig. 2a), and sequencing showed that all have single amino acid substitutions in the predicted BPs tail spike protein, gp22 (Extended Data Table 2). Interestingly, two of these substitutions, gp22 A306V and A604E (present in phKSW3 and phKSW5, respectively), were reported previously as BPs host range mutants able to infect *M. tuberculosis*^{19,29}. The gp22 A604E substitution is also present in phage BPs Δ 33HTH_HRM^{GD03} that infects some other *M. abscessus* strains⁴. Although phKSW4 (and phKSW2; Extended Data Table 2) has a gp22 L462R substitution, BPs_REM1 has both a gp22 L462R substitution and a G780R substitution. BPs_REM1 forms somewhat clearer plaques than phKSW4 on the TPP mutants (Fig. 2a), suggesting that G780R has an additive effect towards clear plaque formation.

TPPs are required for BPs adsorption to *M. abscessus* GD01

Because TPPs are surface exposed and are required for BPs Δ 33HTH_HRM10 infection, we tested whether they are required for adsorption (Fig. 2b). Wild-type BPs adsorb relatively poorly to *M. smegmatis*¹⁹ and BPs Δ 33HTH_HRM10 adsorption is similarly poor on *M. abscessus* GD01 (Fig. 2b). However, BPs Δ 33HTH_HRM10 is clearly defective in adsorption to a GD01 *fadD23::Tn* mutant (Fig. 2b, left panel). Interestingly, the TPP-independent phage phKSW1 (Extended Data Table 2) adsorbs considerably faster to GD01 (as does a BPs gp22 A604E mutant in *M. smegmatis*¹⁹) than its parent phage (Fig. 2b, middle panel) and shows only a small improvement in adsorption to the GD01 *fadD23::Tn* mutant relative to BPs Δ 33HTH_HRM10 infection of GD01 (Fig. 2b). In contrast, Zoej Δ 43–45 adsorbs similarly to both *M. abscessus* strains (Fig. 2b, right panel).

Phage Muddy tail spike mutants are also TPP independent

We similarly isolated a resistance escape mutant of Muddy (Muddy_REM1, Extended Data Table 2) and, together with three Muddy mutants with expanded *M. tuberculosis*²⁰ host ranges, characterized their infection of TPP pathway mutants (Fig. 2c). Three of the mutants (Muddy_REM1, Muddy_HRM^{N0157-1} and Muddy_HRM^{N0052-1}) efficiently infect all of the TPP pathway mutants; Muddy_HRM^{N0157-2} forms very turbid plaques on all of the mutants, similar to wild-type Muddy (Fig. 2c). Sequencing showed that Muddy_REM1 contains a single base substitution in the tail spike gene 24 conferring an E680K substitution (Extended Data Table 2), the same substitution as in Muddy_HRM^{N0052-1}; Muddy_HRM^{N0157-1} and Muddy_HRM^{N0157-2} have G487W and T608A substitutions in gp24, respectively²⁰.

Loss of TPPs in spontaneous *M. abscessus* resistant mutants

We previously reported *M. abscessus* mutants spontaneously resistant to BPs derivatives⁹. Two of the strains (GD17_RM1 and GD22_RM4, Extended Data Table 3) have mutations in *pks* and are at least partially resistant to BPs Δ 33HTH_HRM10 (ref. 9). We have similarly isolated three additional spontaneous mutants resistant to BPs Δ 33HTH_HRM10, two of which (GD38_RM2 and GD59_RM1) have mutations in *pks*; the third (GD180_RM2) has a nonsense mutation in *mmpL10* (Extended Data Table 3). BPs Δ 33HTH_HRM10 does not form plaques on mutants GD38_RM2, GD17_RM1 or GD59_RM1 and forms very small plaques at a reduced efficiency of plaquing on GD22_RM4 (Fig. 3a). Thus, point mutations in *M. abscessus* TPP synthesis genes can give rise to BPs resistance, although these have not been observed clinically⁵. These mutants are infected well by other phages we tested that infect the parent strain (Fig. 3a).

The *M. abscessus* Pks protein (MAB_0939) is a 3,697-residue multi-domain protein (Fig. 3b). Two of the spontaneously resistant mutants have frameshift mutations close to the midpoint of the gene (at codons 2,115 and 2,389, Extended Data Table 3 and Fig. 3b) and two others have amino acid substitutions in the N-terminal ketosynthase (KS) domain (Extended Data Table 3 and Fig. 3b). We note that the two frameshift mutations are in the second acyltransferase (AT) domain and leave the upstream domains intact (Fig. 3b).

Some phage-insensitive clinical isolates lack TPPs

M. abscessus clinical isolates vary greatly in their sensitivity to BPs Δ 33HTH_HRM10 and Muddy⁹. There are probably numerous determining factors, but these could include loss of TPPs. Analysis of the TPP synthesis proteins (Pks, PE, PapA3, MmpL10 and FadD23) of 143 sequenced clinical isolates and reference strain ATCC19977 identified 37 distinct genotypes that generally correlate with global nucleotide similarity (Fig. 3c); however, no evident correlation between these variations and sensitivity to BPs Δ 33HTH_HRM10 and/or Muddy was observed (Fig. 3c). Most of the variations observed reflect amino acid substitutions, although two strains (GD262 and GD273) have identical large deletions in *pks* (3,645 bp) and two others (GD155 and GD286) have translocations resulting in 30.2 kbp insertions in *pks* (Fig. 3d). Both GD273 and GD286 have phage infection profiles consistent with TPP loss, and the TPP-independent mutant Muddy_HRM^{N0052-1} overcomes the defect (Fig. 3e). GD262, GD273 and GD286 are not susceptible to BPs Δ 33HTH_HRM10 or the TPP-independent mutant BPs_REM1 (Fig. 3e), and these strains probably carry additional phage defence mechanisms targeting BPs and its derivatives. GD155 has a smooth colony morphology (Fig. 3c) and is not susceptible to any of the phages tested here.

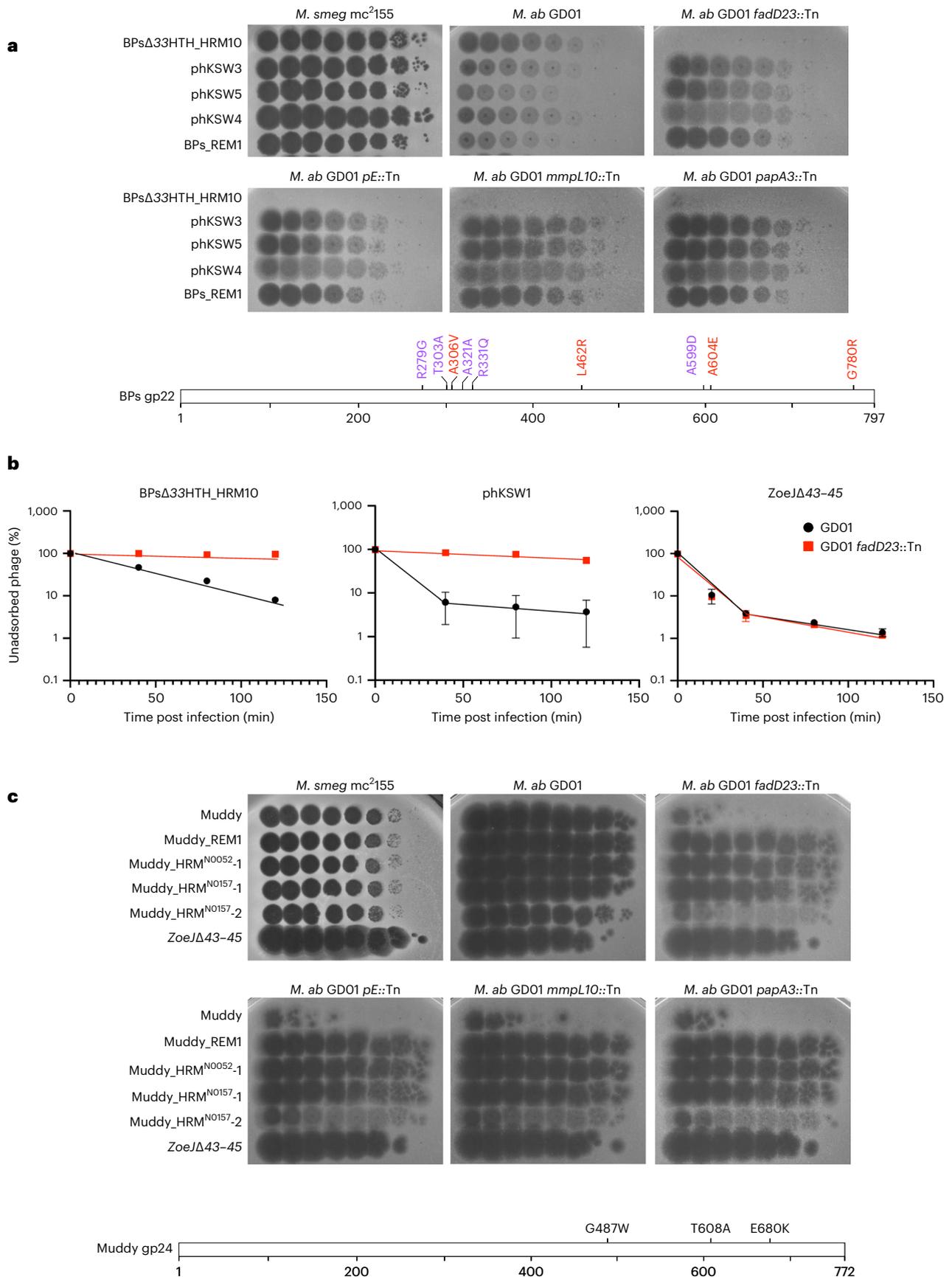
Complementation restores TPP synthesis and phage infection

Mutants GD22_RM4 and GD180_RM2, which are defective in *pks* and *mmpL10*, respectively (Fig. 4a), can both be complemented to fully restore BPs Δ 33HTH_HRM10 and Muddy infection (Fig. 4b). Both mutants lack cell wall TPPs and TPPs are at least partially restored by complementation (Fig. 4c). Furthermore, a derivative of BPs expressing mCherry³⁵, which behaves similarly to BPs Δ 33HTH_HRM10 in plaque assays (Fig. 4b) and liquid infections (Fig. 4d), gives fluorescence from parent strains but not from GD22_RM4 and GD180_RM2 (Fig. 4e,f and

Fig. 2 | Mutants of BPs Δ 33HTH_HRM10 and Muddy overcome TPP loss.

a, Tenfold serial dilutions of BPs Δ 33HTH_HRM10 and gp22 mutants (as indicated on the left; see Extended Data Table 2) were spotted onto solid media with *M. smegmatis* mc²155, *M. abscessus* GD01 or *M. abscessus* GD01 transposon insertion mutant strains. Plaque assays were performed at least twice with similar results. The locations of amino acid substitutions in BPs Δ 33HTH_HRM10 gp22 conferring the ability to infect TPP-deficient strains (red) or previously found to broaden host range to include *M. tuberculosis* (purple) (bottom panel) are indicated. The A306V and A604E substitutions were identified with both assays. **b**, Adsorption of phages BPs Δ 33HTH_HRM10, phKSW1 and Zoej Δ 43–45 to *M. abscessus*

strains GD01 and GD01 *fadD23::Tn* (GD01Tn_BPs_HRM10_RM1) as indicated by the percentage of unadsorbed phages remaining in infection supernatants at different times after infection. Assays were performed in duplicate twice and data presented are mean \pm s.d. **c**, Tenfold serial dilutions of Muddy and Muddy gp24 mutants (as indicated on the left) were spotted onto solid media with *M. smegmatis* mc²155, *M. abscessus* GD01 or *M. abscessus* GD01 transposon insertion mutant strains. Plaque assays were performed at least twice with similar results. The locations of amino acid substitutions in Muddy gp24 that confer the ability to infect TPP-deficient strains (bottom panel) are indicated.



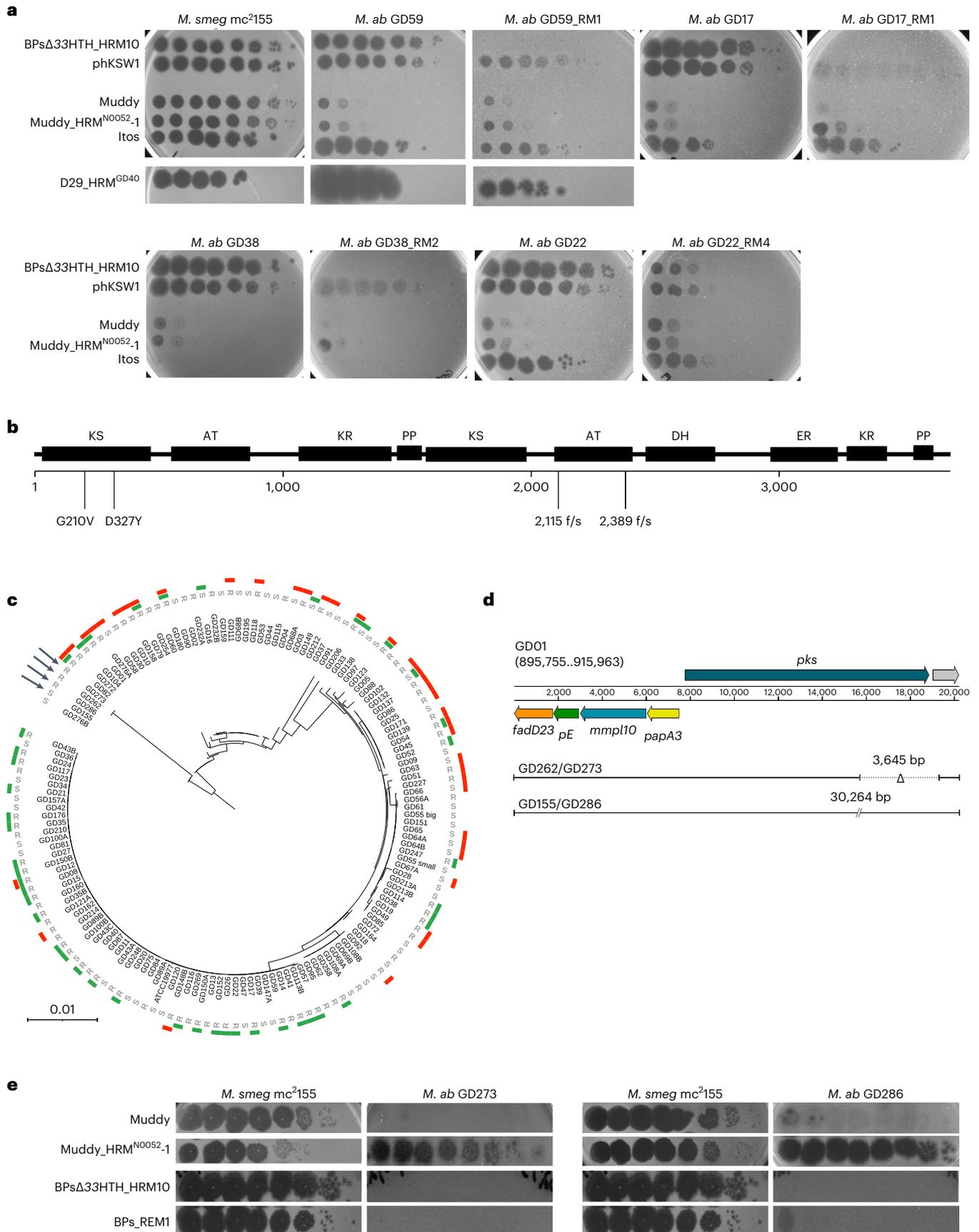


Fig. 3 | Phage infection profiles of *M. abscessus* phage-resistant mutants.

a, Tenfold serial dilutions of phage lysates (as indicated on the left) were spotted onto solid media with *M. smegmatis* mc²155, the parent *M. abscessus* strains or spontaneously isolated phage-resistant mutant (RM) derivatives. Plaque assays were performed at least twice with similar results. **b**, A schematic representation of *M. abscessus* Pks showing the location of predicted functional domains and the amino acid changes in spontaneous phage-resistant mutants below. Domain abbreviations are: AT, acyltransferase; KS, ketosynthase, KR, ketoreductase; DH, dehydratase; ER, enoylreductase; PP, phosphopantetheinylate acyl carrier protein. Domains were identified using the PKS analysis web site at <http://nrps.igs.umd.edu/> (ref. 53). **c**, Amino acid sequences from the five TPP synthesis

pathway genes in 143 *M. abscessus* clinical isolates (and *M. abscessus* ATCC19977) were concatenated and used to construct a phylogenetic tree. Strain morphotypes are labelled as either rough (R) or smooth (S). Susceptibilities to phages BPsΔ33HTH_HRM10 and Muddy are represented in green and red, respectively⁹. Arrows indicate strains in **d** and **e**. **d**, Position of large deletions (GD262 and GD273) or insertions (GD155 and GD286) in the *pks* gene with respect to the GDO1 TPP locus. **e**, Tenfold serial dilutions of phage lysates (as indicated on the left) were spotted onto solid media with either *M. smegmatis* mc²155 or *M. abscessus* strains GD273 and GD286. Plaque assays were performed at least twice with similar results.

Extended Data Fig. 2). Complementation fully restores liquid infection of GD180_RM2 and partially restores infection of GD22_RM4 (Fig. 4d), as well as fluorescence with the reporter phage (Fig. 4e,f). These data are consistent with an early defect in phage infection in these mutants, consistent with loss of adsorption to the cell surface. We note that disruption of TPP synthesis does not interfere with Ziehl-Neelsen staining of the bacteria or alter antibiotic sensitivities (Extended Data Fig. 3).

***M. smegmatis* TPP mutants are resistant to BPs and Muddy**

M. smegmatis is genetically tractable and susceptible to a large number of diverse phages, and using TPP mutants in *pks* (*MSMEG_0408*), *papA3* (*MSMEG_0409*), *mmpL10* (*MSMEG_0410*), *fadD23* (*MSMEG_0411*) and *pE* (*MSMEG_0412*)^{24,36}, we showed that these have similar, albeit somewhat milder, phenotypes to *M. abscessus* TPP mutants (Fig. 5a). As expected, Δ*pks*, Δ*mmpL10* and Δ*pE* mutants failed to produce TPPs, while complementation restores the presence of TPPs (Fig. 5b). The relatively efficient infection of the Δ*fadD23* mutant is consistent with incomplete TPP loss, possibly due to an unidentified fatty acyl-AMP ligase partially overcoming the defect²⁴. Muddy similarly forms very turbid plaques on the Δ*pks* and Δ*papA3* mutants, but only mildly so on the Δ*fadD23* mutant (Fig. 5a). Interestingly, the TPP-independent BPs and Muddy mutants infect *M. smegmatis* TPP mutants normally (Fig. 5a). Complementation of the Δ*papA3*, Δ*pks*, Δ*mmpL10* and Δ*pE* mutants restores normal infection by both Muddy and BPsΔ33HTH_HRM10 (Extended Data Fig. 4).

BPsΔ33HTH_HRM10 and its mCherry derivatives are both defective in liquid infection of the Δ*pks*, Δ*mmpL10* and Δ*pE* *M. smegmatis* mutants, and efficient infection and lysis are restored by complementation (Extended Data Fig. 4a,e). The mCherry reporter phage shows fluorescence in wild-type *M. smegmatis* but loss of fluorescence in infection of all three mutants, with restoration of infection in the complemented strains (Extended Data Fig. 4b,c). In addition, the mCherry fluorophage behaves similarly to its parent in plaque assays on *M. smegmatis* mutant and complemented strains (Extended Data Fig. 4e). Both BPsΔ33HTH_HRM10 and the TPP-independent phKSW1 are defective in adsorption of a Δ*pks* mutant relative to wild-type *M. smegmatis* (Fig. 5c and Extended Data Fig. 5), similar to *M. abscessus* (Fig. 2b).

Testing a broader phage panel showed that most are not dependent on TPPs, except for ShedlockHolmes, MsGreen and Papyrus in Clusters/Subclusters K3, L3 and R, respectively, which show some TPP dependence (Fig. 5d). MsGreen and ShedlockHolmes have tail genes

related to Muddy gene 24, although we note that Zoj also does and yet is not TPP dependent. However, such variation is not unexpected, as the escape mutant observations show that only a single amino acid substitution is sufficient to confer TPP independence (Figs. 2a,c and 5a).

TPP-independent phages reveal host resistance mechanisms

The TPP-independent phage mutants infect *M. abscessus* efficiently and we therefore repeated the selection for Tn insertion mutants to explore whether there are other surface molecules required for infection. Interestingly, such mutants arise from the same library at a 100-fold lower abundance than BPsΔ33HTH_HRM10 and Muddy resistant mutants (Fig. 6a and Extended Data Table 1). All but one of the phKSW1 resistant mutants analysed are similarly resistant to BPsΔ33HTH_HRM10, BPs_REM1 and phKSW1 but remain sensitive to Muddy and Muddy_REM1 (Fig. 6b); one (GDO1Tn_phKSW1_RM10) is resistant to phKSW1 but is sensitive to BPs_REM1 and is resistant to Muddy but not Muddy_REM1 (Fig. 6b). One of the two Muddy_REM1 resistant mutants is only partially resistant to Muddy and Muddy_REM1, but both are fully sensitive to all of the BPs derivatives (Fig. 6b).

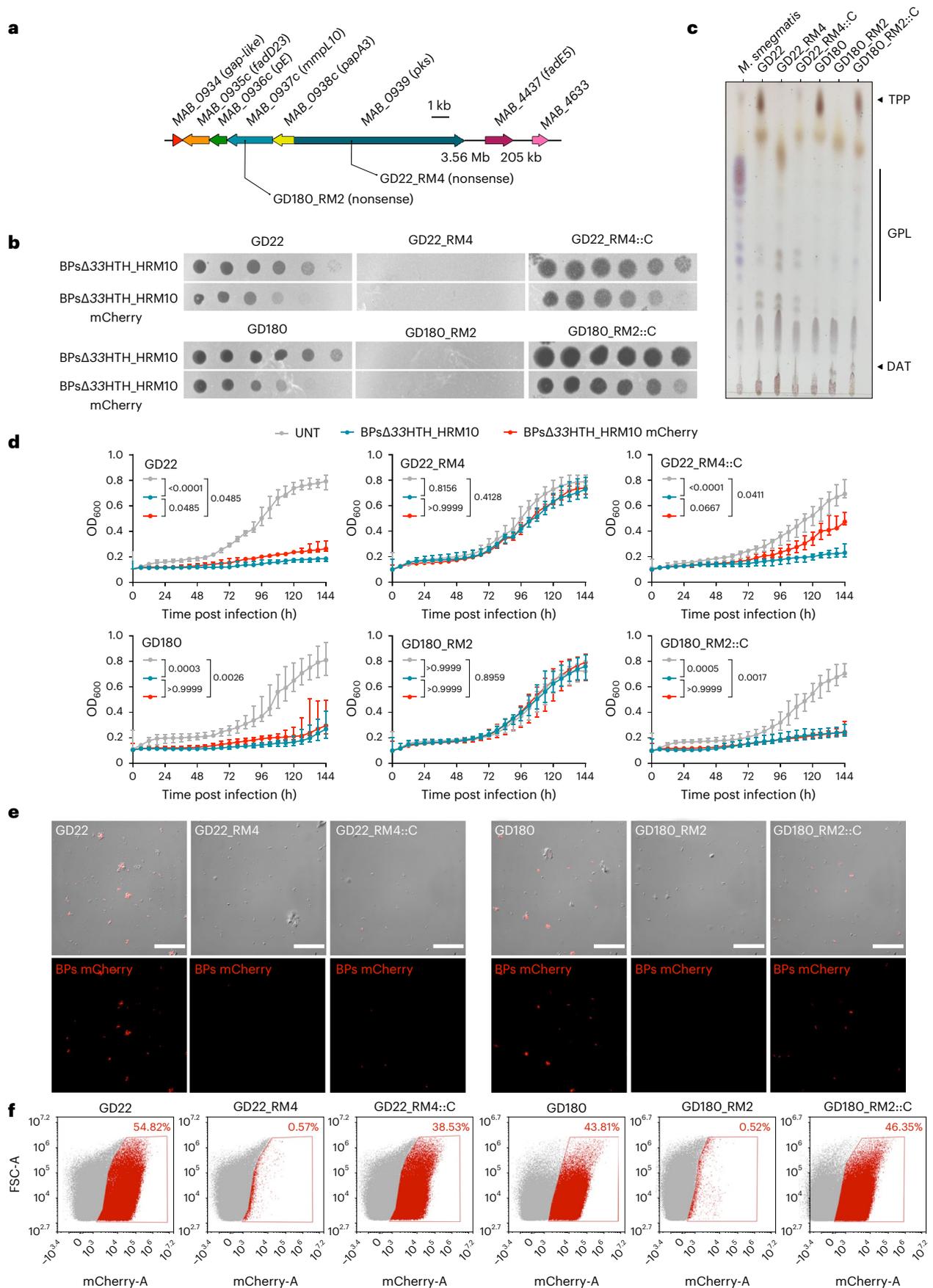
Characterization of these mutants shows that they are unlikely to be defective in surface recognition by the phages. Two Muddy_REM1 resistant strains have Tn insertions in transcription genes *greA* and *rpoC* (Extended Data Table 1), and one phKSW1 resistant mutant maps in *recB* (*MAB_0399c*; Extended Data Table 1); these are unlikely to be directly involved in phage binding. Four of the phKSW1 resistant mutants (RM2, RM5, RM7 and RM8), representing at least three independent insertions (Fig. 6 and Extended Data Table 1), have transposons at GDO1 coordinate 1,169,901 in a region absent from ATCC19977 and many other *M. abscessus* strains and within a candidate 'phage-inducible chromosomal island' (PICl) (Fig. 6c and Extended Data Table 1). The insertions are upstream of GDO1 gene *EXM25_05825* encoding a protein with a DUF4145 domain, which is implicated in a variety of viral defence systems and is often fused with restriction endonucleases and abortive infection systems^{37–39} (Fig. 6c). It is plausible that the BPs resistant phenotype results from overexpression of this gene.

Analysis of the cell wall lipids shows that all of the mutants retain TPPs, except for GDO1Tn_phKSW1_RM10 (Fig. 6d), which has a Tn insertion in *papA3* in addition to a secondary insertion in *MAB_1686* (Extended Data Table 1). Two additional mutants (GDO1Tn_phKSW1_RM1 and RM4) have an insertion in the nearby *MAB_1690* gene and have normal TPPs (Fig. 6d); *MAB_1686* and *MAB_1690* are within a large

Fig. 4 | TPPs are essential for BPsΔ33HTH_HRM10 to lyse *M. abscessus*.

a, Representation of the *M. abscessus* TPP locus showing mutations affecting the clinical strains studied. **b**, Phages were spotted as tenfold serial dilutions onto clinical strains (GD22 and GD180), spontaneous resistant mutants (RM) and complemented strains (::C). Plates were incubated for 2–3 d at 37 °C before imaging. The assay was repeated at least three times and a representative experiment is shown. **c**, TLC analysis of total lipids extracted from *M. abscessus* clinical strains, resistant mutants and complemented strains. Eluent: CHCl₃/CH₃OH (90:10 v/v). Anthrone was sprayed on the plates to visualize the lipid profile, followed by charring. **d**, Liquid growth of the strains with BPsΔ33HTH_HRM10 or BPsΔ33HTH_HRM10 mCherry (MOI10) or without phage (untreated; UNT)

monitored every 6 h for 6 d at 37 °C in 7H9/OADC supplemented with 1 mM CaCl₂. Data are plotted as the median ± interquartile range of three independent experiments done in triplicate. Statistical analysis conducted to compare the differences at 144 h between strains was done with a two-sided Dunn's multiple comparisons test, with *P* values indicated. **e**, Representative fields of *M. abscessus* clinical strains infected with BPsΔ33HTH_HRM10 mCherry (MOI 10) for 4 h at 37 °C before fixation. Infected bacilli appear in red. These results were obtained at least two times. Scale bars, 30 μm. **f**, Flow cytometry data represented as dot plot show the percentage of bacilli infected with the BPsΔ33HTH_HRM10 mCherry fluorophage relative to the study population. This assay was conducted at least twice.



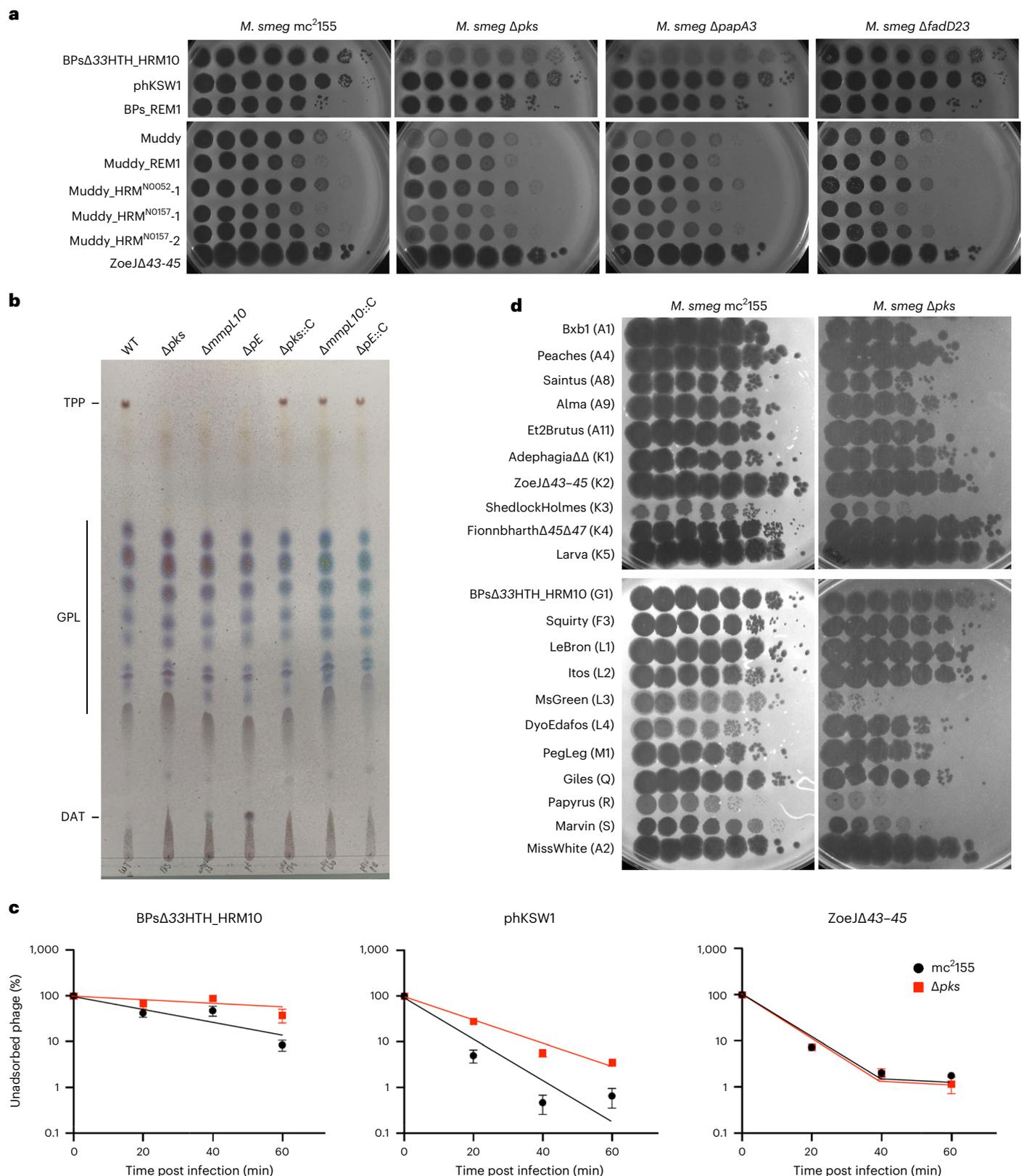


Fig. 5 | TPPs are also required for infection of *M. smegmatis* by phages BPs and Muddy. **a**, Tenfold serial dilutions of phages (as indicated on the left) were spotted onto solid media with *M. smegmatis* mc²155, Δpks , $\Delta papA3$ or $\Delta fadD23$ as indicated. Plaque assays were performed at least twice with similar results. **b**, TLC analysis of total lipids extracted from wild-type *M. smegmatis*, three TPP-deficient mutants and the corresponding complemented strains. Eluent: CHCl₃/CH₃OH (90:10 v/v). TLC was revealed by spraying anthrone on the plate, followed by charring. **c**, Adsorption of phages BPs Δ 33HTH_HRM10, phKSW1 and ZoeJ Δ 43–45 to *M. smegmatis* strains

mc²155 and Δpks as indicated by the percentage of unadsorbed phages remaining in the supernatant at different times after infection. Assays were performed in triplicate at least twice with similar results and a representative experiment is shown. Data are represented as mean \pm s.d. Other replicates are shown in Extended Data Fig. 5. **d**, A panel of phages from various genetic clusters were tenfold serially diluted and spotted onto *M. smegmatis* mc²155 and Δpks . Phage names are shown with their cluster/subcluster designation in parentheses. Plaque assays were performed twice with similar results.

(22 kbp) operon encoding an Mce4 transport system (Extended Data Table 1). However, this Mce4 system is probably not acting as a receptor as the GD01Tn_phKSW1_RM1 mutant does not have an adsorption defect (Fig. 6e). The GD01Tn_phKSW1_RM2 mutant also does not have any adsorption defect (Fig. 6e).

Discussion

Trehalose polyphosphates are among the largest known lipids in mycobacteria and are structurally related to sulfolipids SL-1 and polyacylated trehalose PAT, which, in contrast to TPPs, are found exclusively in *M. tuberculosis*. The roles of TPPs in mycobacterial physiology and/or growth remain unclear, but they are implicated in clumping and cording in *M. abscessus*²⁵. Many TPP-defective *M. abscessus* strains have rough morphotypes, typically associated with cording, consistent with the rough colony morphology primarily resulting from GPL loss²³. Clearly, TPPs are critical for adsorption of several phages, including the therapeutically useful Muddy and BPs^{4,5}. The finding that both phages require TPPs is a surprise, as they are genomically distinct, share few genes and were thus considered to be suitable for combination in phage cocktails. Nonetheless, the availability of TPP-independent phage mutants provides substitutes to which resistance to both phages occurs at a much lower frequency, and such mutants do not typically show co-resistance to the two phages. We propose that the TPP-independent phages replace their cognate parent phages in therapeutic cocktails.

A simple explanation for the role of TPPs is that they are specifically recognized and bound to by BPs, Muddy and the other TPP-dependent phages as the only requirement for DNA injection. However, it is then unclear as to how the TPP-independent phages overcome TPP loss, and it seems implausible that they gain the ability to bind to a completely different receptor. A more likely explanation is that TPPs act as co-receptors for Muddy and BPs and facilitate recognition of a different surface molecule; the TPP-independent phage mutants would then simply bypass the need for activation by TPPs. The observation that tail spike mutants such as phKSW1 adsorb substantially better than the parent phage, even to TPP-containing host cells, is consistent with this latter explanation. Furthermore, wild-type BPs does not efficiently infect *M. tuberculosis* H37Rv, but a mutant with the gp22 A604E substitution enables efficient infection¹⁹, even though *M. tuberculosis* lacks TPPs⁴⁰. Similarly, wild-type Muddy efficiently infects *M. tuberculosis* H37Rv²⁰ despite its lack of TPPs, and Muddy tail spike substitutions expand its host range to other *M. tuberculosis* strains²⁰. These observations not only suggest that TPPs are not the receptors per se for these phages, but that there may be general mechanisms governing receptor access by the phages, together with phage strategies for expanding host cell recognition and infection. Furthermore, if TPPs are not the target of direct phage recognition, the true receptor is likely to be encoded by genes that are essential for mycobacterial viability. Thus, although transposon insertion mutagenesis has been used in other systems for identifying phage receptors^{41–44}, this may be of more limited use

in *Mycobacterium*, although as we have shown here, it is useful for mapping a plethora of resistance mechanisms.

Understanding the roles of TPPs in *M. abscessus* is important for therapeutic phage use, and we note that in at least some clinical isolates, the loss of TPPs through gene deletions or translocation leads to loss of infection by BPsΔ33HTH_HRM10 or Muddy. In the first therapeutic use of mycobacteriophages, BPsΔ33HTH_HRM10 and Muddy were used in combination with Zoj, and it is of interest that Zoj is not TPP dependent. We also note that resistance to BPs derivatives or Muddy has not been observed in clinical use, even in 11 cases where only a single phage was used⁵. It is plausible that resistance through TPP loss has a trade-off with fitness, although the roles of TPPs in *M. abscessus* pathogenicity and persistence are not known. Strikingly, the use of TPP-independent derivatives of BPs and Muddy not only avoids concerns about resistance via TPP loss, but also negates cross-resistance between the two phages (Fig. 6).

Finally, transposon mutagenesis and selection of mutants resistant to the TPP-independent phages reveal additional mechanisms of phage resistance. Particularly intriguing is the isolation of insertions in a candidate PIC1, with the potential to activate expression of a PIC1 gene implicated in phage defence. These *Mycobacterium* PIC1s and their roles in phage infection profiles deserve further investigation.

Methods

Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains (Extended Data Table 4) were grown in Middlebrook 7H9 media (BD Difco) supplemented with 10% oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC enrichment) (7H9/OADC), or in Middlebrook 7H10/OADC solid media (BD Difco) at 37 °C. Antibiotics were added when required. Transformations of electrocompetent mycobacteria were performed using a Bio-Rad Gene pulser (25 μF, 2,500 V, 800 Ω). For some *M. smegmatis* strains, Tween80 (0.05%) was used in starter cultures but omitted in subcultures used for phage infections. Cultures used in phage infection were supplemented with 1 mM CaCl₂. When required, *M. abscessus* strains were selected with 1 mg ml⁻¹ hygromycin (Toku-E, 31282-04-9) or 200 μg ml⁻¹ streptomycin, and *M. smegmatis* was selected with 50 μg ml⁻¹ hygromycin. *M. abscessus* strains in the GDxx series are part of the strain collection at the University of Pittsburgh and were kindly provided by numerous colleagues.

Engineering of MycoMarT7-Hyg2

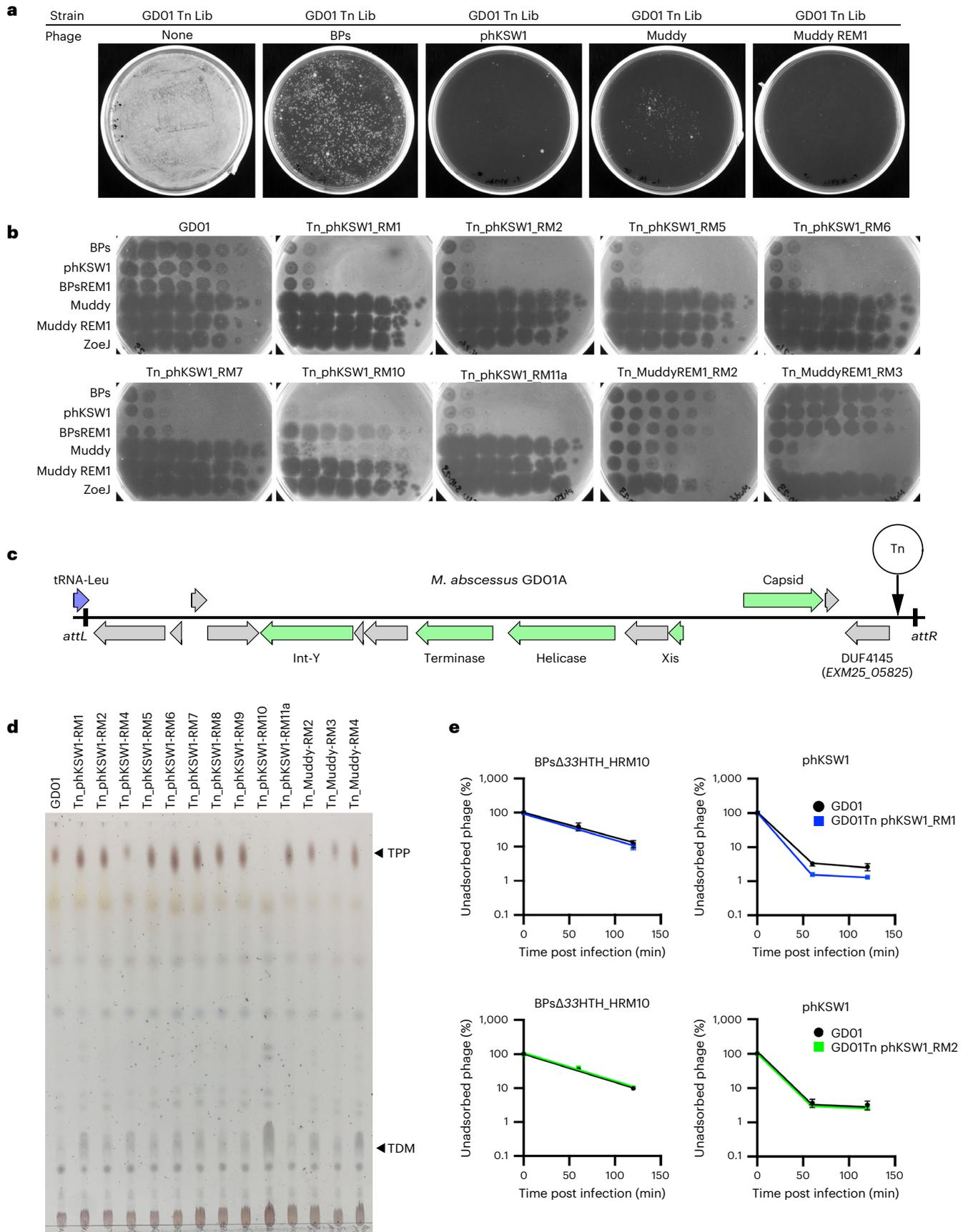
Phage MycoMarT7-Hyg1 and MycoMarT7-Hyg2 were engineered from phage MycoMarT7 using CRISPY-BRED recombineering³¹. Briefly, double-stranded DNA recombineering substrates were designed that contained the desired mutation (a HygR cassette) with flanking sequences to permit the replacement of either KanR (MycoMarT7-Hyg1) or KanR and oriR6K (MycoMarT7-Hyg2). These substrates and genomic (g)DNA from MycoMarT7 were transformed into *M. smegmatis* mc²155 recombineering cells that contain the plasmid pJV138 (ref. 31). Transformations were combined with cells containing a CRISPR plasmid

Fig. 6 | Evidence for additional phage resistance mechanisms. **a**, Recovery of *M. abscessus* GD01 transposon mutants resistant to phages BPs, phKSW1, Muddy and Muddy_REM1. A culture of an *M. abscessus* GD01 transposon library (GD01 Tn Lib) containing approximately 10⁶ c.f.u. was plated onto phage-seeded plates as indicated. **b**, Phage infection profiles of resistant mutants. Tenfold serial dilutions of phages BPsΔ33HTH_HRM10 ('BPs'), phKSW1, Muddy, Muddy_REM1 and ZojΔ43–45 ('Zoj') (as indicated on the left) were spotted onto lawns of *M. abscessus* GD01 or mutants isolated as resistant to TPP-independent phages phKSW1 and Muddy_REM1. Mutant designations indicate that they are Tn insertions (Tn), the phage used for mutant selection (that is, phKSW1 or Muddy_REM1) and the mutant number (for example, RM1, RM2 and so on). Where siblings are suspected (Extended Data Table 1), only one representative is shown; suspected siblings showed similar results. **c**, Organization of a putative candidate PIC1 in *M. abscessus* GD01. The satellite region is defined by the *attL*

and *attR* attachment sites resulting from site-specific integration at a tRNA-Leu gene (GD01 coordinates 1158039 to 1170246). It contains several phage-related genes (green arrows) with the putative functions indicated. At the extreme right-hand end of the PIC1, a gene (locus tag EXM25_05825) carries a DUF4145 domain implicated in phage defence in other systems. Four mutants contain a Tn insertion at the site, indicated by the vertical arrow. **d**, TLC analysis of total lipids extracted from *M. abscessus* GD01 and transposon mutants isolated as resistant to TPP-independent phages. **e**, Adsorption of BPsΔ33HTH_HRM10 and phKSW1 to GD01Tn_phKSW1_RM1 (blue, top panels) and to GD01Tn_phKSW1_RM2 (green, bottom panels). Adsorption to GD01 performed in parallel is shown in black. The proportions of phage particles remaining in solution are shown at different times after infection. Assays were performed in duplicate twice and data presented are mean ± s.d.

(a derivative of pIRL53) selecting against the parent MycoMarT7 and plated on solid media; this enriches for mutants containing the allelic replacement that form plaques on the plate. Resulting plaques were

screened for the presence of the Hyg-marked transposon by PCR, and positive plaques were plaque purified, whole-genome sequenced and confirmed to have retained temperature sensitivity.



