THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Célia BERNARD

Le 1 décembre 2023

Identification des mécanismes de tolérance à la céfoxitine chez Mycobacterium abscessus

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

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

Thèse dirigée par
Christian CHALUT et Kaymeuang CAM

Jury

Mme Emmanuelle CAMBAU, Rapporteure
Mme Zeynep BAHAROGLU, Rapporteure
M. Abdellah BENACHOUR, Rapporteur
M. Matthieu ARLAT, Examinateur
M. Christian CHALUT, Directeur de thèse
M. Kaymeuang CAM, Co-directeur de thèse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Célia BERNARD

Le 1 décembre 2023

Identification des mécanismes de tolérance à la céfoxitine chez Mycobacterium abscessus

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

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

Thèse dirigée par
Christian CHALUT et Kaymeuang CAM

Jury

Mme Emmanuelle CAMBAU, Rapporteure
Mme Zeynep BAHAROGLU, Rapporteure
M. Abdellah BENACHOUR, Rapporteur
M. Matthieu ARLAT, Examinateur
M. Christian CHALUT, Directeur de thèse
M. Kaymeuang CAM, Co-directeur de thèse

Remerciements

Aux membres du jury,

Merci au **Dr Zeynep Baharoglu**, ainsi qu'aux **Pr Emmanuelle Cambau** et **Abdellah Benachour** d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci également au **Pr Matthieu Arlat** d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'examinateur.

Aux membres de mon comité de thèse,

Merci aux **Dr Marie-Pierre Castanié-Cornet** et **Etienne Giraud** pour votre implication dans mon comité de thèse. Merci pour les discussions échangées et vos conseils avisés concernant les directions à prendre pour mener à bien ce projet.

À mes directeurs de thèse,

Merci **Christian** et **Kaymeuang** de m'avoir aidée à conduire à bien ce projet de recherche passionnant. Merci pour tout le temps et l'énergie que vous m'avez consacrés, et bien sûr pour votre implication dans la préparation de ce manuscrit.

À notre chef d'équipe,

Merci **Christophe** pour les nombreuses discussions et pour votre soutien. Je vous remercie également d'avoir suivi de près mon projet de thèse et d'avoir contribué à sa réalisation.

À nos collaborateurs,

Merci à l'équipe du **Dr Etienne Meunier**, et particulièrement aux **Dr Céline Cougoule** et **Stephen Leon-Icaza**. Vous m'avez offert l'opportunité de participer à un travail innovant et très intéressant.

Merci également aux **Dr Gérald Larrouy-Maumus** et **Liu Yi** pour nos échanges, nos discussions ainsi que votre expertise et participation dans l'avancée de ce travail de thèse.

Je remercie également le **Dr Lionnel Mourey** pour le temps qu'il m'a accordé et pour m'avoir offert son expertise dans la modélisation de structures protéiques.

À nos collègues de l'animalerie et de la plateforme de cytométrie,

Je remercie particulièrement **Céline Beronne** et **Flavie Morreau**, sans qui nos expériences sur le modèle murin n'auraient pas pu être réalisées, ainsi que **Emmanuelle Näser** pour le temps accordé à ma formation à la cytométrie en flux et ses réponses à mes questions.

Aux membres de l'équipe, passés et présents,

Un énorme merci à **Wladimir**. Je te remercie pour ton implication dans ma formation expérimentale et pour ton soutien, ton écoute et tes conseils durant notre cohabitation dans la « caravane ». Merci également à **Cathy** d'avoir fait le lien entre les étudiants et les statutaires, ainsi que pour tes conseils.

Merci aux « Guilhot Girls », **Delphine**, **Aideen**, **Laurie**, **Coralie** et **Eva**. Vous étiez là quand je suis arrivée dans l'équipe et avez rendu mes premières années inoubliables. **Eva**, je pense particulièrement à toi car nous avons été ensemble en thèse durant ces 4 ans, et que quelques mois après ta soutenance, c'est à mon tour d'y passer.

Merci aux « Besties », **Grégoire** et **Bastien**. Vous m'avez plus appris à rire qu'à travailler mais ce sont des souvenirs précieux. Vous avez bien évidemment contribué de manière significative à rendre ma thèse si inoubliable. « Groooos bisouuuuuuu ! »

Merci également aux supers copains/copines ! **Marie** et **Jéjé** vous êtes un sacré binôme avec qui j'adore partager des discussions et du contenus des réseaux sociaux, surtout ne changez rien. **Valou** tu as été un partenaire de bureau formidable, merci pour tes nombreux conseils en tant que docteur récemment diplômé ainsi que pour toutes nos conversations. Merci à **Sophie** également, tu viens consolider le lien entre les statutaires et les étudiants/non-permanents et c'est vraiment très chouette. Merci pour tes conseils, ton partage et toutes nos discussions. Je vous apprécie énormément et vous fais aussi un « Groooos bisouuuuuuu ! »

Merci également à **Adriano** pour ton implication dans notre pratique de la langue anglaise et pour l'exotisme que tu apportes à l'équipe.

Aux copains/copines à l'extérieur du labo,

Merci à vous tous pour vos encouragements. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour votre soutien.