Construction of the *M. abscessus* GD01 transposon insertion library and phage challenge

The transposon mutagenesis library was largely prepared as previously described³². Briefly, 50 ml of *M. abscessus* GD01 was grown to an OD₆₀₀ of 0.2. The cells were pelleted and resuspended in 1 ml of phage buffer (10 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM MgSO₄, 68.5 mM NaCl, 1 mM CaCl₂), pre-warmed to 37 °C and infected with 800 µl MycoMarT7-Hyg2 (5 × 10¹⁰ plaque-forming units (p.f.u.) ml⁻¹). The cells and MycoMarT7-Hyg2 were incubated at 37 °C for 7.5 h. Cells were pelleted and resuspended in 8 ml PBS + 0.05% Tween80, and the resuspension was combined with 8 ml 40% glycerol for freezing at -80 °C. The transduction frequency was determined by measuring hygromycin-resistant colonies per ml and 120,000 transductants were plated onto large square plates containing solid 7H10/OADC media with 0.1% Tween80 and 1 mg ml⁻¹ hygromycin. Plates were incubated at 37 °C for 9 d. To collect the library, cells were scraped off the solid media, resuspended in 7H9/OADC combined with 40% glycerol, aliquoted and frozen at -80 °C.

To identify GD01 insertion mutants that were resistant to phage infection, ~20 µl of GD01 Tn library was thawed and grown overnight to an OD₆₀₀ of 0.175. Dilutions of this culture (approximately 10⁴, 10⁵ and 10⁶ cells) were spread onto 7H10/OADC solid media plates seeded with or without 10⁸ p.f.u. of phages BPsΔ33HTH_HRM10, Muddy, pHKSW1 or Muddy_REM1. Plates were incubated at 37 °C for 7 d. Colonies able to grow on phage-seeded plates were subjected to PCR to identify a transposon insertion site (see below) and struck out two times to remove any remaining phage. After streaking, single colonies were grown in liquid media and used for phage susceptibility testing by standard plaque assay.

Identification of transposon insertion sites

Transposon insertion sites were identified by PCR using a primer that annealed to the transposon in the hygromycin resistance gene (Tn_Hyg_Fwd_2: 5'-CTTCACCTTCCTGCACGACT-3') and a primer with a degenerate 3' end, or if that did not yield an amplicon, nested PCR with primers Tn_Hyg_Fwd_2 and Primer 557 (5'-GGCCAGCGACTAACGAGCANNNNNNNGTT-3') followed by PCR with primers Primer 414 (5'-GGCCAGCGACTAACGAGAC-3') and Tn_Hyg_Fwd_1 (5'-TTCGAGGTGTTTCGAGGAGAC-3'). Amplicons were gel extracted, Sanger sequenced from the transposon and the result aligned to the GD01 sequence to identify the transposon insertion site. For most strains (and at least one strain per interrupted gene), the transposon insertion site was confirmed by designing primers that flanked the site identified by the initial PCR and confirming that this region had increased in size by 1,259 bp compared with strain GD01. For five strains resistant to pHKSW1 (GD01Tn_pHKSW1_RM1, 2, 4, 6 and 10), the entire genomes were also sequenced as previously described⁹ (and see below) to confirm the location of inserted transposons. Reads were assembled into contigs and the location of the transposon sequence was identified. To confirm the total number of transposon insertions, reads at the transposon/chromosome boundaries were closely inspected to determine the number of branches, and the coverage of the transposon contig compared to the rest of the genome was determined. In the cases of RM1, 2 and 4, the transposon contig had approximately the same coverage as the rest of the genome and showed only one type of transposon/chromosome hybrid read at each end. In the cases of RM6 and 10, the transposon contig had approximately twice the coverage of the rest of the genome, and at each end, there were two types of transposon/chromosome hybrid read.

Phages and screening of phage susceptibility

Phages used in this study were obtained from the University of Pittsburgh and *M. smegmatis* mc²155 was used to propagate them. Phage ZoeJΔ43–45 is a derivative of the previously described ZoeJΔ45 (ref. 28) and contains a deletion of genes 43 (integrase), 44 and 45 (repressor), corresponding to ZoeJ coordinates 33972–36489.

It also contains the following single nucleotide polymorphisms different from ZoeJ: G3204T, A10165G, A10713G, C15262T. Phage susceptibility profiles were assessed using standard plaque assays. Top agar bacterial lawns were made by combining Middlebrook top agar (Middlebrook 7H9, 1 mM CaCl₂, 0.35% BactoAgar) with 300–500 µl cell culture. After top agar had solidified, phages were tenfold serially diluted and spotted onto the top agar bacterial lawns and incubated for 24–48 h (*M. smegmatis*) or 5–7 d (*M. abscessus*) until bacterial lawns were confluent.

Plasmid construction

To create plasmid pKSW131, *fadD23*, *pE*, *mmpL10* and *papA3* and the flanking intergenic sequence was amplified using Q5 HiFi2× master mix (New England Biolabs) from gDNA isolated from *M. abscessus* GD01. The amplicon was purified and cloned into EcoRI-digested vector pLA155 using the NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix (New England Biolabs) and transformed into *E. coli* strain DH5a; plasmids and primers are shown in Extended Data Table 5. The culture that yielded a successfully constructed plasmid was grown at 30 °C rather than 37 °C, although it is unknown whether this contributed to successful plasmid maintenance in the culture. To create plasmid pKSW134, the open reading frame of *fadD23* was amplified from GD01 gDNA and cloned into PmlI-digested anhydrotetracycline (ATc)-inducible vector pCCK39 (ref. 45) using the NEBuilder HiFi DNA Assembly master mix. The entire plasmids were sequenced using Plasmidsaurus (<https://www.plasmidsaurus.com/>).

pMVpks_*mWasabi* and pMVmmpL10_*mWasabi* were constructed on the basis of pMVpks and pMVmmpL10 by in-fusion cloning. The *mWasabi* sequence under the control of the constitutive *Pleft** promoter⁴⁶ was amplified by PCR using a Q5 high-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Plasmids were linearized with KpnI-HF (New England Biolabs). Agarose gels were used to purify linear fragments, then circularized using In-Fusion SNAP Assembly master mix (Takara) according to the manufacturer's instructions. Stellar competent cells (Takara) were used for transformation. Plasmids generated were verified by sequencing (Eurofins Scientific).

Isolation and whole-genome sequencing of phage-resistant mycobacteria mutants

Two of these phage-resistant mutants (GD17_RM1 and GD22_RM4) were described previously⁹; the others were isolated in the same manner. Briefly, 10⁸ colony-forming units (c.f.u.) of *M. abscessus* were incubated with 10⁹ p.f.u. of phage. Infections were plated on solid media at 2 and 5 d post infection, and survivors were purified, tested for phage resistance and sequenced. The mutants were sequenced as described previously⁹. Briefly, 3 ml of culture was pelleted and resuspended in 600 µl nuclei lysis solution (Promega). Cells were added to lysing matrix B tubes (MP Biomedicals) and milled four times using a Bead-Bug6 microtube homogenizer (BenchMark). RNase A (2 µl, Thermo Scientific) was added and the solution was incubated at 37 °C for 10 min. Phenol-chloroform-isoamyl alcohol was added to the lysed cells and the aqueous phase was removed after centrifugation. DNA was precipitated using isopropanol and 3 M sodium acetate, and washed two times with 75% ethanol before resuspension. Libraries were prepared with the NEBNext Ultra II FS Library Prep kit (New England Biolabs) and sequenced on an Illumina MiSeq. The resulting reads were aligned to the parent strain genome using Consed⁴⁷. A custom programme (AceUtil) was used to identify differences between the mutant reads and the parent genome, and all mutations were confirmed by close inspection of the reads⁴⁸.

Isolation of BPsΔ33HTH_HRM10 mutants

Clear plaques were observed within high-titre spots for phage BPsΔ33HTH_HRM10 on strains GD01Tn_BPs_HRM10_RM6, GD01Tn_BPs_HRM10_RM11 and GD180_RM2. These plaques were picked and plated on the resistant strain two additional times to purify. A purified

plaque was then used to produce a high-titre phage lysate on *M. smegmatis* mc²155 and subsequently subjected to gene 22 PCR sequencing or whole-genome sequencing.

Total lipids extraction of mycobacteria and TLC analysis

Bacteria were grown in LB medium (Lennox, X964.3) at 37 °C without agitation and pelleted by centrifugation (3,000 g, 10 min, room temperature). Lipids were extracted from bacterial pellets treated successively with CHCl₃/CH₃OH (1:2) (Carlo Erba, 67-66-3; Honeywell, 67-56-1) and CHCl₃/CH₃OH (2:1), washed with water and dried. Lipids were resuspended in CHCl₃ before spotting on TLC. For TLC analysis, silica gel G60 plates (10 × 20 cm, Macherey-Nagel) were used to spot samples and lipids were separated with CHCl₃/CH₃OH (90:10 v/v). Lipid profiles were shown by spraying the plates with a 0.2% anthrone (Sigma, 90-44-8) solution (w/v) in concentrated H₂SO₄ (Honeywell, 7664-93-9) and charring.

Adsorption assays

M. smegmatis strains were grown to an OD₆₀₀ of 0.5–0.8, then concentrated approximately tenfold to 1.75 × 10⁹ ml⁻¹ in 7H9/10% albumin dextrose complex (ADC)/1 mM CaCl₂. One millilitre of cells (*M. smegmatis* mc²155 or mc²155 Δ*pks*) was infected in triplicate in a 12-well plate at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001. Cells were incubated at 37 °C with agitation. At each timepoint, 50 μl of liquid was removed and pelleted, and the supernatant that contained unbound phage was titred on *M. smegmatis*. For *M. abscessus* GD01 and *M. abscessus* GD01 *fadD23::Tn*, the same protocol was followed but the strains were grown to an OD₆₀₀ of 0.15–0.25 and cells were concentrated approximately tenfold to 6.3 × 10⁸ ml⁻¹ in 7H9/10% OADC/1 mM CaCl₂.

Growth curves of mycobacteria incubated with phages

Bacterial growth assays were performed in 96-well plates (Falcon), each well containing 100 μl of bacterial culture and 100 μl of phage lysates or medium as control. Exponential phage cultures of mycobacteria were used and set at 3 × 10⁷ c.f.u. ml⁻¹ in Middlebrook 7H9/OADC supplemented with 1 mM CaCl₂. Phages were incubated at an MOI of 10 and diluted in 7H9/OADC supplemented with 1 mM CaCl₂. Measurements were taken every 3 h for *M. smegmatis* strains and every 6 h for *M. abscessus* strains using a spectrophotometer (Tecan, infinite 200 PRO) until stationary phase was reached (2 d for *M. smegmatis* strains and 6 d for *M. abscessus* strains). Plates were incubated at 37 °C without agitation.

Microscopy and flow cytometry sample preparation

Mycobacteria were subcultured in 7H9/OADC with agitation to obtain exponential phase cultures. Bacteria were concentrated to obtain a sample containing 1.2 × 10⁷ c.f.u. (for microscopy) or 6 × 10⁶ c.f.u. (for flow cytometry) and then incubated with either medium or phage BPsΔ33HTH_HRM10 (MOI 10) as controls or phage BPsΔ33HTH_HRM10 mCherry (MOI 10). The infections were performed for 2 h and 4 h for *M. smegmatis* and *M. abscessus* strains, respectively, at 37 °C without agitation. After infection, samples were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, EM-15714) for 20 min at room temperature. Samples were then diluted as necessary, depending on the experiment, with 7H9/OADC supplemented with 0.025% tyloxapol and sonicated to disrupt bacterial aggregates. For microscopy, samples were then mounted between coverslips and slides with Immu-Mount (Eprelia). Samples were kept at 4 °C in the dark until analysis.

Microscopy

Differential interference contrast and epifluorescence images were acquired on a ZEISS Axio Imager Z1 upright microscope. A ×63 Plan Achromat 1.4 NA oil objective and a ×100 Plan Achromat 1.4 NA oil objective were respectively used for *M. smegmatis* and *M. abscessus* strains. mCherry was excited with an Intensilight fibre lamp with Texas

Red (Ex: 560/40, dic. 585, Em: 630/75) filter cube. Images were acquired with an sCMOS ZYLA 4.2 MP camera.

Image analysis

Representative fields without technical artefacts were chosen. Fiji software (version 1.53t) was used to adjust intensity, brightness and contrast (identically for compared image sets).

Flow cytometry

Infected bacteria were analysed by flow cytometry using a NovoCyte ACEA flow cytometer (excitation laser wavelength: 561 nm, emission filter: 615/20 nm). Gates were drawn using SSC-A/FSC-A and multiple cells were excluded with SSC-H/SSC-A. Uninfected cells and bacteria infected by non-fluorescent phage were included as controls. Experiments were performed at least twice with similar results. Approximately 300,000 events were recorded per experiment. Analysis was done with NovoExpress version 1.6.1.

Ziehl-Neelsen staining

Concentrated cultures were fixed on glass slides by heating at 150 °C for 15 min, followed by chemical fixation with methanol. BD Carbolfuchsin kit was used following the manufacturer's instructions. Samples were observed using an Evos M7000 imaging system.

Drug susceptibility testing

The Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines⁴⁹ were followed to determine the MICs. Briefly, all cultures were incubated in cation-adjusted Mueller–Hinton Broth (Merck, 90922) at 30 °C prior to the experiment. Each well of a 96-well plate was filled with 100 μl of bacterial suspension previously inoculated with 5 × 10⁶ c.f.u. ml⁻¹, except for the first column, to which 198 μl of the bacterial suspension was added. Drug (2 μl) at its highest concentration was added to the first column containing 198 μl of bacterial suspension and was twofold serially diluted. Results were obtained after 4 d of incubation at 30 °C without agitation. Three independent experiments were carried out in duplicate.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with GraphPad Prism v.9.0.0 for Windows. Descriptive statistics are cited and represented as median and interquartile range for each of the variables calculated. A non-parametric Dunn's test was used to compare the different conditions at 48 h for *M. smegmatis* or 144 h for *M. abscessus*. An a priori significance level was set at $\alpha = 0.05$.

Phylogenetic analysis of TPP pathway amino acid sequences in *M. abscessus*

A phylogenetic tree was constructed for a concatenated alignment of amino acid sequences of the five TPP synthesis pathway members for 143 clinical isolates of *M. abscessus* and *M. abscessus* ATCC19977. Homologues were identified using MMSeqs2 (v.13.45111) and phammseqs (v.1.0.4)⁵⁰ and subsequently aligned using ClustalO (v.1.2.4) and Trimal (v.1.4.1)⁵¹. A concatenated alignment was generated with a custom Python script and the maximum-likelihood phylogeny was generated using RAxML (v.8.2.12)⁵².

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The genome sequences of mycobacteriophages referenced here are available at phagesdb.org. The genome sequences of the *M. abscessus* strains are available at <https://osf.io/hjb7q/> and at NCBI BioProject PRJNA669041. All biological materials described in this study are available from G.F.H. at gfh@pitt.edu on reasonable request.

References

1. Martiniano, S. L., Nick, J. A. & Daley, C. L. Nontuberculous mycobacterial infections in cystic fibrosis. *Thorac. Surg. Clin.* **29**, 95–108 (2019).
2. Johansen, M. D., Herrmann, J. L. & Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 392–407 (2020).
3. Nick, J. A., Daley, C. L., Lenhart-Pendergrass, P. M. & Davidson, R. M. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **27**, 586–592 (2021).
4. Dedrick, R. M. et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Med.* **25**, 730–733 (2019).
5. Dedrick, R. M. et al. Phage therapy of *Mycobacterium* infections: compassionate-use of phages in twenty patients with drug-resistant mycobacterial disease. *Clin. Infect. Dis.* **76**, 103–112 (2023).
6. Nick, J. A. et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell* **185**, 1860–1874.e12 (2022).
7. Little, J. S. et al. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection. *Nat. Commun.* **13**, 2313 (2022).
8. Hatfull, G. F. Mycobacteriophages: from Petri dish to patient. *PLoS Pathog.* **18**, e1010602 (2022).
9. Dedrick, R. M. et al. *Mycobacterium abscessus* strain morphotype determines phage susceptibility, the repertoire of therapeutically useful phages, and phage resistance. *mBio* **12**, e03431-20 (2021).
10. Hatfull, G. F., Dedrick, R. M. & Schooley, R. T. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annu. Rev. Med.* **73**, 197–211 (2022).
11. Hatfull, G. F. Actinobacteriophages: genomics, dynamics, and applications. *Annu. Rev. Virol.* **7**, 37–61 (2020).
12. Chen, J. et al. Defects in glycopeptidolipid biosynthesis confer phage I3 resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **155**, 4050–4057 (2009).
13. Russell, D. A. & Hatfull, G. F. PhagesDB: the actinobacteriophage database. *Bioinformatics* **33**, 784–786 (2017).
14. Pedulla, M. L. et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**, 171–182 (2003).
15. Pope, W. H. et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. *eLife* **4**, e06416 (2015).
16. Hatfull, G. F. et al. Comparative genomic analysis of 60 mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size. *J. Mol. Biol.* **397**, 119–143 (2010).
17. Hatfull, G. F. et al. Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. *PLoS Genet.* **2**, e92 (2006).
18. Hatfull, G. F. Molecular genetics of mycobacteriophages. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–36 (2014).
19. Jacobs-Sera, D. et al. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology* **434**, 187–201 (2012).
20. Guerrero-Bustamante, C. A., Dedrick, R. M., Garland, R. A., Russell, D. A. & Hatfull, G. F. Toward a phage cocktail for tuberculosis: susceptibility and tuberculocidal action of mycobacteriophages against diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains. *mBio* **12**, e00973-21 (2021).
21. Abrahams, K. A. & Besra, G. S. Synthesis and recycling of the mycobacterial cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **60**, 58–65 (2021).
22. Gutierrez, A. V., Viljoen, A., Ghigo, E., Herrmann, J. L. & Kremer, L. Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* complex. *Front. Microbiol.* **9**, 1145 (2018).
23. Bernut, A. et al. 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 (2016).
24. Burbaud, S. et al. Trehalose polyphleates are produced by a glycolipid biosynthetic pathway conserved across phylogenetically distant mycobacteria. *Cell Chem. Biol.* **23**, 278–289 (2016).
25. Llorens-Fons, M. et al. Trehalose polyphleates, external cell wall lipids in *Mycobacterium abscessus*, are associated with the formation of clumps with cording morphology, which have been associated with virulence. *Front. Microbiol.* **8**, 1402 (2017).
26. Thouvenel, L. et al. The final assembly of trehalose polyphleates takes place within the outer layer of the mycobacterial cell envelope. *J. Biol. Chem.* **295**, 11184–11194 (2020).
27. Hatfull, G. F. Phage therapy for nontuberculous mycobacteria: challenges and opportunities. *Pulm. Ther.* **9**, 91–107 (2023).
28. Dedrick, R. M. et al. Mycobacteriophage ZoeJ: a broad host-range close relative of mycobacteriophage TM4. *Tuberculosis* **115**, 14–23 (2019).
29. Sampson, T. et al. Mycobacteriophages BPs, Angel and Halo: comparative genomics reveals a novel class of ultra-small mobile genetic elements. *Microbiology* **155**, 2962–2977 (2009).
30. Johansen, M. D. et al. Mycobacteriophage-antibiotic therapy promotes enhanced clearance of drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Dis. Model. Mech.* **14**, dmm049159 (2021).
31. Wetzel, K. S. et al. CRISPY-BRED and CRISPY-BRIP: efficient bacteriophage engineering. *Sci. Rep.* **11**, 6796 (2021).
32. Akusobi, C. et al. Transposon mutagenesis in *Mycobacterium abscessus* identifies an essential penicillin-binding protein involved in septal peptidoglycan synthesis and antibiotic sensitivity. *eLife* **11**, e71947 (2022).
33. Rifat, D., Chen, L., Kreiswirth, B. N. & Nuermberger, E. L. Genome-wide essentiality analysis of *Mycobacterium abscessus* by saturated transposon mutagenesis and deep sequencing. *mBio* **12**, e0104921 (2021).
34. Grzegorzewicz, A. E. et al. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 334–341 (2012).
35. Dulberger, C. L. et al. Mycobacterial nucleoid-associated protein Lsr2 is required for productive mycobacteriophage infection. *Nat. Microbiol.* **8**, 695–710 (2023).
36. Judd, J. A. et al. A mycobacterial systems resource for the research community. *mBio* **12**, e02401–e02420 (2021).
37. Vassallo, C. N., Doering, C. R., Littlehale, M. L., Teodoro, G. I. C. & Laub, M. T. A functional selection reveals previously undetected anti-phage defence systems in the *E. coli* pangenome. *Nat. Microbiol.* **7**, 1568–1579 (2022).
38. Anantharaman, V., Makarova, K. S., Burroughs, A. M., Koonin, E. V. & Aravind, L. Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. *Biol. Direct* **8**, 15 (2013).
39. Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4360–4377 (2013).
40. Touchette, M. H. et al. The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis* polyacyltrehalose lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **197**, 201–210 (2015).
41. McKittrick, A. C. & Bernhardt, T. G. Phage resistance profiling identifies new genes required for biogenesis and modification of the corynebacterial cell envelope. *eLife* **11**, e79981 (2022).
42. Bohm, K. et al. Genes affecting progression of bacteriophage P22 infection in *Salmonella* identified by transposon and single gene deletion screens. *Mol. Microbiol.* **108**, 288–305 (2018).

43. Mutalik, V. K. et al. High-throughput mapping of the phage resistance landscape in *E. coli*. *PLoS Biol.* **18**, e3000877 (2020).
44. Kortright, K. E., Chan, B. K. & Turner, P. E. High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **117**, 18670–18679 (2020).
45. Ko, C. C. & Hatfull, G. F. Mycobacteriophage Fruitloop gp52 inactivates Wag31 (DivIVA) to prevent heterotypic superinfection. *Mol. Microbiol.* **108**, 443–460 (2018).
46. Nesbit, C. E., Levin, M. E., Donnelly-Wu, M. K. & Hatfull, G. F. Transcriptional regulation of repressor synthesis in mycobacteriophage L5. *Mol. Microbiol.* **17**, 1045–1056 (1995).
47. Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**, 195–202 (1998).
48. Russell, D. A. Sequencing, assembling, and finishing complete bacteriophage genomes. *Methods Mol. Biol.* **1681**, 109–125 (2018).
49. Woods, G. L. et al. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes* 2nd edn. Report no. M24-A2 (Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011).
50. Gauthier, C. H., Cresawn, S. G. & Hatfull, G. F. PhaMMseqs: a new pipeline for constructing phage gene families using MMseqs2. *G3* **12**, jkac233 (2022).
51. Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J. M. & Gabaldon, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**, 1972–1973 (2009).
52. Stamatakis, A., Ludwig, T. & Meier, H. RAXML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* **21**, 456–463 (2005).
53. Bachmann, B. O. & Ravel, J. Chapter 8. Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol.* **458**, 181–217 (2009).
54. Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R. Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1911–1919 (1990).

Acknowledgements

We thank C. Akusobi, M. Sullivan, K. McGowen, C. Rodriguez, W. DePas and W. Daher for helpful discussions; all of the students and faculty in the SEA-PHAGES programme, who discovered and characterized phages used in this study; and the numerous colleagues who provided *M. abscessus* strains in the GDxx series. Microscopy and flow cytometry were performed at the Montpellier Imaging Center for Microscopy (MRI). This work was supported by grants from the National Institutes of Health (GM131729) and the Howard Hughes Medical Institute (Grant GT12053) to G.F.H., a Cystic Fibrosis Foundation Postdoc Fellowship WETZEL21F0 to K.S.W., grants from the French National Research Agency ANR-21-CE44-0027-01 (MYCOLT) to L.K. and C.C., and Vaincre la Mucoviscidose (RF20200502678) and Association Grégory Lemarchal PhD fellowship to M.I.

Author contributions

K.S.W., M.I., G.F.H. and L.K. conceptualized the project; K.S.W., M.I., L.A., H.G.A., M.C., S.M., R.A.G. and D.A.R. conducted the investigations; K.S.W., M.I., G.F.H. and L.K. wrote the original draft; K.S.W., M.I., L.A., H.G.A., M.C., S.M., R.A.G., D.A.R., C.C., G.F.H. and L.K. reviewed and edited the manuscript; K.S.W., M.I., G.F.H. and L.K. acquired funding; and G.F.H. and L.K. supervised the project.

Competing interests

GFH receives support through a Collaborative Research Agreement with Janssen Inc., which did not fund the work reported here. The remaining authors declare no competing interests.

Additional information

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01451-6>.

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01451-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Graham F. Hatfull or Laurent Kremer.

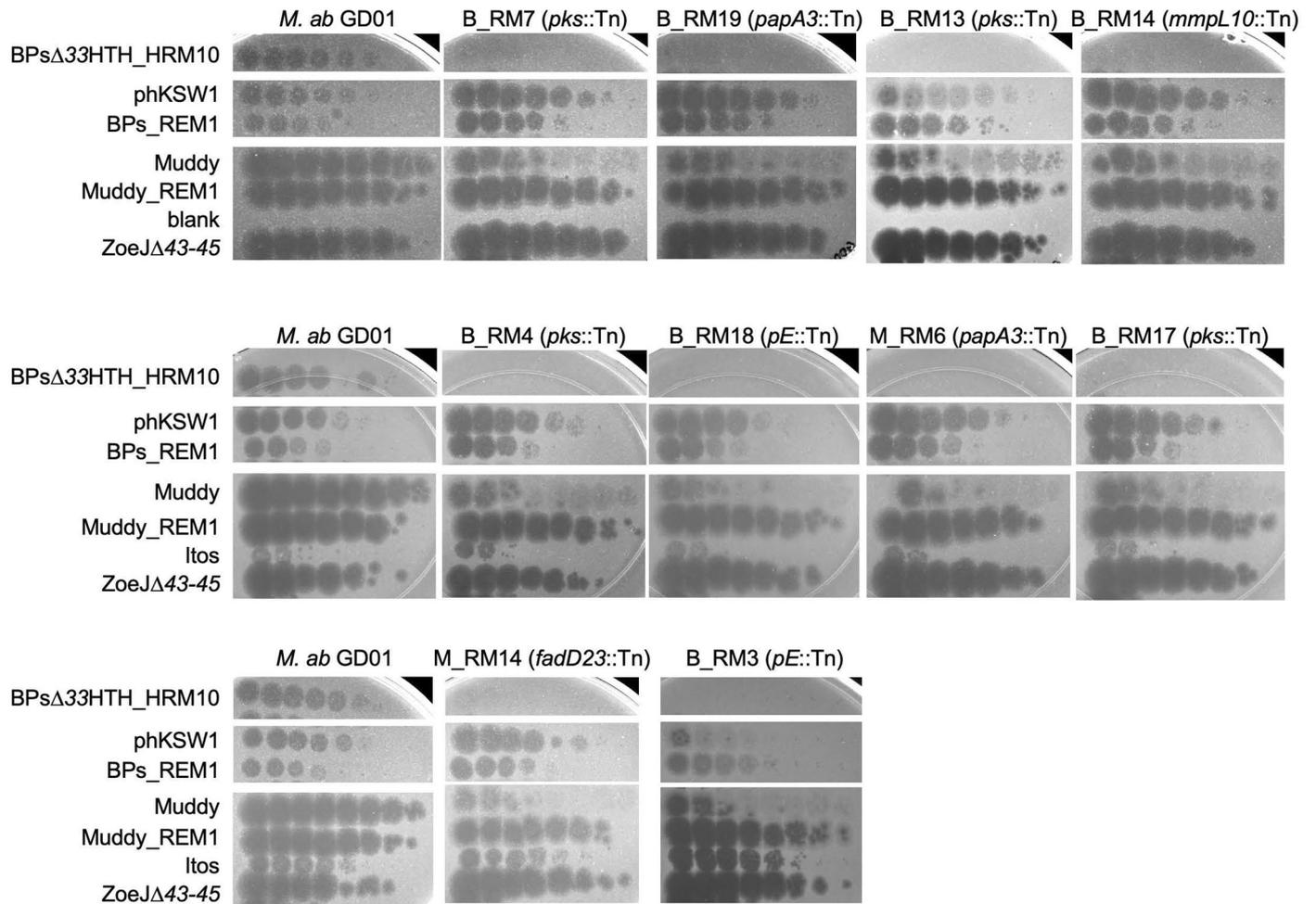
Peer review information *Nature Microbiology* thanks Jeremy Rock, William Jacobs and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

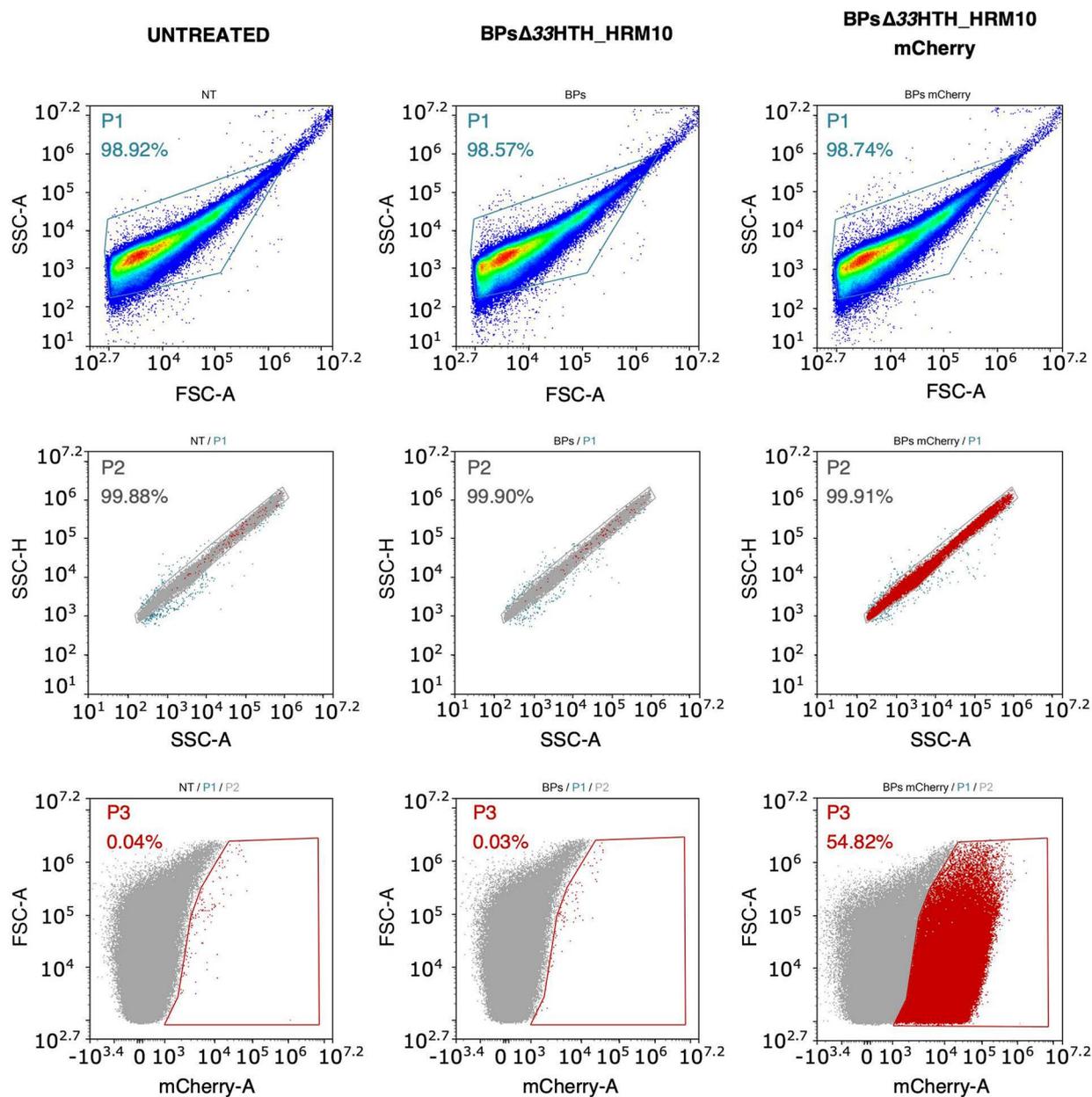
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



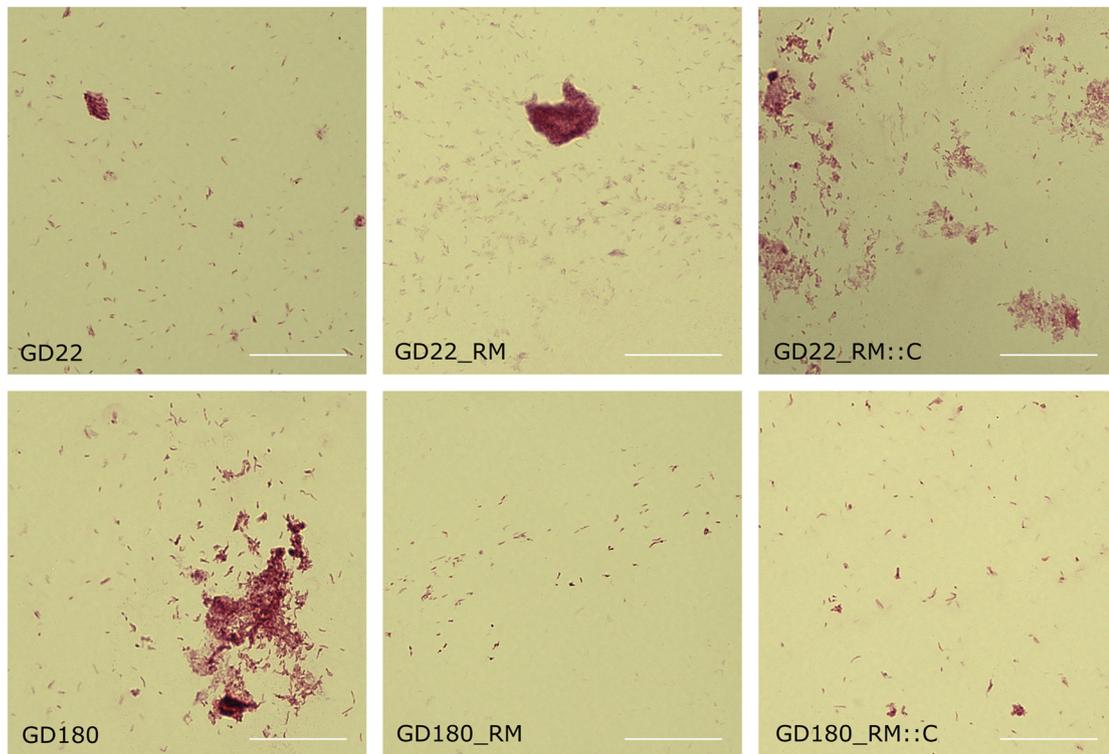
Extended Data Fig. 1 | Plaque assays of phages on *M. abscessus* GD01 transposon insertion mutants. Phages as shown on the left were spotted onto solid media with *M. abscessus* GD01 or transposon insertion mutant strains. Each row indicates a set strains tested together.



Extended Data Fig. 2 | Gating strategy for flow cytometry analysis of fluorophage-infected bacteria. Bacteria untreated or infected with non-fluorescent phages were used as controls. The first gate was plotted on SSC-A/FSC-A to exclude cellular debris. SSC-H/SSC-A was analysed to

eliminate multiple cells. The gate for fluorescence was drawn thanks to controls to exclude non-fluorescent bacteria. The analysis was performed on approximately 300,000 bacteria using NovoExpress software. Here is shown an example of analysis for GD22 strain performed at least twice.

A



B

Strains		MIC (µg/mL) ^a								
		AMK	IPM	BDQ	RFB	CFZ	LNZ	CFX	ZEO	AU1235
GD22	Exp 1	25	25-50	0.098	12.5	3.125	12.5	50-100	12.5	0.39
	Exp 2	50	50	0.098	25	1.56	25	100	12.5	0.195
	Exp 3	100	50	0.098	25	0.39	6.25	100	6.25	0.39
GD22_RM4	Exp 1	25	25	0.195	12.5	1.56	6.25	50	6.25	0.78
	Exp 2	50	25	0.098	12.5	1.56	12.5	50	6.25	0.195
	Exp 3	50	100	0.098	25	3.25	12.5	50	12.5	0.195
GD22_RM4 :: C	Exp 1	50	12.5	0.098	12.5	1.56	12.5	50	6.25	0.39
	Exp 2	50	25	0.098	12.5	0.78	12.5	50	6.25	0.195
	Exp 3	50	25-50	0.19	25	1.56	6.25	50	6.25	0.195
GD180	Exp 1	25	25	0.098	1.56	ND	12.5	25	>200	0.048
	Exp 2	25	50	0.048	6.25	0.78	6.25	50	>200	<0.048
	Exp 3	50	25	0.024	12.5	0.78	6.25	25	>200	0.19
GD180_RM2	Exp 1	25	12.5	0.024	3.125	1.56	6.25	25	>200	0.39
	Exp 2	50	25	0.098	3.125	1.56	1.56	25	>200	<0.048
	Exp 3	50	12.5	0.048	6.25	0.78	1.56	25	>200	0.19
GD180_RM2 :: C	Exp 1	50	25	0.098	3.125	0.78	3.125	25	>200	0.098
	Exp 2	25	50	0.024	3.125	0.78	3.125	50	>200	<0.048
	Exp 3	50	25	0.024	3.125	0.78	3.125	25	>200	0.098
CIP104536 (R)	Exp 1	50	50	0.048	12.5-25	1.56	25	100	50	0.39
	Exp 2	50	25	0.098	25	0.78	12.5	50	25	0.78

^a MICs (µg/ml) were determined following the CLSI guidelines.

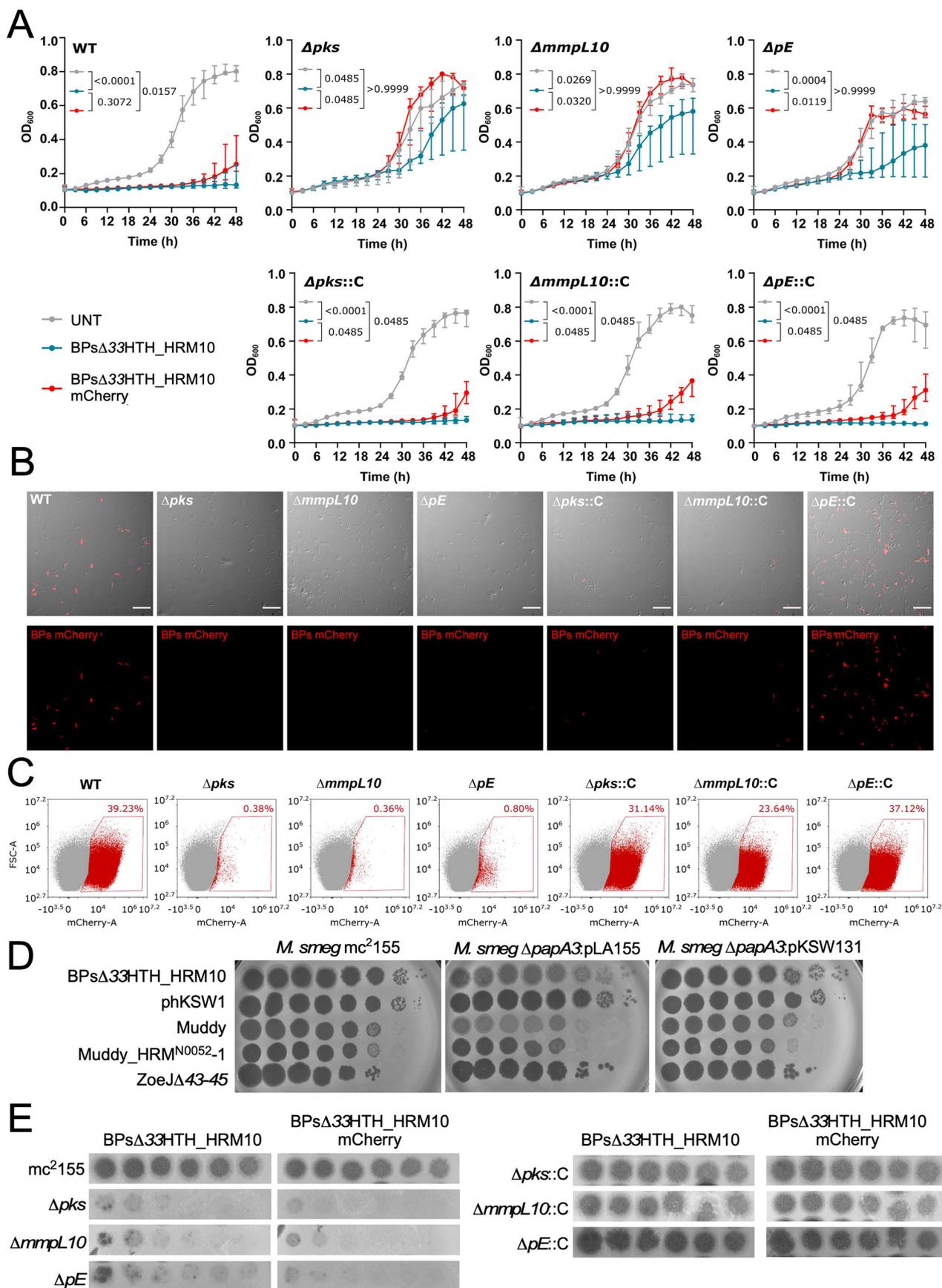
AMK, amikacin; IPM, imipenem; BDQ, bedaquiline; RFB, rifabutin; CFZ, clofazimine; LNZ, linezolid; CFX, ceftiofloxacin; ZEO, zeocin; AU1235, MmpL3 inhibitor

Extended Data Fig. 3 | See next page for caption.

Extended Data Fig. 3 | Characterization of TPP-defective mutants.

A. Ziehl-Neelsen staining of *M. abscessus* TPP mutants. Cultures of GD22, GD22_RM, GD22_RM::C, GD180, GD180_RM and GD180_RM::C were fixed on glass slides and acid-fast staining was performed using the BD Carbofuchsin kit, and observed microscopically at 60x magnification. This assay was performed three times. Scale bar: 30 μm . **B.** MIC (in $\mu\text{g}/\text{mL}$) values of antibiotics determined in

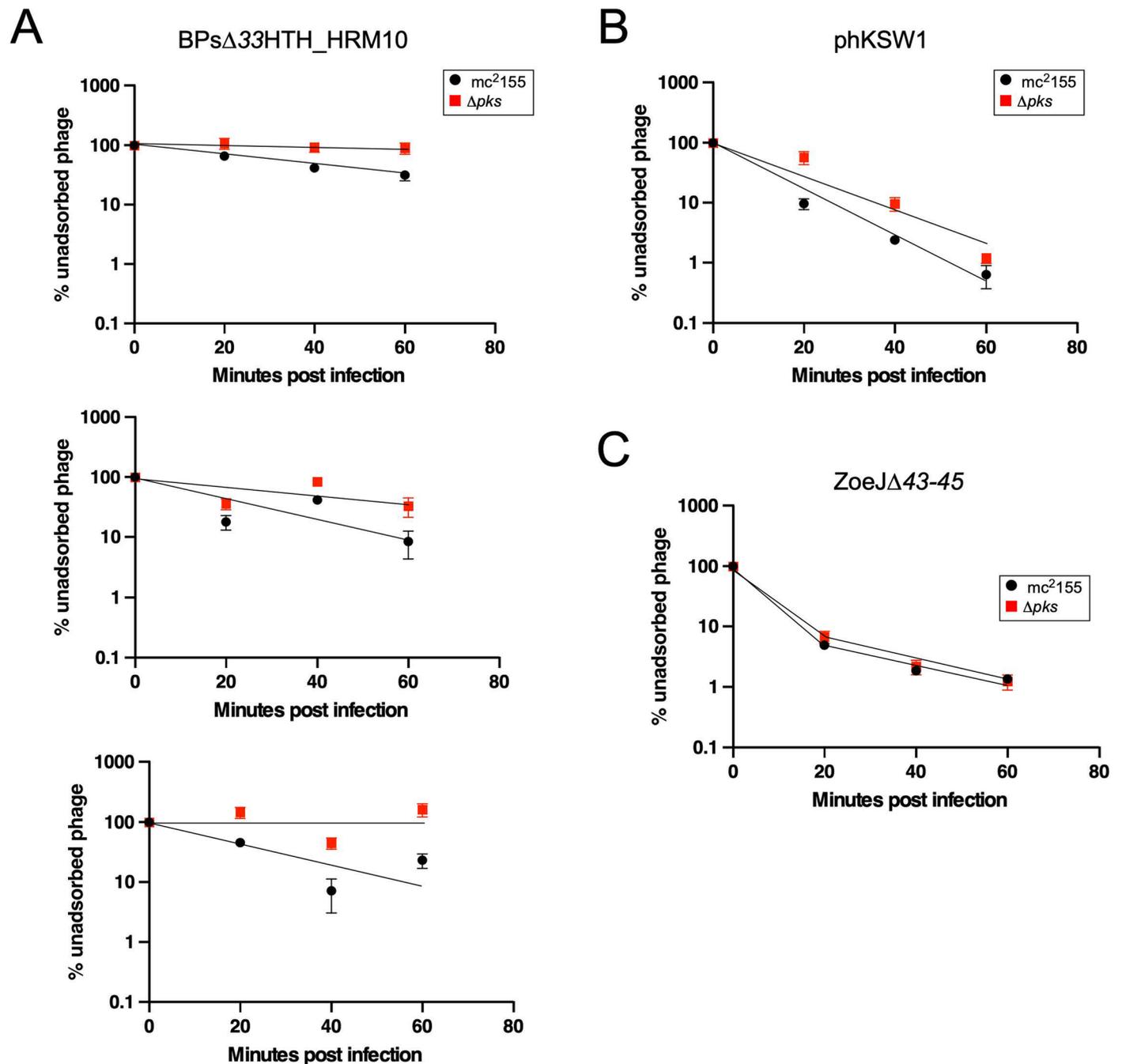
Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (CaMHB) at 30 °C against *M. abscessus* clinical isolates (GD22 and GD180), resistant mutants (GD22_RM4 and GD180_RM2) and complemented strains (GD22_RM4::C and GD180_RM2::C) with CIP104536 (ATCC19977) as a control. Results from three independent experiments are shown.