À ma famille,

Merci à vous tous d'avoir suivi l'avancée de ma thèse durant ces 4 ans et de m'avoir soutenue. Si vous lisez ce manuscrit j'espère ne pas compliquer davantage les explications que je vous donnais quand vous me demandiez en quoi consistait mon travail.

Enfin merci **Billy**. Merci de m'avoir soutenue durant ces 4 années riches en compromis. Merci pour ton soutien, ton calme et ta patience. Je crois bien que sans toi, je n'en serais pas là.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail et merci à ceux qui liront ce manuscrit, en espérant que vous y trouverez ce que vous cherchez.

Bonne lecture !

Résumé

Mycobacterium abscessus est une mycobactérie pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires sévères, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement de ces infections est souvent inefficace du fait de la résistance intrinsèque de *M. abscessus* à de nombreux antibiotiques et de l'émergence de souches résistantes. Au-delà de la résistance, la tolérance aux antibiotiques qui désigne la capacité d'une sous-population bactérienne ou d'une population bactérienne dans sa globalité, à survivre de manière transitoire à l'exposition à des doses létales d'antibiotiques, contribue probablement à l'échec des traitements. La tolérance conduit à l'allongement de la durée de l'antibiothérapie et favorise la sélection de bactéries mutantes résistantes. Malgré son importance en clinique, la tolérance reste peu étudiée chez *M. abscessus*. Par ailleurs, l'absence de modèles infectieux adéquats pour étudier les infections à *M. abscessus* et évaluer l'efficacité des antibiotiques complique la mise en place de stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient.

Dans ce contexte, la première partie de ce travail a porté sur l'identification des fonctions impliquées dans la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*. Un mutant présentant une tolérance accrue à la céfoxitine lors de la sortie des bactéries de la phase stationnaire a été isolé par évolution expérimentale. Ce mutant présente une mutation dans le gène *serB2*, codant une phosphosérine phosphatase impliquée dans la biosynthèse de la L-sérine. Les changements métaboliques causés par cette mutation altèrent l'homéostasie rédox intracellulaire et induisent la surexpression du régulateur transcriptionnel *whiB7*, favorisant la tolérance aux antibiotiques par la mise en place d'une réponse au stress médiée par WhiB7 selon des mécanismes moléculaires qui restent à préciser.

Une deuxième partie de ce travail, réalisée dans le cadre d'une collaboration inter-équipes, a contribué au développement d'un modèle d'organoïde pulmonaire récapitulant certaines des caractéristiques pulmonaires associées à la mucoviscidose (organoïde CF) pour étudier l'infection à *M. abscessus* et sa réponse aux antibiotiques. Nos données montrent que l'environnement oxydant de l'organoïde CF favorise la croissance de *M. abscessus* et confirment le caractère hyper-virulent du morphotype rugueux de *M. abscessus* par rapport au morphotype lisse. Nous avons également démontré que l'ajout d'antioxydants potentialise l'effet bactéricide de la céfoxitine lors d'un traitement d'organoïdes CF infectés par *M. abscessus*, suggérant que des antioxydants pourraient être utilisés comme adjuvants pour améliorer l'efficacité des traitements antibiotiques en clinique.

Abstract

Mycobacterium abscessus is an opportunistic pathogenic mycobacterium responsible for severe lung infections, especially in patients with cystic fibrosis. Treatment of these infections is often ineffective due to the intrinsic resistance of *M. abscessus* to many antibiotics and the emergence of resistant strains. Beyond resistance, antibiotic tolerance, which relies on the ability of a whole bacterial population or a subpopulation to transiently survive lethal doses of antibiotics without developing resistance, probably contributes to treatment failure. Drug tolerance contributes to extended duration of antibiotic treatments and promotes the emergence of drug-resistant bacteria. Despite its importance in clinic, tolerance remains poorly studied in *M. abscessus*. Furthermore, the lack of relevant infectious models to study *M. abscessus* infections and assess the efficacy of antibiotics impedes the implementation of therapeutic strategies adapted to each patient.

In this context, the first part of this work focused on the identification of functions involved in antibiotic tolerance in *M. abscessus*. A mutant with increased cefoxitin tolerance during exit of bacteria from the stationary phase has been isolated by experimental evolution. This mutant harbors a mutation in *serB2*, a gene encoding a phosphoserine phosphatase involved in the biosynthesis of L-serine. Metabolic changes caused by this mutation alter the intracellular redox homeostasis and induce the overexpression of the transcriptional regulator *whiB7*, promoting antibiotic tolerance through the establishment of a WhiB7-mediated stress response via molecular mechanisms that have yet to be elucidated.

The second part of this work, carried out within the framework of an inter-team collaboration, contributed to the development of a lung organoid model recapitulating some of the pulmonary characteristics associated with cystic fibrosis (CF organoid) to study *M. abscessus* infection and its response to antibiotics. Our data indicate that the oxidative environment of the CF organoid promotes the growth of *M. abscessus* and confirm the hyper-virulent phenotype of the rough morphotype of *M. abscessus* compared to the smooth morphotype. We also demonstrated that addition of antioxidants potentiates the bactericidal effect of cefoxitin during treatment of CF organoids infected with *M. abscessus*, suggesting that antioxidants could be used as adjuvants to improve the efficacy of antibiotic treatments in a clinical context.