Extended Data Fig. 4 | See next page for caption.

Extended Data Fig. 4 | Infection of *M. smegmatis* TPP mutants by BPs and its derivatives. A. Growth curves of the different strains incubated with phage BPs Δ 33HTH_HRM10 or BPs Δ 33HTH_HRM10-mCherry at MOI 10 or without (UNT) for 2 days in 7H9/OADC supplemented with 1 mM CaCl₂ at 37 °C without agitation. Measurements were taken every 3 hours. Data shown are represented as median of three independent experiments done in triplicate \pm interquartile range. Two-sided Dunn's multiple comparisons test was used to perform statistical analysis. Statistical analysis was done to compare the differences at 48 hours between each strain, p values are mentioned on each plot. **B.** Representative microscope fields of *M. smegmatis* strains infected with the fluorophage BPs Δ 33HTH_HRM10-mCherry (designated BPs mCherry) (MOI 10) for 2 hours at 37 °C. Similar results

were obtained at least three times. Scale bars: 30 μ m. **C.** Flow cytometry data plotted as a dot plot showing the percentage of bacilli infected with BPs Δ 33HTH_HRM10-mCherry relative to the study population. This assay was conducted twice with similar results obtained. **D.** Phage infection of *M. smegmatis* TPP mutants. Phages as shown on the left were tenfold serially diluted and spotted onto solid media with *M. smegmatis* mc²155, *M. smegmatis* Δ papA3:pLAI55 or *M. smegmatis* Δ papA3:pKSW131. **E.** Plaquing of BPs Δ 33HTH_HRM10 and the mCherry derivative on *M. smegmatis* strains defective in TPP production (left panels) and the complemented strains (right panels). Phage lysates were tenfold serially diluted prior to spotting on bacterial lawns. Similar results were obtained at least three times and a representative experiment is shown.



Extended Data Fig. 5 | Additional replicates of phage adsorption assays on *M. smegmatis* mc²155 and Δ pks. Biological replicates of phage adsorption assays for phages BPs Δ 33HTH_HRM10 (A), phKSW1 (B) and ZoeJ Δ 43-45 (C) are shown. Data are represented as the mean of technical duplicates \pm SD. For

BPs Δ 33HTH_HRM10, each individual assay showed reduced adsorption on Δ pks as compared to mc²155. However, the measured adsorption rates varied between each replicate, such that observed differences were obfuscated when displaying the means; representative replicates for all phages are shown in Fig. 5.

Extended Data Table 1 | Characterization of phage resistant *M. abscessus* GD01 transposon mutants

Strain Name ¹	Isolated as resistant to ²	# Insert ³	Tn insertion coordinate ⁴	Tn Dir ⁵	GD01 Locus Tag ⁶	ATCC19977 Gene ⁷	Protein ⁸	PCR ver. ⁹	Plaque assay ¹⁰
GD01Tn_Muddy_RM9	Muddy	≥1	895811	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM9	BPs_HRM10	≥1	896103	Fwd	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	ND	ND
GD01Tn_BPsHRM10_RM15	BPs_HRM10	≥1	896250	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	ND	ND
GD01Tn_Muddy_RM14	Muddy	≥2	#1 896251 #2 2068078	Fwd Fwd	EXM25_04535 EXM25_10305	MAB_0935c MAB_2130	FadD23 HAD	Y Y	Y Y
GD01Tn_Muddy_RM11 ¹¹	Muddy	≥1	896372	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	ND	ND
GD01Tn_Muddy_RM15 ¹¹	Muddy	≥1	896372	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	ND	ND
GD01Tn_Muddy_RM13	Muddy	≥1	896513	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	ND	ND
GD01Tn_Muddy_RM7	Muddy	≥1	896840	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	ND	ND
GD01Tn_Muddy_RM12	Muddy	≥1	896990	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM1	BPs_HRM10	≥1	897275	Rev	EXM25_04535	MAB_0935c	FadD23	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM6	BPs_HRM10	≥1	897828	Rev	EXM25_04540	MAB_0936c	PE	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM3	BPs_HRM10	≥2	#1 898266 #2 1702803	Fwd Rev	EXM25_04540 EXM25_08515	MAB_0936c MAB_1681	PE Hyp	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM8	BPs_HRM10	≥2	#1 898475 #2 2710182	Fwd Rev	EXM25_04540 EXM25_13435	MAB_0936c MAB_2752	PE ABC	ND ND	ND ND
GD01Tn_Muddy_RM20	Muddy		898646	Rev	EXM25_04540	MAB_0936c	PE	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM18	BPs_HRM10	≥2	#1 898656 #2 50130	Rev Fwd	EXM25_04540 EXM25_00255	MAB_0936c MAB_0457	PE Hyp	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM20	BPs_HRM10	≥3	#1 899155 #2 2314064 #3 4430814	Fwd Fwd Fwd	EXM25_04545 EXM25_11400 Inter EXM25_22125-22130	MAB_0937c MAB_2352 MAB_4446-4447	Mmpl10 DNA glyc Hyp/ABC	ND ND ND	ND ND ND
GD01Tn_BPsHRM10_RM11	BPs_HRM10	≥1	899212	Fwd	EXM25_04545	MAB_0937c	Mmpl10	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM14	BPs_HRM10	≥2	#1 900526 #2 3419195	Rev Rev	EXM25_04545 EXM25_17025	MAB_0937c MAB_3426c	Mmpl10 SDR	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM19	BPs_HRM10	≥2	#1 901936 #2 2004769	Fwd Rev	EXM25_04550 EXM25_10050	MAB_0938c MAB_2081	PapA3 Acyl-CoA	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM2	BPs_HRM10	≥1	901937	Rev	EXM25_04550	MAB_0938c	PapA3	ND	ND
GD01Tn_Muddy_RM17	Muddy	≥1	902798	Fwd	EXM25_04550	MAB_0938c	PapA3	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM10	BPs_HRM10	≥1	902799	Rev	EXM25_04550	MAB_0938c	PapA3	Y	Y
GD01Tn_Muddy_RM1 ¹¹	Muddy	≥2	902799 1708979	Rev Fwd	EXM25_04550 EXM25_08540	MAB_0938c MAB_1686	PapA3 Hyp	ND ND	ND ND
GD01Tn_Muddy_RM3 ¹¹	Muddy	≥2	902799 1708979	Rev Fwd	EXM25_04550 EXM25_08540	MAB_0938c MAB_1686	PapA3 Hyp	ND ND	ND ND
GD01Tn_Muddy_RM6	Muddy	≥2	#1 902802 #2 1799970	Rev Fwd	EXM25_04550 EXM25_09000	MAB_0938c MAB_1882c	PapA3 DoxX	Y Y	Y Y
GD01Tn_Muddy_RM19	Muddy		903001	Rev	EXM25_04550	MAB_0938c	PapA3	Y	Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM4	BPs_HRM10	≥2	#1 903920 #2 3438375	Fwd Fwd	EXM25_04555 EXM25_17140	MAB_0939 MAB_3449c	MFS	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM5	BPs_HRM10	≥2	#1 905614 #2 3575341	Fwd Fwd	EXM25_04555 EXM25_17815	MAB_0939 MAB_3593	Pks MgtC	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM17	BPs_HRM10	≥2	#1 911720 #2 3319297	Rev Rev	EXM25_04555 EXM25_16510	MAB_0939 MAB_3332c	Pks DoxX	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM13	BPs_HRM10	≥2	#1 914389 #2 934573	Fwd Rev	EXM25_04555 EXM25_04650	MAB_0939 MAB_0958c	Pks NAD(P)	Y Y	Y Y
GD01Tn_BPsHRM10_RM7	BPs_HRM10	≥2	#1 914477 #2 3546108	Rev Rev	EXM25_04555 Inter EXM25_17670-17675	MAB_0939 MAB_3538-3539	Pks Kinase/ WhiB	Y Y	Y Y
GD01Tn_phKSW1_RM1 ¹¹	phKSW1	1	1711653	Fwd	EXM25_08560	MAB_1690	ABC	Y	Y
GD01Tn_phKSW1_RM4 ¹¹	phKSW1	1	1711653	Fwd	EXM25_08560	MAB_1690	ABC	Y	Y
GD01Tn_phKSW1_RM2	phKSW1	1	1169901	Fwd	Inter EXM25_05825-05830	None – MAB_1175	DUF4145	Y	Y
GD01Tn_phKSW1_RM7 ¹¹	phKSW1	≥2	#1 1169901 #2 2201133	Fwd Fwd	Inter EXM25_05825-05830 EXM25_10900	None – MAB_1175 MAB_2245	DUF4145	Y Y	Y Y
GD01Tn_phKSW1_RM8 ¹¹	phKSW1	≥2	#1 1169901 #2 2201133	Fwd Fwd	Inter EXM25_05825-05830 EXM25_10900	None – MAB_1175 MAB_2245	DUF4145	Y Y	Y Y
GD01Tn_phKSW1_RM5	phKSW1	≥2	#1 1169902 #2 4426058	Rev Rev	Inter EXM25_05825-05830 EXM25_22105	None – MAB_1175 MAB_4441	DUF4145	Y Y	Y Y
GD01Tn_phKSW1_RM6	phKSW1	2	#1 3688289 #2 429116	Fwd Fwd	EXM25_18375 EXM25_02155	MAB_3698 MAB_0399c	ATP RecB	Y Y	Y Y
GD01Tn_phKSW1_RM10	phKSW1	2	#1 1708979 #2 902799	Fwd Rev	EXM25_08540 EXM25_04550	MAB_1686 MAB_0938c	Hyp PapA3	Y Y	Y Y
GD01Tn_phKSW1_RM11a	phKSW1	≥2	#1 3371296 #2 4561506	Rev Fwd	EXM25_16760 EXM25_22720	MAB_3381c MAB_4573c	Mif EphC	Y Y	Y Y
GD01Tn_MuddyREM1_RM2	Muddy_REM1	≥2	#1 1195603 #2 4785617	Rev Fwd	EXM25_05970 EXM25_23740	MAB_1201c MAB_4773	GreA HMOX	Y Y	Y Y
GD01Tn_MuddyREM1_RM3	Muddy_REM1	>1	3850846	Rev	EXM25_19265	MAB_3868c	RpoC	Y	Y

¹Strain names include three parameters separated by underscores: i.e. Parent strain_phage used for selection_mutant number.

²The strain was isolated from a solid agar plate seeded with phages as indicated.

³The likely number of Tn insertions in each strain: ≥1 indicates that we have mapped one insertion, but we cannot exclude that there are one or more additional insertions.; ≥2 indicates that two insertions were mapped, but we cannot exclude that there are one or more additional insertions. Five phKSW1 resistant strains were whole genome sequenced such that the precise number of insertions are known, as indicated.

⁴Coordinates of the transposon insertions mapped in *M. abscessus* GD01 (accession number CP035923.1). Where more than one Tn has been mapped, they are listed as #1 and #2, and #2 is shown in grey shading. Strains with similar coordinates are listed together.

⁵Orientation of the Tn insertion, Forward (Fwd) or reverse (Rev) compared to the genome.

⁶The locus tag of the strain GD01 gene with the Tn insertion is shown. Intergenic insertions show the two flanking locus tags.

⁷The gene name of the *M. abscessus* ATCC19977 (NC_010397.1) homolog(s) of the interrupted genes is shown. For intergenic insertions, flanking genes are shown.

⁸Protein names or predicted function of genes with Tn insertions are shown, or functions of flanking genes for intergenic insertions.

⁹The location of the transposon insertion was confirmed by a second PCR with primers designed to flank the insertion site. Y, Yes; ND, Not determined.

¹⁰The strain was streaked out to remove phage, grown in liquid media and tested for phage resistance by plaque assay. Y, Yes; ND, Not determined.

¹¹In four instances, two strains isolated against the same phage were found to have identical transposon insertion sites and are likely siblings. GD01Tn_phKSW1_RM1 and GD01Tn_phKSW1_RM4 are likely siblings, as are GD01Tn_phKSW1_RM7 and GD01Tn_phKSW1_RM8. GD01Tn_phKSW1_RM2, GD01Tn_phKSW1_RM5, and GD01Tn_phKSW1_RM7 have insertions in the same location (coordinate 1169901) but are not siblings as they have Tn insertions in different orientations or different secondary insertions.

Extended Data Table 2 | Phage BPs and Muddy mutants escaping TPP-loss mediated resistance

Phage ¹	Parent ²	Amino Acid Substitution ³	Isolated on ⁴	Reference
phKSW2	BPs Δ 33HTH_HRM10	gp22 L462R	<i>M. ab.</i> GD01Tn BPs_HRM10_RM6	This work
phKSW3	BPs Δ 33HTH_HRM10	gp22 A306V	<i>M. ab.</i> GD01Tn BPs_HRM10_RM6	This work
phKSW4 (Prob. a sib of phKSW2)	BPs Δ 33HTH_HRM10	gp22 L462R	<i>M. ab.</i> GD01Tn BPs_HRM10_RM11	This work
phKSW5	BPs Δ 33HTH_HRM10	gp22 A604E	<i>M. ab.</i> GD01Tn BPs_HRM10_RM11	This work
BPs_REM1	BPs Δ 33HTH_HRM10	gp22 L462R; G780R	<i>M. ab.</i> GD180_RM2	This work
phKSW1	BPs Δ 33HTH_HRM10	gp22 A604E	<i>M. smegmatis</i> Δ MSMEG_5439	This work
Muddy_REM1	Muddy	gp24 E680K	<i>M. ab.</i> GD180_RM2	This work
Muddy_HRM ^{N0157} -1	Muddy	gp24 G487W	<i>M. tuberculosis</i> N0157	Ref. 20 ⁵
Muddy_HRM ^{N0157} -2	Muddy	gp24 T608A	<i>M. tuberculosis</i> N0157	Ref. 20 ⁵
Muddy_HRM ^{N0052} -1	Muddy	gp24 E680K	<i>M. tuberculosis</i> N0052	Ref. 20 ⁵

¹Name of a phage able to form more clear plaques on TPP synthesis pathway mutants. ²Parent phage from which the mutant was isolated. ³Amino acid substitutions identified in mutant phages. ⁴The *M. abscessus* or *M. tuberculosis* strain on which the mutant phage was isolated ⁵Data from reference ²⁰.

Extended Data Table 3 | *M. abscessus* mutants spontaneously resistant to phage BPs derivatives

Resistant mutant ¹	Parent ²	Isolated as resistant to ³	Mutated gene ⁴	Amino Acid Substitution ⁵	Reference
GD17_RM1	<i>M. ab.</i> GD17	BPsHRM ^{GD03}	<i>pks</i>	G210V	Ref. 9 ⁶
GD22_RM4	<i>M. ab.</i> GD22	BPsΔ33HTH_HRM10 and Itos	<i>pks</i>	W2389fsX2406	Ref. 9 ⁶
GD38_RM2	<i>M. ab.</i> GD38	BPsΔ33HTH_HRM10	<i>pks</i>	M2115fsX2118	This work
GD59_RM1	<i>M. ab.</i> GD59	BPsΔ33HTH_HRM10 and Itos	<i>pks</i>	D327Y	This work
GD180_RM2	<i>M. ab.</i> GD180	BPsΔ33HTH_HRM10	<i>mmpL10</i>	S688fsX704	This work

¹Resistant mutants were named after the parent strain and the number of the resistant mutant (RM) isolated. ²Parent strain of *M. abscessus* from which the resistant mutant was isolated upon phage infection. ³RMs were isolated by infecting cell cultures at a high MOI and plating infections on solid media to isolate survivors. ⁴The entire genomes of the resistant mutants were sequenced and compared to the genomes of the parents to identify mutated genes conferring phage resistance. ⁵The amino acid substitution in the protein product resulting from the gene mutation. ⁶Data from reference ⁹.

Extended Data Table 4 | List of strains used in this study

Name	Description / genotype	Reference
<i>M. smegmatis</i> (WT)	<i>M. smegmatis</i> , strain mc ² 155	Ref. 54 ¹
Δ pks (PMM284)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ pks::res	Ref. 24 ²
Δ mmpL10 (PMM223)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ mmpL10::res	Ref. 24 ²
Δ pE (PMM229)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ pE::res	Ref. 24 ²
Δ pks::C (PMM284/pMVpks)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ pks::res complemented with pMVpks, Hyg ^R	Ref. 24 ²
Δ mmpL10::C (PMM223/pMVmmpL10)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ mmpL10::res complemented with pMVmmpL10, Hyg ^R	Ref. 24 ²
Δ pE::C (PMM229/pMVpE)	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ pE::res complemented with pMVpE, Hyg ^R	Ref. 24 ²
GD01	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i> , R morphotype	Ref. 4 ³
fadD23::Tn :pKSW134	GD0Tn_BPsHRM10_RM1 complemented with pKSW134	This study
GD17	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD17_RM1	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD22	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD22_RM4	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> spontaneous resistant mutant, R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD22_RM4::C	<i>M. abscessus</i> GD22_RM4 complemented with pMVpks_mWasabi, Hyg ^R	This study
GD38	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD59_RM1	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD59	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	Ref. 9 ⁴
GD180	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , R morphotype	This study
GD180_RM2	<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , spontaneous resistant mutant, R morphotype	This study
GD180_RM2::C	<i>M. abscessus</i> GD180_RM2 complemented with pMVmmpL10_mWasabi, Hyg ^R	This study
Δ fadD23	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ fadD23::ZeoR	Ref. 36 ⁵
Δ papA3	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ papA3::ZeoR	Ref. 36 ⁵
GD273	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	This study
GD286	<i>M. abscessus subsp. massiliense</i>	This study
Δ papA3 :pLA155	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ fadD23 containing vector pLA155	This study
Δ papA3 :pKSW131	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 Δ papA3 complemented with pKSW131	This study

¹Data from reference 54. ²Data from reference 24. ³Data from reference 4. ⁴Data from reference 9. ⁵Data from reference 36.

Extended Data Table 5 | Plasmids and primers used in this study

Name	Plasmid/Primer	Description
pMV <i>pks_mWasabi</i>	Plasmid	pMV361eH containing <i>pks</i> under the control of its own promoter ¹ and <i>mWasabi</i> sequence under the control of the constitutive <i>Pleft*</i> promoter (addgene plasmid :169409)
pMV <i>mmpL10_mWasabi</i>	Plasmid	pMV361eH containing <i>mmpL10</i> under the control of the <i>PblaF*</i> promoter ¹ and <i>mWasabi</i> sequence under the control of the constitutive <i>Pleft*</i> promoter (addgene plasmid :169409)
pLA155	Plasmid	pMH94 (L5 integrase) where the Kanamycin resistance cassette has been replaced with a streptomycin resistance cassette
pKSW131	Plasmid	pLA155 containing <i>papA3</i> , <i>mmpL10</i> , <i>pE</i> and <i>fadD23</i> from <i>M. abscessus</i> GD01 under control of the native promoter
pKSW134	Plasmid	pCCK39 (L5 integrase, streptomycin resistance cassette) containing <i>fadD23</i> from <i>M. abscessus</i> GD01 under control of a tet-inducible promoter.
Inf_ <i>Pleft*_mWasabi_pMV</i> (KpnI) (F)	Primer	5'-CCACTGCGATCCCCGGGTACTGATGCCTGGCAGTCGATCGT
Inf_ <i>Pleft*_mWasabi_pMV</i> (KpnI) (R)	Primer	5'-CGTCGCCGAGGGCTTGGTACGGCCGCGGTACCAGATCTT
TPP_pMH94_Fwd	Primer	5'-TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCTTGTGGCCTCCTTGCGTC
TPP_pMH94_Rev	Primer	5'-ATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACCGAGAGGCTAGGCGAC
FadD_pCCK39_Fwd	Primer	5'- GATTCGCCGCCGAAATCACAGCGTGACTTGGACAAAACCTATGACACC
FadD-pCCK39_Rev	Primer	5'-GCGTTTAAACCTGCAGGCACCTAGGCGACGCCACCGG

Reporting Summary

Nature Portfolio wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Portfolio policies, see our [Editorial Policies](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

n/a Confirmed

- The exact sample size (n) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement
- A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly
- The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided
Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.
- A description of all covariates tested
- A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons
- A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals)
- For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. F , t , r) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and P value noted
Give P values as exact values whenever suitable.
- For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings
- For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes
- Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's d , Pearson's r), indicating how they were calculated

Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.

Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

Data collection Flow cytometry data was collected with NovoExpress.

Data analysis Flow cytometry data was analyzed with NovoExpress. Fluorescent images were analyzed with Fiji. Graphs were generated and infection/adsorption data analyzed with GraphPad Prism 9.0. M. abscessus strain sequences were analyzed using MMSeqs2 (v13.45111), phammseqs (v1.0.4), ClustalO (v1.2.4), Trimal (v1.4.1) and RAXML (v8.2.12). The concatenated amino acid alignment was generated with a custom Python script.

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors and reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Portfolio [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A description of any restrictions on data availability
- For clinical datasets or third party data, please ensure that the statement adheres to our [policy](#)

Sequences of newly reported M. abscessus isolates are deposited in GenBank (accession numbers pending). All phage sequences are publicly available (phagesdb.org).

Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants and Sex and Gender in Research](#).

Reporting on sex and gender

N/A

Population characteristics

N/A

Recruitment

N/A

Ethics oversight

N/A

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

Life sciences Behavioural & social sciences Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size

N/A

Data exclusions

No data exclusions.

Replication

All experiments that measured various steps in phage infection were performed in duplicate or triplicate, and performed at least twice. Similar results were found every time.

Randomization

N/A

Blinding

N/A

Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

Materials & experimental systems

- n/a | Involved in the study
- Antibodies
- Eukaryotic cell lines
- Palaeontology and archaeology
- Animals and other organisms
- Clinical data
- Dual use research of concern

Methods

- n/a | Involved in the study
- ChIP-seq
- Flow cytometry
- MRI-based neuroimaging

Flow Cytometry

Plots

Confirm that:

- The axis labels state the marker and fluorochrome used (e.g. CD4-FITC).
- The axis scales are clearly visible. Include numbers along axes only for bottom left plot of group (a 'group' is an analysis of identical markers).
- All plots are contour plots with outliers or pseudocolor plots.
- A numerical value for number of cells or percentage (with statistics) is provided.

Methodology

Sample preparation

M. abscessus or M. smegmatis cells were incubated with either medium or phage BPs_Δ33HTH_HRM10 as controls or phage BPs_Δ33HTH_HRM10 mCherry (MOI 10). After incubation, samples were fixed with PFA 4% for 20 min at room temperature. Samples were then diluted as necessary depending on the experiment with 7H9/OADC supplemented with 0.025% tyloxapol and sonicated to disrupt bacterial aggregates.

Instrument

NovoCyte ACEA flow cytometer

Software

NovoExpress

Cell population abundance

Approximately 300,000 events were recorded per experiment.

Gating strategy

Gates were drawn using SSC-A/FSC-A and multiples of cells were excluded with SSC-H / SSC-A.

- Tick this box to confirm that a figure exemplifying the gating strategy is provided in the Supplementary Information.

En permettant d'élucider un nouveau mécanisme de résistance chez *M. abscessus*, ces travaux ont servi à isoler de nouveaux phages au spectre d'action élargi, permettant ainsi de proposer un traitement à l'efficacité accrue face au variant R. Toutefois, l'expansion du spectre d'hôte n'est pas suffisante pour pallier à la résistance des souches S et laisse par conséquent certains patients dans une impasse thérapeutique.

La récente découverte d'un phage lytique spécifique des souches S par l'équipe du Pr P. Bifani (« National University of Singapore ») pourrait ouvrir la voie vers le traitement de patients infectés par ces souches et requiert une caractérisation approfondie de ce phage afin de valider son usage en tant qu'agent thérapeutique. Ce phage dénommé Jabs est un *Siphoviridae* présentant la capacité unique, à notre connaissance, d'infecter des souches S de *M. abscessus*. L'infection par ce phage entraînerait cependant un fort taux de résistance des souches par divers mécanismes, et pourrait, dans certains cas, induire la transition vers le morphotype R. Ces observations préliminaires suggèrent une participation des GPL dans le mécanisme d'action du phage que nous avons souhaitée évaluer grâce à une collection de mutants arborant ces lipides tronqués. Cette banque, initialement établie au sein de l'équipe [116,120] avait permis de mettre en évidence l'impact du talose acétylé sur le morphotype bactérien. De ce fait, nous avons décidé de nous concentrer sur le rôle de ces acétyles dans la modification morphologique des bactéries et potentiellement dans l'inaction du phage Jabs. L'ensemble de ces travaux s'inscrivent dans le second axe de mes objectifs de thèse. L'article ci-dessous présente la caractérisation structurale et fonctionnelle de mutants de *M. abscessus* déficients dans l'acétylation des GPL.

Article 2. Multiple *Mycobacterium abscessus* O-acetyltransferases influence glycopeptidolipid structure and colony morphotype. Illouz, M.*, Leclercq, L. D.*, Dessenne, C., Hatfull, G., Daher, W., Kremer, L., & Guérardel, Y. (2023). *The Journal of biological chemistry*, 299(8), 104979. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104979>

*Ces auteurs ont contribué à parts égales

Afin d'évaluer, dans un premier temps, l'impact de l'acétylation sur la morphologie et sur la virulence de *M. abscessus*, nous avons généré, par double recombinaison homologue, une batterie de mutants au sein de la souche S de référence CIP104536^T ($\Delta atf1$, $\Delta atf2$ et $\Delta atf1$, $atf2$). Malgré une délétion totale des deux *atf*, l'analyse biochimique a révélé une persistance de l'acétylation des GPL suggérant une redondance fonctionnelle. Une analyse bioinformatique nous a permis d'identifier deux *atf* paralogues situées en

dehors du locus *gpl*, l'une étant codée par un prophage. Les nouveaux mutants ont validé la redondance fonctionnelle supposée en démontrant une absence d'acétylation dans le quadruple mutant. Par ailleurs, la délétion des *Atf* a induit des changements additionnels inattendus dans la structure des GPL (relatifs à la glycosylation et à la méthylation) mais aussi des modifications de la morphologie des colonies bactériennes. Aucune altération de la croissance ou de l'internalisation des souches par les macrophages n'a cependant été remarquée. Malgré un impact vraisemblablement limité de l'acétylation des GPL sur l'aptitude (« fitness ») de la souche, cette étude a permis de mettre en exergue la capacité de *M. abscessus* à détourner et à tirer profit d'un gène codé par un prophage.

Ma contribution expérimentale lors de ces travaux a été de générer les différents mutants chez *M. abscessus*, de réaliser l'analyse bioinformatique pour identifier les paralogues des gènes *atf* et de caractériser les phénotypes des souches *in vitro*. Avec l'aide du Dr Wassim Daher, nous avons également évalué l'impact de l'acétylation sur l'internalisation par des macrophages et réalisé les analyses quantitatives et qualitatives en microscopie.



Multiple *Mycobacterium abscessus* O-acetyltransferases influence glycopeptidolipid structure and colony morphotype

Received for publication, January 11, 2023, and in revised form, June 19, 2023. Published, Papers in Press, June 28, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104979>

Morgane Illouz^{1,‡}, Louis-David Leclercq^{2,‡}, Clara Dessenne², Graham Hatfull³, Wassim Daher^{1,4}, Laurent Kremer^{1,4,*}, and Yann Guérardel^{2,5,*}

From the ¹Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, Montpellier, France; ²UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS, Université de Lille, Lille, France; ³Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA; ⁴INSERM, IRIM, Montpellier, France; ⁵Institute for Glyco-Core Research (iGCORE), Gifu University, Gifu, Japan

Reviewed by members of the JBC Editorial Board. Edited by Chris Whitfield

Mycobacterium abscessus causes severe lung infections. Clinical isolates can have either smooth (S) or rough (R) colony morphotypes; of these, S but not R variants have abundant cell wall glycopeptidolipids (GPL) consisting of a peptidolipid core substituted by a 6-deoxy- α -L-talose (6-dTal) and rhamnose residues. Deletion of *gtf1*, encoding the 6-dTal transferase, results in the S-to-R transition, mycobacterial cord formation, and increased virulence, underscoring the importance of 6-dTal in infection outcomes. However, since 6-dTal is di-O-acetylated, it is unclear whether the *gtf1* mutant phenotypes are related to the loss of the 6-dTal or the result of the absence of acetylation. Here, we addressed whether *M. abscessus atf1* and *atf2*, encoding two putative O-acetyltransferases located within the *gpl* biosynthetic locus, transfer acetyl groups to 6-dTal. We found deletion of *atf1* and/or *atf2* did not drastically alter the GPL acetylation profile, suggesting there are additional enzymes with redundant functions. We subsequently identified two paralogs of *atf1* and *atf2*, *MAB_1725c* and *MAB_3448*. While deletion of *MAB_1725c* and *MAB_3448* had no effect on GPL acetylation, the triple *atf1-atf2-MAB_1725c* mutant did not synthesize fully acetylated GPL, and the quadruple mutant was totally devoid of acetylated GPL. Moreover, both triple and quadruple mutants accumulated hyper-methylated GPL. Finally, we show deletion of *atf* genes resulted in subtle changes in colony morphology but had no effect on *M. abscessus* internalization by macrophages. Overall, these findings reveal the existence of functionally redundant O-acetyltransferases and suggest that O-acetylation influences the glycan moiety of GPL by deflecting biosynthetic flux in *M. abscessus*.

fast-growing bacteria, increasingly acknowledged as an emerging human pathogen, responsible for skin, soft tissue (2), and lung infections, mostly in patients with underlying lung disorders, such as patients with cystic fibrosis (CF) (3, 4). *M. abscessus* displays either smooth (S) or rough (R) colony morphotypes to which distinct *in vitro* and *in vivo* phenotypes can be assigned. S variants are typified by the production of surface-associated glycopeptidolipids (GPL), which are lacking or produced at low levels in the R variants (5–7).

GPL are complex lipids (Fig. 1A) comprising a D-Phe-D-*allo*Thr-D-Ala-L-alaninol peptide core assembled by the action of two non-ribosomal peptide synthetases, Mps1 and Mps2, and acylated with a 3-hydroxy/methoxy C₂₄–C₃₃ fatty acid (8–10). It was recently shown that alaninol can be replaced by branched amino-alcohol valinol or leucinol (11). The resulting lipopeptide is glycosylated with 6-deoxy- α -L-talose (6-dTal) on the *allo*-Thr residue by the action of the glycosyltransferase Gtf1, while the alaninol is substituted by a α -L-rhamnose (Rha) by Gtf2, resulting in the production of the less-polar diglycosylated GPL molecules, designated GPL-2a. In addition to GPL-2a that contains a 3,4-di-O-acetylated 6-dTal and a 3,4-di-O-methylated or 2,3,4-tri-O-methylated Rha (8, 12–14), *M. abscessus* also produces a more polar GPL, designated GPL-3, through the addition of a 2,3,4-tri-hydroxylated Rha to the alaninol-linked 3,4-di-O-methyl Rha, a reaction catalyzed by glycosyltransferase Gtf3 (15). GPL-3 is structurally identical in *M. abscessus* and *Mycobacterium smegmatis* but is more abundant in *M. abscessus* (8). Once synthesized, GPL-2a and GPL-3 are translocated across the inner membrane by the MmpL4a/MmpL4b transporters (16–19) and inserted into the outer leaflet of the mycomembrane where they are exposed to the surface of the bacilli (20).

Numerous studies showed that the presence or loss of GPL influences susceptibility to antibiotics, sliding motility, biofilm formation (5, 7, 16, 21–23), bacterial surface hydrophobicity (20, 24), cord formation (5, 16, 25, 26), interaction with host macrophages (13, 27), and induction of pro-inflammatory responses (28). The role of S/R morphotypes to influence disease outcomes is supported by cellular and animal models,

Infections caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM), and particularly *Mycobacterium abscessus*, are globally on the rise and remain difficult to treat due to their intrinsic resistance levels to most antibiotic classes (1). *M. abscessus* is a

[‡] These authors contributed equally to this work.

* For correspondence: Yann Guérardel, yann.guerardel@univ-lille.fr; Laurent Kremer, laurent.kremer@irim.cnrs.fr.

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

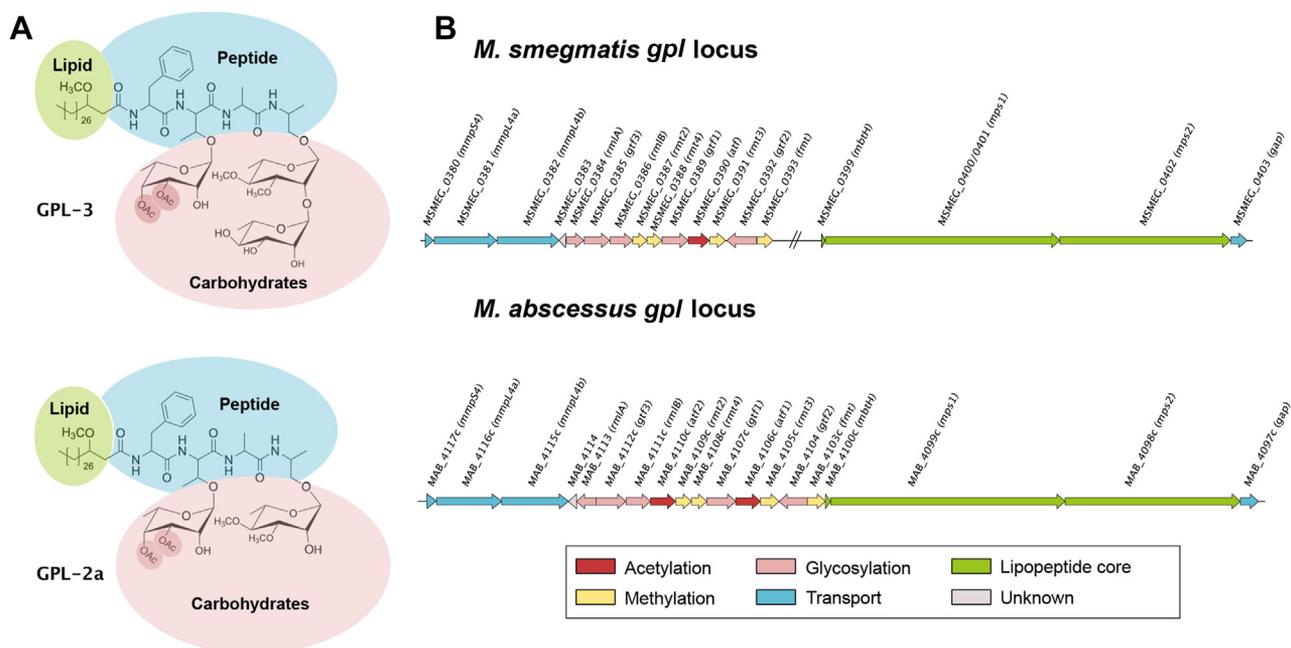


Figure 1. Prediction of GPL acetyltransferases in *M. abscessus*. A, the two major structures of GPL are schematized with a lipid chain (green), a peptide core (blue), and a glycan moiety (pink). Tri-glycosylated GPL, designated GPL-3, is composed of a 6-dTal and two Rha residues. Di-glycosylated GPL, designated GPL-2a, possesses only one Rha. The acetyl groups on the C3 and C4 positions of 6-dTal are highlighted by a red circle. Internal Rha residues are methylated in C3 and C4 positions. B, *M. smegmatis* and *M. abscessus* gpl loci encode enzymes for the synthesis, modification, and transport of GPL.

indicating increased pathogenesis of R forms relative to S forms (16, 26, 29, 30). In particular, in the zebrafish model of infection, the S-to-R transition is associated with increased bacterial loads, production of mycobacterial cords, abscess formation, and enhanced larval mortality (29). Understanding the molecular mechanisms behind the switch from S to R morphotype is of paramount importance and clinically relevant as evidenced by epidemiological surveys highlighting the predominance of R strains in patients with severe lung diseases and chronic colonization of the airways in CF patients (31, 32). Genomic and transcriptomic analyses originally revealed the presence of various insertions or deletions in the R strains, mostly found in *mgs1*, *mgs2*, and *mmpL4b* genes participating either in the biosynthesis or transport of GPL and responsible for the S-to-R transition in *M. abscessus* (33–35). A recent in-depth dissection study of the GPL glycome provided insights into the biological function of the different monosaccharides and demonstrated that deletion of either *gtf1* or *gtf2* (but not *gtf3*) resulted also in the S-to-R transition with enhanced cording and increased virulence in zebrafish embryos (15). These findings emphasize the importance of 6-dTal in infection outcomes and in the interaction with host macrophages. However, because 6-dTal is diacetylated, it is not known whether the phenotypes associated with *gtf1* deletion are a direct consequence of the absence of the 6-dTal or caused by the loss of the 6-dTal-substituted acetyl groups. In addition, whether the presence/absence of 6-dTal acetylation influences the GPL structure is not well understood. Thus, the identification of the *O*-acetyl transferases (Atf) and the contribution of *O*-acetylation to the overall GPL structure and biological function in *M. abscessus* remain to be established.

The aim of this study was to further advance our understanding of the genetic requirements for the biosynthesis and biological functions of the high-GPL-producing variants by focusing on the Atf-related enzymes involved in GPL *O*-acetylation. Bioinformatics and genetic studies were combined to identify and generate single and multiple deletion mutants lacking one to four *atf* genes and further characterized by functional complementation studies followed by detailed biochemical and structural lipid analyses. These mutants were also exploited to address the contribution of *O*-acetylation during the synthesis of GPL, their role in bacterial morphology and internalization of *M. abscessus* in human macrophages.

Results

Generation of *atf1* and *atf2* acetyltransferases deleted strains

While previous studies aimed at deciphering the contribution of the different moieties composing GPL (*O*-methylation of the lipid core (24) or glycosylation of the peptide backbone (15)) to the biological functions of this glycolipid, the importance of GPL acetylation on C3 and C4 positions of the 6-dTal of GPL-2a and GPL-3 (Fig. 1A) remains unsolved. The *M. abscessus* gpl biosynthetic locus encompasses two genes coding for putative acetyltransferases, referred to as *atf1* (*MAB_4106c*) and *atf2* (*MAB_4110c*) (8), contrasting with *M. smegmatis* which possesses a single *atf* gene (*MSMEG_0390*) (36) (Fig. 1B); all of these are predicted to be membrane-localized and contain ten putative transmembrane domains. To investigate the contribution and biological functions of Atf1 and Atf2 in GPL synthesis, *atf1* and *atf2* were deleted either individually or simultaneously in a high-GPL-producing *M. abscessus* S variant (CIP104536^T; identical to

ATCC19977), using an unmarked deletion system that allows multiple gene deletions in *M. abscessus* (37). In brief, the strategy involves double homologous recombination leading to the deletion of the *atf1* and/or *atf2* open reading frames from the *gpl* locus, based on the pUX1-*katG* suicide vector (Table S1) carrying a kanamycin resistance (*kan^R*) cassette, a tdTomato fluorescence marker, and a *katG* cassette that confers susceptibility to isoniazid (INH) in *M. abscessus*. The DNA segments flanking *atf1* or *atf2* were cloned into pUX1-*katG*, yielding pUX1-*katG-atf1* and pUX1-*katG-atf2* (Fig. S1A). Transformants that integrated the plasmids into their specific loci *via* homologous recombination were selected for resistance to kanamycin and had visible red fluorescence. After a second homologous recombination event, loss of the plasmid resulted in the recovery of $\Delta atf1$ (designated $\Delta 1$) and $\Delta atf2$ (designated $\Delta 2$) non-fluorescent colonies that were INH-resistant and Kan-susceptible. PCR/sequencing of the progenitor and the deletion strains using primers listed in Table S2, confirmed the genotype of these *atf* mutants (Fig. S1B). Functional complementation of $\Delta 1$ and $\Delta 2$ was done through specific integration at the *attB* chromosomal site (38) of an intact copy of *atf1* and *atf2* with an HA-tag placed at the 3'-end and under the control of the *hsp60* promoter (Fig. S2A). Western blotting of the crude lysates using anti-HA antibodies was carried out by loading equal amounts of proteins (confirmed by the KasA protein internal control) (Fig. S2B). This revealed the presence of single bands, corresponding to Atf1-HA and Atf2-HA, although these proteins migrated slightly faster than their predicted sizes, validating their expression in the complemented $\Delta 1$ and $\Delta 2$ strains.

Deletion of *atf1* and/or *atf2* does not suppress GPL acetylation

To qualitatively analyze the impact of *atf1* and/or *atf2* deletion, we analyzed the GPL from WT, $\Delta 1$, $\Delta 2$, and $\Delta 1,2$ strains (Table S3). GPL was prepared by sequential extraction of apolar and polar lipid fractions and analyzed by thin-layer chromatography (TLC). Apolar fractions all exhibited similar profiles (Fig. S3A) and were not further studied. In contrast, the GPL profiles in polar fractions of $\Delta 1$, $\Delta 2$, and $\Delta 1,2$ differed from the parental S strain (Fig. 2A), whereas other glycolipids are expressed at similar levels (Fig. S3B). In particular, the band intensity of GPL-2a significantly decreased in $\Delta 1$, $\Delta 2$, and $\Delta 1,2$ compared to WT. TLC analysis also showed an increased intensity for a set of bands with slower mobility, potentially more polar than GPL-3, in all three mutants; this was more pronounced in $\Delta 1,2$ (Fig. 2A, gray arrowhead).

The MALDI-MS spectrum of polar fraction from the WT strain reveals the presence of a complex set of GPL dominated by multiple isomers of GPL-3 (major signals at m/z 1404 and 1432) and GPL-2a (major signals at m/z 1258 and 1286) (Fig. 2B), as reported previously (13, 15, 24, 39). The presence of di-*O*-acetylated GPL-3 was confirmed in all four samples by MS/MS analysis of the parent m/z 1404 ion that produced the diagnostic fragment ion M-248 at m/z 1156, typifying the loss of 3,4 di-*O*-acetylated 6-dTal (Fig. 2C). Detailed analysis of the fragmentation spectra showed several fragment ions with 28 a.m.u. differences that originate from either the variation in the

length of the lipid chain (C_{26} or C_{28}) or the variation in the peptide sequence (alaninol or valinol), generating intrinsic heterogeneity of GPL-3, designated Ala- C_{28} or Val- C_{26} (Fig. 2C). It should be noted that the internal Rha residue linked to the amino alcohol is 3,4 di-*O*-methylated. MS/MS analysis of the signal at m/z 1404 in all four strains resulted in the same fragmentation spectrum, demonstrating that $\Delta 1$ and $\Delta 2$ synthesize similar di-*O*-acetylated GPL-3 (Fig. S4A). Comparable observations were made with the isomeric structure of GPL-3 at m/z 1432 (Fig. S4B). As for GPL-3, GPL-2a was observed in all four strains with similar structures. However, in accordance with the TLC analysis, the intensity of GPL-2a MS signals at m/z 1258 and 1286 was strongly decreased in $\Delta 2$ and $\Delta 1,2$ when compared to the GPL-3 signals at m/z 1404 and 1432 (Fig. 2B) but not in $\Delta 1$ (Fig. S5). Importantly, the complementation of $\Delta 1$ and $\Delta 2$ restored the parental GPL profile (Fig. S3C). At this stage of the study, we could not identify the product accumulating in $\Delta 1$, $\Delta 2$ and $\Delta 1,2$ (Fig. 2A, grey arrowhead) due to spectral overlap but this was later identified as mono-*O*-acetylated GPL-3 (see below).

Together, these observations show that the single and double disruptions of *atf1* and *atf2* induced moderate under-acetylation of GPL-3 associated with an unexpected reduction of GPL-2a amounts compared to GPL-3, which was more pronounced in the absence of *atf2*.

Bioinformatic analyses identify two *atf* paralogues in *M. abscessus*

The fact that the acetylation profile was incompletely modified in $\Delta 1,2$ raised the possibility of additional enzymes with redundant functions, encoded by genes outside of the *gpl* locus. BLAST analyses using either Atf1 or Atf2 as queries identified two putative acetyltransferase candidates, encoded by *MAB_1725c* and *MAB_3448*, respectively. Interestingly, *MAB_1725c* is part of a previously identified prophage (designated prophATCC19977-1) in *M. abscessus* ATCC19977 (Fig. 3A) and can spontaneously induce to give viable phage particles (40, 41). The prophage is integrated into *attB-5* overlapping a host *tRNA^{Met}* gene and has 113 predicted coding sequences (35, 40, 41). In contrast, *MAB_3448* belongs to a cluster of genes coding for proteins with unknown function or expressing lipolytic activity, such as *MAB_3447c* or *MAB_3452c* (Fig. 3A). Multiple amino acid alignments show the high sequence conservation between all four proteins (Fig. 3B). *MAB_1725c* shares 65% and 53% identity with Atf1 and Atf2 while *MAB_3448* shares 66% and 57% identity with Atf1 and Atf2, respectively. *MAB_1725c* and *MAB_3448* share 79% identity (Fig. 3C). This high sequence conservation suggests these enzymes may be functionally redundant. Like Atf1 and Atf2, *MAB_1725c* and *MAB_3448* are predicted to be membrane localized.

Loss of *atf1*, *atf2*, *MAB_1725c*, and *MAB_3448* severely impact the GPL composition

To investigate the potential contribution of *MAB_1725c* and *MAB_3448* to GPL acetylation, these genes were individually or simultaneously deleted in *M. abscessus* using the genetic

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

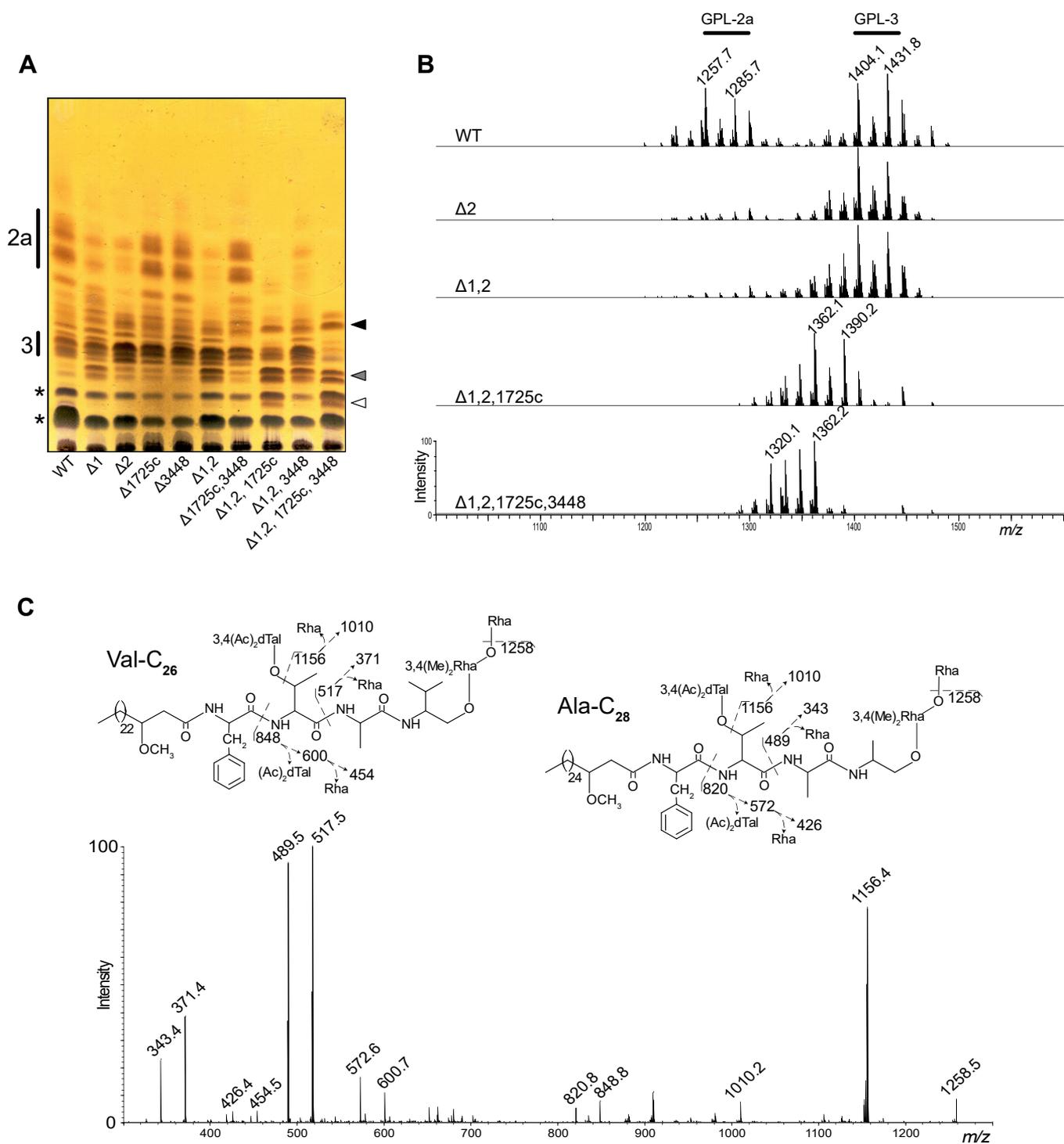


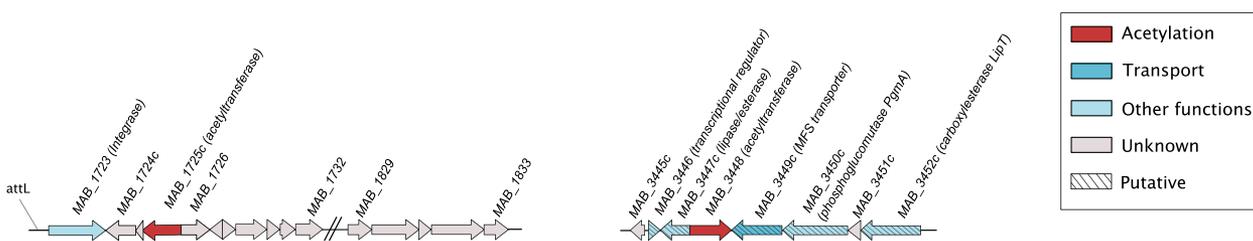
Figure 2. The GPL profile varies according to deleted acetyltransferases. A, TLC analysis of the polar lipid fraction of wild-type (WT) and acetyltransferases mutant strains. Previously characterized GPL-2a and GPL-3 mobility (15, 24) are shown on the left side (2a and 3); newly observed accumulating GPL are marked on the right side as white, grey, and black arrowheads; diacyl-trehalose isomers (DAT) identified by NMR are highlighted with an asterisk. B, MALDI-MS spectra in positive mode of the polar lipid fraction of wild-type (WT) and selected acetyltransferases mutant strains. Previously characterized GPL-2a and GPL-3 (15, 24) MS signals are shown on top of the spectra. C, MS² fragmentation spectrum of the selected parent ion at *m/z* 1404. Fragmentation patterns are illustrated for two GPL-3 isomers with alaninol and C₂₈ lipid (Ala-C₂₈) or valinol and C₂₆ lipid (Val-C₂₆). Each one produces the same fragment ions when di-O-acetylated 6-dTal and/or Rha are lost, but Y fragments ions are shifted by 28 a.m.u. along the peptidic backbone.

approach employed to generate $\Delta 1$ and $\Delta 2$, leading to $\Delta 1725c$, $\Delta 3448$, and $\Delta 1725c, 3448$ (Table S3 and Fig. S1C). The deletions were confirmed by PCR/sequencing (Fig. S1D and Table S2), and the mutants were subjected to lipid analyses.

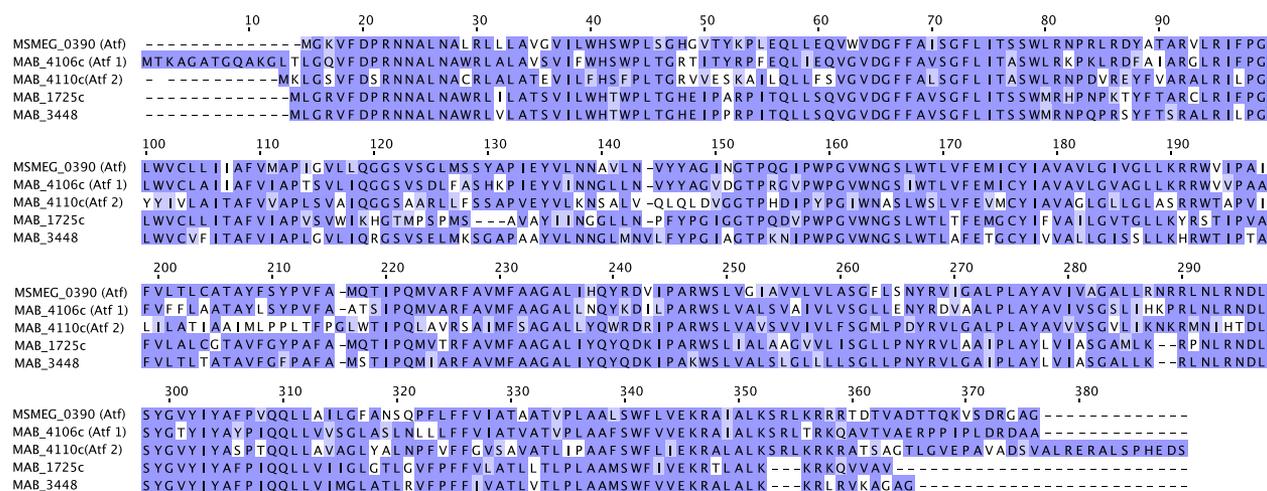
TLC (Fig. 2A) as well as MALDI-MS profiling (Fig. S5) of $\Delta 1725c$, $\Delta 3448$, and $\Delta 1725c, 3448$ closely mirror the WT pattern, demonstrating that *MAB_1725c* and *MAB_3448* are not essential for acetylation of GPL in a WT strain. Next, we

A Prophage locus

MAB_3448 environment



B



C

	Atf MSMEG_0390	Atf1 MAB_4106c	Atf2 MAB_4110	MAB_1725c	MAB_3448
Atf MSMEG_0390	100.00	71.94	55.83	65.78	68.31
Atf1 MAB_4106c	71.94	100.00	55.80	64.71	65.80
Atf2 MAB_4110c	55.83	55.80	100.00	53.53	56.52
MAB_1725c	65.78	64.71	53.53	100.00	78.82
MAB_3448	68.31	65.80	56.52	78.82	100.00

Figure 3. Paralogues of *atf1* and *atf2* are present in the *M. abscessus* genome. A, genomic organization around the two putative acetyltransferases encoding genes, *MAB_1725c* and *MAB_3448*. B, alignment of the protein sequence of the *M. smegmatis* GPL acetyltransferase (Atf) with the putative *M. abscessus* GPL acetyltransferases. C, cross-tabulation of the percentage of identity between the five acetyltransferases.

tested the possibility that these enzymes express redundant activities with Atf1 and/or Atf2 by comparing the GPL profiles of $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 1,2$ with $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,3448$ as well as in the quadruple mutant ($\Delta 1,2,1725c,3448$) lacking the four genes. $\Delta 1,2,3448$ showed by TLC and MALDI-MS analyses a GPL profile comparable to $\Delta 1,2$ (Figs. 2A and S5). Conversely, $\Delta 1,2,1725c$ exhibited a different profile characterized by a strong reduction of GPL-2a and GPL-3 but with a concomitant increase in the intensity of the lower Rf bands (Fig. 2A). Furthermore, two intense sets of bands appeared just below the GPL-3 (Fig. 2A, white and gray arrowheads) and one

between GPL-3 and GPL-2a (Fig. 2A, black arrowhead), suggesting that biosynthetic intermediates accumulate concomitantly to the disappearance of the final products. A similar trend was observed in $\Delta 1,2,1725c,3448$, culminating with the total disappearance of GPL-2a and GPL-3 bands (Fig. 2A). The polar glycolipid content was also assessed by TLC using other developing solvents, but no significant changes outside GPLs were observed (Fig. S3, D and E). Consistently, MALDI-MS spectra of $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$ displayed very different profiles to the WT strain, characterized by the strong reduction of GPL-3 signals at *m/z* 1404 and 1432 in the former

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

and their complete disappearance in the latter (Fig. 2B). The MALDI-MS spectrum of $\Delta 1,2,1725c$ showed a new cluster of signals dominated by a pair of ions at m/z 1362 and 1390, tentatively identified as mono-*O*-acetylated GPL-3 based on a 42 a.m.u reduction compared to GPL-3 signals at m/z 1404 and 1432. A cluster of ions from m/z 1320 to 1362 was identified in $\Delta 1,2,1725c,3448$ (Fig. 2B), requiring further investigation.

M. abscessus lacking *atf1*, *atf2*, *MAB_1725c*, and *MAB_3448* produce non-acetylated and hyper-methylated GPL

To explore the complex nature of the structural modifications observed in the different mutant strains, we first focused on the quadruple mutant. Indeed, deletion of all four *atf* genes

induced substantial biochemical alterations, resulting in the simplest GPL profile of all studied mutants, characterized by the accumulation of three lipids, as observed on the TLC (Fig. 2A, black, gray, and white arrowheads). The structures of these three components were individually determined in order to provide the basis for analyzing the more complex triple mutant. First, the polar lipid fraction isolated from the quadruple mutant was separated by preparative TLC into three fractions, referred to as $\Delta 1,2,1725c,3448$ -F1, $\Delta 1,2,1725c,3448$ -F2 and $\Delta 1,2,1725c,3448$ -F3 (Fig. 4A). $\Delta 1,2,1725c,3448$ -F1, which co-elutes with di-acyl trehalose (DAT), showed two major ions at m/z 1320 and 1348 on the MALDI-MS spectrum (Fig. 4B), tentatively attributed to non-acetylated GPL-3 based on the 84 a.m.u decrease from ions m/z 1404 and 1432. MS² fragmentation confirmed that the GPL signal at m/z 1320 was

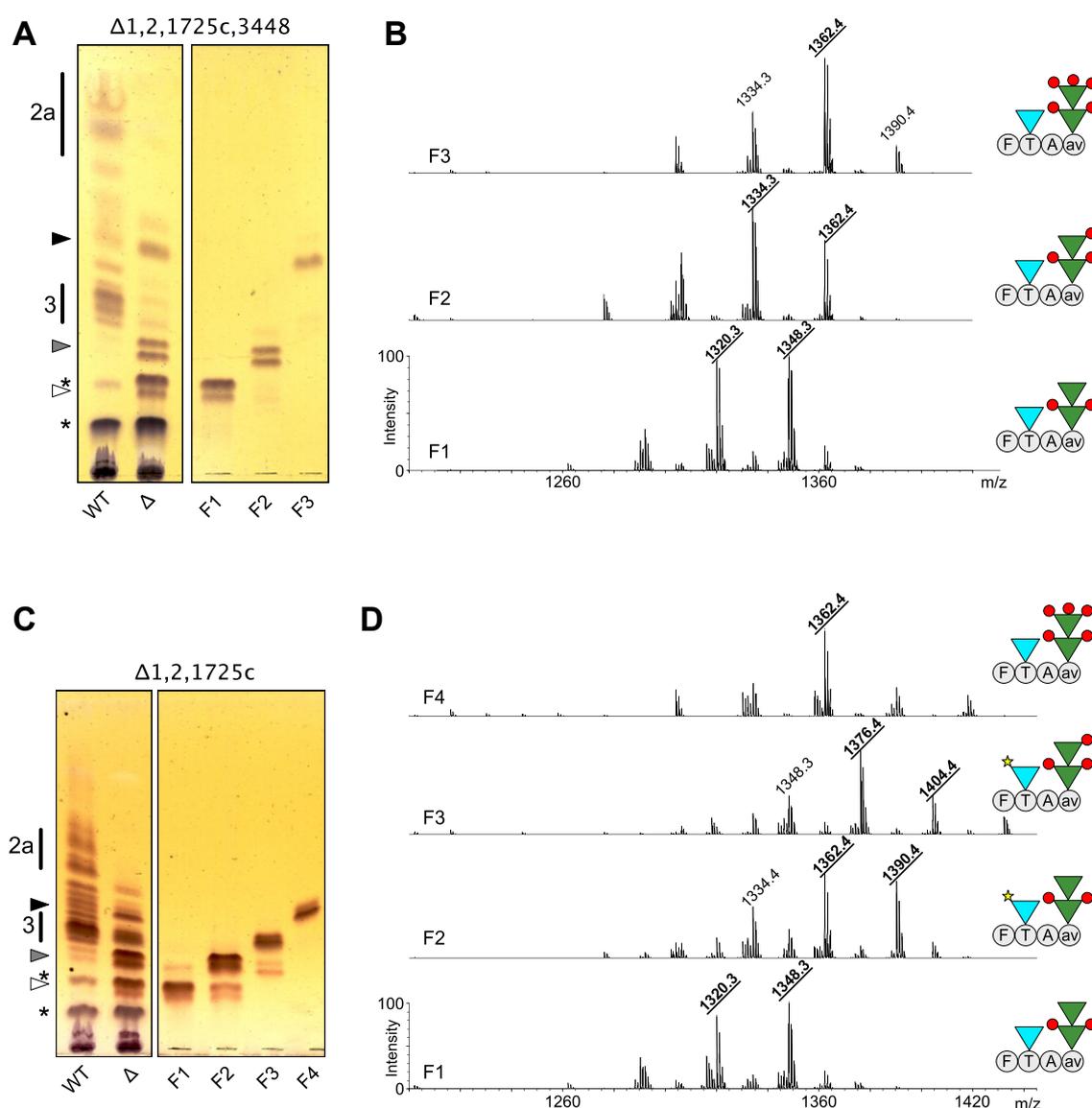


Figure 4. GPL from *M. abscessus* $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$ are under-acetylated and hyper-methylated. A and C, TLC analyses of $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$ before and after separation in three (F1–F3) or four (F1–F4) fractions, respectively, as compared with wild-type (WT). White, grey, and black arrowheads correspond to the accumulating products observed on TLC plates of total polar fractions. B and D, MALDI-MS spectra of $\Delta 1,2,1725c,3448$ -F1 to F3 and $\Delta 1,2,1725c$ -F1 to F4 following the separation of total polar fractions. Increasing m/z values are associated with additional acetyl group (yellow star) on the 6-dTal and *O*-methyl groups (red circles) on the terminal Rha. GPL schemes are drawn according to single-letter amino-acids code and SNFG nomenclature.

made of two GPL-3 isomers Ala-C₂₈ and Val-C₂₆, substituted by non-acetylated 6-dTal and Rha residues, owing to the observation of signals M-6dTal at m/z 1156 and M-Rha at m/z 1174, respectively (Fig. S6A). The GPL signal at m/z 1348 was identified as a GPL-3 isomer Val-C₂₈ substituted by identical monosaccharides (Fig. S6B). Δ 1,2,1725c,3448-F2 comprises two bands with intermediate R_f between Δ 1,2,1725c,3448-F1 and GPL-3 (Fig. 4A). MALDI-MS analysis showed a group of three intense ions dominated by the ion at m/z 1334 (Fig. 4B). MS² fragmentation generated a signal at m/z 1170 indicative of the loss of non-acetylated 6-dTal as well as a M-160 ion at m/z 1174, indicative of the loss of terminal mono-*O*-methyl Rha from non-acetylated GPL-3 isomers Ala-C₂₈ and Val-C₂₆ (Fig. S7A). Parent ion at m/z 1362 displayed a similar MS² pattern, highlighting the loss of non-acetylated 6-dTal and mono-*O*-methyl Rha, which typifies a GPL-3 Val-C₂₈ form (Fig. S7B). It should be noted that tri-*O*-methylated GPL-3 with identical signal at m/z 1334 was previously reported in *M. smegmatis* (42). Finally, Δ 1,2,1725c,3448-F3 was characterized as a single high mobility band on TLC, associated to a set of major ions at m/z 1334, 1362 and 1390 on MALDI-MS (Fig. 4, A and B). The 28 a.m.u increase in the parent ion over Δ 1,2,1725c,3448-F2, coupled with the Y2-fragment ion generated by MS/MS at m/z 531, suggested the presence of two additional *O*-methyl groups. These were located on the terminal Rha owing to the MS³ fragmentation of the Y2 ion at m/z 531 that generated a secondary fragment M-188 ion at m/z 343, confirming the presence of a terminal tri-*O*-methyl Rha on GPL-3 Ala-C₂₈ (Fig. S8A). Similar MS² fragmentation patterns were observed for parent ion at m/z 1390, which typifies GPL-3 Ala-C₃₀ and Val-C₂₈ isobars with terminal tri-*O*-methyl Rha (Fig. S8B). The presence of tri-*O*-methyl Rha was then confirmed by GC/MS analysis as demonstrated below.

Together, these data demonstrate that the quadruple mutant Δ 1,2,1725c,3448 completely lost the ability to synthesize acetylated GPL but accumulated a set of non-acetylated GPL-3 isomers substituted by two, three or five methoxy groups (Fig. 4B).

M. abscessus lacking *atf1*, *atf2*, and MAB_1725c synthesizes mono-*O*-acetylated GPL-3

Next, we examined in detail the GPL pattern of the triple Δ 1,2,1725c mutant that showed a more complex pattern than the quadruple Δ 1,2,1725c,3448 mutant, presumably because of the presence of partially acetylated products. The polar lipids from Δ 1,2,1725c were separated by preparative TLC into four fractions, designated Δ 1,2,1725c-F1 to Δ 1,2,1725c-F4 (Fig. 4C), and subjected to MALDI-MS and MS/MS analysis (Fig. 4D). Fraction Δ 1,2,1725c-F1 was identified as non-acetylated GPL-3 with a terminal Rha residue based on identical R_f, MALDI-MS, and MALDI-MS² fragmentation patterns than Δ 1,2,1725c,3448-F1 (Figs. 4, C and D; Fig. S9, A and B). Similarly, based on TLC mobility, MS, MS², and MS³ analyses (Figs. 4, C and D and S8C), Δ 1,2,1725c-F4 was identified as non-acetylated GPL-3 Ala-C₂₈ with a terminal tri-*O*-methyl

Rha, as observed in Δ 1,2,1725c,3448-F3. In contrast, Δ 1,2,1725c-F2 and Δ 1,2,1725c-F3 were shown to contain differently methylated mono-*O*-acetylated GPL-3 species. In particular, Δ 1,2,1725c-F2 was characterized by a set of three ions dominated by a signal at m/z 1362 (Fig. 4D). MS² analysis of parent ion at m/z 1362 showed the presence of a complex mixture consisting of two major GPL-3 isomers with valinol- or alaninol-containing peptides identified as mono-*O*-acetylated GPL-3 Val-C₂₆ and GPL-3 Ala-C₂₈ substituted by terminal Rha residues (Fig. S10A). Alaninol- and valinol-containing peptides were differentiated by simultaneous detection of fragment ions at m/z 489 and 517 and those resulting from the cleavage of terminal glycosidic linkages at m/z 1156 and 1216. The second major ion in Δ 1,2,1725c-F2 observed at m/z 1390 was identified as mono-*O*-acetylated GPL-3 Val-C₂₈ according to primary fragment M-206 at m/z 1184 while the fragment M-146 at m/z 1244 confirmed the presence of a terminal Rha residue (Fig. S10B). Fraction Δ 1,2,1725c-F3, that is exclusively observed in Δ 1,2,1725c showed three major ions at m/z 1348, 1376, and 1404 by MALDI-MS (Fig. 4D) that were further subjected to MS² and MS³ experiments. Of interest, the MS² spectrum of parent ion at m/z 1376 yielded signals at m/z 1170 and 1216 generated by the cleavage of terminal mono-*O*-acetylated 6-dTal and mono-*O*-methyl Rha residues (Fig. S11A), as confirmed by MS³ fragmentation of ion at m/z 1170. MS³ Y2-fragment ions at m/z 503 or 531 and secondary fragments produced by Y3-fragments at m/z 792 or 820 typified two GPL-3 isomers Val-C₂₆ and Ala-C₂₈, both characterized by the presence of mono-*O*-acetylated 6-dTal and terminal mono-*O*-methyl Rha. The 28 a.m.u higher mass ion at m/z 1404 was similarly identified as GPL-3 Val-C₂₈ based on MS² analysis (Fig. S11B). The exclusive presence of *O*-acetyl groups in fractions Δ 1,2,1725c-F2 and Δ 1,2,1725c-F3 was further confirmed by ¹H NMR analyses that showed a clear signal attributable to CH₃-CO- group at δ 2.14 ppm (Fig. S12). However, detailed NMR analysis of mono-acetylated GPL-3 did not reveal the exact position of the acetyl group due to the low relative amount of purified compound and possible heterogeneity caused by concomitant acetylation and methylation (data not shown). Overall, detailed GPL mapping in the multiple *atf*-deleted strains established that the loss of at least three *atf* genes presents inside and outside the *gpl* locus is required to significantly reduce GPL acetylation while disruption of all four *atf* genes is needed to abrogate GPL acetylation in *M. abscessus*.

Deletion of all four *atf* genes disturbs the synthesis of GPL glycan moiety

To address whether acetylation or acetyltransferases expression regulates the synthesis of GPL glycan moiety, the relative quantity of each deoxyhexose was determined in the various *atf* mutants. To do so, GPL was first chemically deacetylated to afford a complete purification from acyl ester glycolipids such as trehalose-based compounds, in particular DAT. Then, the monosaccharide composition of the resulting

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

purified deacetylated GPL (dGPL) was established by GC/MS (Fig. 5A). This revealed that the overall proportion of Rha residues slightly increased in all mutants lacking *atf2* (below 60% in WT and up to 65% in $\Delta 1,2,1725c,3448$) but remained unchanged in all other mutants as well as in the $\Delta 2$ -complemented strain. In agreement with the above-mentioned data, GC/MS analysis revealed the presence of about 3% 2,3,4 tri-*O*-methyl Rha in $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$, but not in the other strains.

As saponification releases the acetyl groups, the migration of the resulting dGPL on TLC exclusively relies on the rhamnan moiety (Fig. 5B) which considerably simplifies the migration pattern as compared to their corresponding native GPL (Fig. 2A). Standard dGPL-3 and dGPL-2a were obtained by saponification of GPL-3 and GPL-2a (Fig. S13A) while standard deacetylated tri- and penta-*O*-methylated-GPL-3 were obtained from $\Delta 1,2,1725c,3448$ -F2 and F3 (Fig. S13B). Based on the mobility of those standard molecules, the TLC

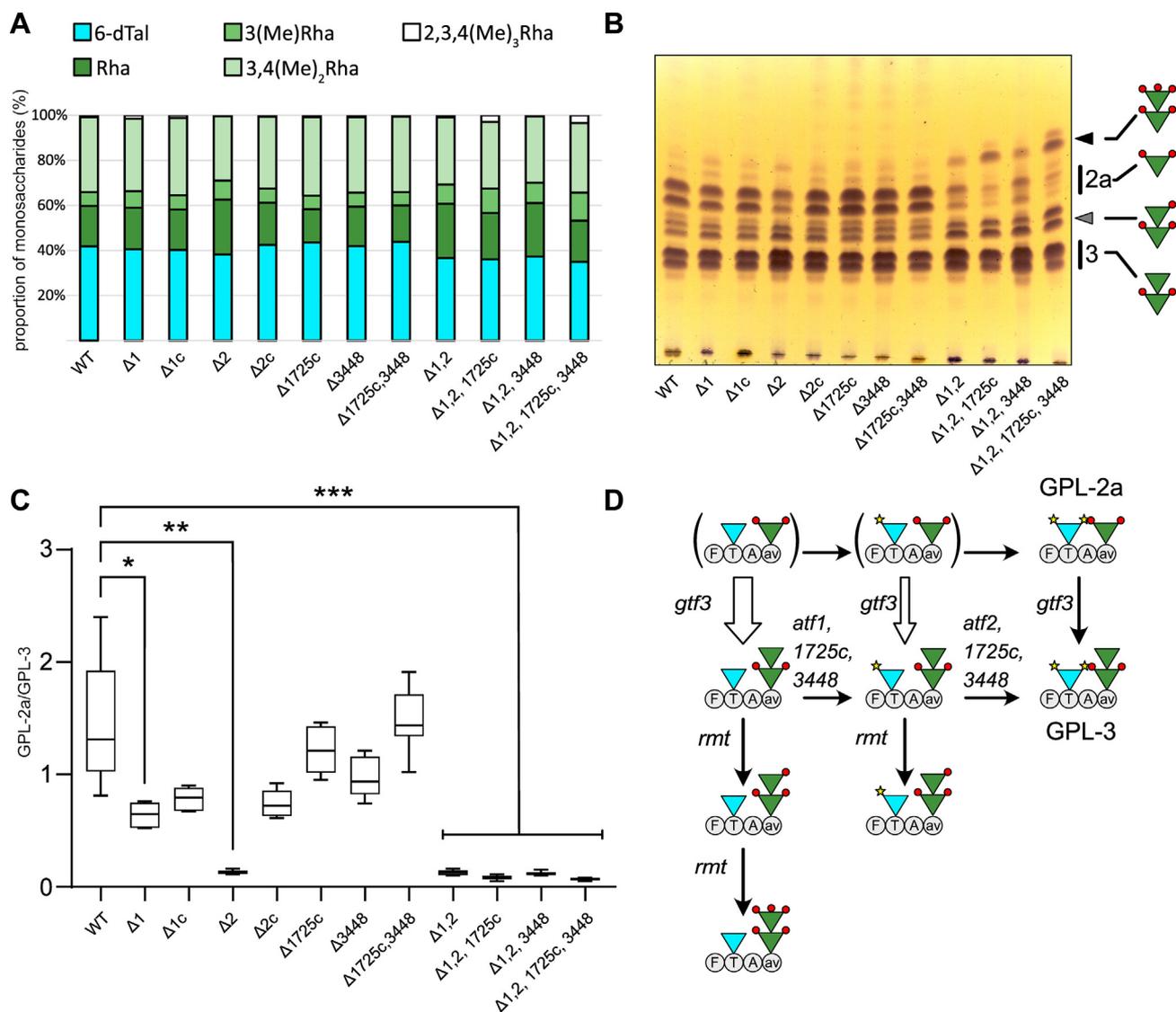


Figure 5. Deletion of the *atf* genes alters the GPL pattern. A, monosaccharide composition of purified deacetylated GPL. The relative proportion of Rha residues increased in all mutants lacking *atf2*, as well as *O*-methyl Rha residues in $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$. B, TLC of the saponified polar lipid fraction highlights important GPL modifications in all mutants deleted in *atf1* and *atf2* genes. Deacetylated dGPL-2a and dGPL-3 were attributed owing to saponification of the purified GPL-2a and GPL-3 as well as purified fractions from $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$ (Fig. S13, A and B). The composition of rhamnan moiety is shown to the right of the TLC. C, dGPL-2a/dGPL-3 ratios in all mutant strains were established by integrating relative intensities of ions at *m/z* 1174 versus 1320 as well as 1202 versus 1348. In all mutants lacking *atf2* gene, the relative proportion of GPL-2a is significantly reduced. Median values are shown and results (*n* = 8) were analyzed using the Friedman *t* test. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001. D, proposed biosynthetic pathway of GPL modification by glycosylation (*gtf*), acetylation (*atf*), and methylation (*rmt*). Acetyl groups are illustrated by yellow stars on the 6-dTal and *O*-methyl groups by red circles. All four identified acetyltransferases show partial overlapping activities. *Atf1* produces a mono-*O*-acetylated GPL-3 while *Atf2* catalyzes the transfer of the second acetyl group. *MAB_1725c* and *MAB_3448* are likely to be active on both non-acetylated and mono-*O*-acetylated GPL, although with different efficiencies. The rhamnosyltransferase *Gtf3* is thought to be more active on non-acetylated substrates (indicated by a thick arrow), which would explain the accumulation of under-acetylated GPL-3, which in turn, serves as a substrate for rhamnosyl-methyltransferases (*Rmt*) to synthesize the over-methylated GPL-3 species. Under-acetylated GPL-2a (in brackets) are not observed in any of the studied strains as they represent biosynthetic intermediates that do not accumulate.

analysis of deacetylated GPL fractions confirmed that the relative quantity of dGPL-2a was strongly decreased in all *atf2*-deficient mutants, with a complete loss of dGPL-2a in the quadruple mutant (Fig. 5B). Simultaneously, di-, tri-, and penta-*O*-methylated dGPL-3 strongly accumulated. The impact of *atf* deletion on reduced dGPL-2a production was quantified by computing the integration values of MALDI-MS diagnosis ion signals at *m/z* 1320 and 1348 for dGPL-3 and 1202 and 1174 for dGPL-2a (Fig. S13C). Determination of the dGPL-2a/dGPL-3 ratio clearly indicated that the deletion of *atf2* was sufficient to reduce, by at least 10-fold, the relative quantity of GPL-2a with respect to GPL-3 (Fig. 5C). In comparison, the individual deletion of *atf1*, *MAB_1725c*, or *MAB_3448* failed to or only marginally reduced the GPL-2a content.

To investigate the specificity of the individual acetyltransferases in *M. abscessus*, each gene was reintroduced into the $\Delta 1,2,1725c,3448$ quadruple mutant and the corresponding GPL profiles were analyzed. Western blotting using anti-HA antibodies clearly indicated that all four proteins were produced in the $\Delta 1,2,1725c,3448$ mutant, albeit at different levels (Fig. S2C). As shown by TLC and MS analyses, expression of the individual genes, with the exception of *atf2*, significantly altered the GPL profiles as compared to the $\Delta 1,2,1725c,3448$ quadruple mutants, but did not modify the apolar lipid pattern (Fig. S14, A and B). TLC and MS analysis of the deacetylated GPL fractions of the four mutant strains were dominated by dGPL-3 as in the parental $\Delta 1,2,1725c,3448$ mutant strain, confirming that the expression of individual genes only impacts on acetylation (Figs. S13C and S14C). Moreover, the expression of the single acetyltransferases did not rescue the WT expression level of GPL-2a. Analysis of the native GPLs of the *Atf1*-expressing strain showed that it accumulates mono-*O*-acetylated GPL-3, demonstrating that *Atf1* can transfer a single acetyl group onto unacetylated GPL3, but appears to be unable to use the produced mono-*O*-acetylated GPL-3 as a substrate (Fig. S14, B and C). In contrast, the GPL profile of the strain expressing *Atf2* shows predominantly deacetylated and hypermethylated GPL3 as in the quadruple mutant, suggesting that *Atf2* cannot use a non-acetylated substrate (Fig. S14, B and C). The unique expression of *MAB_1725c* or *MAB_3448* correlates with the disappearance of non-acetylated GPL3 and the concomitant synthesis of mono- and di-*O*-acetylated GPL3. This demonstrates that both gene products are capable of catalyzing the acetylation of non-acetylated or mono-*O*-acetylated substrates, although with different efficiencies, with the strain expressing *MAB_1725c* showing greater completeness for GPL acetylation.

Disruption of acetyltransferases influences colony morphology but not the uptake of *M. abscessus* by macrophages

It is well established that the absence or the presence of GPL determines the morphotype of *M. abscessus* colonies on agar medium (5, 16, 33). In addition, that a *gtf1* mutant lacking 6-dTal acquires a rough morphotype (15), prompted us to

compare the colony morphology of the single, double, triple, and quadruple *atf* mutants. Observation of individual colonies on Tryptic Soy agar failed to reveal morphological differences in $\Delta 1$, $\Delta 1725c$, $\Delta 3448$ and $\Delta 1725c,3448$ and all appeared similar to the parental S strain (Fig. 6A); none of these have altered acetylation patterns. Unexpectedly, $\Delta 2$ and $\Delta 1,2$ showed a different morphology than the parental S strain but distinct from the typical rough and dry features of the R strain. Strains $\Delta 1,2,1725c$, $\Delta 1,2,3448$, and $\Delta 1,2,1725c,3448$ all exhibited morphological differences, possibly as a consequence of the reduced GPL-2a/GPL-3 ratio (Fig. 6A). In contrast to the $\Delta gtf1$ mutant lacking 6-dTal with a pronounced corded phenotype (15), none of the acetylation mutants displayed the typical serpentine cords of the R variant (data not shown), suggesting that the corded structure of $\Delta gtf1$ is primarily caused by the loss of the 6-dTal rather than by the absence of the acetyl substituents. Similar to the *M. abscessus* R strain, only mutants lacking *atf2* rapidly sedimented in liquid culture, again underscoring a possible role of the reduced GPL-2a/GPL-3 ratio in bacterial aggregation (Fig. 6B). The *in vitro* growth curves of the *atf* mutants in 7H9 broth at 37 °C were comparable to the one of the parental S strain, reaching a plateau after 2 days (Fig. 6C). This suggests that the single or multiple deletions of the *atf* genes do not influence the replication rate of *M. abscessus* in planktonic cultures.

We next infected human THP-1 macrophages for 3 h with *M. abscessus* S, $\Delta 1,2$, $\Delta 1,2,1725c$, $\Delta 1,2,3448$, and $\Delta 1,2,1725c,3448$ prior to assessing phagocytosis by CFU counting. As shown in Figure 6D, all strains were equally taken up by macrophages, suggesting that GPL acetylation is not required for the internalization of *M. abscessus* by macrophages. To confirm these observations, we determined the contribution of GPL acetylation in phagocytosis using acetylated versus deacetylated GPL-2a and acetylated versus deacetylated GPL-3-coated fluorescent beads. Quantification of the proportion of bead-containing cells indicated that macrophages internalized significantly more GPL-2a-coated beads than uncoated beads (Fig. 6E). As reported previously, THP-1 cells phagocytosed more GPL-3-coated beads than GPL-2a-coated beads, thus highlighting the contribution of the terminal Rha in this process (15). However, no significant differences between dGPL-2a versus GPL-2a or between dGPL-3 versus GPL-3 were noticed (Fig. 6E). High-resolution confocal imaging confirmed the intracellular localization of the different GPL-counted beads (Fig. 6F).

Overall, the structure-function comparison using either whole bacilli or purified GPL beads suggests that acetylation of 6-dTal is not essential for the uptake of *M. abscessus* by macrophages.

Discussion

Acetylation of GPL has been proposed to regulate various biological processes such as sliding motility and biofilm formation in *M. smegmatis* (36) or macrophage apoptosis in *M. abscessus* through the interaction of di-*O*-acetylated GPL with mitochondrial cyclophilin D (13). While *M. smegmatis* produces essentially di-glycosylated GPL-2, *M. abscessus*

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

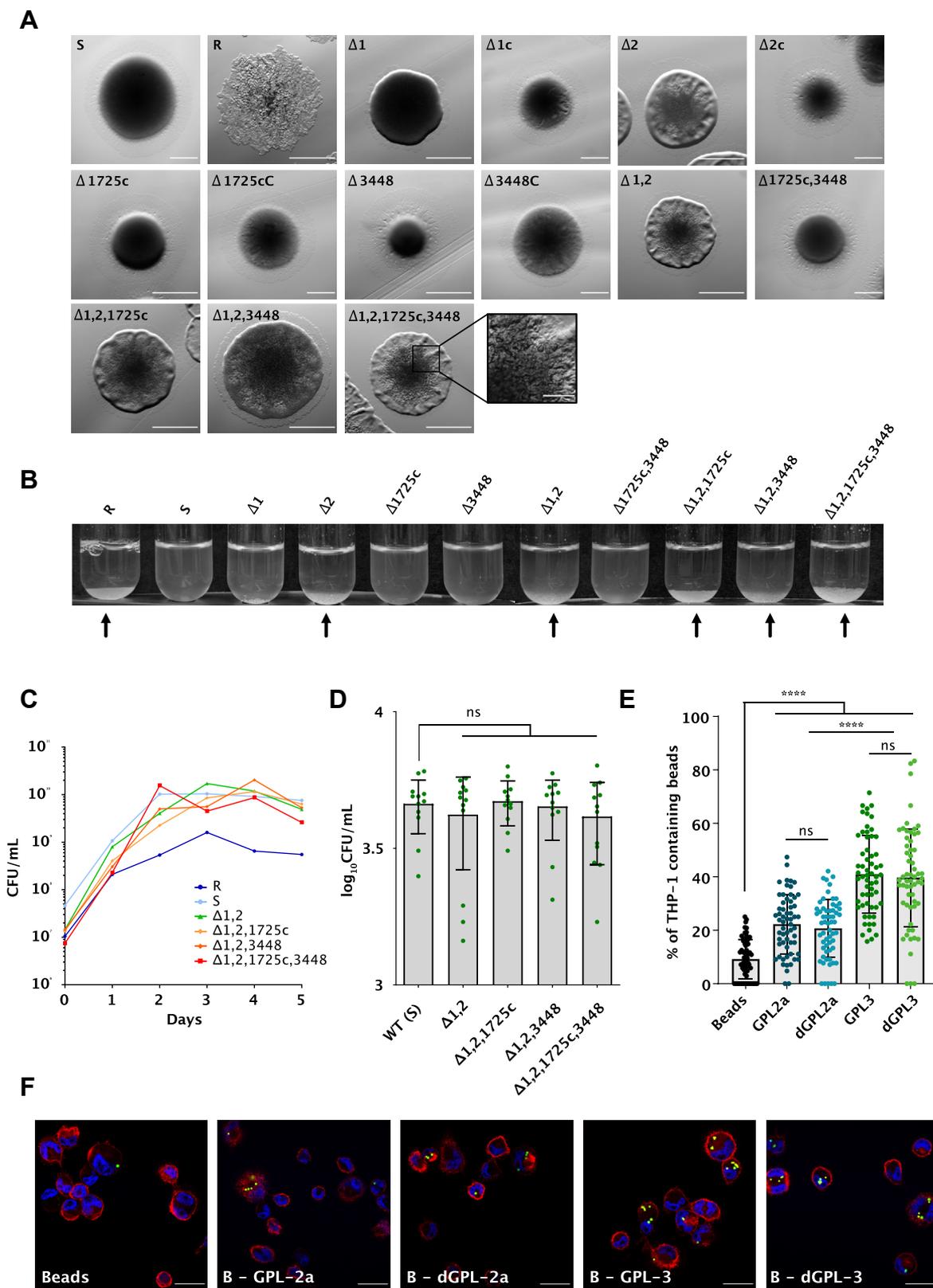


Figure 6. Impact of GPL acetylation on bacterial growth, morphology and sedimentation. *A*, colony morphology of the wild-type *M. abscessus* smooth and rough strains, *atf* mutants, and complemented strains. Scale bars represent 1 mm. Scale bar of inset represents 0.2 mm. *B*, sedimented bacterial aggregates are indicated by arrows. *C*, growth curve of reference strains (S and R), $\Delta 1,2$, $\Delta 1,2,1725c$, $\Delta 1,2,3448$, and $\Delta 1,2,1725c,3448$ at 37 °C for 5 days with agitation. The experiment was performed three times. *D*, internalization by macrophages of different *atf* mutants and wild-type strain (S) after 3 h of infection (MOI 2:1). Intracellular bacteria are expressed as CFU/ml and error bars represent standard deviations. Four independent experiments performed in triplicate are plotted on the graph and analyzed using the two-tailed Mann–Whitney *t* test. *E*, the influence of GPL acetylation in macrophage infection was evaluated with fluorescent beads coated with di- (GPL-2a) or tri-glycosylated (GPL-3) GPL, either di- or deacetylated (dGPL) using ten beads/cell. Non-coated

synthesizes equivalent amounts of GPL-2a and GPL-3, which can be easily distinguished by TLC and mass spectrometry. Previous work demonstrated that disruption of the unique *atf* gene in *M. smegmatis* abolished di-*O*-acetylated GPL-2 synthesis (8, 36). However, in the present work, our attempts to quantitatively inhibit GPL acetylation in *M. abscessus* by simultaneously deleting *atf1* and *atf2*, located within the *gpl* biosynthetic locus, were unsuccessful despite the fact that Atf1 and Atf2 sequentially transfer acetyl groups to 6-dTal when overexpressed in the *M. smegmatis atf* mutant (8). Indeed, single and simultaneous disruptions of *atf1* and *atf2* genes only resulted in a slight decrease of GPL acetylation. These observations challenge the initial hypothesis that *atf1* and *atf2* are sufficient to sequentially add the two acetyl groups on the 6-dTal in *M. abscessus*. Unexpectedly, disruption of *atf2* induced a notable decrease of di-*O*-acetylated GPL-2a correlating with an accumulation of mono- and di-*O*-acetylated GPL-3. Since all mutants lacking *atf2* sedimented efficiently in liquid culture, similarly to *M. abscessus* R, it may be proposed that this aggregation property is linked to the increased proportion of GPL-3 over GPL-2a. This hypothesis is strengthened by the fact that *M. abscessus* S overproducing the rhamnosyl-transferase Gtf3, also associated with an increased GPL-3/GPL-2a ratio, aggregated rapidly in liquid culture like the original R strain (15).