Table des matières

ABREVIATIONS **1**

INDEX DES FIGURES **5**

INDEX DES TABLEAUX **7**

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **9**

Chapitre I. Le complexe *Mycobacterium abscessus* **11**

I. Généralités sur les mycobactéries **11**

A) Phylogénie des mycobactéries 12

B) Particularité morphologique des mycobactéries : l'enveloppe mycobactérienne 14

II. Origine et taxonomie de *M. abscessus* **16**

III. Spécificités génomiques de *M. abscessus* **18**

A) Facteurs de virulence mycobactériens 18

B) Facteurs de virulence non-mycobactériens 19

IV. Morphotypes de *M. abscessus* **21**

Chapitre II. Infections associées à *Mycobacterium abscessus* **23**

I. Pathologies dues à *M. abscessus* **23**

A) Infections pulmonaires 23

B) Infections pulmonaires dans un contexte de mucoviscidose 24

C) Infections extra-pulmonaires 25

II. Physiopathologie de l'infection pulmonaire **25**

A) Réservoir environnemental et infection de l'hôte humain 25

B) Réponse immunitaire face à l'infection 27

III. Modèles d'études actuels et futurs des infections à *M. abscessus* **30**

A) Les amibes comme réservoirs environnementaux 30

B) Les macrophages comme modèle d'étude de la réponse immunitaire innée 31

C) La souris comme modèle d'étude des infections mycobactériennes 31

D) L'embryon de poisson-zèbre comme modèle des premières étapes de l'infection 32

E) Les organoïdes comme modèles futurs de l'infection dans un contexte de mucoviscidose 33

IV. Adaptation de *M. abscessus* aux stress lors de l'infection **35**

A) Les différents stress rencontrés lors de l'infection 35

B) Maintien de l'homéostasie rédox chez les mycobactéries 38

i) Les protéines senseurs de l'homéostasie rédox mycobactérienne 39
Les protéines WhiB 39
Les facteurs sigma et anti-sigma 44
Le système DosRST 47
Autres systèmes senseurs 48
ii) Les protéines effectrices de l'homéostasie rédox mycobactérienne 48
Les thiorédoxines 49
Les alkyls hydropéroxydes réductases 50
La catalase péroxydase KatG 51
Les superoxydes dismutases 52
Le mycothiol comme principale molécule donneuse d'électrons 53

Chapitre III. Antibiothérapie des infections liées à *Mycobacterium abscessus* 59

I. L'antibiothérapie contre *M. abscessus* 59

II. La résistance aux antibiotiques chez *M. abscessus* 62

A) Limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique 63
B) Modification ou inactivation des antibiotiques 64
C) Protection de la cible des antibiotiques par des protéines 65
D) Protection de la cible des antibiotiques par le polymorphisme génétique (naturel ou acquis) 66
E) Rôle des régulateurs transcriptionnels dans la résistance de *M. abscessus* aux antibiotiques 68
i) Le régulateur TetR 68
ii) Le régulateur WhiB7 71

Chapitre IV. La tolérance aux antibiotiques 75

I. Notions de tolérance et de persistance aux antibiotiques 75

II. Mécanismes associés à la formation des bactéries persistantes 79

A) Relation entre l'état de dormance, le ralentissement du métabolisme et la formation de bactéries persistantes 79
i) La réponse stringente 80
ii) La réponse SOS 81
iii) Les modules toxine-antitoxine 82
iv) L'organisation en biofilms 84
B) Implication des voies de détoxification des ROS dans les phénotypes de tolérance 85

III. Modulation de la persistance par accumulation de mutations génétiques 87

IV. Lien entre tolérance et résistance 89

V. Conséquences de la tolérance aux antibiotiques en clinique 90

OBJECTIFS DE THÈSE 93

RÉSULTATS & DISCUSSION 97

Objectif I. Identification des déterminants génétiques et mécanismes associés à la tolérance chez *Mycobacterium abscessus.* 99

I. Contexte et résumé de l'étude 101

II. Résultats 103

Publication n°1: "Altered serine metabolism promotes drug tolerance in *Mycobacterium abscessus* via a WhiB7-mediated adaptive stress response" 105

III. Résultats additionnels, discussion et perspectives 165

Objectif II. Impact de la tolérance sur la persistance de *Mycobacterium abscessus in vivo* et l'acquisition de mutations de résistance. 171

I. Contexte et objectifs de l'étude 173

II. Résultats 175

A) Lien entre tolérance aux antibiotiques et persistance *in vivo* 175

B) Lien entre tolérance et acquisition de mutations de résistance à la céfoxitine 177

III. Discussion et perspectives 181

A) La tolérance aux antibiotiques favorise-t-elle la persistance dans le modèle murin ? 181

B) La tolérance à la céfoxitine du mutant MABserB2 ne semble pas accélérer l'acquisition de mutations de résistance à ce même antibiotique. 182

Objectif III. Mise au point d'un modèle d'organoïde pulmonaire pour l'étude de la sensibilité de *Mycobacterium abscessus* aux antibiotiques. 185