We posit here the existence of additional acetyltransferases, encoded outside the *gpl* locus, capable of functionally substituting Atf1 and Atf2. To advance our understanding of the GPL acetylation genetic requirements, two additional Atf-related enzymes potentially involved in GPL *O*-acetylation were identified, *MAB_1725c* and *MAB_3448*. Whereas individual or simultaneous deletion of these genes did not significantly modify the GPL profile, multiple deletions of *atf1*, *atf2*, and *MAB_1725c* resulted in a high accumulation of mono-*O*-acetylated GPL-3. Further deletion of *MAB_3448* in $\Delta 1,2,1725c,3448$ induced complete loss of GPL acetylation, as assessed by the accumulation of de-*O*-acetylated GPL-3. In addition to the loss of 6-dTal acetylation in $\Delta 1,2,1725c$ and $\Delta 1,2,1725c,3448$ strains, additional methylation of the terminal Rha residue occurred in GPL-3, generating several highly methylated by-products that are not observed in WT *M. abscessus*. Overall, observation of the individual GPL profiles of single and multiple mutants of *M. abscessus* reflects a complex compensatory mechanism between the different *atf* genes that does not exist in *M. smegmatis*. Accordingly, a bioinformatics analysis of the genomes of GPL-producing mycobacteria shows that while *M. smegmatis* and *Mycobacterium avium* have only one *atf*, *Mycobacterium chelonae* possesses two (*atf1* and *atf2*) (Table S4). Thus, the requirement for additional acetyltransferases in *M. abscessus* CIP104536^T appears to be a unique feature among the few mycobacterial species analyzed.

Three hypotheses for the biosynthesis of GPL in *M. abscessus* can be drawn from these observations, as summarized in Figure 5D. (1) The four putative acetyltransferases identified show a high level of redundancy in terms of activity toward GPL-3 and probably GPL-2a. Specifically, single and simultaneous deletions of *atf1* and *atf2* generate a modest accumulation of mono-*O*-acetylated GPL-3 while still producing di-*O*-acetylated GPL-3. Interestingly, when *atf1* or *atf2* are expressed individually in the quadruple mutant, this results in the production of mono-*O*-acetylated or non-acetylated GPL-3 rather than di-*O*-acetylated GPL-3 as in the WT strain. This strongly suggests that Atf1 and Atf2 are specific for non-acetylated and mono-*O*-acetylated GPL-3, respectively. In comparison, both *MAB_1725c* and *MAB_3448* can acetylate non- and mono-*O*-acetylated GPL-3, although with different efficiencies, with *MAB_1725c* being the most active enzyme, as revealed by the comparison of the level of di-*O*-acetylated GPL-3 in the $\Delta 1,2,1725c$ with the $\Delta 1,2,3448$ and in mutants that individually express *MAB_1725c* or *MAB_3448*. (2) Gtf3 has higher activity on non-acetylated GPL-2a than acetylated GPL. We have previously demonstrated that Gtf3 uses di-*O*-acetylated GPL-2a to synthesize GPL-3 by transferring an additional Rha onto the internal Rha residue (15). The observation that GPL-2a content was strongly reduced when the *atf* genes were deleted put into light a totally unexpected regulatory process occurring during GPL synthesis that cannot be directly explained by the intrinsic activities of the enzymes. However, it may be partially explained by a modification in the metabolic processing of GPL-2a due to increased activity of Gtf3 on non-acetylated GPL that would reroute the pool of GPL-2a toward GPL-3. If so, acetylation of GPL appears as a possible regulatory signal that maintains the GPL-2a/GPL-3 balance. It can also be hypothesized that the physical presence of acetyltransferases may limit the access of Gtf3 to GPL-2a and, consequently, restrict the production of GPL-3 due to steric hindrance. (3) In a similar manner, the build-up of under-acetylated GPL-3 in mutant strains is coupled with the unexpected accumulation of hyper-methylated species that are not found in the WT *M. abscessus* strain. It may be inferred that methylation acts as a compensatory mechanism to keep the overall hydrophobicity of GPL under the control of methyltransferases showing residual activity on under-acetylated GPL-3. Indeed, three genes *rmt2*, *rmt3*, and *rmt4* located within the *gpl* locus (Fig. 1) have orthologs in *M. smegmatis* and *M. avium* that are involved in the methylation of the first rhamnose (43, 44). Although attractive, these hypotheses should ideally be confirmed by studying the enzymatic activities of recombinantly produced acetyltransferases using individual acceptor substrates and identifying methyltransferases involved in the modification of GPL in *M. abscessus*.

Previous findings indicated that 6-dTal is a critical determinant promoting bacterial cell entry into macrophages (15),

beads were included as a control group. Each symbol represents the percentage of bead-containing macrophages in one field. Experiments were conducted three times ($n = 60$) and data are expressed as mean values \pm SD. Results were analyzed using the Mann-Whitney *t* test. ns, non-significant; **** $p \leq 0.0001$. *F*, representative fields of fluorescent beads (green) internalized by THP-1 cells. DAPI (blue) was used to stain the nuclei and CD43 antibodies (red) to detect the cell membrane. Scale bar, 50 μ m.

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

prompting us to investigate whether this was due to the loss of the monosaccharide and/or caused by the absence of the two acetyl groups. Quantitative analysis of the proportion of macrophages containing the various *atf* mutants at 3 h post-infection revealed that all strains were equally taken up by THP-1 cells, thus ruling out a role of GPL acetylation in the early interaction between the bacilli and the macrophage surface. This was also supported when determining the proportion of macrophages containing beads coated with chemically deacetylated GPL-2a versus di-*O*-acetylated GPL-2a or deacetylated GPL-3 versus di-*O*-acetylated GPL-3. Thus, the results obtained from whole bacteria or beads coated with purified GPL suggest that acetylation of GPL is not essential in the recognition between GPL and the macrophage receptor(s). Therefore, it can be speculated that the reduced uptake of the *gtf1* mutant is likely a consequence of the absence of the 6-dTal rather than of the acetyl groups. Given the importance of GPL-3 in the internalization of *M. abscessus* S by macrophages (15), one would expect the strains displaying high proportion of GPL-3 as compared to GPL-2a to be more efficiently internalized by THP-1 cells than the WT strain. However, this phenomenon was not observed in the case of the *atf2*-deletion mutants. This could be due to hyper-*O*-methylation of GPL compensating for the loss of acetylation during interaction between the bacilli and the host receptor(s). This hypothesis will be explored in future studies on the roles of the rhamnosyl-*O*-methyl transferases Rmt2, Rmt3, and Rmt4 in GPL structure and function.

An intriguing observation is that MAB_1725c is encoded by prophage prophATCC19977-1, grouped within Subcluster Maba1. Prophages are prevalent and highly diverse among *M. abscessus* strains (41). However, *atf*-like genes are generally only present within Cluster Maba prophages, and only about half of all Maba prophages have an *atf* gene (41). These include prophage prophGD17-2 and RNAseq analysis shows that its *atf* gene is lysogenically expressed – albeit at low levels – and can at least partially *O*-acetylate GPL in $\Delta 1,2$ (Fig. S15). Thus, at least in $\Delta 1,2$, the Atf encoded by the prophage participates in GPL biosynthesis and, therefore, in host cell wall assembly. These observations also suggest that GPL composition could vary among *M. abscessus* clinical isolates depending on the prophage status. Finally, we note that no *M. smegmatis* phages code for *atf* genes, but *Gordonia* phage Doggs and *Arthrobacter* phage Faja both code for Atf-like enzymes, and although GPL are not well characterized in these strains, it suggests that prophages may play broad roles in cell wall chemistry.

Experimental procedures

Mycobacterial strains, growth conditions, and reagents

All bacterial strains used for this study are listed in Table S3. Bacteria were grown in Middlebrook 7H9 broth (BD Difco) supplemented with 0.025% Tyloxapol and 10% oleic acid, albumin, dextrose, catalase (OADC enrichment) or on Middlebrook 7H10 agar (Difco) containing 10% OADC enrichment (7H10^{OADC}) at 37 °C, with antibiotics, if required. A Bio-Rad Gene pulser (25 μ F, 2500 V, 800 Ω) was used to transform

electrocompetent mycobacteria. After transformation, strains carrying pTEC27 (Addgene, plasmid 30,182) were selected in the presence of 1 mg/ml hygromycin for pTEC27 plasmid and strains carrying the pMV306 derivatives were selected on 250 μ g/ml kanamycin.

Deletion of atf genes and complementation in M. abscessus

All deletion mutants were generated in the smooth (S) variant of the reference strain CIP104536^T using the suicide vector pUX1-*katG* by double homologous recombination (37). Briefly, the upstream and downstream gene regions were PCR-amplified using the primers listed in Table S2 and ligated into the PacI/NheI-linearized pUX1-*katG*. After transformation, bacteria were selected on 7H10^{OADC} supplemented with 250 μ g/ml kanamycin with a visual screening of red fluorescent colonies, which have undergone the first homologous recombination. The second homologous recombination event was induced by INH counter-selection and selected on 7H10^{OADC} with 50 μ g/ml INH and screening for non-fluorescent colonies (15, 37). This unmarked deletion system allowed to successively delete all four *atf* genes in the *M. abscessus*. Complementation of the single and quadruple *atf* mutants were done by introducing the complementation plasmids generated using the integrative pMV306 (Table S1). Genes in fusion with an HA-tagging sequence were amplified by PCR under the control of the *hsp60* promoter (15). Proper gene deletion and all plasmids were verified by DNA sequencing.

Western blotting

Bacteria were harvested, resuspended in PBS and protease inhibitor, and disrupted by bead beating using 1 mm diameter glass beads and a Mixer Mill MM 301 (Retsch, Germany) for two pulses of 3 min at 30 Hz. Protein concentration was assessed using the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce), according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of proteins (10 μ g) were separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, probed for 1 h with either rat anti-HA (dilution 1:1000; Sigma) or rat anti-KasA (dilution 1:2000; loading control) antibodies. Membranes were washed and incubated for 45 min with goat anti-rat antibody conjugated to HRP (dilution 1:5000; Abcam). Bands were revealed using a SuperSignal West Femto (ThermoFisher Scientific) and a ChemiDoc MP system (Bio-Rad laboratories).

Colony morphology, sedimentation, and growth

Colony morphology was assessed from log phase cultures (OD₆₀₀ = 1) and streaked on Tryptic Soy agar. Plates were incubated 4 days at 37 °C and then imaged using a Zeiss microscope equipped with a Zeiss Plan Neo Fluor Z13/0.25 FWD objective. Images were taken with an Axiocam503 monochrome (Zeiss) camera and processed using ZEN 2 (blue edition). Sedimentation of bacterial aggregates was followed as reported earlier (24). Growth was initiated by inoculating mid-log phase cultures into fresh 7H9^{OADC} at an OD₆₀₀ of 0.05. Cultures were incubated at 37 °C with shaking and a sample of 1 ml of serially diluted culture was harvested every

day and plated onto LB agar. After 4 days at 37 °C, colonies were counted to determine the colony forming unit (CFU).

Glycolipids extraction

Bacteria grown on 7H10^{OADC} agar plates without detergent were collected and lyophilized. 50 mg of bacterial pellets were weighted and apolar lipid fractions were first extracted in order to avoid TDM interference. GPL were extracted from the polar lipid fraction, first with chloroform/methanol/0.3% NaCl (9/10/3, v/v/v) and then with chloroform/methanol/0.3% NaCl (5:10:4, v/v/v). The combined solvent extracts were mixed for 5 min with chloroform and 0.3% NaCl (1:1, v/v) and centrifuged at 3000g for 5 min to separate the lower organic phase from the aqueous phase. The upper aqueous layer was discarded and the lower organic phase was evaporated under a stream of nitrogen and resuspended in chloroform/methanol (2:1, v/v).

TLC analysis

Apolar and polar lipids were subjected to TLC analysis. 10 µl of extract were spotted along 0.5 mm lane with glass capillary on Silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck). GPL were separated in one or two migrations at 4 °C using chloroform/methanol/water (90:10:1, v/v/v) and more polar lipids were visualized with chloroform/methanol/water (65:25:4 or 30:8:1, v/v/v). Glycolipids were revealed by spraying the plates with orcinol in 20% sulfuric acid and charring.

GPL purification

Preparative TLC was performed on polar extracts: 300 µl were spotted on a 160 mm lane on a 60 µm silica gel plate with a glass back (20 cm × 20 cm) and migrated in a solution of chloroform/methanol/water (90:10:1, v/v/v). Plates were reversibly stained with iodide vapor to label bands, which were scrapped and GPL was further extracted in chloroform/methanol (2:1, v/v) under sonication for 1 h. Silica was, respectively, filtrated on glass wool and through a 0.2-µm PTFE syringe filter.

Glycolipids saponification

In all, 300 µl of the polar lipid fraction were dried under nitrogen, 1 ml sodium hydroxide 0.1 M in chloroform/methanol (1:1, v/v) was added, and heated overnight at 37 °C. 1 ml butanol and 1 ml water were added and the mixture vortexed for 1 min and centrifuged for 30 s. The upper butanolic phase was dried under nitrogen and dissolved in 300 µl chloroform/methanol (2:1, v/v).

ItoI-acetates derivation

For the hydrolysis step, 1 µg mesoinositol was added to the deacetylated GPL fraction then, 1 ml 3 M TFA was mixed, heated 4 h at 80 °C, dried and desiccated overnight. The reduction step was conducted for 4 h at room temperature in 500 µl NaBH₄ 10 mg/ml in 2 M NH₄. The reaction was stopped with concentrated glacial acetic acid. Samples were dried at 55 °C under a nitrogen stream by co-distillation with

methanol/acetic acid five times, desiccated overnight. Peracetylation was done by incubation in 500 µl anhydride acetic 4 h at 80 °C. The reaction products were extracted several times with chloroform/water. The chloroform-rich phase was then filtered, dried and dissolved in 500 µl chloroform. For GC-FID, 1 µl of itol-acetate derivatives was injected in splitless mode with an automatic sampler on a Solgel 1 MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm capillary column with the following gradient temperature: 120 to 230 °C at 3 °C/min, then to 270 °C at 10 °C/min. Compounds were detected with a flame ionization detector on a HP-7820 gas chromatograph (Agilent Technologies). Previously determined retention times were used to identify each deoxyhexoses (15).

MALDI-TOF mass spectrometry

Before spotting 1 µl on the MALDI plate with a glass capillary tube, 10 µl of 20 mg/ml dihydroxybenzoic acid (DHB) in chloroform/methanol (1:2, v/v) were mixed with 10 µl of the sample extract in chloroform/methanol (2:1, v/v). MS and MSⁿ spectra were acquired on an Axima Resonance (Shimadzu, Kyoto, Japan) in reflectron mode. For MS² experiments, ion selection was set from 250 to 500 Δm, and collision energy was tuned from 300 eV to 600 eV. The GPL-2a/GPL-3 ratio was determined by dividing the relative intensities of the detected ion's pair at *m/z* 1174 and 1320 or 1202 and 1348 following 1/2, 1/3, or 1/5 sample dilution with the matrix.

Nuclear magnetic resonance

TLC-purified GPL was dried and dissolved in a mixture of CDCl₃/CD₃OD (2:1, v/v) with 0.03% trimethylsilane (Euriso-top, France) three times and then dissolved in a final volume of 270 µl. Samples were introduced into a 3 mm glass tube (Shigemi). A TBI probe was used to observe ¹H and ¹³C nuclei at 293K on an AVANCE II system (Bruker Biospin GmbH). Impulsion sequences used for homonuclear and heteronuclear experiments were from the manufacturer. After acquisition, phase correction and calibration on methanol signals were performed for δ ¹H and δ ¹³C.

Internalization of *M. abscessus* by macrophages

THP-1 macrophages were grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) (RPMI^{FBS}), differentiated in the presence of 20 ng/ml phorbol myristate acetate in 24-well flat-bottom tissue culture microplates (10⁵ cells/well) and incubated for 48 h at 37 °C with 5% CO₂. Infections with *M. abscessus* strains were performed for 3 h at 37 °C in the presence of 5% CO₂ with two bacteria per cell (MOI 2:1). Cells were carefully washed three times with PBS and then incubated with RPMI^{FBS} supplemented with 250 µg/ml amikacin for 2 h to kill extracellular bacteria. The medium containing amikacin was discarded and cells were washed three times with PBS prior to assess CFU by lysing cells with 100 µl of 1% Triton X100 and plating serial dilutions of the homogenates. CFU were counted after 4 days of incubation at 37 °C, as described earlier (15).

Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

Fluorescent beads phagocytosis assay

Fluorescent beads were coated with purified acylated and deacylated GPL-2a and GPL-3, as reported previously (15). THP-1 cells were incubated for 4 h at 37 °C with fluorescent beads (ten beads/macrophage), washed and stained using anti-CD43 antibodies and Alexa Fluor 594-coupled anti-mouse secondary antibody and DAPI. The percentage of macrophages containing beads was quantified using an epifluorescence microscope (15).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with Prism 9.0 (Graphpad). Details are given in the legend of each figure. ns, $p \geq 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Data availability

All data are contained within the manuscript and [Supporting information](#) section. The raw data can be shared upon request to yann.guerardel@univ-lille.fr.

Supporting information—This article contains supporting information (15, 24, 25, 38, 41).

Acknowledgments—We acknowledge Vaincre la Mucoviscidose (RF20200502678) and the Association Grégory Lemarchal for funding the PhD fellowship of MI. We are grateful to the Montpellier RIO Imaging facility and to the PAGES core facility (<http://plateforme-pages.univ-lille1.fr>) and UAR 2014 - US 41 - Plateformes Lilloises en Biologie et Santé for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We thank SEA-PHAGES students Megan Ulbrich, Erin Bogler, and Dylan Leonard for their work on phages Doggs and Faja.

Author contributions—M. I., L. D. L., C. D., and W. D. investigation; M. I., L.-D. L., W. D., Y. G., and L. K. formal analysis; Y. G., L. K., M. I., L.-D. L., W. D., and G. H. writing—original draft. L. K. conceptualization.

Funding and additional information—This study was supported by the French National Research Agency ANR-19-CE15-0012-01 (SUNLIVE) to L. K. and Y. G., and National Institutes of Health grant GM131729 to G. F. H. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Conflict of interest—The funders had no role in study design, data collection, interpretation, or the decision to submit the work for publication. G. H. receives support through a collaborative research agreement with Janssen Inc.

Abbreviations—The abbreviations used are: 6-dTal, 6-deoxy- α -L-talose; DAT, di-acyl trehalose; GPL, glycopeptidolipids; kanR, kanamycin resistance; NTM, non-tuberculous mycobacteria; R, rough; S, smooth; TLC, thin-layer chromatography.

References

- 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
- Brown-Elliott, B. A., Nash, K. A., and Wallace, R. J. (2012) Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 545–582
- Sermet-Gaudelus, I., Le Bourgeois, M., Pierre-Audigier, C., Offredo, C., Guillemot, D., Halley, S., et al. (2003) *Mycobacterium abscessus* and children with cystic fibrosis. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1587–1591
- Esther, C. R., Esserman, D. A., Gilligan, P., Kerr, A., and Noone, P. G. (2010) Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **9**, 117–123
- 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)* **152**, 1581–1590
- Medjahed, H., Gaillard, J.-L., and Reyrat, J.-M. (2010) *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol.* **18**, 117–123
- Gutiérrez, A. V., Viljoen, A., Ghigo, E., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2018) Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* complex. *Front. Microbiol.* **9**, 1145
- Ripoll, F., Deshayes, C., Pasek, S., Laval, F., Beretti, J.-L., Biet, F., et al. (2007) Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genomics* **8**, 114
- Burbaud, S., Laval, F., Lemassu, A., Daffé, M., Guilhot, C., and Chalut, C. (2016) Trehalose Polyphleates are produced by a glycolipid biosynthetic pathway conserved across phylogenetically distant mycobacteria. *Cell Chem. Biol.* **23**, 278–289
- Vats, A., Singh, A. K., Mukherjee, R., Chopra, T., Ravindran, M. S., Mohanty, D., et al. (2012) Retrobiosynthetic approach delineates the biosynthetic pathway and the structure of the acyl chain of mycobacterial glycopeptidolipids. *J. Biol. Chem.* **287**, 30677–30687
- Wiersma, C. J., Belardinelli, J. M., Avanzi, C., Angala, S. K., Everall, I., Angala, B., et al. (2020) Cell surface remodeling of *Mycobacterium abscessus* under cystic fibrosis airway growth conditions. *ACS Infect. Dis.* **6**, 2143–2154
- Villeneuve, C., Etienne, G., Abadie, V., Montrozier, H., Bordier, C., Laval, F., et al. (2003) Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J. Biol. Chem.* **278**, 51291–51300
- Whang, J., Back, Y. W., Lee, K.-I., Fujiwara, N., Paik, S., Choi, C. H., et al. (2017) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis.* **8**, e3012
- Miyamoto, Y., Mukai, T., Nakata, N., Maeda, Y., Kai, M., Naka, T., et al. (2006) Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **188**, 86–95
- Daher, W., Leclercq, L.-D., Johansen, M. D., Hamela, C., Karam, J., Trivelli, X., et al. (2022) Glycopeptidolipid glycosylation controls surface properties and pathogenicity in *Mycobacterium abscessus*. *Cell Chem. Biol.* **29**, 910–924.e7
- Bernut, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., et al. (2016) Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium bolletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol. Microbiol.* **99**, 866–883
- Medjahed, H., and Reyrat, J.-M. (2009) Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1331–1338
- Nessar, R., Reyrat, J.-M., Davidson, L. B., and Byrd, T. F. (2011) Deletion of the *mmpL4b* gene in the *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization

- capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response. *Microbiology (Reading)* **157**, 1187–1195
19. Viljoen, A., Dubois, V., Girard-Misguich, F., Blaise, M., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2017) The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. *Mol. Microbiol.* **104**, 889–904
 20. Viljoen, A., Viela, F., Kremer, L., and Dufrière, Y. F. (2020) Fast chemical force microscopy demonstrates that glycopeptidolipids define nano-domains of varying hydrophobicity on mycobacteria. *Nanoscale Horiz.* **5**, 944–953
 21. Ryan, K., and Byrd, T. F. (2018) *Mycobacterium abscessus*: shapeshifter of the mycobacterial world. *Front. Microbiol.* **9**, 2642
 22. Madani, A., Ridenour, J. N., Martin, B. P., Paudel, R. R., Abdul Basir, A., Le Moigne, V., et al. (2019) Cyclopostins and cyclophostin analogues as multitarget inhibitors that impair growth of *Mycobacterium abscessus*. *ACS Infect. Dis.* **5**, 1597–1608
 23. Johansen, M. D., Daher, W., Roquet-Banères, F., Raynaud, C., Alcaraz, M., Maurer, F. P., et al. (2020) Rifabutin is bactericidal against intracellular and extracellular forms of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e00363-20
 24. Daher, W., Leclercq, L.-D., Viljoen, A., Karam, J., Dufrière, Y. F., Guérardel, Y., et al. (2020) O-methylation of the glycopeptidolipid acyl chain defines surface hydrophobicity of *Mycobacterium abscessus* and macrophage invasion. *ACS Infect. Dis.* **6**, 2756–2770
 25. Viljoen, A., Gutiérrez, A. V., Dupont, C., Ghigo, E., and Kremer, L. (2018) A simple and rapid gene disruption strategy in *Mycobacterium abscessus*: on the design and application of glycopeptidolipid mutants. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 69
 26. Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., et al. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E943–E952
 27. Roux, A.-L., Viljoen, A., Bah, A., Simeone, R., Bernut, A., Laencina, L., et al. (2016) The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol.* **6**, 160185
 28. Roux, A.-L., Ray, A., Pawlik, A., Medjahed, H., Etienne, G., Rottman, M., et al. (2011) Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell. Microbiol.* **13**, 692–704
 29. 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
 30. Catherinot, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J.-F., Daffé, M., et al. (2007) Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect. Immun.* **75**, 1055–1058
 31. Catherinot, E., Roux, A.-L., Macheras, E., Hubert, D., Matmar, M., Dannhoffer, L., et al. (2009) Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 271–274
 32. 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
 33. 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
 34. Park, I. K., Hsu, A. P., Tettelin, H., Shallom, S. J., Drake, S. K., Ding, L., et al. (2015) Clonal diversification and changes in lipid traits and colony morphology in *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3438–3447
 35. Dedrick, R. M., Smith, B. E., Garlena, R. A., Russell, D. A., Aull, H. G., Mahalingam, V., et al. (2021) *Mycobacterium abscessus* strain morphotype determines phage susceptibility, the repertoire of therapeutically useful phages, and phage resistance. *mBio* **12**, e03431-20
 36. Recht, J., and Kolter, R. (2001) Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **183**, 5718–5724
 37. Richard, M., Gutiérrez, A. V., Viljoen, A., Rodriguez-Rincon, D., Roquet-Baneres, F., Blaise, M., et al. (2019) Mutations in the MAB_2299c TetR regulator confer cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e01316–e01318
 38. Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., et al. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456–460
 39. Jia Khor, M., Broda, A., Kostrzewa, M., Drobniowski, F., and Larrouy-Maumus, G. (2021) An improved method for rapid detection of *Mycobacterium abscessus* complex based on species-specific lipid fingerprint by routine MALDI-TOF. *Front. Chem.* **9**, 715890
 40. 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
 41. Dedrick, R. M., Aull, H. G., Jacobs-Sera, D., Garlena, R. A., Russell, D. A., Smith, B. E., et al. (2021) The prophage and plasmid mobilome as a likely driver of *Mycobacterium abscessus* diversity. *mBio* **12**, e03441-20
 42. Gao, J., and Sampson, N. S. (2014) A GMC oxidoreductase homologue is required for acetylation of glycopeptidolipid in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* **53**, 611–613
 43. Jeevarajah, D., Patterson, J. H., Taig, E., Sargeant, T., McConville, M. J., and Billman-Jacobe, H. (2004) Methylation of GPLs in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.* **186**, 6792–6799
 44. Patterson, J. H., McConville, M. J., Haites, R. E., Coppel, R. L., and Billman-Jacobe, H. (2000) Identification of a methyltransferase from *Mycobacterium smegmatis* involved in glycopeptidolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 24900–24906

Supporting information

Multiple *Mycobacterium abscessus* O-acetyltransferases influence glycopeptidolipid structure and colony morphotype

Morgane Illouz^{1,&}, Louis-David Leclercq^{2,&}, Clara Dessenne², Graham Hatfull³, Wassim Daher^{1,4},

Laurent Kremer^{1,4,#}, and Yann Guérardel^{2,5#}

¹Centre 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.

²Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France.

³Department of Biological Sciences, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, US

⁴INSERM, IRIM, 34293 Montpellier, France.

⁵Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Gifu University, Gifu, Japan

&These authors contributed equally to this work.

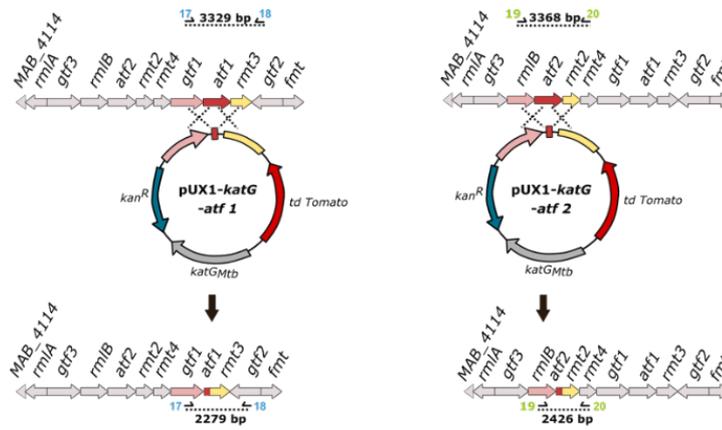
#For correspondence: E-mails yann.guerardel@univ-lille.fr, Tel: (+33) 3 20 43 69 41; laurent.kremer@irim.cnrs.fr, Tel: (+33) 4 34 35 94 47.

Running title: Acetylation of GPL in *Mycobacterium abscessus*

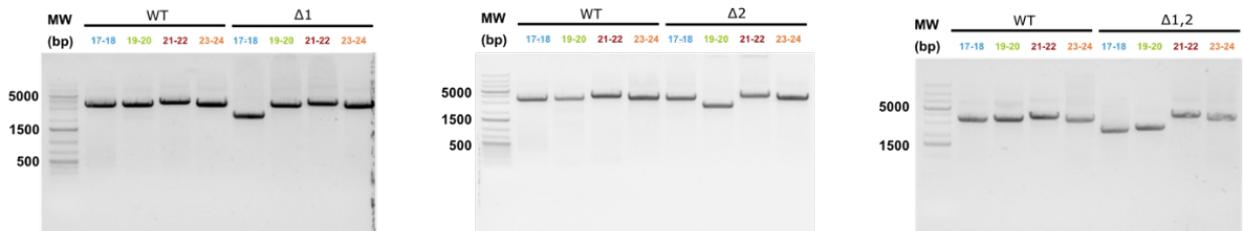
Keywords: *Mycobacterium abscessus*, glycopeptidolipid, cell wall, acetyltransferase, macrophage, mass spectrometry.

SUPPLEMENTARY FIGURES

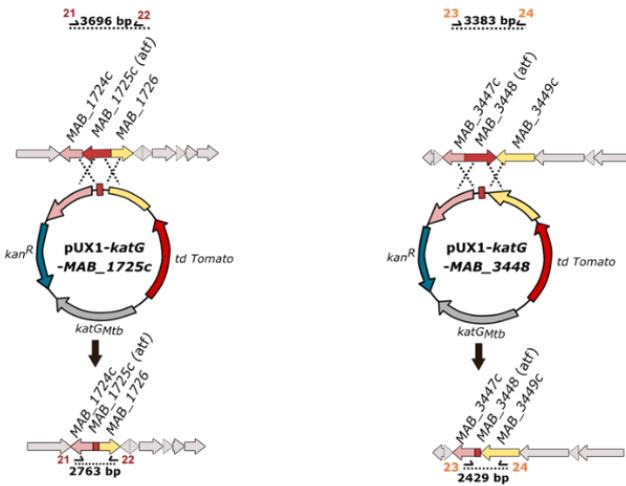
A



B



C



D

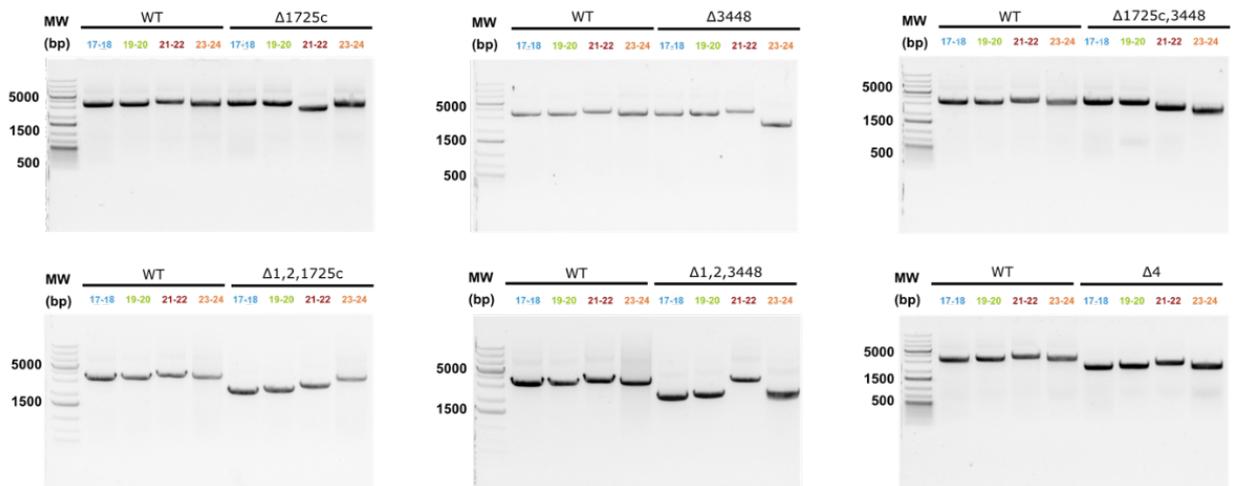


Figure S1: Generation of the *atf* mutants in *M. abscessus*. (A, C) The gene of interest to be inactivated in the bacterial chromosome is colored in red. The upstream and downstream regions of the gene of interest are in pink and yellow, respectively. Crosses represent homologous recombination events. Primers used are listed in **Table S2**. The intact locus is drawn above the plasmid and the modified locus is shown below the plasmid. (B, D) PCR profile of the different mutants compared to WT strain. To amplify the different loci, genomic DNA was used as template. Sequencing of the amplicons was performed to confirm the proper deletions.

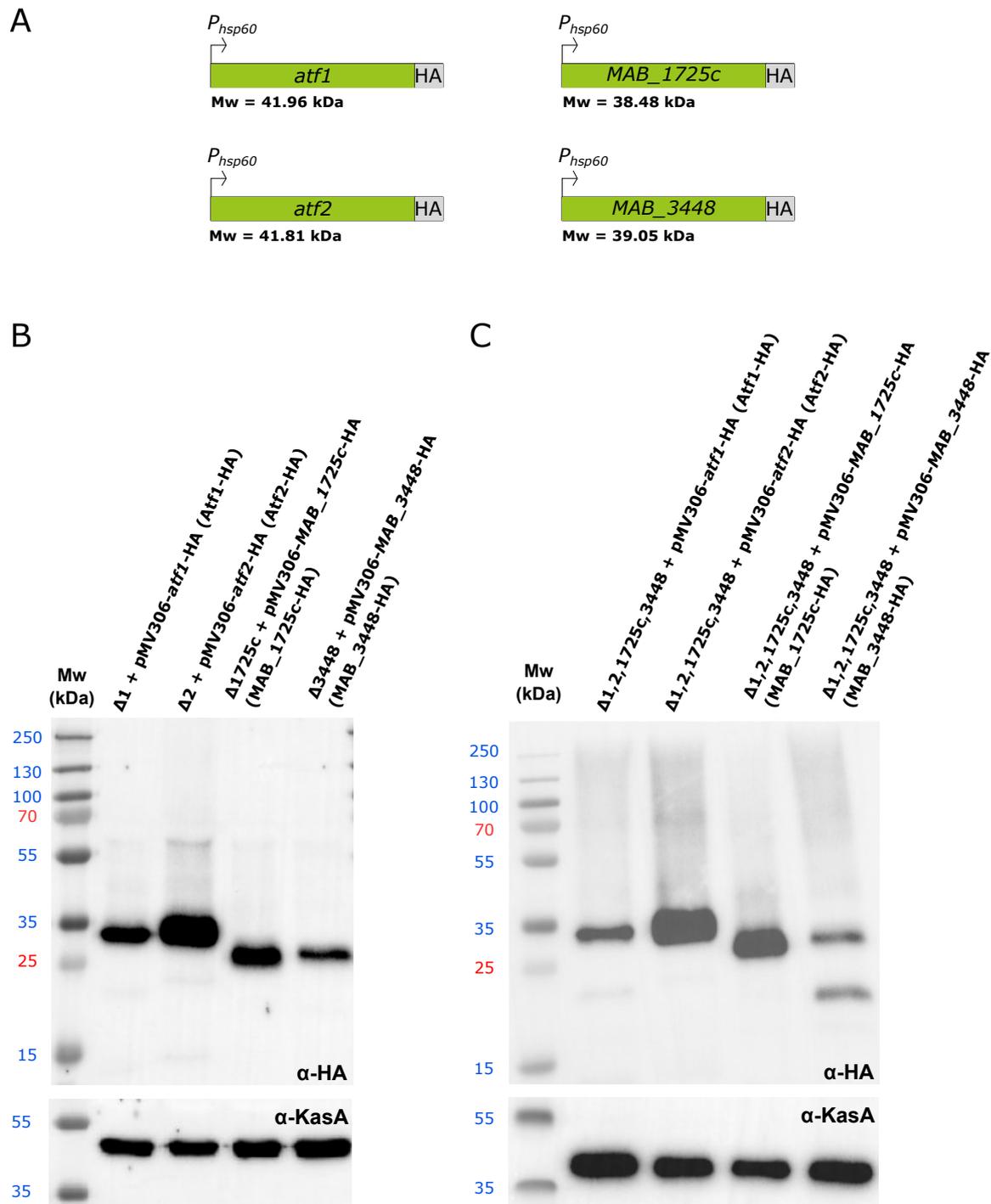


Figure S2: Acetyltransferase complementation in *M. abscessus* mutants. (A) Diagrams of the genes of interest fused with an HA-tag on the C-terminal side produced under the control of the *hsp60* promoter. The molecular weight of the protein with the HA-tag is indicated below each diagram. **(B, C)** Western blot analysis showing the production of the four HA-tagged Atf proteins in the single **(B)** and quadruple **(C)** *atf* mutants (upper panels). The KasA protein serves as an internal loading control (lower panels).

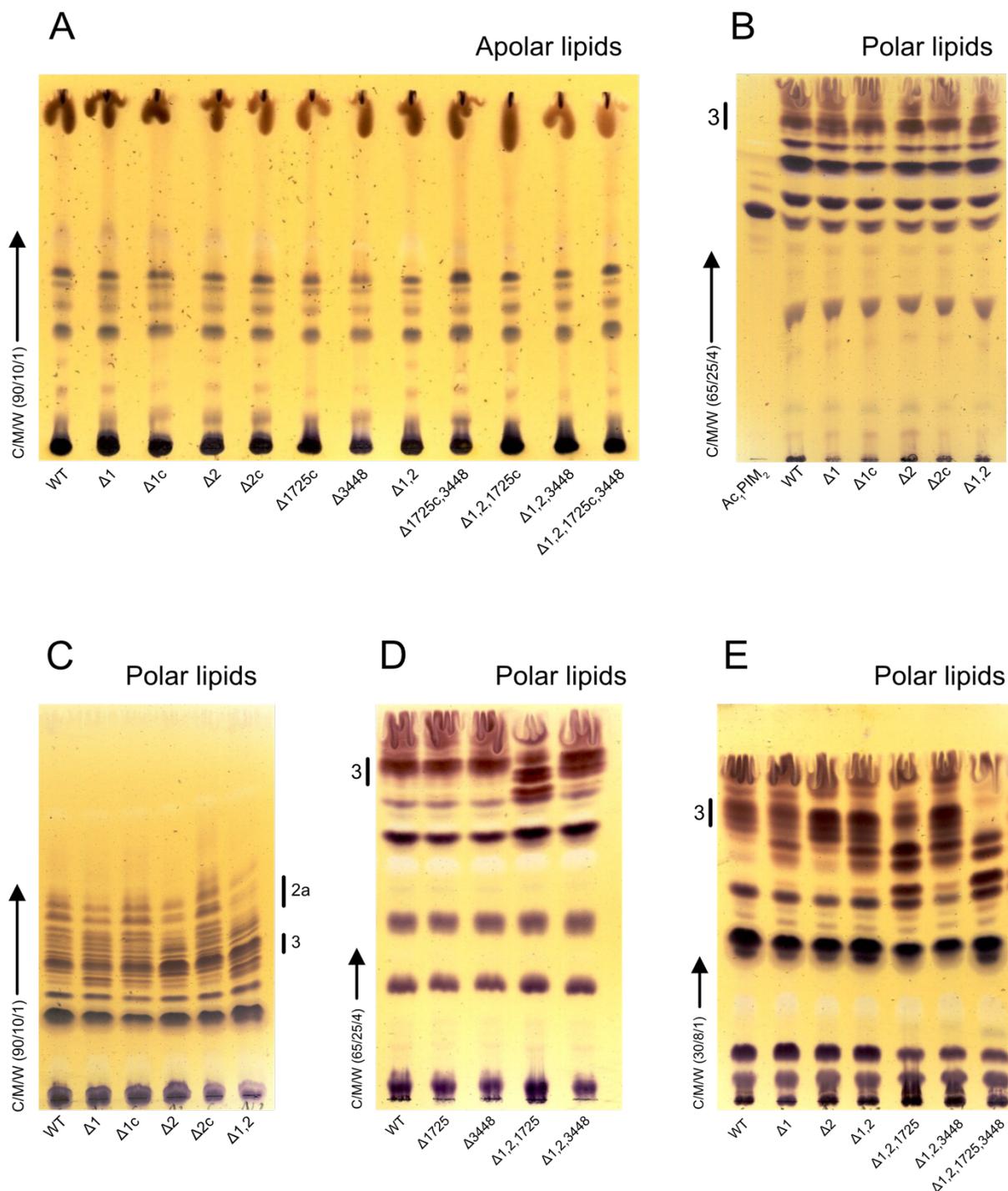
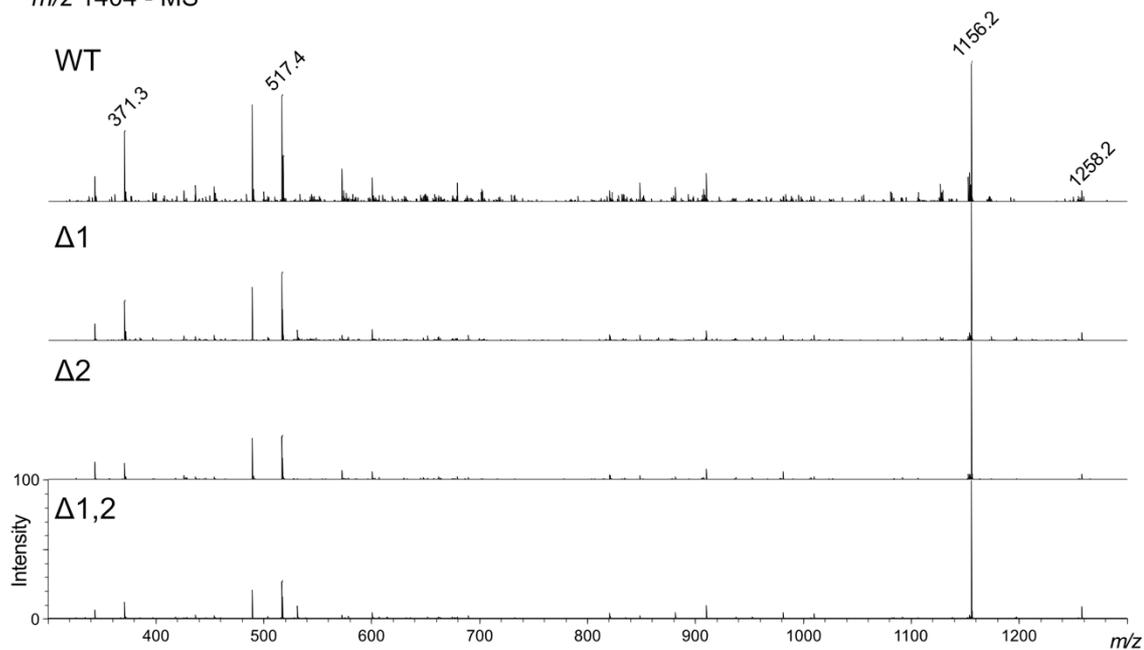


Figure S3: TLC analysis of polar and apolar fractions from mutant strains developed in different solvents. (A) Petroleum ether extracted apolar lipid fraction of wild-type (WT) and all acetyltransferase mutant strains. **(B, C)** Polar glycolipids from WT, Δ1 and complemented strain, Δ2 and complemented strain, Δ1,2 showed phosphatidyl *myo*-inositol mannosides and GPLs. **(D, E)** Polar glycolipids from WT, Δ1, Δ2, Δ1725c, Δ3448 as well as Δ1,2 and Δ1,2,1725c and Δ1,2,3448 mutants. Only GPL showed significant modifications in the mutant strains.

A m/z 1404 - MS²



B

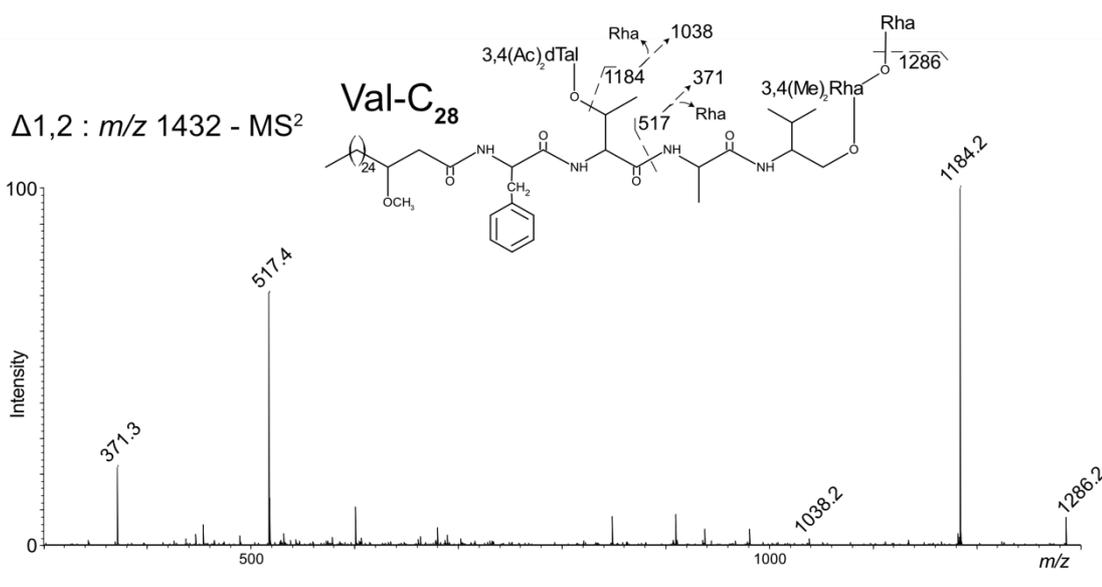


Figure S4: (A) MALDI-MS² spectra in positive mode of the selected parent ion at m/z 1404 from WT, $\Delta 1$, $\Delta 2$ and $\Delta 1,2$ mutant strains. **(B)** MALDI-MS² spectra in positive mode of the selected parent ion at m/z 1432 of $\Delta 1,2$. Fragmentation scheme shows the presence of 3,4 di-*O*-acetylated 6d-Tal in valinol form with C28 lipid (Val-C₂₈).

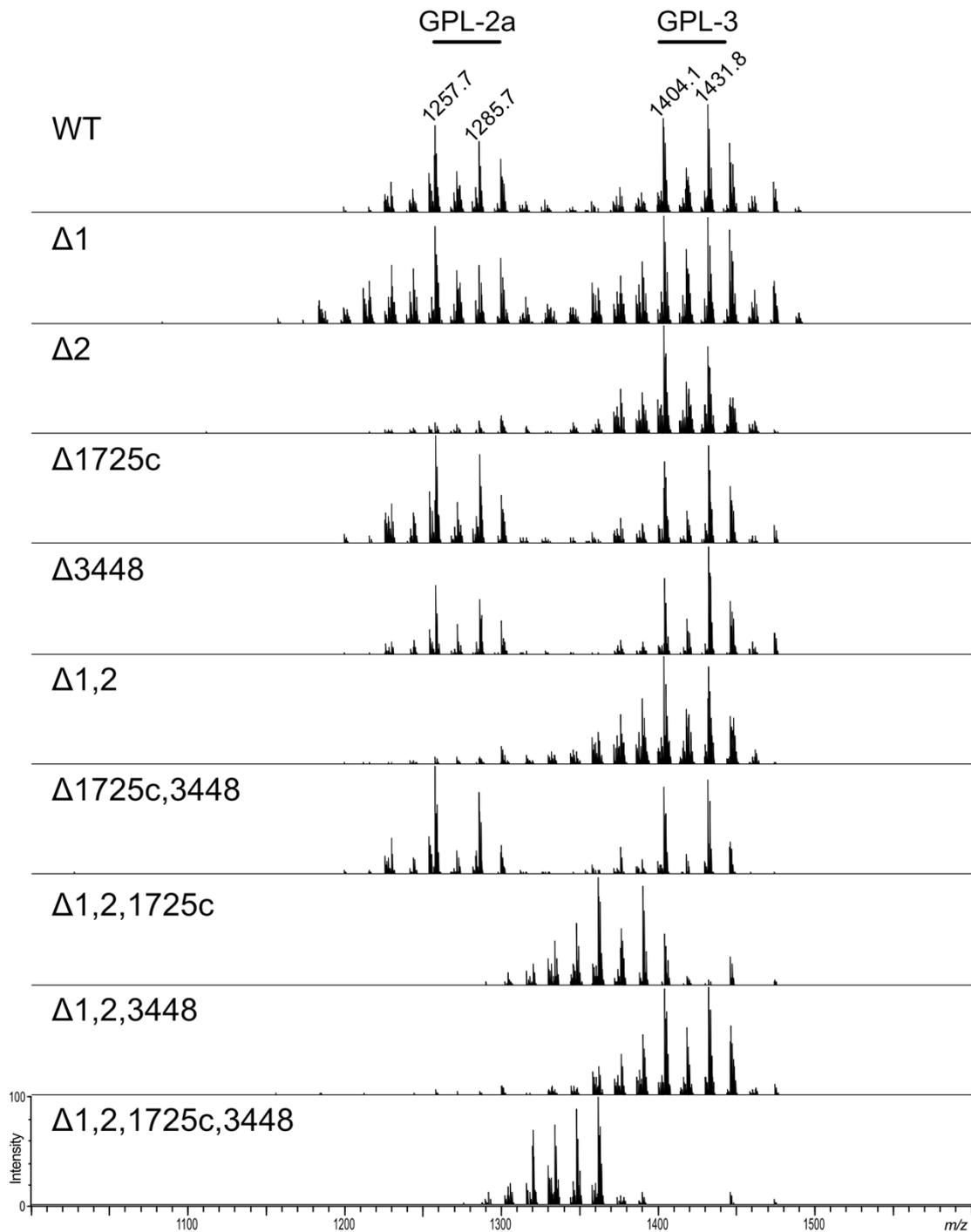


Figure S5: MALDI-MS spectra in positive mode of the polar lipid fraction from wild-type and acetyltransferase mutants. Previously characterized GPL-2a and GPL-3 (15, 24) are shown on top of the spectra.

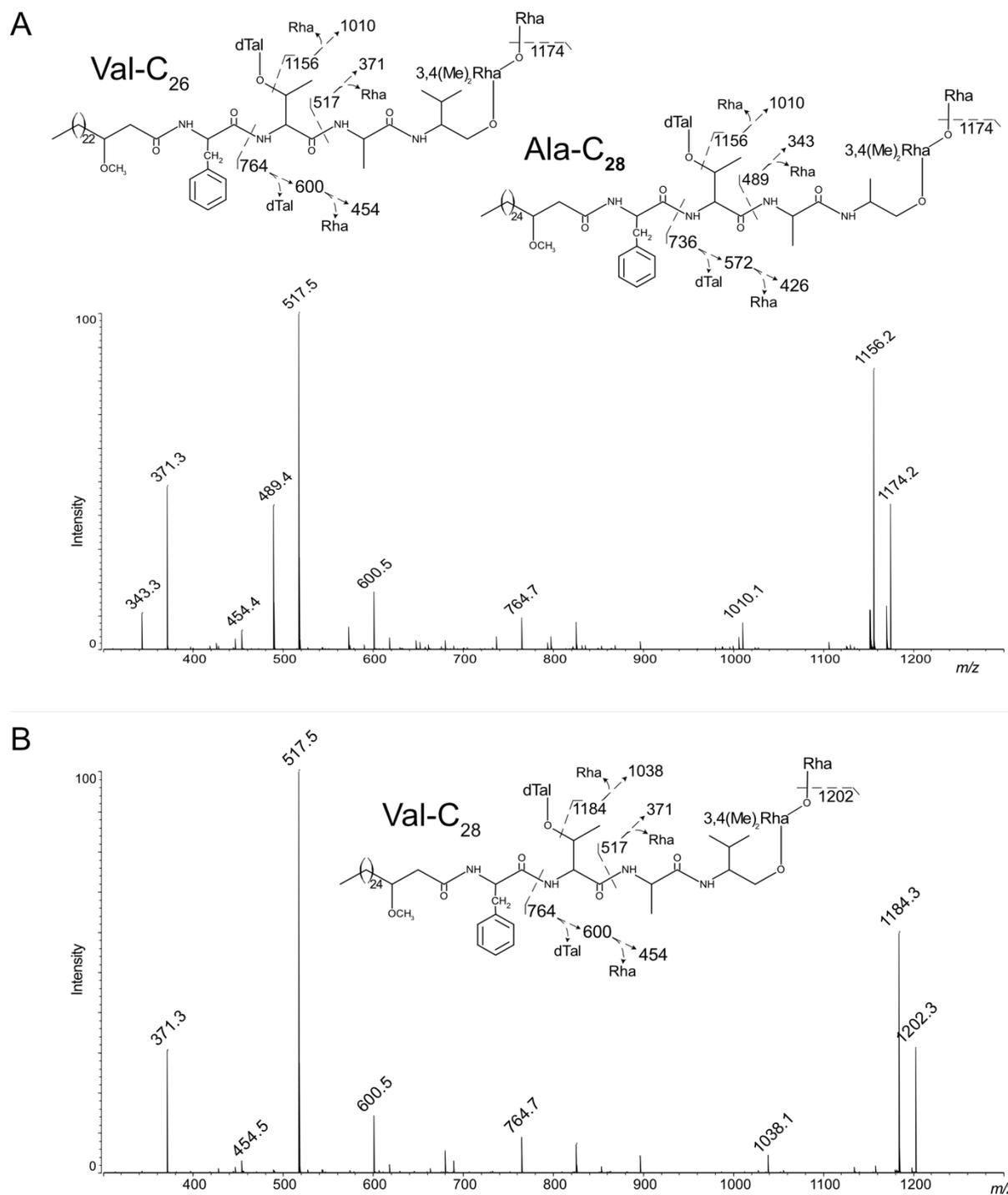


Figure S6: (A) MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1320 of F1 purified fraction from Δ 1,2,1725c,3448. Fragmentation patterns of two GPL-3 isomers Ala-C₂₈ and Val-C₂₆. **(B)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1348 from Δ 1,2,1725c,3448 mutant strain. Fragmentation pattern of GPL-3 Val-C₂₈ is shown.

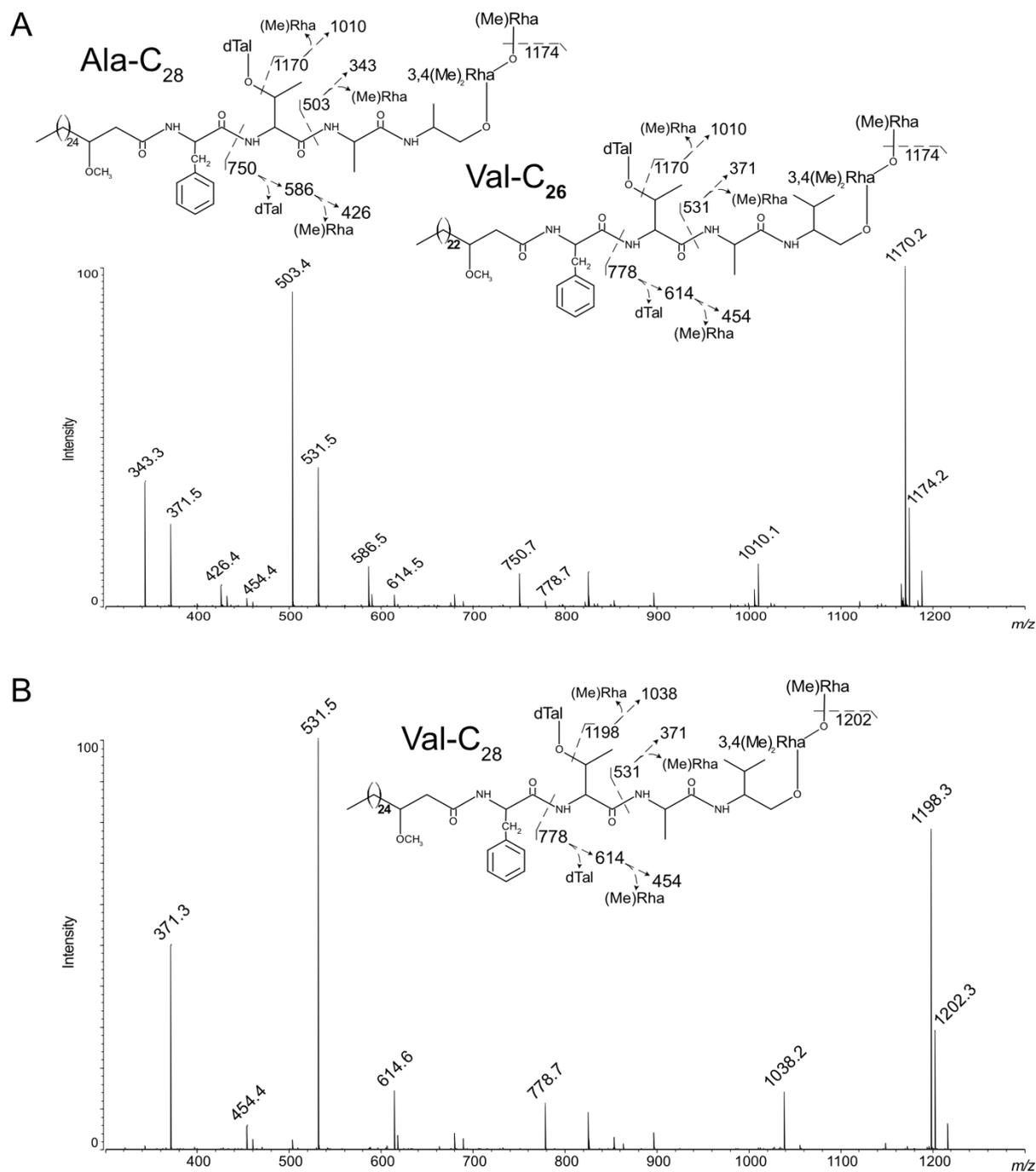


Figure S7: (A) MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1334 of F2 purified fraction from Δ 1,2,1725c,3448. Fragmentation patterns of two GPL-3 isomers Ala-C₂₈ and Val-C₂₆ are shown **(B)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1362 of F2 purified fraction from Δ 1,2,1725c,3448. Fragmentation pattern of GPL-3 Val-C₂₈ is shown.

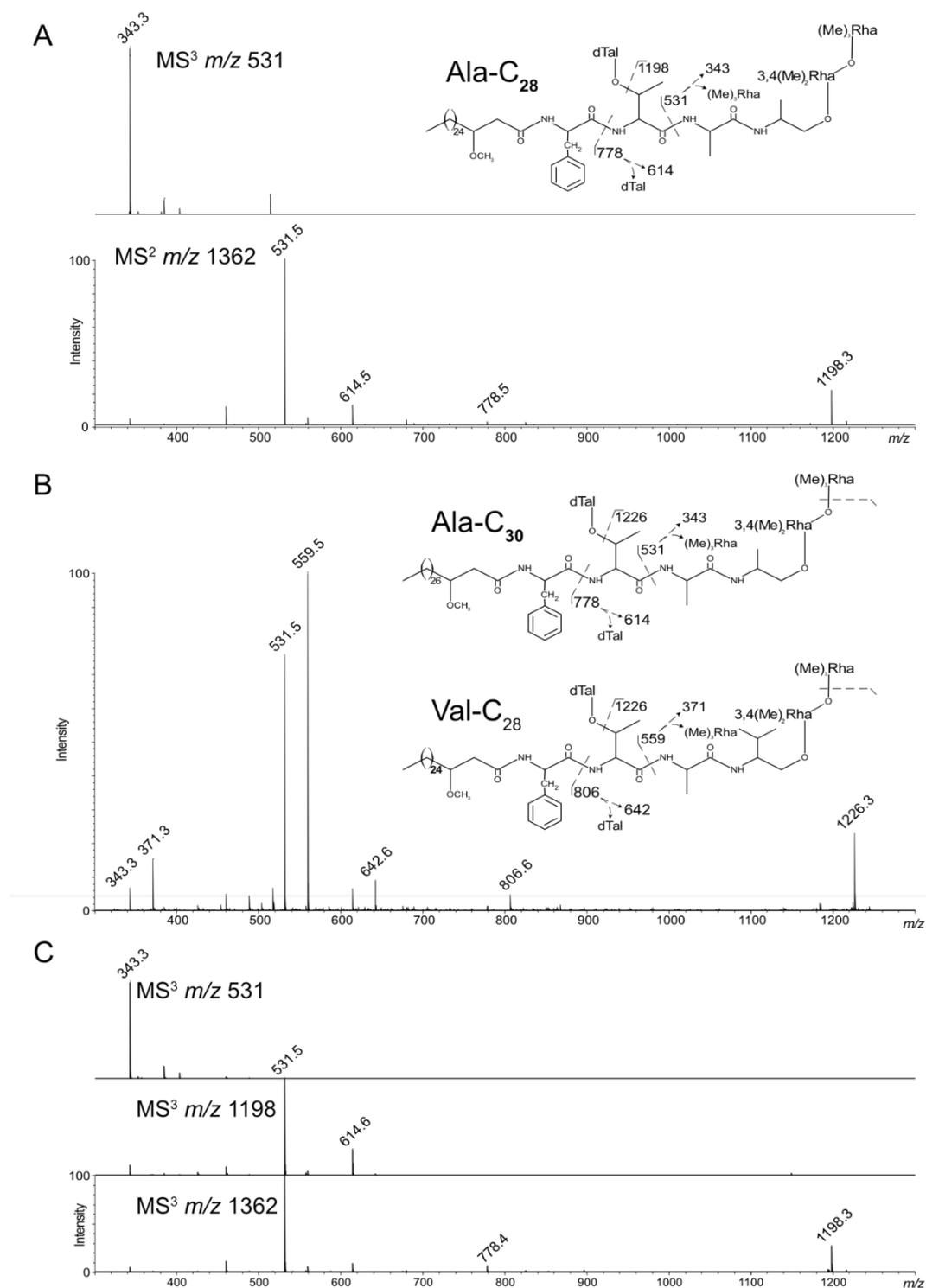


Figure S8: (A) MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1362, superimposed with MS³ of fragment ion at m/z 531 of F3 purified fraction from Δ 1,2,1725c,3448. Fragmentation pattern of GPL-3 Ala-C₂₈ is shown. **(B)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1390 of F3 purified fraction from Δ 1,2,1725c,3448. Fragmentation patterns of two GPL-3 isomers Ala-C₃₀ and Val-C₂₈ are shown. **(C)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1362, superimposed with MS³ of fragment ions at m/z 1198 and 531 of F4 purified fraction from Δ 1,2,1725c. These two fractions exhibited similar spectra.

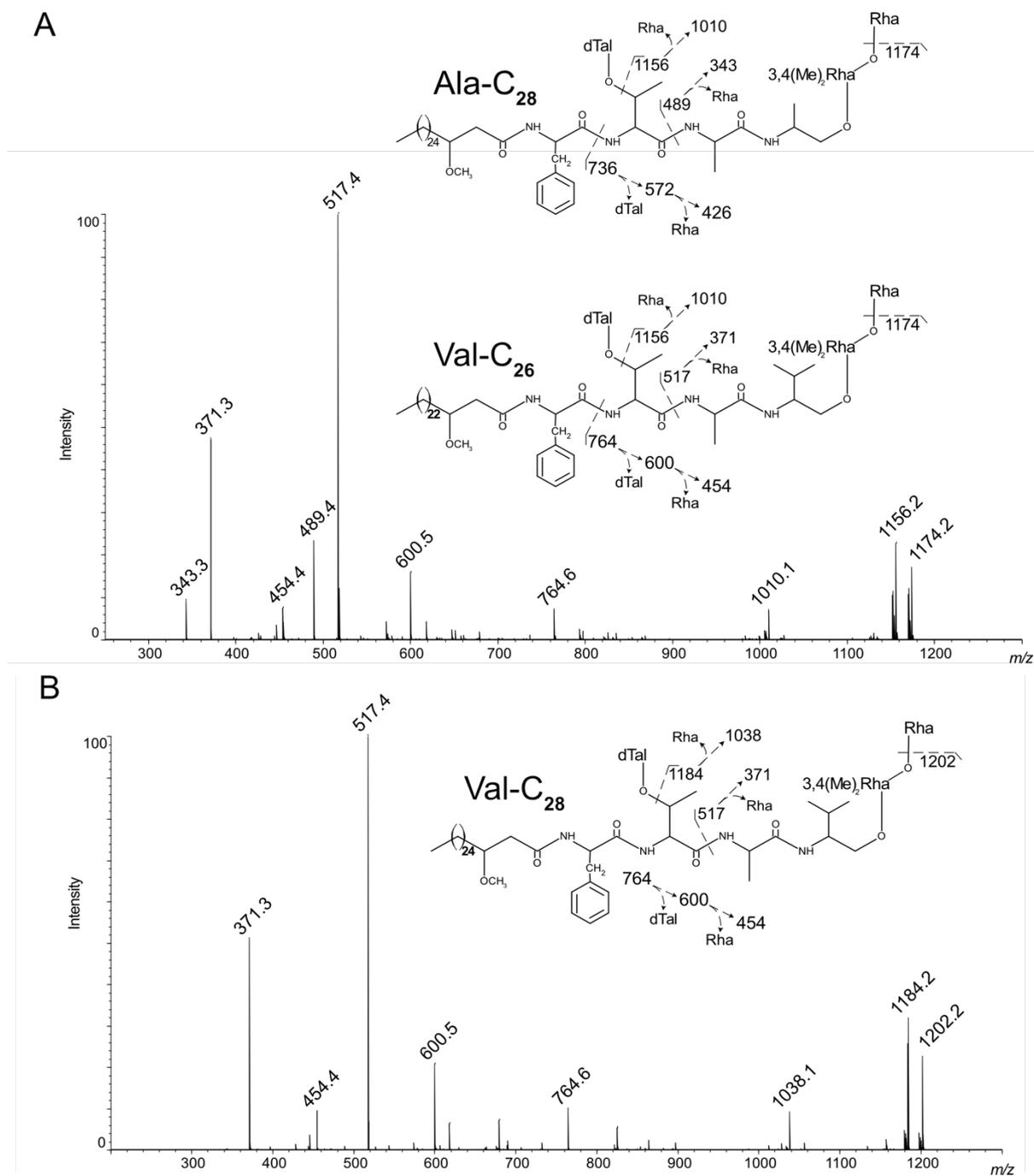


Figure S9: (A) MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1320 of F1 purified fraction from Δ 1,2,1725c. Fragmentation patterns of two GPL-3 isomers Ala-C₂₈ and Val-C₂₆ are shown. **(B)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1348 of the same fraction. Fragmentation pattern of GPL-3 Val-C₂₈ is shown.

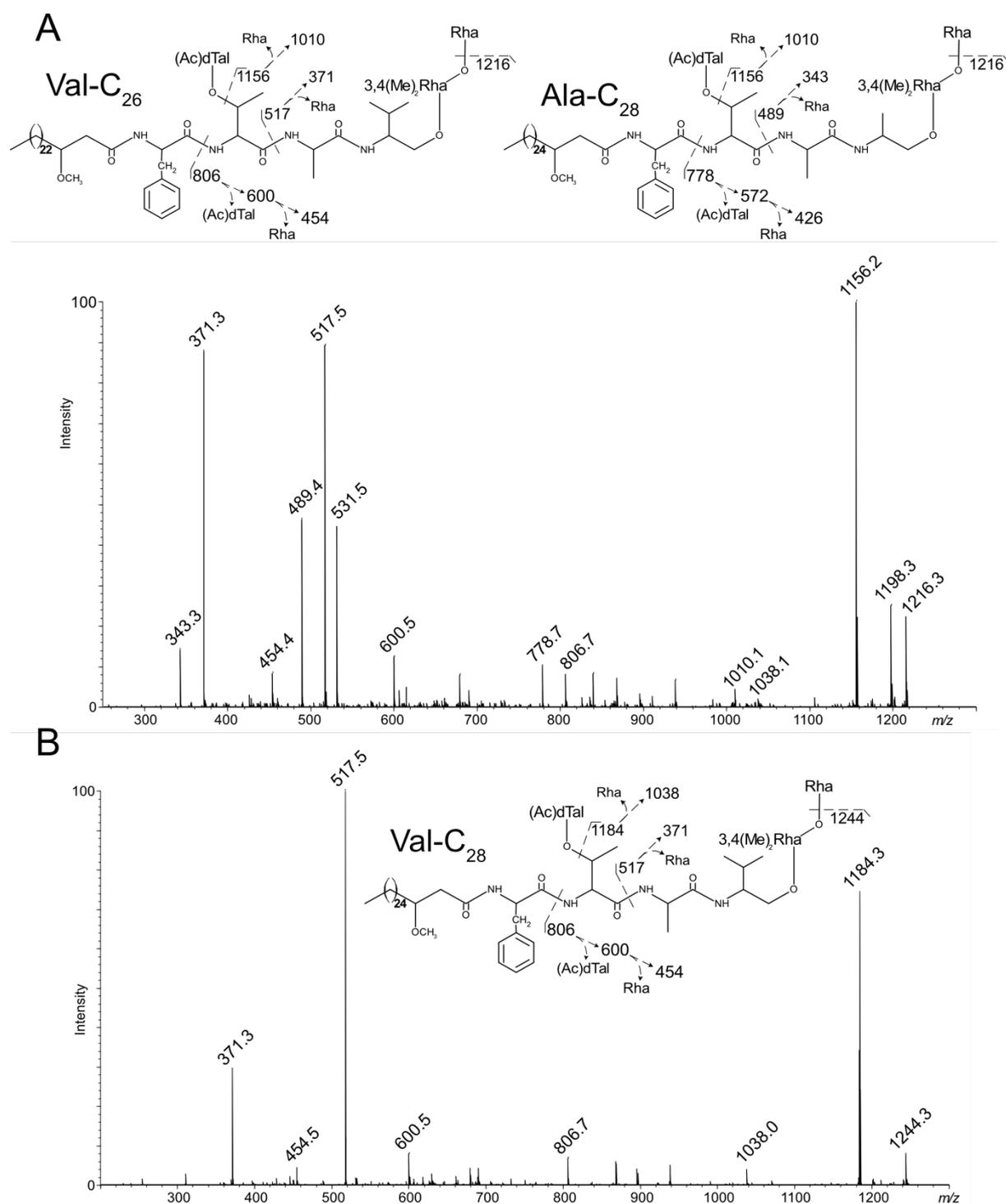


Figure S10: (A) MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1362 of F2 purified fraction from Δ 1,2, 1725c. Fragmentation pattern of two GPL-3 isomers are shown. **(B)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1390 of the same fraction. Fragmentation pattern of mono-*O*-acetylated GPL-3 Val-C₂₈.

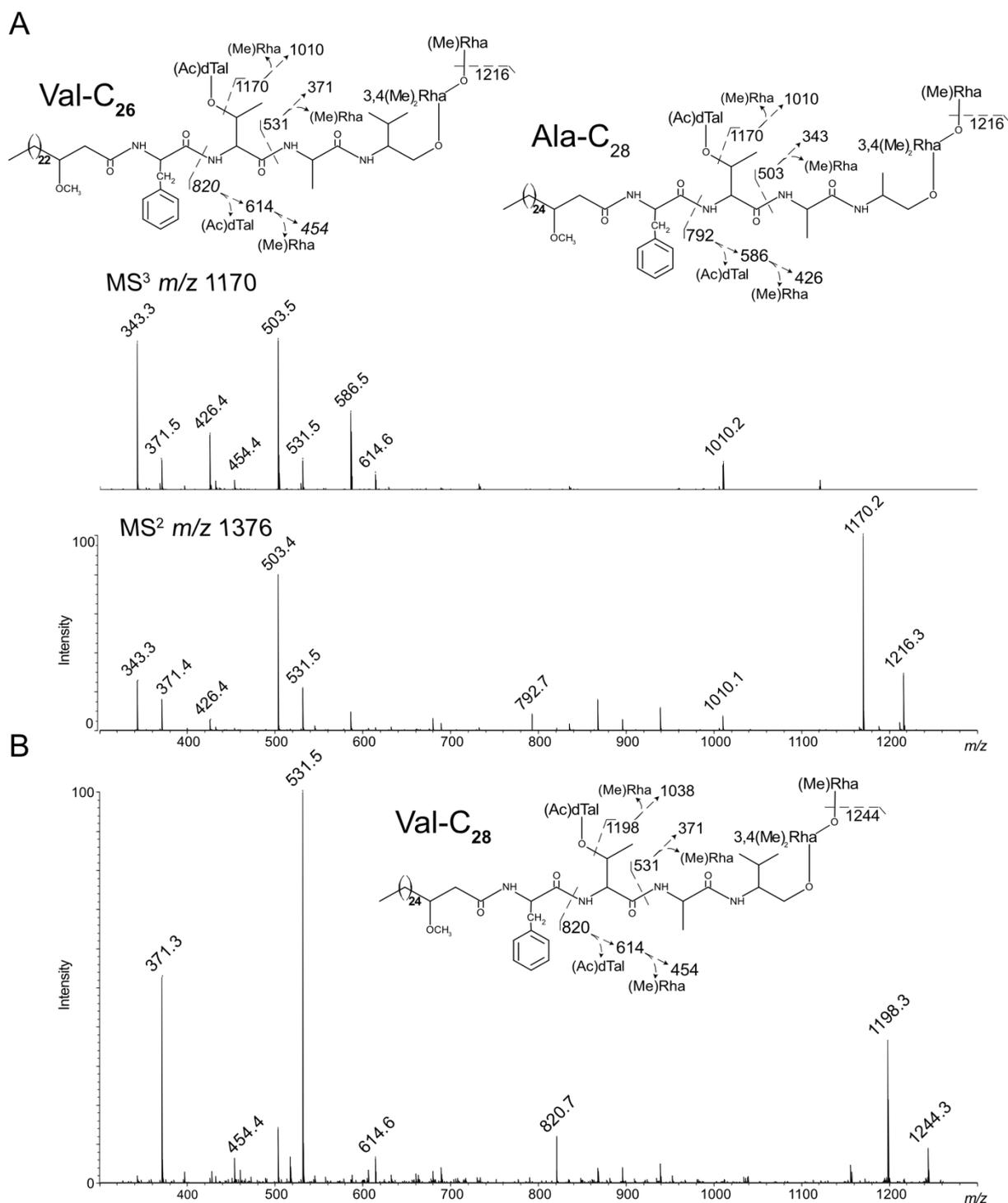


Figure S11: (A) MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1376 of F3 purified fraction from Δ 1,2,1725c, superimposed with MALDI-MS³ spectrum of fragment ion at m/z 1170, confirming the loss of mono-*O*-methyl Rha. Fragmentation patterns of two GPL-3 isomers Ala-C₂₈ and Val-C₂₆ are shown. **(B)** MALDI-MS² spectrum in positive mode of the selected parent ion at m/z 1404 of the same fraction. Fragmentation pattern of GPL-3 Val-C₂₈ is shown.

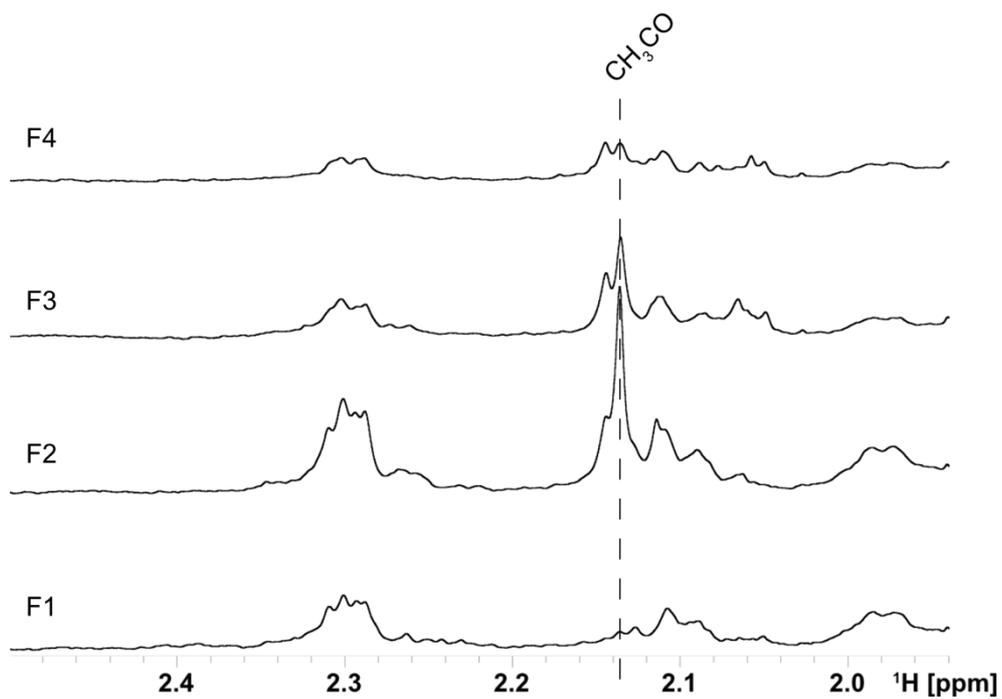


Figure S12: ^1H NMR spectra of F1 to F4 purified fractions from $\Delta 1,2,1725c$ that show a clear signal at $\delta 2,14$ ppm attributed to acetyl group in F2 and F3 fractions.

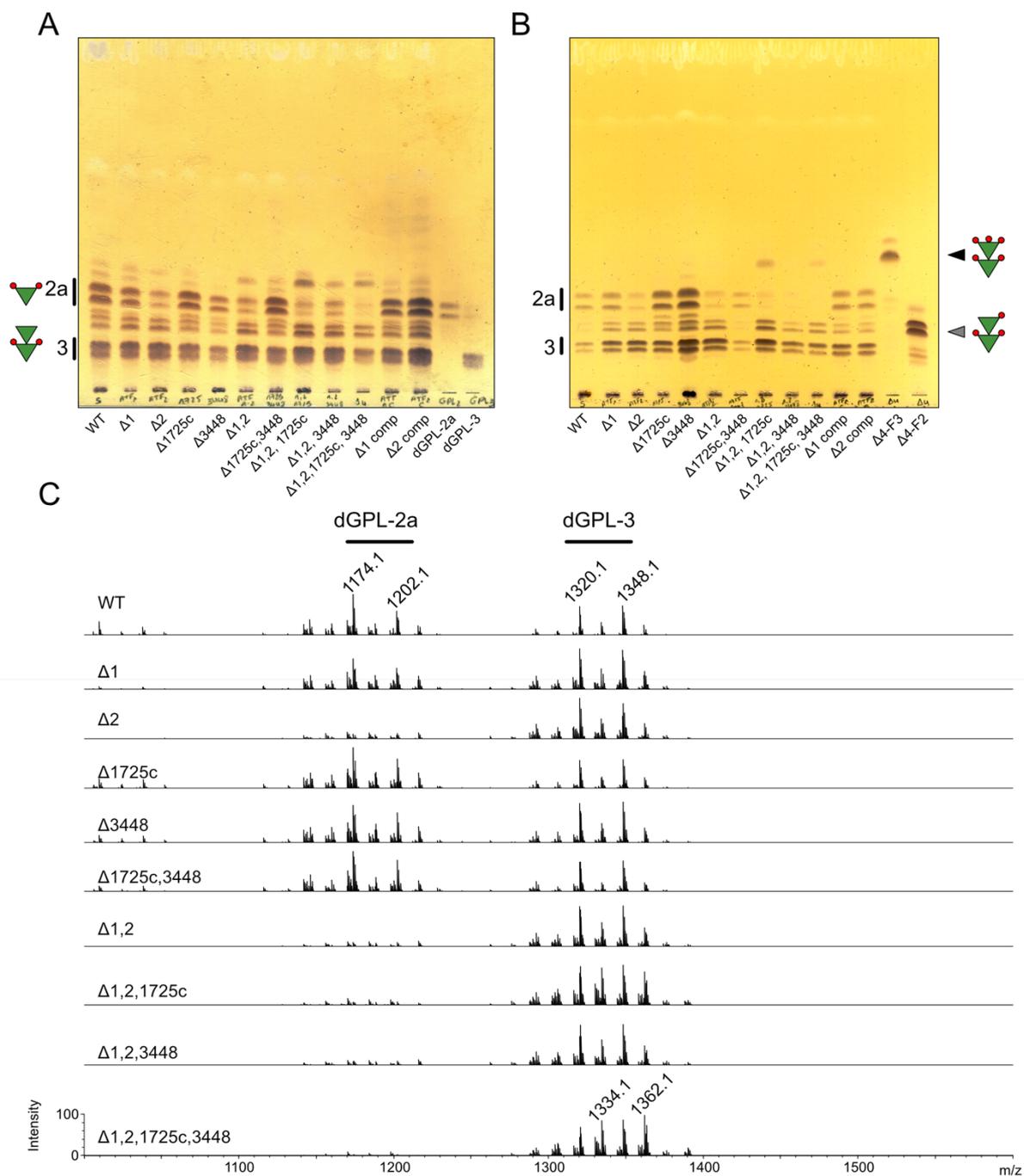


Figure S13: (A, B) TLC analysis of the saponified polar lipid fraction from WT and *atf* mutants. Butanol extracted GPLs were developed once with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10:1, v/v/v) and stained with orcinol. Purified GPL-2a and GPL-3 were submitted to the same treatment **(A)** as well as F2 and F3 fractions from $\Delta 1,2$, 1725c,3448 **(B)**. **(C)** MALDI-MS spectra in positive mode of the saponified GPL from WT and *atf* mutants. Previously characterized de-*O*-acetylated GPL-2a (dGPL-2a) and GPL-3 (dGPL-3) are shown on top of the spectra (24).

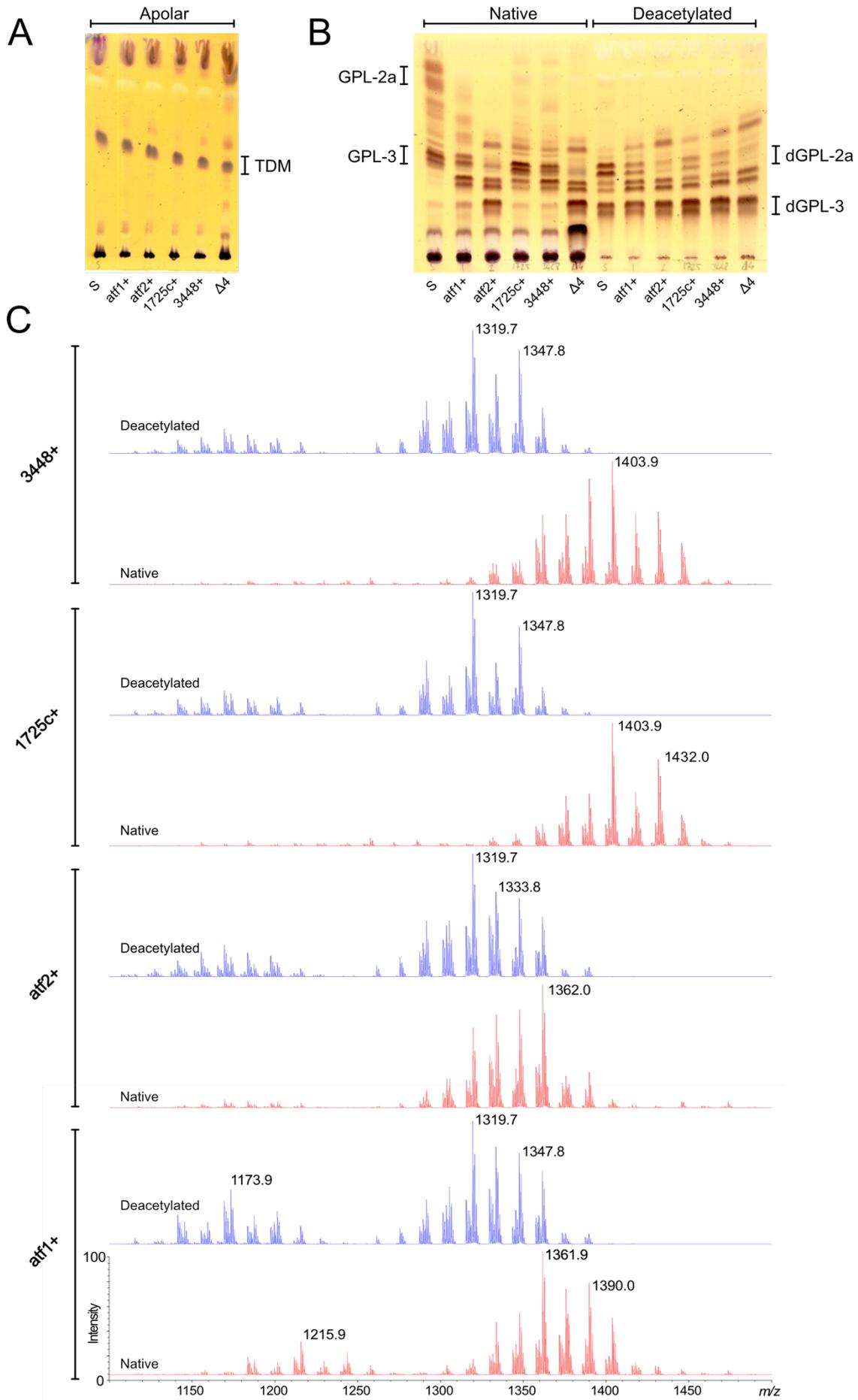


Figure S14: TLC analysis of the apolar lipid fraction **(A)** and the native or deacetylated polar lipid fraction **(B)** of WT and quadruple mutant strains individually expressing each acetyltransferase. Glycolipids or butanol-extracted GPLs were developed once with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10:1, v/v/v) and stained with orcinol. **(C)** Positive mode MALDI-MS spectra of the native and deacetylated polar lipid fraction derived from WT and quadruple mutant strains individually expressing each acetyltransferase.

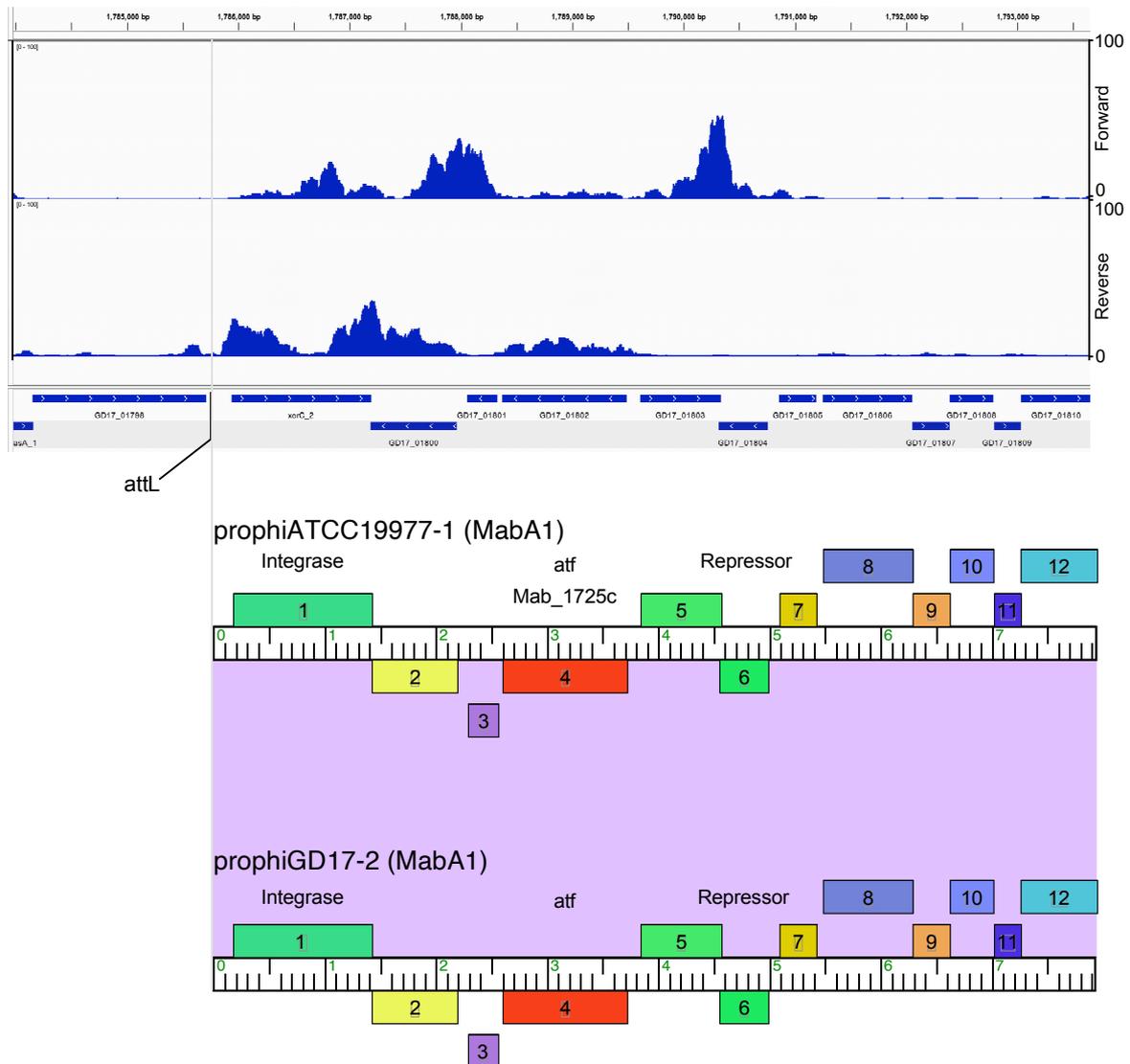


Figure S15: RNAseq analysis of prophage-encoded *atf* genes. Below is shown the left parts (~ 7 kbp) of the closely-related prophages prophiTCC19977-1 and prophIGD17-2, both members of Subcluster MabA1. The genes are shown as colored boxes above or below each genome maker, reflecting rightwards- and leftwards-transcription respectively. The purple shading between the genomes reflects BLASTN nucleotide sequence similarity, and the genomes are 100% identical in this segment. The genomes are aligned with the RNAseq data above for *M. abscessus* GD17, as reported previously (41), showing the numbers of reads mapping to the forward and reverse strands as indicated, from 0 to 100. The left ends of the prophages correspond to the left attachment site, *attL*, as indicated.

SUPPLEMENTARY TABLE

Table S1: Plasmids used in this study.