I. Objectifs et résumé de l'étude 187

II. Résultats 191

Publication n°2: "Mycobacteria-host interactions in human bronchiolar airway organoids" 193

Publication n°3: "Druggable redox pathways against *M. abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids" 207

III. Discussion et perspectives 233

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 235

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 241

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

Ahp : Alkyl hydropéroxyde réductase

AM : Arabinomannane

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

ATS : American thoracic society

CDS : Séquence codant de l'ADN

CF : Cystic fibrosis

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CFU : Unité formatrice de colonie

CMI : Concentration (en antibiotique) minimale inhibitrice (de croissance bactérienne)

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CRISPRi : CRISPR interference

DDT : D,D-transpeptidase

EGT : Ergothionéine

ERGD : Ethambutol resistance-determining region

ERS : European respiratory society

ESCMID : European society of clinical microbiology and infectious diseases

ESX : Système de sécrétion

GDP : Guanosine diphosphate

GFP : Protéine fluorescente verte

GPL : Glycopeptidolipide

GSH : Glutathion (forme réduite)

GSSG : Glutathion (forme oxydée)

Hip (mutant) : Mutant de persistance

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

IDSA : Infectious diseases society of America

ILGM (allèle) : Allèle isoleucine-leucine-glycine-méthionine

Indel (mutation) : Mutation par insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides

INF : Interféron

INH : Isoniazide

IS : Séquence d'insertion

Kb : Kilobase

LAM : Lipoarabinomannane

LDT : L,D-transpeptidase

Mb : Mégabase

MCR : Mycobactérie à croissance rapide

MDK_X : Durée minimale nécessaire à l'élimination d'une certaine proportion X de bactéries

MNT : Mycobactérie non-tuberculeuse

MPC : Concentration en antibiotique prévenant l'apparition de mutations de résistance

MSH : Mycothiol (forme réduite)

Msm : *Mycobacterium smegmatis*

MSNHOH : Mycothiol-N-hydrosulfenamide

MSNO : S-nitrosomycothiol

MSSM : Mycothione ou disulfure de mycothiol (forme oxydée)

NAD(P)+ : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (forme oxydée)

NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) (forme réduite)

NPET : Tunnel de sortie des protéines néosynthétisées

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORF : Cadre de lecture ouvert de l'ADN

PAS (coloration) : Periodic acid shiff

PaSH : Persistence as Stuff Happens

Pb : Paire de base

PBP : Protéine de liaison à la pénicilline

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PE : Protéine avec un motif proline-glutamate

pH : Potentiel hydrogène

Pi : Phosphate inorganique

PI : Post-infection

PIM : Phosphatidyl inositol mannoside

PL : Phospholipide

PPE : Protéine avec un motif proline-glutamate-glutamate

ppGpp : Alarmone guanosine tétraphosphate

PSP : Phosphosérine phosphatase

QMGM (allèle) : Allèle glutamine-méthionine-glycine-méthionine

qRT-PCR : Transcription reverse quantitative PCR

R (morphotype) : Rugueux

RMB : Sous-produit métabolique réactif

RNS : Espèce réactive de l'azote

ROOH : Alkyl hydropéroxyde

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

RSH : Homologue aux protéines Rel et Spo

S (morphotype) : Lisse

SCFM2 : Milieu synthétique d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose

SEM : Erreur standard

SNP : Mutation au niveau d'un seul nucléotide

Strep : Streptomycine

TA (module) : Module toxine-antitoxine

TCA (cycle) : Cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs

TDM : Dimycolate de tréhalose

TFR : Famille des régulateurs transcriptionnels TetR

TLR2 : Récepteur de type Toll

TMM : Monomycolate de tréhalose

TNF : Facteur de nécrose tumorale

Trx : Thiorédoxine

uORF : upstream ORF

WT (souche) : Souche sauvage

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Cellules de Mycobacterium tuberculosis observées au microscope électronique. 11

Figure 2. Classification des mycobactéries selon leur pathogénicité et leur vitesse de croissance. 13

Figure 3. Structure de l'enveloppe mycobactérienne. 15

Figure 4. Changements dans la classification et la nomenclature de M. abscessus depuis sa découverte en 1953. 17

Figure 5. Morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de M. abscessus. 22

Figure 6. Cycle infectieux des morphotypes S et R de M. abscessus. 29

Figure 7. Organoïdes pulmonaires d'individu sain ou de patient atteint de mucoviscidose. 34

Figure 8. Les différents stress rencontrés par M. abscessus lors d'une infection pulmonaire. 36

Figure 9. Stress spécifiques et non spécifiques rencontrés par la bactérie lors d'un traitement antibiotique. 37

Figure 10. L'interaction entre SigA et les protéines WhiB est dépendante de l'état rédox de la cellule. 42

Figure 11. Mécanismes de réduction des composés ou protéines oxydé(e)s par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. 50

Figure 12. Mécanismes de réduction des ROS par les alkyls hydropéroxydes réductases et leur lien avec le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. 51

Figure 13. Mécanismes de réduction des ROS par l'activité péroxydase (a) ou catalase (b) de KatG. 52

Figure 14. Enzymes impliquées dans la biosynthèse du mycothiol chez M. tuberculosis et M. abscessus. 53

Figure 15. Mécanismes de réduction et de détoxification des composés oxydants et toxiques assurés par le mycothiol. 56

Figure 16. Structure chimique de l'ergothionéine. 57

Figure 17. Mécanismes senseurs et effecteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie rédox mycobactérienne. 58
Figure 18. Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez M. abscessus. 63
Figure 19. Structure de TetR et fonctionnement du système de régulation en absence et en présence d'inducteur. 69
Figure 20. La transcription de whiB7 est régulée par la traduction d'un petit ORF localisé en amont (uORF). 73
Figure 21. La sous-population de bactéries persistantes au sein d'une population clonale de M. smegmatis explique la cinétique de survie biphasique lors d'un traitement antibiotique à la streptomycine et l'isoniazide. 76
Figure 22. Paramètres distinctifs entre les phénotypes de tolérance, persistance et résistance aux antibiotiques. 77
Figure 23. L'activation de la réponse stringente conduit à la formation de bactéries persistantes. 80
Figure 24. Les modules Toxine-Antitoxine jouent un rôle central dans la formation des bactéries persistantes. 83
Figure 25. Prédiction de structure des protéines SerB2 A) WT et B) MABserB2 avec le logiciel AlphaFold2-multimer. 166
Figure 26. Le mutant MABserB2 présente une surexpression de certains gènes du régulon de WhiB7 en phase stationnaire. 169
Figure 27. Cinétiques de survie à la céfoxitine des souches WT::pMV361e et MABserB2::pMV361zeo. 175
Figure 28. Expérience de compétition réalisée avec les souches WT::pMV361e et MABserB2::pMV361zeo dans le modèle murin. 176
Figure 29. Expérience d'évolution expérimentale pour établir un lien entre la tolérance et l'acquisition de mutations de résistance. 179

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Protéines WhiB de *M. tuberculosis* et leurs orthologues chez *M. abscessus* 40

Tableau 2. Facteurs sigma et anti-sigma de *M. tuberculosis* et leurs orthologues chez *M. abscessus* 45

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Le complexe *Mycobacterium abscessus*

I. Généralités sur les mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles longs aérobiques, asporulés et non-flagellés mesurant entre 0,2 et 0,6 µm de diamètre sur 1 à 10 µm de long (Figure 1). Leur aspect varie de bâtonnets uniformes à irréguliers en fonction des espèces mycobactériennes. Leur génome est très riche en GC (60-70%) et présente une taille comprise entre 3,2 et 8,1 Mégabases (Mb) avec une moyenne à 5,7 Mb (Cook *et al.*, 2009; Behra *et al.*, 2022).

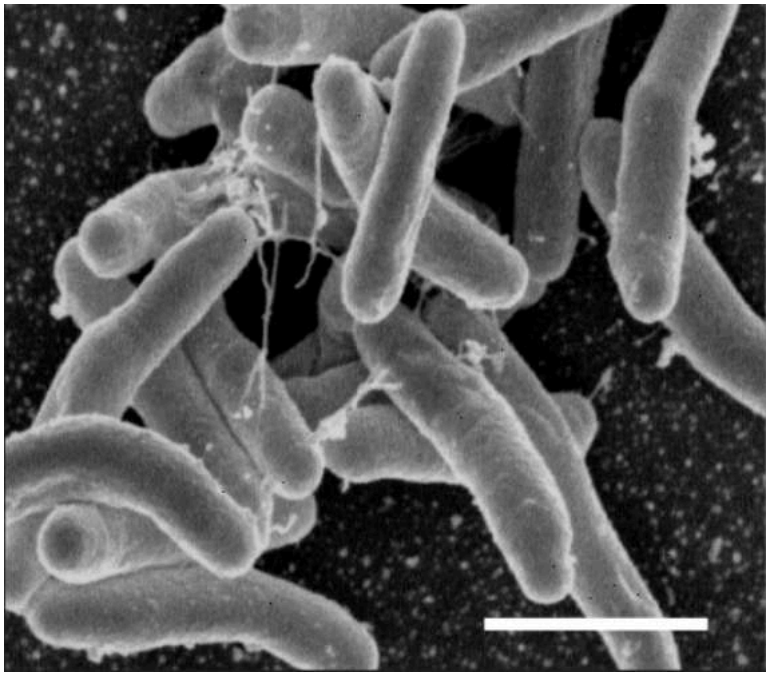


Figure 1. *Cellules de Mycobacterium tuberculosis observées au microscope électronique.*

Barre correspondant à 1,5 µm.
Issue de (Dahl, 2005).

A) Phylogénie des mycobactéries

Appartenant à la classe des Actinomycètes, dans l'ordre des Corynébactéries et plus précisément dans la famille des *Mycobacteriaceae*, 188 espèces mycobactériennes sont recensées à ce jour (Gupta *et al.*, 2018). Leur classification repose sur plusieurs paramètres physiologiques ou génétiques tels que leur pathogénicité, leur vitesse de croissance ou leur identité de séquence ADN.

Selon leur pouvoir pathogène, les mycobactéries se répartissent en 3 catégories ; i) pathogènes stricts, ii) pathogènes opportunistes et iii) bactéries saprophytes.