Plasmids			
pTEC27	<i>tdTomato</i> expressed under the control of a strong mycobacterial promoter by a multicopy <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector	Hyg	Addgene (plasmid 30182)
pUX1- <i>katG</i>	A pUX1 variant including <i>katG</i> gene of <i>M. tuberculosis</i> as a marker to counter-select in the presence of isoniazid and allowing to generate unmarked chromosomal alterations.	Kan, Hyg	(25)
pUX1- <i>katG-atf1</i>	pUX1- <i>katG</i> including the upstream and downstream sequences around <i>atf1</i>	Kan	This study
pUX1- <i>katG-atf2</i>	pUX1- <i>katG</i> including the upstream and downstream sequences around <i>atf2</i>	Kan	This study
pUX1- <i>katG-MAB-1725c</i>	pUX1- <i>katG</i> including the upstream and downstream sequences around <i>MAB-1725c</i>	Kan	This study
pUX1- <i>katG-MAB_3448</i>	pUX1- <i>katG</i> including the upstream and downstream sequences around <i>MAB-3448</i>	Kan	This study
pMV306	Integrative vector	Kan	(38)
pMV306- <i>atf1</i>	pMV306 enabling the expression of Atf1-HA in mycobacteria	Kan	This study
pMV306- <i>atf2</i>	pMV306 enabling the expression of Atf2-HA in mycobacteria	Kan	This study
pMV306- <i>MAB_1725c</i>	pMV306 enabling the expression of MAB-1725c-HA in mycobacteria	Kan	This study
pMV306- <i>MAB_3448</i>	pMV306 enabling the expression of MAB-3448-HA in mycobacteria	Kan	This study

Hyg, hygromycin; Kan, kanamycin

Table S2: Primers used in this study.

Number		5'→3' sequence	Restriction site	F (forward), R (reverse)
Cloning in pUX1-katG				
1	Atf1 U (F)	GAGATTAATTAAAACACCACGCTGATGTCTGCGG	Pacl	F
2	Atf1 U (R)	GAGACAATTGGAGTGTCAAACCTTAGCCTGCC	Mfel	R
3	Atf1 D (F)	GAGACAATTGCCGATTCTCTTGATCGCGATGCT	Mfel	F
4	Atf1 D (R)	GAGAGCTAGCGGATAGTGTCAACAGGCCGCCGA	NheI	R
5	Atf2 U (F)	GAGATTAATTAACACAGCACAGTCGCTTTCGGAG	Pacl	F
6	Atf2 U (R)	GAGACAATTGGTTCAGCGCGTTGTTTCGTGAATCGA	Mfel	R
7	Atf2 D (F)	GAGACAATTGCTGATCGAGAAACGCGCGCTG	Mfel	F
8	Atf2 D (R)	GAGAGCTAGCGAATCACGACCACCGAGTCGAAC	NheI	R
9	MAB_1725c U (F)	GAGATTAATTAACTGCGATGGGAACCAGGTTCG	Pacl	F
10	MAB_1725c U (R)	GAGACAATTGGAGCGCGTTGTTGCGTGGGT	Mfel	R
11	MAB_1725c D (F)	GAGAGAATTCGAGAAACGCACTCTGGCGTTGAA	EcoRI	F
12	MAB_1725c D (R)	GAGAGCTAGCTAGTGAGCATGATTGCCGTGCGTTG	NheI	R
13	MAB_3448 U (F)	GAGATTAATTAAATGAGCTGATACCGAATCCACTGCTTG	Pacl	F
14	MAB_3448 U (R)	GAGACAATTGTGCGTTAAGTGC GTTGTACGCGGA	Mfel	R
15	MAB_3448 D (F)	GAGACAATTGGCACTCAAGAAACGGCTGCGC	Mfel	F
16	MAB_3448 D (R)	GAGATCTAGAGATCGTTGTCATGCTGGTCTATTTCCGGA	XbaI	R
Primers to verify double homologous recombination				
17	Atf1	GACGTGTATCGCAATTTCTGGACGTTCTTCT	-	F
18	Atf1	GAAATCAACTTAGCCGACTCAAGGTAGGTGCT	-	R
19	Atf2	GATTCATTGGATCCGCGCTGTCCAA	-	F
20	Atf2	CTGCATTTTCGGTGAATCTGTCAAAAAATCTTATG	-	R
21	MAB_1725c	AACATACGGCAAACATCTGGGCATTACAAG	-	F
22	MAB_1725c	TCTAACCTCAACGAGCTGCTGAGCTAA	-	R
23	MAB_3448	CGCTCGAAGCTCAATAGGCCAGTAA	-	F
24	MAB_3448	CTGCACTGGGCAGTGCTGTTGT	-	R
Cloning in pMV306 under the hsp60 promoter				
25	Atf1	GAGACAATTGCCATGACCAAGGCGGGTGC GACC	Mfel	F
26	Atf1	GAGAGTTAACCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT ACGCAGCATCGCGATCAAGAGGA	HpaI	R
27	Atf2	GAGAGAATTC CATGAAGCTCGGTTCTGTATTCCGATTCAC GA	EcoRI	F
28	Atf2	GAGAGTTAACCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT AACTGTCCTCATGCGGCGACAGT	HpaI	R

29	MAB_1725c	GAGAGAATTCCCGTGCTCGGACGCGTATTCGAC	EcoRI	F
30	MAB_1725c	GAGAGTTAACCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT AGACGGCCACCACTTGCTTC	HpaI	R
31	MAB_3448	GAGAGAATTCCCGTGCTGGGACGGGTATTTGATCC	EcoRI	F
32	MAB_3448	GAGAGTCGACCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT ACCCCGCACCCGCTTTGACGCGCA	SaII	R

Table S3: Strains used in this study.

Name	Description/genotype	Resistance	Reference
<i>M. abscessus</i> Smooth (S)	<i>M. abscessus sensu stricto</i> , strain CIP104536 ^T , S morphotype	-	Laboratoire de Référence des Mycobactéries
<i>M. abscessus</i> Rough (R)	<i>M. abscessus sensu stricto</i> , strain CIP104536 ^T , R morphotype	-	Laboratoire de Référence des Mycobactéries
$\Delta 1$	Unmarked deletion of <i>atf1</i> (<i>MAB_4106c</i>) in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta 2$	Unmarked deletion of <i>atf2</i> (<i>MAB_4110c</i>) in <i>M. abscessus</i>	-	This study
ΔMAB_1725c	Unmarked deletion of <i>MAB_1725c</i> in <i>M. abscessus</i>	-	This study
ΔMAB_3448	Unmarked deletion of <i>MAB_3448</i> in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta 1, 2$	Unmarked deletion of <i>atf1</i> (<i>MAB_4106c</i>) and <i>atf2</i> (<i>MAB_4110c</i>) in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta MAB_1725c, MAB_3448$	Unmarked deletion of <i>MAB_1725c</i> and <i>MAB_3448</i> in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta 1, 2, MAB_1725c$	Unmarked deletion of <i>atf1</i> , <i>atf2</i> and <i>MAB_1725c</i> in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta 1, 2, MAB_3448$	Unmarked deletion of <i>atf1</i> , <i>atf2</i> and <i>MAB_3448</i> in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta 4$	Unmarked deletion of <i>atf1</i> , <i>atf2</i> , <i>MAB_1725c</i> and <i>MAB_3448</i> in <i>M. abscessus</i>	-	This study
$\Delta 1 + \text{pMV306-}atf1\text{-HA}$	$\Delta atf1$ carrying pMV306- <i>atf1</i>	KAN	This study
$\Delta 2 + \text{pMV306-}atf2\text{-HA}$	$\Delta atf2$ carrying pMV306- <i>atf2</i>	KAN	This study
$\Delta MAB_1725c + \text{pMV306-}MAB_1725c\text{-HA}$	ΔMAB_1725c carrying pMV306- <i>MAB_1725c</i>	KAN	This study
$\Delta MAB_3448 + \text{pMV306-}MAB_3448\text{-HA}$	ΔMAB_3448 carrying pMV306- <i>MAB_3448</i>	KAN	This study
$\Delta 4 + \text{pMV306-}atf1\text{-HA}$	$\Delta 4$ carrying pMV306- <i>atf1</i>	KAN	This study
$\Delta 4 + \text{pMV306-}atf2\text{-HA}$	$\Delta 4$ carrying pMV306- <i>atf2</i>	KAN	This study

$\Delta 4$ + pMV306- MAB_1725c-HA	$\Delta 4$ carrying pMV306-MAB_1725c	KAN	This study
$\Delta 4$ + pMV306-MAB_3448- HA	$\Delta 4$ carrying pMV306-MAB_3448	KAN	This study

Table S4: Distribution of the different genes coding for acetyltransferases in selected GPL-producing mycobacteria. The “+” sign indicates the presence of *atf* or an orthologue of *atf*. The “-” symbol denotes the absence of the indicated gene. Bioinformatics analysis was performed using KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>). The four *M. abscessus* genes were blasted using the ortholog function of the software.

	<i>atf</i>	<i>atf1</i> & <i>atf2</i>	<i>MAB_1725c</i>	<i>MAB_3448</i>
<i>M. abscessus</i>	-	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	-	-	-
<i>M. chelonae</i>	-	+	-	-
<i>M. avium</i>	+	-	-	-

Dans un second temps, cette panoplie de mutants a servi, par la méthode des plages de lyse, à évaluer le rôle des composants des GPL dans les interactions du mycobactériophage Jabs avec *M. abscessus* (**Figure 37**). Ce phage, décrit comme capable de lyser efficacement les souches S, ne présente qu'une action limitée et à de fortes concentrations face aux souches R. En revanche, les mutants *atf* de morphologie variable ont conservé un profil de lyse similaire à celui exhibé par la souche parentale. De même, la délétion des glycosyltransférases codées par *gtf1* ou *gtf3* ne paraît pas impacter l'activité lytique du phage, écartant ainsi un potentiel impact du talose ou du second rhamnose sur le processus infectieux de Jabs. Néanmoins, une résistance partielle et comparable à celle de la souche R a pu être observée suite à l'inactivation de *gtf2*, un gène impliqué dans le transfert du premier rhamnose des GPL, proposant ainsi un rôle de ce monosaccharide dans le mécanisme d'action de ce phage.

Par conséquent, la sensibilité conservée des mutants *gtf1* et *gtf3* couplée à l'inactivité de Jabs face au mutant *gtf2*, suggère une interaction du phage avec le premier rhamnose des GPL, bien qu'une résistance partielle du double mutant *gtf1,3* semble aller à l'encontre de cette hypothèse qui devra être évaluée par des travaux complémentaires.

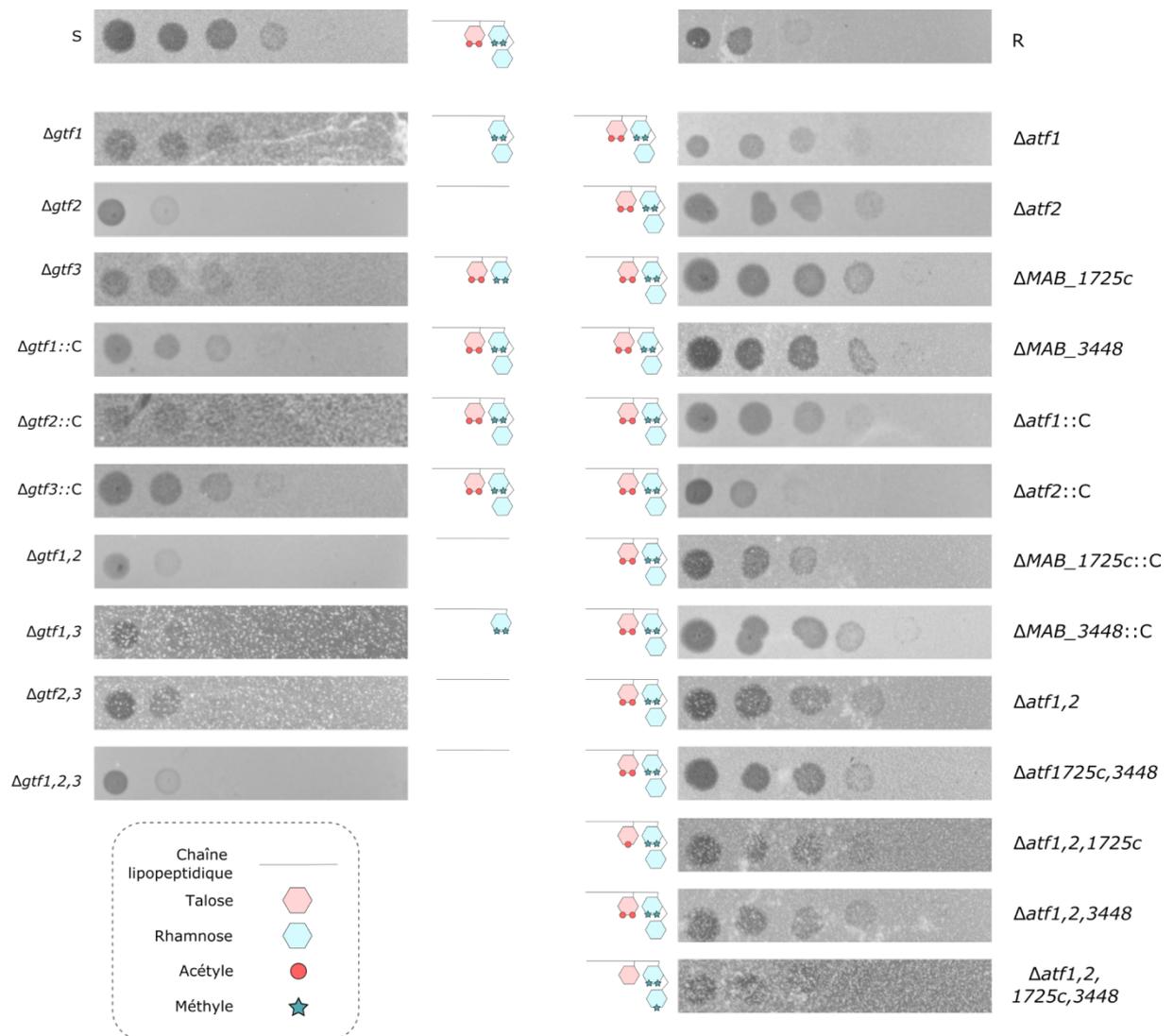


Figure 37. Susceptibilité de mutants arborant des glycopeptidolipides tronqués face au phages Jabs. Le phage a été déposé sur un tapis bactérien à différentes dilutions (de 10^8 PFU/mL à 10^3 PFU/mL) afin d'établir son efficacité lytique. Structure des glycopeptidolipides (GPL) arborés par la souche schématisée à côté de la plage de lyse.



DISCUSSION

Au cours des dernières années, la phagothérapie a connu un regain d'intérêt pour lutter contre les infections mycobactériennes réfractaires à l'antibiothérapie. Les effets positifs de cette stratégie sur des infections mycobactériennes observés dans un nombre limité d'études compassionnelles mettent en évidence un traitement alternatif prometteur à proposer aux patients en échec thérapeutique. Cependant, la phagothérapie peut être confrontée à des obstacles tels que l'apparition de souches résistantes pouvant entraver son efficacité. Dans le but de limiter l'émergence de ces résistances, il est donc primordial de faire évoluer notre compréhension des mécanismes d'action des mycobactériophages et particulièrement des étapes précoces de l'infection. L'adhésion du phage à son hôte paraît être une étape de prédilection pour la bactérie à inhiber afin de survivre tout en empêchant la réplication virale. Dans cette optique, ce travail de thèse a eu pour objectif de déterminer le rôle des lipides de surface dans les interactions des mycobactériophages avec *M. abscessus*.

Rôle des polyphléates de tréhalose dans les étapes précoces de l'infection phagique

Lors de notre étude, les TPP, des lipides complexes de surface et spécifiques de certaines MNT se sont montrés essentiels dans le processus infectieux de quelques mycobactériophages à usage thérapeutique. Leur absence à la surface de souches cliniques de *M. abscessus* a conféré une résistance totale à BPs Δ 33HTH_HRM10 et une résistance partielle à Muddy, suggérant un rôle de ces lipides dans le processus d'adhésion phagique. L'insertion de Tn exclusivement au sein du locus *tpp* a permis de proposer ce mécanisme comme principal moyen de défense de *M. abscessus* contre ces phages. D'après ces résultats, l'existence d'autres mécanismes de résistance tels que ceux démontrés par Dedrick *et al.* ne peut être exclue bien que la bactérie semble moins encline à les mettre en place dans les conditions étudiées [326].

L'aisance démontrée par *M. abscessus* à résister à ces mycobactériophages *in vitro* par la perte des TPP interroge sur le fait qu'un tel mécanisme n'ait pour le moment pas été mis en évidence lors du traitement de patients. Un rôle de ces lipides dans la virulence ou l'aptitude (« fitness ») des souches et dont l'absence confèrerait un désavantage à la bactérie pourrait expliquer ce phénomène. Les similarités structurales des TPP avec des lipides spécifiques de *M. tuberculosis*, tels que les SL-1 ou les PAT connus pour être impliqués dans la maturation des phagosomes et la virulence des souches, confortent cette hypothèse. Par conséquent, l'initiation d'études approfondies quant au rôle biologique des TPP paraît indispensable pour évaluer les risques de rencontrer cette résistance lors d'un usage thérapeutique. A ce jour, seuls Llorens-Fons *et al.* ont proposé une implication des TPP dans la capacité des souches R à former des cordes que nos travaux ont toutefois remis en question [111].

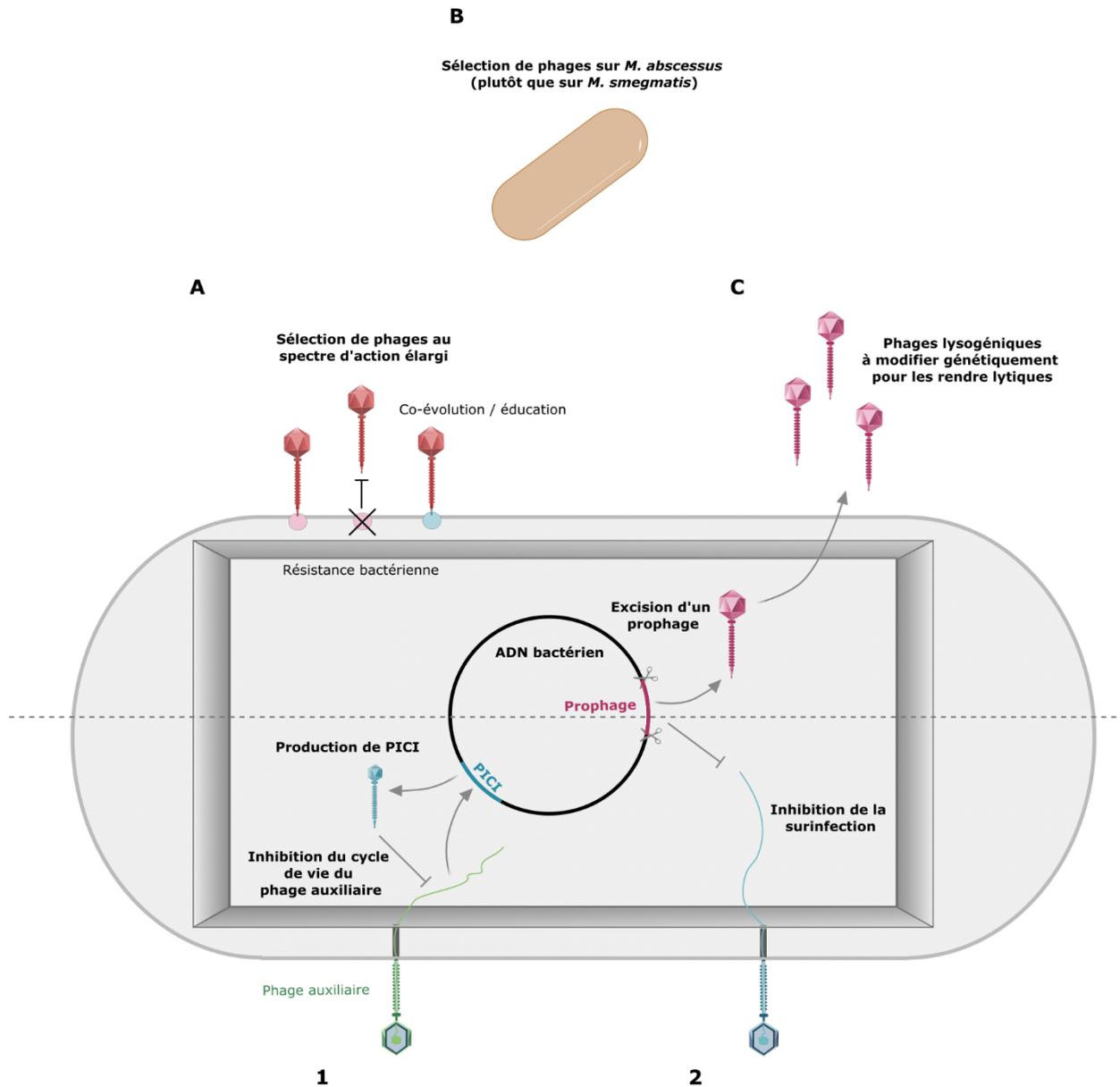


Figure 38. (A à C) Stratégies envisageables afin d'étendre le répertoire de phages thérapeutiques chez *M. abscessus*. **A.** L'entraînement des phages, basé sur des mécanismes de co-évolution avec leur hôte, par exemple avec le contournement de l'étape d'adhésion à un premier récepteur modifié ou absent, doit être exploité afin d'obtenir des phages au spectre d'action élargi **B.** L'utilisation de souches de *M. abscessus* comme souches d'isolation doit être envisagée pour découvrir de nouveaux phages et particulièrement des phages spécifiques des souches lisses (S). **C.** L'excision de prophages, et en particulier de prophages contenus dans des souches lisses, permettrait d'obtenir des phages lysogéniques spécifiques de ces souches. Par la suite, des modifications génétiques en laboratoire serviraient à les rendre lytiques. **(1 et 2) Potentiels mécanismes de résistance de *M. abscessus* mis en évidence au cours de ces travaux de thèse.** **1.** La présence d'un PICI au sein de la souche clinique GD01 conférerait à la

Mise à disposition de nouveaux phages thérapeutiques au spectre d'action élargi

La capacité des phages à contourner les résistances de la bactérie en co-évoluant avec celle-ci est un atout de taille dans un enjeu thérapeutique (**Figure 38. A.**). Grâce à l'acquisition de mutations au sein de gènes codant pour des protéines mineures de la queue (gp22 pour BPsΔ33HTH_HRM10 ou gp24 pour Muddy), l'activité lytique des phages face aux souches résistantes déficientes en TPP a été restaurée. L'importance de la protéine gp22 dans l'activité du phage BPsΔ33HTH_HRM10 sur la souche *M. tuberculosis* mc²7000 a été précédemment révélée par Jacobs-Sera *et al.* [346]. De façon comparable, l'acquisition de mutations spontanées dans le gène *gp24* codant pour une protéine mineure de la queue du phage Muddy avait permis d'élargir son spectre d'action à diverses souches de *M. tuberculosis* [347]. D'après ces observations, les protéines mineures de la queue homologues à gp22 de BPsΔ33HTH_HRM10 ou gp24 de Muddy pourraient représenter des cibles intéressantes à modifier génétiquement afin d'élargir le spectre d'hôte d'autres phages thérapeutiques (**Figure 38. A.**).

Proposition du mécanisme d'adhésion des mycobactériophages

Les simples modifications de la queue, élargissant le spectre d'hôte des mycobactériophages et leur permettant d'outrepasser la résistance bactérienne, suggèrent une faculté de ces derniers à contourner l'étape de reconnaissance des TPP plutôt qu'une aptitude à interagir avec un nouveau récepteur. Selon cette hypothèse, les TPP joueraient, pour les phages BPsΔ33HTH_HRM10 et Muddy, un rôle de co-récepteur pouvant faciliter la reconnaissance du récepteur principal. Le partage d'un co-récepteur par ces phages était parfaitement inattendu au vu de leurs différences génétiques qui avaient par ailleurs conforté leur utilisation combinée pour le traitement de plusieurs patients. Dès lors, nos résultats démontrent l'importance d'initier des travaux expérimentaux complémentaires pour écarter les risques de résistances croisées et optimiser les cocktails phagiques.

D'après nos travaux, les mycobactériophages BPsΔ33HTH_HRM10 et Muddy pourraient agir selon un processus en deux étapes pour reconnaître et infecter leur hôte, processus similaire à celui du bactériophage T5 [262,263]. L'utilisation d'un premier récepteur ou co-récepteur tel que les TPP permettrait une interaction réversible du phage avec la bactérie et serait suivie d'une interaction irréversible avec un second récepteur ou récepteur principal.

Néanmoins, la capacité de Muddy à lyser efficacement la souche *M. tuberculosis* H37Rv ne produisant pas de TPP ainsi que l'inhibition partielle de l'activité lytique sur les mutants déficients en TPP de *M. abscessus*

Figure 38. bactérie une résistance à l'infection par des phages auxiliaires. La libération du PICI pourrait entraîner la dissémination de gènes de virulence ou de résistance au sein de la population bactérienne ainsi que l'inhibition du cycle de vie du phage auxiliaire. **2.** La présence d'un prophage au sein du génome de la souche rugueuse de référence de *M. abscessus* CIP104536^T pourrait expliquer sa résistance à un large panel de mycobactériophages thérapeutiques.

interrogent quant au processus d'adhésion de ce phage [347]. En opposition à BPs Δ 33HTH_HRM10, pour lequel nos travaux ont démontré un rôle essentiel des TPP dans son processus infectieux, Muddy pourrait utiliser un mécanisme d'adhésion légèrement différent. L'interaction directe d'un pourcentage limité de phages avec son récepteur principal sans l'aide d'un co-récepteur est un mécanisme à envisager. En outre, une reconnaissance des lipides moins spécifique que celle de BPs Δ 33HTH_HRM10, par exemple *via* l'interaction à un motif commun à plusieurs lipides, pourrait également expliquer l'activité lytique du phage en absence de TPP. D'après cette hypothèse, Muddy pourrait se servir de lipides homologues produits par *M. tuberculosis*, tels que les SL-1 ou les PAT, pour interagir avec la bactérie et adhérer au récepteur principal. Néanmoins, ces hypothèses devront être étayées expérimentalement.

Récepteur principal des mycobactériophages BPs Δ 33HTH_HRM10 et Muddy

Afin de décrypter l'ensemble du mécanisme d'adhésion de ces mycobactériophages à *M. abscessus* et écarter un autre risque de résistance, nos travaux ont eu pour but ultime d'identifier ce second récepteur. Au cours de ce criblage, aucun mutant présentant un défaut d'adhésion n'a pu être identifié laissant imaginer un rôle essentiel de ce récepteur dans la croissance bactérienne. Par ailleurs, l'activité de ces phages sur diverses espèces mycobactériennes (*M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. tuberculosis* ou encore *M. chelonae* et *M. avium* pour le phage Muddy) suggère sa conservation chez les mycobactéries qui pourrait être utilisée pour identifier le récepteur principal. Pour illustration, *M. smegmatis* possède un génome plus large que *M. abscessus* et présente davantage de redondances fonctionnelles à exploiter.

De nombreux travaux doivent être menés pour identifier le récepteur principal de ces phages. Les dérivés des acides mycoliques (TMM et TDM) ou les protéines impliquées dans leur synthèse pourraient être des candidats intéressants à envisager au vu du caractère essentiel des acides mycoliques dans la croissance bactérienne. Leur conservation chez les mycobactéries ainsi que leur accessibilité en surface confortent le rôle potentiel de ces composants de la paroi dans le processus d'interaction avec des phages. Enfin, les mécanismes de résistance à l'infection *via* l'inhibition de la synthèse de ces lipides essentiels entraîneraient un suicide de la bactérie. Ce suicide conférerait un avantage non négligeable au traitement phagique qui pourra être exploité par le clinicien.

Mise en lumière de divers mécanismes de résistance de *M. abscessus* face aux mycobactériophages

Grâce au criblage d'une banque transpositionnelle, l'identification d'autres mécanismes de défense de la bactérie ciblant probablement des étapes plus tardives du cycle infectieux nous a permis de montrer l'absence de résistances croisées contre les dérivés des phages BPs Δ 33HTH_HRM10 ou Muddy. Ces résultats suggèrent des voies de réplication et/ou de formation des particules phagiques divergentes, confortant l'utilisation combinée de ces mycobactériophages en thérapie pour limiter les risques d'échec thérapeutique. L'étude de ces mécanismes permettrait d'étayer nos connaissances sur les diverses étapes du cycle de réplication des mycobactériophages et ainsi anticiper les moyens de défense pouvant être mis en place par la bactérie.

Au cours de nos travaux, un mécanisme bien distinct de ceux utilisant le cycle phagique a également pu être rapporté avec la probable présence d'un « Phage-inducible chromosomal island » (PICI) dans la souche clinique GD01 isolée d'une patiente traitée avec succès. Les PICI sont des éléments génétiques mobiles (EGM) dont le cycle de vie est induit par des phages auxiliaires spécifiques venant infecter la souche hôte [348]. Ils permettent une dissémination de gènes de virulence ou de résistance au sein de la population bactérienne et représentent ainsi un atout considérable pour la bactérie [348]. De plus, les PICI sont capables de se répliquer de façon autonome tout en détournant la machinerie du phage auxiliaire, interférant ainsi avec la reproduction de ce dernier [349,350]. Au cours de notre étude, l'insertion d'un Tn en amont du gène GD01 *EXM25_05825* codant une protéine avec un domaine DUF4145, généralement impliqué dans des systèmes de défense virale, pourrait avoir induit une surexpression de ce gène et par conséquent une résistance au dérivé du phage BPs Δ 33HTH_HRM10. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour comprendre le mécanisme exact de résistance engendré par ce PICI dans la souche GD01 (**Figure 38. 1.**).

Découverte d'un phage lytique au spectre d'action singulier

La résistance aux mycobactériophages de *M. abscessus* peut être innée ou acquise lors de sa rencontre avec un phage. La principale résistance innée de *M. abscessus* face au spectre étendu de phages thérapeutiques, et à ce jour disponible, serait présentée par les souches S.

Dans ce contexte, la découverte du phage Jabs par l'équipe du Pr P. Bifani, capable d'infecter et de lyser efficacement les souches S de *M. abscessus*, pourrait être mise à profit pour étendre le champ d'action de la phagothérapie contre cette espèce. A la différence de la quasi-totalité des mycobactériophages

actuellement décrits dans la littérature et isolés sur la souche saprophyte *M. smegmatis* mc²155, le phage Jabs a directement été isolé sur la souche de référence de *M. abscessus* CIP104536^T(S). Des études antérieures avaient démontré l'impact du choix de l'hôte sur le spectre d'action du phage [165,167]. L'isolation d'un phage efficace sur la souche R de *M. abscessus* à traiter, suite à l'échec rencontré avec la souche saprophyte *M. smegmatis* mc²155 en est un exemple parfait [174]. De ce fait, des travaux supplémentaires devront être entrepris pour comprendre les phénomènes régissant l'inefficacité des phages isolés sur la souche *M. smegmatis* contre les souches *M. abscessus* S, malgré la production de GPL structurellement identiques entre ces espèces [117]. L'utilisation de souches S comme souches d'isolation pourrait favoriser la découverte de phages thérapeutiques actifs contre cette forme et devrait à l'avenir être envisagée de façon plus systématique (**Figure 38. B.**).

Mise à profit des prophages de *M. abscessus*

Dans l'optique d'élargir l'arsenal thérapeutique mis à disposition du clinicien, l'excision de prophages pourrait représenter une voie intéressante à exploiter (**Figure 38. C.**). L'abondance ainsi que la diversité des prophages intégrés dans les souches de *M. abscessus* offrent un panel d'antimicrobiens de choix à étudier. Lors de travaux menés par Dedrick *et al.* qui avaient permis la libération de phages lysogéniques à partir de souches cliniques, le spectre d'action des phages contre *M. abscessus* avait pu être élargi [158]. Ainsi, le prophage intégré au sein de la souche CIP104536^T S pourrait être un candidat prometteur à exciser dans le but de traiter les infections causées par ce variant [351].

Détournement par *M. abscessus* de protéines codées par un prophage

Ce même prophage représenterait également un atout pour la bactérie. Sa présence dans la souche CIP104536^T R pourrait expliquer la difficulté à isoler des phages actifs contre cette dernière en lui conférant une immunité à la surinfection (**Figure 38. 2.**). Nos travaux ont permis de démontrer la capacité de la bactérie à utiliser des protéines à l'instar d'une Atf codée par le prophage afin de compenser l'absence de protéines paralogues. La localisation de cette *atf* entre l'intégrase et les gènes régissant la lyse bactérienne conforte son expression et, par conséquent, la participation de cette Atf dans la synthèse d'un lipide de la paroi bactérienne [326].

La contribution de cette protéine mais également de l'Atf MAB_3448 dans la synthèse des GPL était inattendue au vu de l'existence de deux Atf codées par des gènes localisés dans le locus *gpl*. D'après les travaux menés sur la bactérie saprophyte *M. smegmatis* pour laquelle une Atf unique régit l'acétylation des GPL, l'utilisation de quatre Atf par *M. abscessus* n'aurait pu être anticipée [80]. De façon surprenante, l'acétylation des GPL pourrait être un élément central de la régulation de la glycosylation ou de la méthylation de ce lipide pour *M. abscessus*, chaperonnant ainsi un mécanisme méconnu. La production exclusive de GPL tri-glycosylés en absence d'Atf suggère une limitation directe ou indirecte de l'action de Gtf3 en présence des Atf et particulièrement d'Atf2. Le rôle crucial de la glycosylation dans la reconnaissance de l'hôte pourrait expliquer l'importance pour *M. abscessus* de coder cette panoplie d'enzymes régulant ce processus et demande à être approfondi [120]. L'étude des interactions entre les différentes protéines impliquées dans la synthèse de ce lipide pourrait servir à élucider cette voie de synthèse.

Reconnaissance du variant S de *M. abscessus* par le phage Jabs

D'après nos résultats préliminaires, l'hyperglycosylation et l'hyperméthylation observées chez les mutants *atf* n'impacteraient pas l'efficacité du mycobactériophage Jabs. En revanche, ce dernier a démontré une perte d'activité sur les différents mutants *gtf2* comparable à celle observée sur la souche R. La glycosylation de composants de la paroi avait déjà été démontrée comme essentielle pour l'adsorption de phages chez *Listeria monocytogenes* [352]. Dans ce contexte, l'utilisation du ou des rhamnoses des GPL en tant que récepteurs ou co-récepteurs par le phage Jabs peut être envisagée mais demande des investigations complémentaires.

La contradiction de cette hypothèse par l'action partielle du phage Jabs face à la souche *gtf1, 3* était inattendue et se doit d'être confirmée par des expériences supplémentaires. Il est à noter qu'il s'agit ici de l'unique souche arborant des GPL mono-glycosylés et pourrait donc indiquer un besoin pour le phage de deux motifs glucidiques *a minima* pour interagir avec la bactérie. Selon ce postulat, le phage Jabs serait capable de reconnaître des motifs glucidiques de lipides variés lui permettant d'agir sur un panel de souche plus large que les phages BPs Δ 33HTH_HRM10 ou Muddy.

Par ailleurs, la conservation de l'action du phage Jabs sur le variant R de *M. abscessus*, bien que limitée, suggère que les GPL ne sont pas utilisés en tant que récepteur principal. L'identité de ce dernier pourra être dévoilée par l'analyse de résistants spontanés. Enfin, l'entraînement du phage Jabs basée sur sa capacité à co-évoluer avec son hôte pourra également être envisagé afin d'obtenir un phage actif contre les souches S et R et ainsi agrandir son spectre d'hôtes.

Pour conclure, les différents travaux menés au cours de ma thèse ont permis de démontrer, pour la première fois, un rôle crucial de certains lipides de surface dans les interactions entre les mycobactériophages et *M. abscessus*. Ces composants impliqués directement ou indirectement dans le processus d'adhésion devront faire l'objet d'études ultérieures afin de préciser leur rôle biologique tant pour la bactérie que pour les mycobactériophages. Une meilleure connaissance des interactions phage-bactérie devrait permettre d'éviter considérablement l'émergence de souches résistantes lors de traitements chez l'homme mais également d'étendre l'arsenal thérapeutique pour mieux contrer les infections bactériennes réfractaires à l'antibiothérapie.

REFERENCES

- [1] World Health Organization [WHO]. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2022;
- [2] Howard ST, Byrd TF. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. *Microbes and Infection*. 2000;2:1845–1853.
- [3] Falkingham JO. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine*. 2015;36:35–41.
- [4] Fedrizzi T, Meehan CJ, Grottola A, et al. Genomic characterization of nontuberculous mycobacteria. *Sci Rep*. 2017;7:45258.
- [5] Matsumoto Y, Kinjo T, Motooka D, et al. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. *Emerging Microbes & Infections*. 2019;8:1043–1053.
- [6] Johansen MD, Herrmann J-L, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18:392–407.
- [7] Jarchow-MacDonald A, Smith M, Seagar A-L, et al. Changing incidence and characteristics of nontuberculous mycobacterial infections in Scotland and comparison with *Mycobacterium tuberculosis* complex incidence (2011 to 2019). *Open Forum Infectious Diseases*. 2023;10:ofac665.
- [8] Donohue MJ, Wymer L. Increasing prevalence rate of nontuberculous mycobacteria infections in five states, 2008–2013. *Annals ATS*. 2016;13:2143–2150.
- [9] Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42:1604–1613.
- [10] Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2013;381:1551–1560.
- [11] Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science*. 2016;354:751–757.
- [12] Ruis C, Bryant JM, Bell SC, et al. Dissemination of *Mycobacterium abscessus* via global transmission networks. *Nat Microbiol*. 2021;6:1279–1288.
- [13] Commins N, Sullivan MR, McGowen K, et al. Mutation rates and adaptive variation among the clinically dominant clusters of *Mycobacterium abscessus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2023;120:e2302033120.
- [14] Harris KA, Underwood A, Kenna DTD, et al. Whole-genome sequencing and epidemiological analysis do not provide evidence for cross-transmission of *Mycobacterium abscessus* in a cohort of pediatric cystic fibrosis patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2014;ciu967.
- [15] Tortoli E, Fedrizzi T, Meehan CJ, et al. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium* : The old and the news. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;56:19–25.
- [16] Winthrop KL, McNelley E, Kendall B, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:977–982.
- [17] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An Official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367–416.
- [18] Wallace JM, Hannah JB. *Mycobacterium avium* complex infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Chest*. 1988;93:926–932.

- [19] Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992;165:1082–1085.
- [20] Ristola MA, von Reyn CF, Arbeit RD, et al. High rates of disseminated infection due to non-tuberculous mycobacteria among AIDS patients in Finland. *Journal of Infection*. 1999;39:61–67.
- [21] Tomashefski JF, Stern RC, Demko CA, et al. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. An autopsy study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:523–528.
- [22] Bernut A, Nguyen-Chi M, Halloum I, et al. *Mycobacterium abscessus* induced granuloma formation is strictly dependent on TNF signaling and neutrophil trafficking. Behr MA, editor. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005986.
- [23] Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009;15:906–910.
- [24] Gopaldaswamy R, Shanmugam S, Mondal R, et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections – a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *J Biomed Sci*. 2020;27:74.
- [25] Lehmann KB, Neumann R. Atlas und grundriss der bakterieologie und Lehrbuch der speziellen bakterieologischen diagnostik. Munchen, Lehmann, 1896; 1896.
- [26] Turenne CY. Nontuberculous mycobacteria: insights on taxonomy and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019;72:159–168.
- [27] Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:727–752.
- [28] Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America*. 1959;43:273–290.
- [29] Shinnick T M. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13.
- [30] A. Hussey M, Zayaitz A. Acid-fast stain protocols. 2008;
- [31] Maulahela H, Simadibrata M, Nelwan EJ, et al. Recent advances in the diagnosis of intestinal tuberculosis. *BMC Gastroenterol*. 2022;22:89.
- [32] Jeong J, Kim S-R, Lee SH, et al. The use of high performance liquid chromatography to speciate and characterize the epidemiology of mycobacteria. *Lab Med*. 2011;42:612–617.
- [33] Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:319–354.
- [34] Devulder G, de Montclos MP, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55:293–302.
- [35] Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, et al. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1999;37:852–857.
- [36] Kusunoki' S, Ezak T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., norn. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. 1992;

- [37] Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, et al. Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus* species, based on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Land GA, editor. J Clin Microbiol. 2014;52:3362–3369.
- [38] Moore M, Frerichs JB. An Unusual Acid-Fast Infection of the Knee with Subcutaneous, Abscess-Like Lesions of the Gluteal Region. Journal of Investigative Dermatology. 1953;20:133–169.
- [39] Kubica GP, Baess I, Gordon RE, et al. A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. Journal of General Microbiology. 1972;73:55–70.
- [40] Lee M-R, Sheng W-H, Hung C-C, et al. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. Emerg Infect Dis. 2015;21.
- [41] Gomila M, Ramirez A, Lalucat J. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. Appl Environ Microbiol. 2007;73:3787–3797.
- [42] Thomson R, Tolson C, Sidjabat H, et al. *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. BMC Infect Dis. 2013;13:241.
- [43] Falkingham JO. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. Emerg Infect Dis. 2003;9:763–767.
- [44] Klompas M, Akusobi C, Boyer J, et al. *Mycobacterium abscessus* cluster in cardiac surgery patients potentially attributable to a commercial water purification system. Ann Intern Med. 2023;176:333–339.
- [45] Le Dantec C, Duguet J-P, Montiel A, et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2002;68:5318–5325.
- [46] Bechara C, Macheras E, Heym B, et al. *Mycobacterium abscessus* skin infection after tattooing: first case report and review of the literature. Dermatology. 2010;221:1–4.
- [47] Vaincre la Mucoviscidose. French CF registry. Annual data report 2021. 2022;
- [48] Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. Nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in the United States. Screening practices and environmental risk. Am J Respir Crit Care Med. 2014;190:581–586.
- [49] Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, et al. Nontuberculous mycobacteria: I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167:828–834.
- [50] Roux A-L, Catherinot E, Ripoll F, et al. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. J Clin Microbiol. 2009;47:4124–4128.
- [51] Yan J, Kevat A, Martinez E, et al. Investigating transmission of *Mycobacterium abscessus* amongst children in an Australian cystic fibrosis centre. Journal of Cystic Fibrosis. 2020;19:219–224.
- [52] Taylor JL, Palmer SM. *Mycobacterium abscessus* chest wall and pulmonary infection in a cystic fibrosis lung transplant recipient. The Journal of Heart and Lung Transplantation. 2006;25:985–988.
- [53] Fairhurst RM, Kubak BM, Shpiner RB, et al. *Mycobacterium abscessus* empyema in a lung transplant recipient. The Journal of Heart and Lung Transplantation. 2002;21:391–394.
- [54] Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, et al. Cystic fibrosis. Nat Rev Dis Primers. 2015;1:15010.
- [55] World Health Organization [WHO]. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Geneva. 2021;
- [56] Leitch A, Rodgers H. Cystic fibrosis. J R Coll Physicians Edinb. 2013;43:144–150.

- [57] Di A, Brown ME, Deriy LV, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol.* 2006;8:933–944.
- [58] Bernut A, Dupont C, Ogryzko NV, et al. CFTR Protects against *Mycobacterium abscessus* Infection by Fine-Tuning Host Oxidative Defenses. *Cell Reports.* 2019;26:1828-1840.e4.
- [59] Boudehen Y-M, Kremer L. *Mycobacterium abscessus*. *Trends in Microbiology.* 2021;29:951–952.
- [60] Roux A-L, Viljoen A, Bah A, et al. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol.* 2016;6:160185.
- [61] Laencina L, Dubois V, Le Moigne V, 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.
- [62] Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, et al. Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun.* 2007;75:1055–1058.
- [63] Catherinot E, Roux A-L, Macheras E, et al. Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009;47:271–274.
- [64] Bernut A, Herrmann J-L, Kissa K, et al. *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111.
- [65] Johansen MD, Daher W, Roquet-Banères F, et al. Rifabutin Is Bactericidal against Intracellular and Extracellular Forms of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64:e00363-20, /aac/64/11/AAC.00363-20.atom.
- [66] Viljoen A, Gutiérrez AV, Dupont C, et al. A Simple and rapid gene disruption strategy in *Mycobacterium abscessus*: On the design and application of glycopeptidolipid mutants. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:69.
- [67] Rhoades ER, Archambault AS, Greendyke R, et al. *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF- α by preventing interaction with TLR2. *The Journal of Immunology.* 2009;183:1997–2007.
- [68] Davidson LB, Nessar R, Kempaiah P, et al. *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by H β D2 gene expression and IL-8 release. Fessler MB, editor. *PLoS ONE.* 2011;6:e29148.
- [69] Kam JY, Hortle E, Krogman E, et al. Rough and smooth variants of *Mycobacterium abscessus* are differentially controlled by host immunity during chronic infection of adult zebrafish. *Nat Commun.* 2022;13:952.
- [70] Rottman M, Catherinot E, Hochedez P, et al. 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.* 2007;75:5898–5907.
- [71] Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular Microbiology.* 2008;69:164–174.
- [72] Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, et al. Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone: Colonization of *Naucoris cimicoides* salivary glands by *M. ulcerans*. *Cellular Microbiology.* 2005;7:935–943.
- [73] Hall-Stoodley L, Lappin-Scott H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiology Letters.* 1998;168:77–84.