La première catégorie renferme des mycobactéries pathogènes pour l'Homme ou l'animal dont les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* telles que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*, des Mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) telles que *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium ulcerans* ou encore l'agent étiologique de la lèpre *Mycobacterium leprae* (Figure 2). *M. tuberculosis* est l'un des pathogènes les plus étudiés. Il est l'agent étiologique de la tuberculose, une maladie infectieuse touchant principalement les voies respiratoires et dont la mortalité s'élève encore à 1,5 million de personnes dans le monde en 2020 (Organisation mondiale de la sante, OMS).

La deuxième catégorie de mycobactéries comprend des pathogènes opportunistes responsables d'infections graves chez des individus affaiblis ou immunodéprimés. Ces pathogènes opportunistes appartiennent à la famille des MNT, dans laquelle se trouve *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium avium*, et *Mycobacterium abscessus* (Figure 2).

Enfin les mycobactéries saprophytes sont des mycobactéries non pathogènes telles que *Mycobacterium smegmatis*, une bactérie modèle pour l'étude de la physiologie mycobactérienne (Figure 2).

La vitesse de croissance est un autre critère de classification des mycobactéries. Une espèce mycobactérienne est qualifiée de croissance lente ou croissance rapide si elle nécessite respectivement plus ou moins de 7 jours pour former des colonies visibles sur milieu solide. Les mycobactéries pathogènes, ainsi qu'une grande proportion de

pathogènes opportunistes appartenant à la famille des MNT sont des mycobactéries à croissance lente. *M. smegmatis, M. abscessus* ou encore *M. chelonae* sont quant à elles des mycobactéries à croissance rapide (Figure 2).

Enfin, la classification des mycobactéries repose également sur l'identité des séquences nucléotidiques de certains gènes marqueurs (« housekeeping genes ») tels que l'*ARN16S* (Rogall *et al.*, 1990), *rpoB* (Adékambi *et al.*, 2003) ou *hsp65* (McNabb *et al.*, 2004). La comparaison de ces différents marqueurs génétiques a conduit au reclassement de la mycobactérie *M. abscessus* au rang d'espèce, alors qu'elle était précédemment considérée comme une sous-espèce du complexe de *M. chelonae* (voir Partie II de ce chapitre) (Kusunoki and Ezaki, 1992).

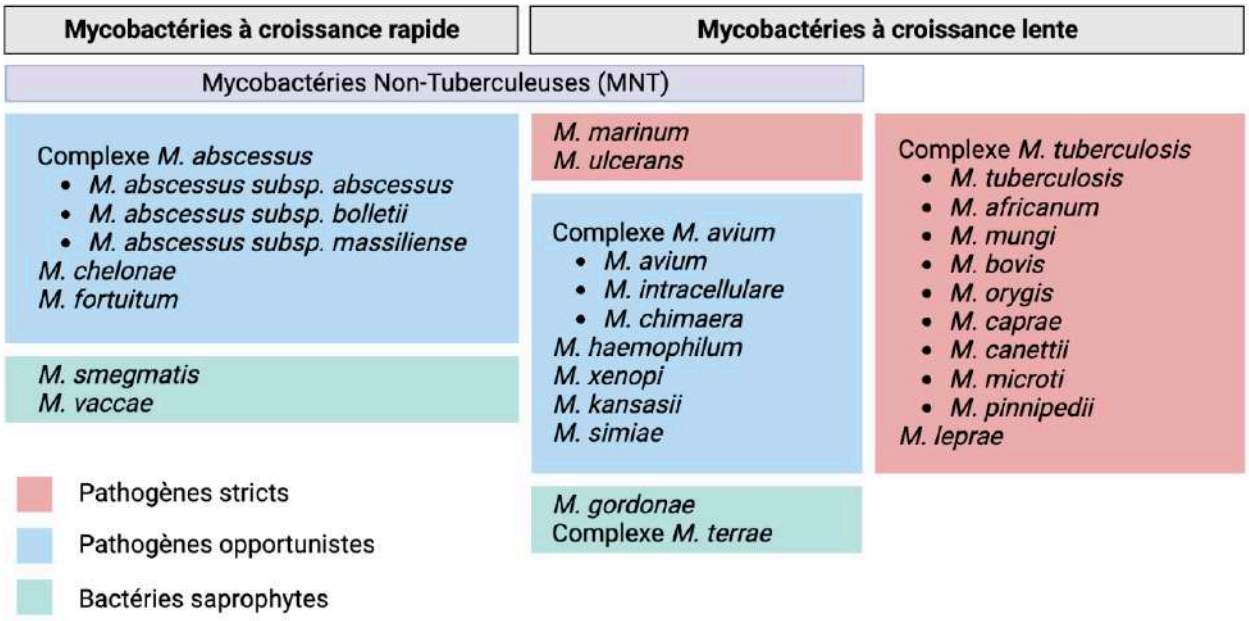


Figure 2. *Classification des mycobactéries selon leur pathogénicité et leur vitesse de croissance.*

Adaptée de (Johansen et al.*, 2020).*

B) Particularité morphologique des mycobactéries : l'enveloppe mycobactérienne

Les mycobactéries se distinguent des bactéries Gram positives ou Gram négatives par la présence d'une enveloppe cellulaire atypique. Sa composition extrêmement riche en acides gras, limite la pénétration des colorants et la rend résistante à l'action décolorante des acides et de l'alcool. La coloration de Ziehl-Neelsen tire profit de cette propriété. Elle repose sur l'utilisation d'un colorant rouge (la fuchsine phéniquée) capable de pénétrer et de colorer toutes les bactéries, suivie d'une étape de décoloration acido-alcoolique à laquelle seules les mycobactéries résistent.

L'enveloppe mycobactérienne est l'une des enveloppes les plus complexes et épaisses du règne bactérien. Les différentes couches qui la composent créent une barrière hydrophobe de plus de 40 nm, imperméable à de nombreuses molécules (Daffé and Marrakchi, 2019). Elle est composée d'une membrane plasmique, d'une paroi cellulaire et d'une capsule (Figure 3).

La membrane plasmique mycobactérienne est semblable à celles des autres bactéries. Elle est organisée en une bicouche de phospholipides et de protéines responsables de l'intégrité de l'enveloppe mycobactérienne.

La paroi cellulaire, séparée de la membrane plasmique par un espace périplasmique, présente une organisation et une composition spécifique aux mycobactéries. Elle est composée de peptidoglycane lié de manière covalente à une couche d'arabinogalactane sur laquelle sont fixés des acides gras contenant entre 60 et 90 atomes de carbone, appelés acides mycoliques. La réticulation du peptidoglycane fait intervenir deux familles de transpeptidases, les D,D-transpeptidases (DDT) qui réalisent des connexions entre le 4ème et 3ème acides-aminés de deux peptides adjacents (liaison 4 → 3) et des L,D-transpeptidases (LDT) qui réalisent des connexions entre deux acides aminés en 3ème position (liaison 3 → 3) (Gokulan and Varughese, 2019). De manière intéréssante, chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus*, la liaison 3 → 3 prédomine, contrairement à d'autres mycobactéries (Lavollay *et al.*, 2008; Lavollay *et al.*, 2011). Enfin, les acides mycoliques greffés à l'arabinogalactane interagissent avec divers lipides et glycolipides de structures complexes et uniques pour former une membrane externe, la mycomembrane. Certains de

ces lipides sont spécifiques d'espèces, tandis que d'autres sont ubiquitaires (Minnikin and Brennan, 2020).

Pour finir, la capsule est une structure labile entourant la cellule et composée de lipides, de polysaccharides ou de protéines (Figure 3) (Daffé and Marrakchi, 2019).