- [74] Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:623–633.
- [75] Greendyke R, Byrd TF. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2019–2026.
- [76] Bjarnsholt T, Høiby N, Donelli G, et al. Understanding biofilms — are we there yet? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65:125–126.
- [77] Esteban J, García-Coca M. *Mycobacterium* biofilms. *Front Microbiol*. 2018;8:2651.
- [78] Fennelly KP, Ojano-Dirain C, Yang Q, et al. Biofilm formation by *Mycobacterium abscessus* in a lung cavity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:692–693.
- [79] Qvist T, Eickhardt S, Kragh KN, et al. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. *Eur Respir J*. 2015;46:1823–1826.
- [80] Recht J, Kolter R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2001;183:5718–5724.
- [81] Clary G, Sasindran SJ, Nesbitt N, et al. *Mycobacterium abscessus* smooth and rough morphotypes form antimicrobial-tolerant biofilm phenotypes but are killed by acetic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e01782-17.
- [82] Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier; 1997. p. 131–203.
- [83] Zuber B, Chami M, Houssin C, et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol*. 2008;190:5672–5680.
- [84] Rezwani M, Lanéelle M-A, Sander P, et al. Breaking down the wall: fractionation of mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;68:32–39.
- [85] Chiaradia L, Lefebvre C, Parra J, et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci Rep*. 2017;7:12807.
- [86] Bansal-Mutalik R, Nikaido H. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:4958–4963.
- [87] Fukuda T, Matsumura T, Ato M, et al. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. Bishai W, Klugman KP, editors. *mBio*. 2013;4:e00472-12.
- [88] Nigou J, Vasselon T, Ray A, et al. Mannan chain length controls lipoglycans signaling via and binding to TLR2. *The Journal of Immunology*. 2008;180:6696–6702.
- [89] Koul A, Herget T, Klebl B, et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:189–202.
- [90] Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18:47–59.
- [91] Petit JF, Adam A, Wietzerbin-Falszpan J, et al. Chemical structure of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. I — Isolation and partial characterization of the peptidoglycan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1969;35:478–485.

- [92] Meroueh SO, Bencze KZ, Heseck D, et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:4404–4409.
- [93] Raymond JB, Mahapatra S, Crick DC, et al. Identification of the *namH* gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:326–333.
- [94] Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, et al. The mycobacterial cell wall—peptidoglycan and arabinogalactan. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5:a021113.
- [95] McNeil M, Daffe M, Brennan PJ. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:18200–18206.
- [96] Daffe M, Brennan PJ, McNeil M. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H and ¹³C NMR analyses. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:6734–6743.
- [97] Pawełczyk J, Kremer L. The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis. Hatfull GF, Jacobs Jr. WR, editors. *Microbiol Spectr*. 2014;2:2.4.24.
- [98] Jackson M. The mycobacterial cell envelope--lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;4:a021105–a021105.
- [99] Di Capua CB, Belardinelli JM, Carignano HA, et al. Unveiling the biosynthetic pathway for short mycolic acids in nontuberculous mycobacteria: *Mycobacterium smegmatis* MSMEG_4301 and its ortholog *Mycobacterium abscessus* MAB_1915 are essential for the synthesis of α' -mycolic acids. Lamichhane G, editor. *Microbiol Spectr*. 2022;10:e01288-22.
- [100] Halloum I, Carrère-Kremer S, Blaise M, et al. Deletion of a dehydratase important for intracellular growth and cording renders rough *Mycobacterium abscessus* avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113.
- [101] Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;29–63.
- [102] Dupont C, Viljoen A, Dubar F, et al. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*: Inhibiting mycolic acid transport in *M. abscessus*. *Molecular Microbiology*. 2016;101:515–529.
- [103] Kozikowski AP, Onajole OK, Stec J, et al. Targeting mycolic acid transport by indole-2-carboxamides for the treatment of *Mycobacterium abscessus* infections. *J Med Chem*. 2017;60:5876–5888.
- [104] Raynaud C, Daher W, Johansen MD, et al. Active benzimidazole derivatives targeting the MmpL3 transporter in *Mycobacterium abscessus*. *ACS Infect Dis*. 2020;6:324–337.
- [105] Alcaraz M, Roquet-Banères F, Leon-Icaza SA, et al. Efficacy and mode of action of a direct inhibitor of *Mycobacterium abscessus* InhA. *ACS Infect Dis*. 2022;8:2171–2186.
- [106] Asselineau CP, Montrozier HL. Etude du processus de biosynthèse des acides phléiques, acides polyinsaturés synthétisés par *Mycobacterium phlei*. *Eur J Biochem*. 1976;63:509–518.
- [107] Burbaud S, Laval F, Lemassu A, et al. Trehalose polyphleates are produced by a glycolipid biosynthetic pathway conserved across phylogenetically distant mycobacteria. *Cell Chemical Biology*. 2016;23:278–289.
- [108] Nivina A, Yuet KP, Hsu J, et al. Evolution and diversity of assembly-line polyketide synthases: focus review. *Chem Rev*. 2019;119:12524–12547.

- [109] Chalut C. MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis*. 2016;100:32–45.
- [110] Thouvenel L, Prevot G, Chiaradia L, et al. The final assembly of trehalose polyphleates takes place within the outer layer of the mycobacterial cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295:11184–11194.
- [111] Llorens-Fons M, Pérez-Trujillo M, Julián E, et al. Trehalose polyphleates, external cell wall lipids in *Mycobacterium abscessus*, are associated with the formation of clumps with cording morphology, which have been associated with virulence. *Front Microbiol*. 2017;8:1402.
- [112] Garcia-Vilanova A, Chan J, Torrelles JB. Underestimated manipulative roles of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope glycolipids during infection. *Front Immunol*. 2019;10:2909.
- [113] Brodin P, Poquet Y, Levillain F, et al. High content phenotypic cell-based visual screen identifies *Mycobacterium tuberculosis* acyltrehalose-containing glycolipids involved in phagosome remodeling. Deretic V, editor. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001100.
- [114] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596:583–589.
- [115] Schorey JS, Sweet L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology*. 2008;18:832–841.
- [116] Daher W, Leclercq L-D, Viljoen A, et al. *O*-Methylation of the Glycopeptidolipid Acyl Chain Defines Surface Hydrophobicity of *Mycobacterium abscessus* and Macrophage Invasion. *ACS Infect Dis*. 2020;6:2756–2770.
- [117] Gutiérrez AV, Viljoen A, Ghigo E, et al. Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* complex. *Front Microbiol*. 2018;9:1145.
- [118] Billman-Jacobe H, McConville MJ, Haites RE, et al. Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*: A peptide synthetase involved in GPL biosynthesis. *Molecular Microbiology*. 2002;33:1244–1253.
- [119] Felnagle EA, Barkei JJ, Park H, et al. MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*. 2010;49:8815–8817.
- [120] Daher W, Leclercq L-D, Johansen MD, et al. Glycopeptidolipid glycosylation controls surface properties and pathogenicity in *Mycobacterium abscessus*. *Cell Chemical Biology*. 2022;29:910-924.e7.
- [121] Ripoll F, Deshayes C, Pasek S, et al. Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *BMC Genomics*. 2007;8:114.
- [122] Sondén B, Kocíncová D, Deshayes C, et al. Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface: glycolipid transport in mycobacteria. *Molecular Microbiology*. 2005;58:426–440.
- [123] Howard ST, Rhoades E, Recht J, et al. 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*. 2006;152:1581–1590.
- [124] Park IK, Hsu AP, Tettelin H, et al. Clonal diversification and changes in lipid traits and colony morphology in *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. Forbes BA, editor. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3438–3447.
- [125] Pawlik A, Garnier G, Orgeur M, et al. Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent

- Mycobacterium abscessus*: genetic traits of rough mutants of *Mycobacterium abscessus*. *Molecular Microbiology*. 2013;90:612–629.
- [126] Viljoen A, Viela F, Kremer L, et al. Fast chemical force microscopy demonstrates that glycopeptidolipids define nanodomains of varying hydrophobicity on mycobacteria. *Nanoscale Horiz*. 2020;5:944–953.
- [127] Martínez A, Torello S, Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. *J Bacteriol*. 1999;181:7331–7338.
- [128] Roux A-L, Ray A, Pawlik A, et al. Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants: TLR-2 ligand induction at the mycobacterial surface. *Cellular Microbiology*. 2011;13:692–704.
- [129] Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. Recognition of mycobacterial lipids by immune receptors. *Trends in Immunology*. 2017;38:66–76.
- [130] Whang J, Back YW, Lee K-I, et al. *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis*. 2017;8:e3012–e3012.
- [131] Petrovic Fabijan A, Iredell J, Danis-Wlodarczyk K, et al. Translating phage therapy into the clinic: recent accomplishments but continuing challenges. *PLoS Biol*. 2023;21:e3002119.
- [132] World Health Organization [WHO]. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2022;
- [133] Suttle CA. Viruses in the sea. *Nature*. 2005;437:356–361.
- [134] Rohwer F. Global phage diversity. *Cell*. 2003;113:141.
- [135] Hankin EH. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur. Bacteriophage*. 1896;10:511–523.
- [136] Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, et al. Bacteriophage prehistory: is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*. 2011;1:174–178.
- [137] Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, et al. Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front Microbio*. 2012;2.
- [138] Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*. 1915;
- [139] d'Hérelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris. Research in Microbiology*. 1917;165:373–375.
- [140] Dublanchet A, Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2008;38:415–420.
- [141] Gaynes R. The discovery of penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:849–853.
- [142] Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929;
- [143] Dufour N, Debarbieux L. La phagothérapie: une arme crédible face à l'antibiorésistance. *Med Sci (Paris)*. 2017;33:410–416.
- [144] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399:629–655.

- [145] Strathdee SA, Hatfull GF, Mutalik VK, et al. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions. *Cell*. 2023;186:17–31.
- [146] Göller PC, Elsener T, Lorgé D, et al. Multi-species host range of staphylococcal phages isolated from wastewater. *Nat Commun*. 2021;12:6965.
- [147] Lin N-T, Chiou P-Y, Chang K-C, et al. Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Research in Microbiology*. 2010;161:308–314.
- [148] Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:376.
- [149] Glonti T, Pirnay J-P. *In vitro* techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. *Viruses*. 2022;14:1490.
- [150] Friman V-P, Soanes-Brown D, Sierocinski P, et al. Pre-adapting parasitic phages to a pathogen leads to increased pathogen clearance and lowered resistance evolution with *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis bacterial isolates. *J Evol Biol*. 2016;29:188–198.
- [151] Eklund MW, Poysky FT, Peterson ME, et al. Relationship of bacteriophages to alpha toxin production in *Clostridium novyi* types A and B. *Infect Immun*. 1976;14:793–803.
- [152] Boyd EF. Bacteriophage-encoded bacterial virulence factors and phage–pathogenicity island interactions. *Advances in Virus Research*. Elsevier; 2012. p. 91–118.
- [153] Hyder SL, Streitfeld MM. Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *Journal of Infectious Diseases*. 1978;138:281–286.
- [154] Chiang YN, Penadés JR, Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical. Kline KA, editor. *PLoS Pathog*. 2019;15:e1007878.
- [155] Waddell TE, Franklin K, Mazzocco A, et al. Generalized transduction by lytic bacteriophages. In: Clokie MRJ and Kropinski AM (Eds), *Bacteriophages: Methods and protocols*, Volume 1: Isolation, characterisation, and inter- actions. Totowa, NJ: Humana Press; 2009.
- [156] Wilson GG, Young KKY, Edlin GJ, et al. High-frequency generalised transduction by bacteriophage T4. *Nature*. 1979;280:80–82.
- [157] Young KK, Edlin GJ, Wilson GG. Genetic analysis of bacteriophage T4 transducing bacteriophages. *J Virol*. 1982;41:345–347.
- [158] Dedrick RM, Smith BE, Garlena RA, et al. *Mycobacterium abscessus* strain morphotype determines phage susceptibility, the repertoire of therapeutically useful phages, and phage resistance. Sloan Siegrist M, editor. *mBio*. 2021;12:e03431-20.
- [159] Plunkett G, Rose DJ, Durfee TJ, et al. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J Bacteriol*. 1999;181:1767–1778.
- [160] Dofferhoff ASM, Nijland JH, De Vries-Hospers HG, et al. Effects of different types and combinations of antimicrobial agents on endotoxin release from Gram-negative bacteria: an in-vitro and in-vivo study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1991;23:745–754.
- [161] Hatfull GF. Mycobacteriophages. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, et al., editors. *Microbiol Spectr*. 2018;6:6.5.08.
- [162] Auad L, De Ruiz Holgado AAP, Forsman P, et al. Isolation and characterization of a new *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* temperate bacteriophage. *Journal of Dairy Science*. 1997;80:2706–2712.

- [163] Lu Z, Breidt F, Fleming HP, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ΦJL-1, from a cucumber fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;84:225–235.
- [164] Bielke L, Higgins S, Donoghue A, et al. Salmonella host range of bacteriophages that infect multiple genera. *Poultry Science*. 2007;86:2536–2540.
- [165] Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, et al. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:575–580.
- [166] Knezevic P, Kostanjsek R, Obreht D, et al. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Curr Microbiol*. 2009;59:173–180.
- [167] Yu P, Mathieu J, Li M, et al. Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. Dozois CM, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82:808–815.
- [168] Parracho HM, Burrowes BH, Enright MC. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J Mol Genet Med*. 2012;06.
- [169] Gorodnichev R, Kornienko M, Kuptsov N, et al. Comparison of methods for purification of bacteriophage lysates of Gram-negative bacteria for personalized therapy. *MES*. 2021;
- [170] Food and Drug Administration USD of H and HS. Questions and answers on quality related controlled correspondence guidance for industry. 2021;
- [171] Carroll-Portillo A, Coffman CN, Varga MG, et al. Standard bacteriophage purification procedures cause loss in numbers and activity. *Viruses*. 2021;13:328.
- [172] Rubalskii E, Ruemke S, Salmoukas C, et al. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics*. 2020;9:232.
- [173] Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, et al. Phage therapy of *Mycobacterium* infections: compassionate use of phages in 20 patients with drug-resistant mycobacterial disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76:103–112.
- [174] Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine*. 2019;25:730–733.
- [175] Khalid A, Lin RCY, Iredell JR. A phage therapy guide for clinicians and basic scientists: background and highlighting applications for developing countries. *Front Microbiol*. 2021;11:599906.
- [176] Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, et al. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. Pettinari MJ, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:4841–4849.
- [177] Acar Soykut E, Tayyarcan EK, Evran Ş, et al. Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions. *Folia Microbiol*. 2019;64:751–763.
- [178] Durr HA, Leipzig ND. Advancements in bacteriophage therapies and delivery for bacterial infection. *Mater Adv*. 2023;4:1249–1257.
- [179] Speck P, Smithyman A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. Millard A, editor. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363:fnv242.
- [180] Lepper P, Held T, Schneider E, et al. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med*. 2002;28:824–833.

- [181] Dufour N, Delattre R, Ricard J-D, et al. The lysis of pathogenic *Escherichia coli* by bacteriophages releases less endotoxin than by β -lactams. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;64:1582–1588.
- [182] Chadha P, Katare OP, Chhibber S. In vivo efficacy of single phage versus phage cocktail in resolving burn wound infection in BALB/c mice. *Microbial Pathogenesis*. 2016;99:68–77.
- [183] Chan BK, Abedon ST. Phage therapy pharmacology. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier; 2012 [cited 2023 Jul 14]. p. 1–23.
- [184] Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris G. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;
- [185] Abedon ST. Bacteriophage secondary infection. *Viol Sin*. 2015;30:3–10.
- [186] Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, et al. Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. Fox D, editor. *PLoS ONE*. 2007;2:e799.
- [187] Li X, Hu T, Wei J, et al. Characterization of a novel bacteriophage henu2 and evaluation of the synergistic antibacterial activity of phage-antibiotics. *Antibiotics*. 2021;10:174.
- [188] Aghaee BL, Khan Mirzaei M, Alikhani MY, et al. Improving the inhibitory effect of phages against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a burn patient using a combination of phages and antibiotics. *Viruses*. 2021;13:334.
- [189] Gu Liu C, Green SI, Min L, et al. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. Sperandio V, editor. *mBio*. 2020;11:e01462-20.
- [190] Gordillo Altamirano FL, Kostoulias X, Subedi D, et al. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. *eBioMedicine*. 2022;80:104045.
- [191] Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, et al. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nat Microbiol*. 2021;6:157–161.
- [192] Yehl K, Lemire S, Yang AC, et al. Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis. *Cell*. 2019;179:459-469.e9.
- [193] Fong K, Wong CWY, Wang S, et al. How broad is enough: the host range of bacteriophages and its impact on the agri-food sector. *PHAGE*. 2021;2:83–91.
- [194] Hanauer DI, Graham MJ, SEA-PHAGES, et al. An inclusive Research Education Community (iREC): impact of the SEA-PHAGES program on research outcomes and student learning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:13531–13536.
- [195] Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, et al. Mycobacteriophage Zoel: a broad host-range close relative of mycobacteriophage TM4. *Tuberculosis*. 2019;115:14–23.
- [196] Marinelli LJ, Piuri M, Swigoňová Z, et al. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. Baker SE, editor. *PLoS ONE*. 2008;3:e3957.
- [197] Broussard GW, Hatfull GF. Evolution of genetic switch complexity. *Bacteriophage*. 2013;3:e24186.
- [198] Ptashne M. Principles of a switch. *Nat Chem Biol*. 2011;7:484–487.
- [199] Broussard GW, Oldfield LM, Villanueva VM, et al. Integration-dependent bacteriophage immunity provides insights into the evolution of genetic switches. *Molecular Cell*. 2013;49:237–248.
- [200] Menon SK, Lawrence CM. Helix-turn-helix motif. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2013. p. 412–415.

- [201] Dedeo CL, Cingolani G, Teschke CM. Portal protein: the orchestrator of capsid assembly for the dsDNA tailed bacteriophages and herpesviruse. *Annu Rev Virol.* 2019;6:141–160.
- [202] Nick JA, Dedrick RM, Gray AL, et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell.* 2022;185:1860-1874.e12.
- [203] Floto RA, Olivier KN, Saiman L, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax.* 2016;71:i1–i22.
- [204] Hatfull GF. Phage therapy for nontuberculous mycobacteria: challenges and opportunities. *Pulm Ther.* 2023;9:91–107.
- [205] Dedrick RM, Freeman KG, Nguyen JA, et al. Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary *Mycobacterium abscessus* infection. *Nat Med.* 2021;27:1357–1361.
- [206] Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, et al. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol.* 2017;74:277–283.
- [207] Bernut A, Herrmann J-L, Ordway D, et al. The diverse cellular and animal models to decipher the physiopathological traits of *Mycobacterium abscessus* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7.
- [208] Penziner S, Schooley RT, Pride DT. Animal models of phage therapy. *Front Microbiol.* 2021;12:631794.
- [209] Brix A, Cafora M, Aureli M, et al. Animal models to translate phage therapy to human medicine. *IJMS.* 2020;21:3715.
- [210] Sarkar S, Heise MT. Mouse models as resources for studying infectious diseases. *Clinical Therapeutics.* 2019;41:1912–1922.
- [211] Hickman DL, Johnson J, Vemulapalli TH, et al. Commonly used animal models. *Principles of Animal Research.* Elsevier; 2017. p. 117–175.
- [212] Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1220–1221.
- [213] Swearengen JR. Choosing the right animal model for infectious disease research. *Animal Model Exp Med.* 2018;1:100–108.
- [214] McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1934–1938.
- [215] Heo Y-J, Lee Y-R, Jung H-H, et al. Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:2469–2474.
- [216] Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT. Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies? *Pharm Res.* 2020;37:12.
- [217] Johansen MD, Hatfull GF, Kremer L. Mycobacteriophage–antibiotic therapy promotes enhanced clearance of drug-resistant *Mycobacterium abscessus* in zebrafish. 2021;15.
- [218] Oechslin F, Piccardi P, Mancini S, et al. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *INFDIS.* 2016;jjw632.
- [219] Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Drulis-Kawa Z, et al. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. *J Biomed Sci.* 2022;29:23.

- [220] Luria SE, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 1943;28:491–511.
- [221] Chang RYK, Chow MYT, Wang Y, et al. The effects of different doses of inhaled bacteriophage therapy for *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections in mice. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28:983–989.
- [222] Roach DR, Leung CY, Henry M, et al. Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen. *Cell Host & Microbe*. 2017;22:38–47.e4.
- [223] Gaborieau B, Debarbieux L. The role of the animal host in the management of bacteriophage resistance during phage therapy. *Current Opinion in Virology*. 2023;58:101290.
- [224] Salazar KC, Ma L, Green SI, et al. Antiviral resistance and phage counter adaptation to antibiotic-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Goldman GH, editor. *mBio*. 2021;12:e00211–21.
- [225] Yang Y, Shen W, Zhong Q, et al. Development of a bacteriophage cocktail to constrain the emergence of phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2020;11:327.
- [226] Yu L, Wang S, Guo Z, et al. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102:971–983.
- [227] Betts A, Gifford DR, MacLean RC, et al. Parasite diversity drives rapid host dynamics and evolution of resistance in a bacteria-phage system: growth and resistance with parasite diversity. *Evolution*. 2016;70:969–978.
- [228] Le S, Yao X, Lu S, et al. Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2014;4:4738.
- [229] Comolli JC, Hauser AR, Waite L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. Burns DL, editor. *Infect Immun*. 1999;67:3625–3630.
- [230] Jacobs-Sera D, Abad LA, Alvey RM, et al. Genomic diversity of bacteriophages infecting *Microbacterium* spp. Cloeckaert A, editor. *PLoS ONE*. 2020;15:e0234636.
- [231] Hatfull GF. Molecular genetics of mycobacteriophages. Hatfull GF, Jacobs Jr. WR, editors. *Microbiol Spectr*. 2014;2:2.2.02.
- [232] Hatfull GF, Pedulla ML, Jacobs-Sera D, et al. Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. Fraser-Liggett C, editor. *PLoS Genet*. 2006;2:e92.
- [233] Pope WH, Anders KR, Baird M, et al. Cluster M mycobacteriophages Bongo, PegLeg, and Rey with unusually large repertoires of tRNA isotypes. Imperiale MJ, editor. *J Virol*. 2014;88:2461–2480.
- [234] Pope WH, Jacobs-Sera D, Best AA, et al. Cluster J mycobacteriophages: intron splicing in capsid and tail genes. Pavelka M, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e69273.
- [235] Pope WH, Ferreira CM, Jacobs-Sera D, et al. Cluster K mycobacteriophages: insights into the evolutionary origins of mycobacteriophage TM4. Bereswill S, editor. *PLoS ONE*. 2011;6:e26750.
- [236] Pope WH, Jacobs-Sera D, Russell DA, et al. Expanding the diversity of mycobacteriophages: insights into genome architecture and evolution. Aziz R, editor. *PLoS ONE*. 2011;6:e16329.
- [237] Hendrix RW, Smith MCM, Burns RN, et al. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:2192–2197.

- [238] Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*. 2003;113:171–182.
- [239] Pope WH, Bowman CA, Russell DA, et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. *eLife*. 2015;4:e06416.
- [240] Klyczek KK, Bonilla JA, Jacobs-Sera D, et al. Tales of diversity: Genomic and morphological characteristics of forty-six *Arthrobacter* phages. Schuch R, editor. *PLoS ONE*. 2017;12:e0180517.
- [241] Klyczek KK, Jacobs-Sera D, Adair TL, et al. Complete genome sequences of 44 *Arthrobacter* phages. *Genome Announc*. 2018;6:e01474-17.
- [242] Sassi M, Bebeacua C, Drancourt M, et al. The first structure of a mycobacteriophage, the *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* phage Araucaria. *J Virol*. 2013;87:8099–8109.
- [243] Zinke M, Schröder GF, Lange A. Major tail proteins of bacteriophages of the order *Caudovirales*. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;298:101472.
- [244] Abuladze NK, Gingery M, Tsai J, et al. Tail length determination in bacteriophage T4. *Virology*. 1994;199:301–310.
- [245] Katsura I, Hendrix RW. Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell*. 1984;39:691–698.
- [246] Mageeney C, Pope WH, Harrison M, et al. Mycobacteriophage Marvin: a new singleton phage with an unusual genome organization. *J Virol*. 2012;86:4762–4775.
- [247] Sciara G, Bebeacua C, Bron P, et al. Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:6852–6857.
- [248] Kizziah JL, Manning KA, Dearborn AD, et al. Structure of the host cell recognition and penetration machinery of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage. Peschel A, editor. *PLoS Pathog*. 2020;16:e1008314.
- [249] Lhuillier S, Gallopin M, Gilquin B, et al. Structure of bacteriophage SPP1 head-to-tail connection reveals mechanism for viral DNA gating. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:8507–8512.
- [250] Veesler D, Johnson JE. Virus maturation. *Annu Rev Biophys*. 2012;41:473–496.
- [251] Guasch A, Pous J, Ibarra B, et al. Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage ϕ 29 connector particle 1 Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*. 2002;315:663–676.
- [252] Isidro A, Henriques AO, Tavares P. The portal protein plays essential roles at different steps of the SPP1 DNA packaging process. *Virology*. 2004;322:253–263.
- [253] Lokareddy RK, Sankhala RS, Roy A, et al. Portal protein functions akin to a DNA-sensor that couples genome-packaging to icosahedral capsid maturation. *Nat Commun*. 2017;8:14310.
- [254] Campbell A. Prophage insertion sites. *Research in Microbiology*. 2003;154:277–282.
- [255] Hargreaves KR, Kropinski AM, Clokie MR. Bacteriophage behavioral ecology: how phages alter their bacterial host's habits. *Bacteriophage*. 2014;4:e29866.
- [256] Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. Millard A, editor. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363:fnw002.
- [257] Schwartz M. Reversible interaction between Coliphage λ and its receptor protein. *J Mol Biol*. 1975;99:185–201.

- [258] Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol.* 2010;59:145–155.
- [259] Garen A, Puck TT. The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses. *Journal of Experimental Medicine.* 1951;94:177–189.
- [260] Lindberg AA. Bacteriophage receptors. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:205–241.
- [261] Heller KJ. Molecular interaction between bacteriophage and the Gram-negative cell envelope. *Arch Microbiol.* 1992;158:235–248.
- [262] Heller K, Braun V. Polymannose O-antigens of *Escherichia coli*, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. *J Virol.* 1982;41:222–227.
- [263] Heller KJ. Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23. *Virology.* 1984;139:11–21.
- [264] Heller K, Braun V. Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J Bacteriol.* 1979;139:32–38.
- [265] Veesler D, Robin G, Lichère J, et al. Crystal structure of bacteriophage SPP1 distal tail protein (gp19.1). *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285:36666–36673.
- [266] Jakutyte L, Baptista C, São-José C, et al. Bacteriophage infection in rod-shaped Gram-positive bacteria: evidence for a preferential polar route for phage SPP1 entry in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2011;193:4893–4903.
- [267] Monteville MR, Ardestani B, Geller BL. Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:3204–3211.
- [268] Baptista C, Santos MA, São-José C. Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus subtilis* cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. *J Bacteriol.* 2008;190:4989–4996.
- [269] Chen J, Kriakov J, Singh A, et al. Defects in glycopeptidolipid biosynthesis confer phage I3 resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology.* 2009;155:4050–4057.
- [270] Piuri M, Hatfull GF. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. *Mol Microbiol.* 2006;62:1569–1585.
- [271] Nakagawa H, Arisaka F, Ishii S. Isolation and characterization of the bacteriophage T4 tail-associated lysozyme. *J Virol.* 1985;54:460–466.
- [272] Moak M, Molineux IJ. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions: phage virion murein hydrolases. *Molecular Microbiology.* 2004;51:1169–1183.
- [273] Linares R, Arnaud C-A, Effantin G, et al. Structural basis of bacteriophage T5 infection trigger and *E. coli* cell wall perforation. *SCIENCE ADVANCES.* 2023;
- [274] Arnaud C-A, Effantin G, Vivès C, et al. Bacteriophage T5 tail tube structure suggests a trigger mechanism for *Siphoviridae* DNA ejection. *Nat Commun.* 2017;8:1953.
- [275] Hardy JM, Dunstan RA, Lithgow T, et al. Tall tails: cryo-electron microscopy of phage tail DNA ejection conduits. *Biochemical Society Transactions.* 2022;50:459-22W.
- [276] Chaban Y, Lurz R, Brasilès S, et al. Structural rearrangements in the phage head-to-tail interface during assembly and infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:7009–7014.

- [277] Molineux IJ, Panja D. Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:194–204.
- [278] Hardy JM, Dunstan RA, Grinter R, et al. The architecture and stabilisation of flagellotropic tailed bacteriophages. *Nat Commun*. 2020;11:3748.
- [279] Casjens SR, Hendrix RW. Bacteriophage lambda: early pioneer and still relevant. *Virology*. 2015;479–480:310–330.
- [280] Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, et al. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J*. 2017;11:1511–1520.
- [281] Ravin VK, Shulga MG. Evidence for extrachromosomal location of prophage N15. *Virology*. 1970;40:800–807.
- [282] Ge J, Lou Z, Cui H, et al. Analysis of phage Mu DNA transposition by whole-genome *Escherichia coli* tiling arrays reveals a complex relationship to distribution of target selection protein B, transcription and chromosome architectural elements. *J Biosci*. 2011;36:587–601.
- [283] Wetzel KS, Aull HG, Zack KM, et al. Protein-mediated and RNA-based origins of replication of extrachromosomal mycobacterial Prophages. Ehrt S, editor. *mBio*. 2020;11:e00385-20.
- [284] Fogg PCM, Colloms S, Rosser S, et al. New applications for phage integrases. *Journal of Molecular Biology*. 2014;426:2703–2716.
- [285] Landy A. The λ integrase site-specific recombination pathway. 2017;
- [286] Landy A, Ross W. Viral integration and excision: structure of the λ att sites: DNA sequences have been determined for regions involved in λ site-specific recombination. *Science*. 1977;197:1147–1160.
- [287] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:913–941.
- [288] Johnson A, Meyer BJ, Ptashne M. Mechanism of action of the Cro protein of bacteriophage λ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:1783–1787.
- [289] Ganguly T, Bandhu A, Chattoraj P, et al. Repressor of temperate mycobacteriophage L1 harbors a stable C-terminal domain and binds to different asymmetric operator DNAs with variable affinity. *Viol J*. 2007;4:64.
- [290] Steven AC, Heymann JB, Cheng N, et al. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Current Opinion in Structural Biology*. 2005;15:227–236.
- [291] Xu J, Hendrix RW, Duda RL. Chaperone–protein interactions that mediate assembly of the bacteriophage λ tail to the correct length. *Journal of Molecular Biology*. 2014;426:1004–1018.
- [292] Köhler B, Karch H, Schmidt H. Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology*. 2000;146:1085–1090.
- [293] Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol Microbiol*. 1999;33:167–176.
- [294] Craig NL, Roberts JW. Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* recA protein-directed cleavage of phage lambda repressor. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256:8039–8044.

- [295] Roucourt B, Lavigne R. The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. *Environmental Microbiology*. 2009;11:2789–2805.
- [296] Hermoso J, Freire R, Bravo A, et al. DNA structure in the nucleoprotein complex that activates replication of phage Φ 29. *Biophys Chem*. 1994;50:183–189.
- [297] Muñoz-Espín D, Holguera I, Ballesteros-Plaza D, et al. Viral terminal protein directs early organization of phage DNA replication at the bacterial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:16548–16553.
- [298] Summers WC, Siegel RB. Control of template specificity of *E. coli* RNA polymerase by a phage-coded protein. *Nature*. 1969;223:1111–1113.
- [299] Chamberlin M, Mcgrath J, Waskell L. New RNA Polymerase from *Escherichia coli* infected with Bacteriophage T7. *Nature*. 1970;228:227–231.
- [300] Hinkle DC. Evidence for direct involvement of T7 RNA Polymerase in bacteriophage DNA replication. *J VIROL*. 1980;34.
- [301] Studier FW. Genetic analysis of non-essential bacteriophage T7 genes. *Journal of Molecular Biology*. 1973;79:227–236.
- [302] Richardson CC. Bacteriophage T7: minimal requirements for the replication of a duplex DNA molecule. *Cell*. 1983;33:315–317.
- [303] Hatfull GF. The secret lives of mycobacteriophages. *Advances in Virus Research*. Elsevier; 2012 [cited 2023 Sep 3]. p. 179–288.
- [304] Motwani T, Teschke CM. Architect of virus assembly: the portal protein nucleates procapsid assembly in bacteriophage P22. Sandri-Goldin RM, editor. *J Virol*. 2019;93:e00187-19.
- [305] Lurz R, Orlova EV, Günther D, et al. Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus 1 1 Edited by T. Richmond. *Journal of Molecular Biology*. 2001;310:1027–1037.
- [306] Dokland T. Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 1999;56:580–603.
- [307] Earnshaw W, King J. Structure of phage P22 coat protein aggregates formed in the absence of the scaffolding protein. *Journal of Molecular Biology*. 1978;126:721–747.
- [308] Hagen EW, Reilly BE, Tosi ME, et al. Analysis of gene function of bacteriophage ϕ 29 of *Bacillus subtilis*: identification of cistrons essential for viral assembly. *J Virol*. 1976;19:501–517.
- [309] Rao VB, Feiss M. The bacteriophage DNA packaging motor. *Annu Rev Genet*. 2008;42:647–681.
- [310] Lata R, Conway JF, Cheng N, et al. Maturation dynamics of a viral capsid: visualization of transitional intermediate states. *Cell*. 2000;100:253–263.
- [311] Moody MF. Geometry of phage head construction. *Journal of Molecular Biology*. 1999;293:401–433.
- [312] King J. Assembly of the tail of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 1967;32:231–262.
- [313] Vegge CS, Brøndsted L, Neve H, et al. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J Bacteriol*. 2005;187:4187–4197.
- [314] Siponen M, Sciara G, Villion M, et al. Crystal structure of ORF12 from *Lactococcus lactis* phage p2 identifies a tape measure protein chaperone. *J Bacteriol*. 2009;191:728–734.

- [315] Pell LG, Liu A, Edmonds L, et al. The X-Ray crystal structure of the phage λ tail terminator protein reveals the biologically relevant hexameric ring structure and demonstrates a conserved mechanism of tail termination among diverse long-tailed phages. *Journal of Molecular Biology*. 2009;389:938–951.
- [316] Wang I-N, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:799–825.
- [317] Young R, Wang I-N, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*. 2000;8:120–128.
- [318] Garcia M, Pimentel M, Moniz-Pereira J. Expression of mycobacteriophage Ms6 lysis genes is driven by two σ 70-like promoters and is dependent on a transcription termination signal present in the leader RNA. *J BACTERIOL*. 2002;184.
- [319] Payne KM, Hatfull GF. Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities. Nigou J, editor. *PLoS ONE*. 2012;7:e34052.
- [320] Payne K, Sun Q, Sacchetti J, et al. Mycobacteriophage Lysin B is a novel mycolylarabinogalactan esterase. *Molecular Microbiology*. 2009;73:367–381.
- [321] Marrakchi H, Lan elle M-A, Daff  M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & Biology*. 2014;21:67–85.
- [322] Hurst-Hess K, Walz A, Yang Y, et al. Intrapulmonary treatment with mycobacteriophage LysB rapidly reduces *Mycobacterium abscessus* burden. *Antimicrob Agents Chemother*. 2023;67:e00162-23.
- [323] Bernheim A, Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18:113–119.
- [324] Patel PH, Maxwell KL. Prophages provide a rich source of antiphage defense systems. *Current Opinion in Microbiology*. 2023;73:102321.
- [325] Fortier L-C, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013;4:354–365.
- [326] Dedrick RM, Jacobs-Sera D, Bustamante CAG, et al. Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat Microbiol*. 2017;2:16251.
- [327] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:317–327.
- [328] Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, et al. Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:6206–6215.
- [329] McGrath S, Fitzgerald GF, Sinderen DV. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages: phage-resistant systems in lactococcal phages. *Molecular Microbiology*. 2002;43:509–520.
- [330] Ko C-C, Hatfull GF. Mycobacteriophage Fruitloop gp52 inactivates Wag31 (DivIVA) to prevent heterotypic superinfection: Fruitloop gp52-mediated exclusion. *Molecular Microbiology*. 2018;108:443–460.
- [331] Kang C-M, Nyayapathy S, Lee J-Y, et al. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. *Microbiology*. 2008;154:725–735.
- [332] Jani C, Eoh H, Lee JJ, et al. Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria. *BMC Microbiol*. 2010;10:327.

- [333] Gentile GM, Wetzel KS, Dedrick RM, et al. More evidence of collusion: a new prophage-mediated viral defense system encoded by mycobacteriophage Sbash. Chang Y-F, editor. *mBio*. 2019;10:e00196-19.
- [334] Dulberger CL, Guerrero-Bustamante CA, Owen SV, et al. Mycobacterial nucleoid-associated protein Lsr2 is required for productive mycobacteriophage infection. *Nat Microbiol*. 2023;8:695–710.
- [335] Gordon BRG, Imperial R, Wang L, et al. Lsr2 of *Mycobacterium* represents a novel class of H-NS-like proteins. *J Bacteriol*. 2008;190:7052–7059.
- [336] Colangeli R, Helb D, Vilchèze C, et al. Transcriptional regulation of multi-drug tolerance and antibiotic-induced responses by the histone-like protein Lsr2 in *M. tuberculosis*. Ramakrishnan L, editor. *PLoS Pathog*. 2007;3:e87.
- [337] Chen JM, Ren H, Shaw JE, et al. Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis* is a DNA-bridging protein. *Nucleic Acids Research*. 2008;36:2123–2135.
- [338] Colangeli R, Haq A, Arcus VL, et al. The multifunctional histone-like protein Lsr2 protects mycobacteria against reactive oxygen intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:4414–4418.
- [339] Gordon BRG, Li Y, Wang L, et al. Lsr2 is a nucleoid-associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:5154–5159.
- [340] Chen JM, German GJ, Alexander DC, et al. Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2006;188:633–641.
- [341] Sharma V, Hardy A, Luthe T, et al. Phylogenetic distribution of WhiB- and Lsr2-type regulators in actinobacteriophage genomes. Sinclair A, editor. *Microbiol Spectr*. 2021;9:e00727-21.
- [342] Le Moigne V, Bernut A, Cortès M, et al. Lsr2 is an important determinant of intracellular growth and virulence in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol*. 2019;10:905.
- [343] Parma DH, Snyder M, Sobolevski S, et al. The Rex system of bacteriophage k: tolerance and altruistic cell death. *Genes Dev*. 1992;6:497_510.
- [344] Mageeney CM, Mohammed HT, Dies M, et al. *Mycobacterium* phage butters-encoded proteins contribute to host defense against viral attack. Alegado R, editor. *mSystems*. 2020;5:e00534-20.
- [345] Unterholzner SJ, Poppenberger B, Rozhon W. Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements*. 2013;3:e26219.
- [346] Jacobs-Sera D, Marinelli LJ, Bowman C, et al. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology*. 2012;434:187–201.
- [347] Guerrero-Bustamante CA, Dedrick RM, Garlena RA, et al. Toward a phage cocktail for tuberculosis: susceptibility and tuberculocidal action of mycobacteriophages against diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains. Ehrt S, editor. *mBio*. 2021;12:e00973-21.
- [348] Úbeda C, Maiques E, Knecht E, et al. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci: Horizontal dissemination of virulence genes. *Molecular Microbiology*. 2005;56:836–844.
- [349] Fillol-Salom A, Martínez-Rubio R, Abdulrahman RF, et al. Phage-inducible chromosomal islands are ubiquitous within the bacterial universe. *ISME J*. 2018;12:2114–2128.
- [350] Tormo MÁ, Ferrer MD, Maiques E, et al. *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol*. 2008;190:2434–2440.

- [351] Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. Ahmed N, editor. PLoS ONE. 2009;4:e5660.
- [352] Cheng Y, Promadej N, Kim J-W, et al. Teichoic acid glycosylation mediated by *gtcA* is required for phage adsorption and susceptibility of *Listeria monocytogenes* serotype 4b. Appl Environ Microbiol. 2008;74:1653–1655.

Rôle des lipides de surface dans la spécificité des interactions entre *Mycobacterium abscessus* et les mycobactériophages

Les nombreux échecs thérapeutiques rencontrés face au pathogène opportuniste *Mycobacterium abscessus* témoignent d'un besoin crucial de diversifier les traitements disponibles pour éradiquer ces infections. La phagothérapie combinée à l'antibiothérapie offre une alternative thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de mucoviscidose et infectés par ce pathogène multirésistant aux antibiotiques. Toutefois, la capacité de *M. abscessus* à résister spontanément à des mycobactériophages thérapeutiques pourrait entraver l'efficacité du traitement. Au cours de l'infection phagique, la richesse lipidique de la paroi mycobactérienne offre à la bactérie une pléthore de cibles à modifier en vue d'inhiber le cycle phagique. Dans ce contexte, le but de ces travaux de thèse a été d'évaluer le rôle de lipides de surface, les polyphléates de tréhalose (TPP) et les glycopeptidolipides (GPL), dans les interactions de mycobactériophages avec *M. abscessus*. Grâce au criblage d'une banque de mutants transpositionnels, ces travaux ont permis de démontrer, pour la première fois, l'usage d'un co-récepteur (TPP) par des mycobactériophages thérapeutiques. Ce co-récepteur faciliterait l'accès des phages à leur récepteur principal encore inconnu mais vraisemblablement essentiel à la croissance bactérienne. Par ailleurs, la capacité de ces phages à évoluer pour conserver leur efficacité lytique contre des souches déficientes en TPP a permis d'élargir le spectre d'action des mycobactériophages à la disposition du clinicien. En parallèle, la découverte d'un premier phage lytique spécifique des souches lisses et adhérant à la bactérie *via* un processus impliquant probablement les GPL, des lipides caractéristiques de ce variant, pourrait contribuer à étendre considérablement l'arsenal thérapeutique existant. Grâce à la construction de mutants arborant des GPL tronqués, nos travaux ont mis en évidence un rôle des motifs glucidiques de ces lipides dans les interactions phagiques. En revanche, l'acétylation d'un de ces motifs, régie par quatre acétyltransférases dont une produite par un prophage de *M. abscessus*, n'impacte pas l'activité des phages. En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'accroître les connaissances sur les étapes précoces de l'infection des mycobactéries par les mycobactériophages tout en élargissant la gamme des phages thérapeutiques disponibles. En complément de ces travaux, des études futures permettront d'approfondir les mécanismes de résistance aux mycobactériophages de *M. abscessus* et contribueront ainsi à proposer de nouveaux cocktails phagiques tout en limitant l'émergence de souches résistantes.

Role of surface exposed lipids in the specificity of interactions between *Mycobacterium abscessus* and mycobacteriophages

The abundance of therapeutic failures encountered with the opportunistic pathogen *Mycobacterium abscessus* justifies the crucial need to diversify available treatments in order to eradicate these infections. Phage therapy combined with antibiotherapy offers a promising therapeutic alternative to cystic fibrosis patients infected with multidrug-resistant *M. abscessus*. However, the ability of *M. abscessus* to spontaneously resist therapeutic mycobacteriophages could hamper treatment efficacy. During phage infection, the lipid-rich mycobacterial cell wall provides the bacterium a plethora of targets that can be modified to inhibit the phage cycle. In this context, this thesis work aimed to evaluate the role of surface-exposed lipids, trehalose polyphleates (TPP) and glycopeptidolipids (GPL), in the interactions between mycobacteriophages and *M. abscessus*. By screening a transposon library, this work has demonstrated, for the first time, the use of a co-receptor (TPP) by therapeutic mycobacteriophages. This co-receptor is proposed to facilitate access to their primary receptor which is not yet known and potentially essential. In addition, the ability of these phages to evolve for retaining their lytic efficacy against TPP-deficient strains has enabled to broaden the spectrum of action for mycobacteriophages currently available to clinicians. At the same time, the discovery of the first lytic phage specific to smooth strains and adhering to the bacteria *via* a process probably involving GPL, the lipids characteristic of this variant, could considerably contribute to expand the existing therapeutic phage arsenal. Thanks to the construction of mutants with truncated GPL variants, our work has revealed a role for the carbohydrate motifs of GPL in phage interactions. However, acetylation of the carbohydrate motif, governed by four acetyltransferases, including one produced by a prophage in *M. abscessus*, has no impact on phage efficacy. In conclusion, this thesis work has increased knowledge of the early stages of mycobacterial infection by mycobacteriophages, while broadening the range of available therapeutic phages. In addition to this work, future studies will investigate the mechanisms of mycobacteriophage resistance in *M. abscessus*, and thus contribute to the development of new phage cocktails while limiting the emergence of resistant strains.