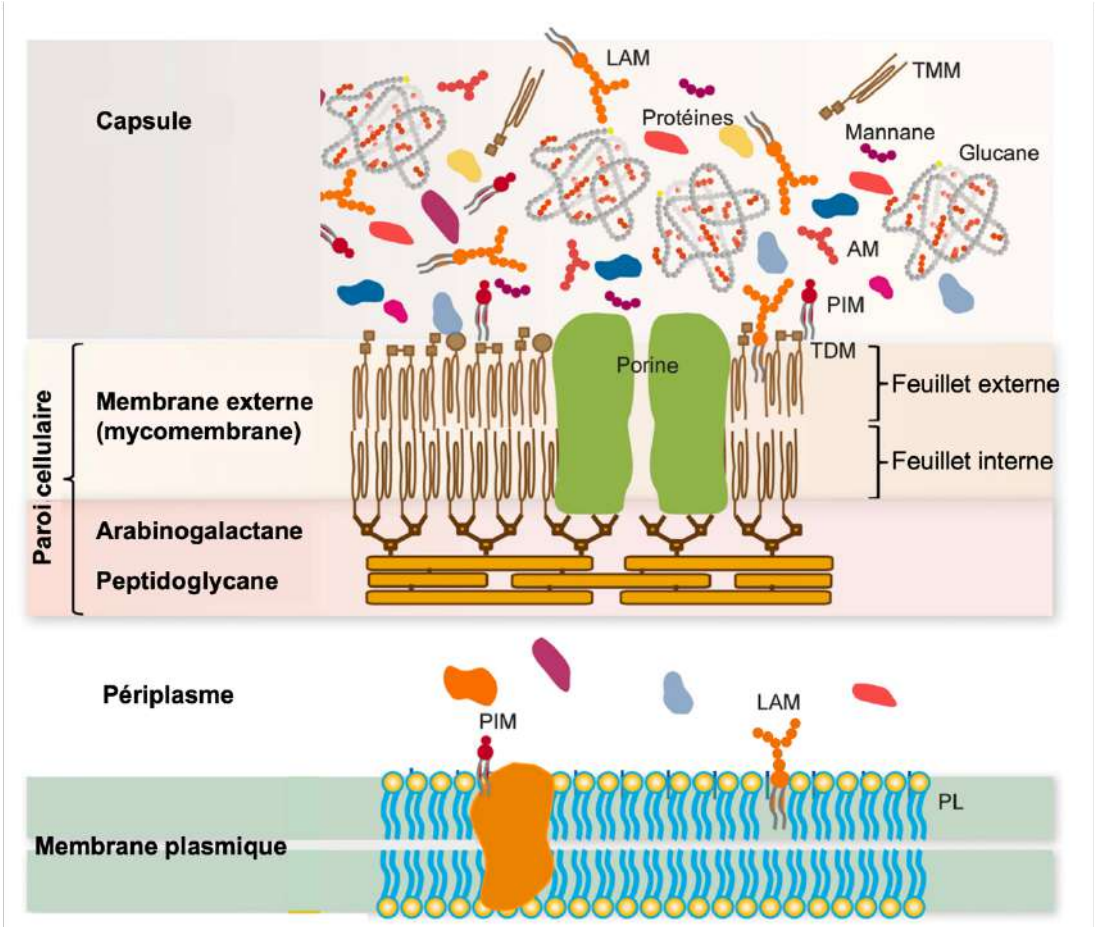


Figure 3. *Structure de l'enveloppe mycobactérienne.*

L'enveloppe mycobactérienne est composée d'une membrane plasmique, d'un périplasme, d'une paroi cellulaire et d'une capsule. La membrane plasmique est principalement constituée de lipides tels que des phospholipides ou des glycolipides. L'espace périplasmique, à l'aspect granuleux, contient des protéines. La paroi cellulaire est constituée de peptidoglycane, d'arabinogalactane et d'une membrane externe, appelée mycomembrane. Celle-ci est composée d'un feuillet interne d'acides mycoliques et d'un feuillet externe contenant des lipides variés. Enfin, la capsule est une matrice labile composée de sucres, de protéines et de lipides. AM : arabinomannane, LAM : lipoarabinomannane, PIM : phosphatidyl inositol mannoside, PL : phospholipide, TDM : dimycolate de tréhalose, TMM : monomycolate de tréhalose. Adaptée de (Daffé and Marrakchi, 2019).

II. Origine et taxonomie de *M. abscessus*

Depuis la découverte de *M. abscessus* en 1953, sa taxonomie a été réévaluée à de nombreuses reprises (Figure 4). Initialement considéré comme une nouvelle espèce (Moore and Frerichs, 1953), *M. abscessus* a par la suite été reclassé en tant que sous-espèce du complexe *Mycobacterium chelonae*, sous le nom de *M. chelonae* subsp. *abscessus*, en raison de caractéristiques biochimiques similaires (Kubica *et al.*, 1972). Quelques années plus tard, l'utilisation de méthodes moléculaires d'hybridation de l'ADN, qui permettent de mesurer l'affinité d'appariement entre différents fragments d'acides nucléiques, révèle un faible pourcentage d'identité entre les génomes de *M. chelonae* subsp. *chelonae* et de *M. chelonae* subsp. *abscessus*. En conséquence, l'appartenance de *M. abscessus* au complexe *M. chelonae* a été réévaluée et en 1992, *M. abscessus* est élevé au rang d'espèce (Levy-Frebault *et al.*, 1986; Kusunoki and Ezaki, 1992).

En 2004 et 2006, deux nouvelles souches mycobactériennes à croissance rapide ont été isolées : *Mycobacterium massiliense* et *Mycobacterium bolletii* (Adékambi *et al.*, 2004; Adékambi *et al.*, 2006). Très proches génétiquement de *M. abscessus*, ces deux espèces se distinguent de cette dernière par la séquence de leur gène *rpoB*. Cependant, sur la base de leur identité de séquence parfaite au niveau de l'*ARN 16S*, *M. massiliense* et *M. bolletii* sont rapidement considérées comme une seule et même sous-espèce du complexe *M. abscessus* ; *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Leao *et al.*, 2011).

Quelques années plus tard, il apparait que les souches incluses dans le groupe de *M. abscessus* subsp. *bolletii* ne sont pas homogènes et présentent des différences notables d'un point de vue clinique (Cho *et al.*, 2013). En effet, bien qu'elles causent toutes des infections chez les humains, les espèces précédemment nommées *M. massiliense* et *M. bolletii* présentent des sensibilités différentes à l'antibiotique clarithromycine, ce qui influe sur l'efficacité de l'antibiothérapie (Kim *et al.*, 2010). Ces divergences sont liées au gène *erm(41)* qui confère une résistance inductible aux antibiotiques de la famille des macrolides, mais qui est présent sous une forme tronquée non fonctionnelle chez *M. massiliense* (Nash *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Les différences de sensibilité aux

macrolides et de séquences du gène *erm(41)* ont finalement reconduit à la distinction des espèces *M. massiliense* et *M. bolletii* (Nash *et al.*, 2009).

Considérant les ressemblances et divergences entre les différentes espèces précédemment abordées - à savoir l'identité de séquence de leur *ARN16S*, la variabilité de séquence du gène *rpoB*, ou encore les différences de sensibilité à l'égard d'un traitement aux macrolides – le complexe *M. abscessus* a été établi. Il rassemble actuellement trois sous-espèces ; *M. abscessus* subsp. *abscessus* (aussi appelée *M. abscessus sensu stricto*), *M. abscessus* subsp. *massiliense* et *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Tortoli *et al.*, 2016) (Figure 4).

Mon travail de thèse a été réalisé sur la souche de référence *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977, également référencée à l'institut Pasteur sous le numéro CIP 104536^{T}.

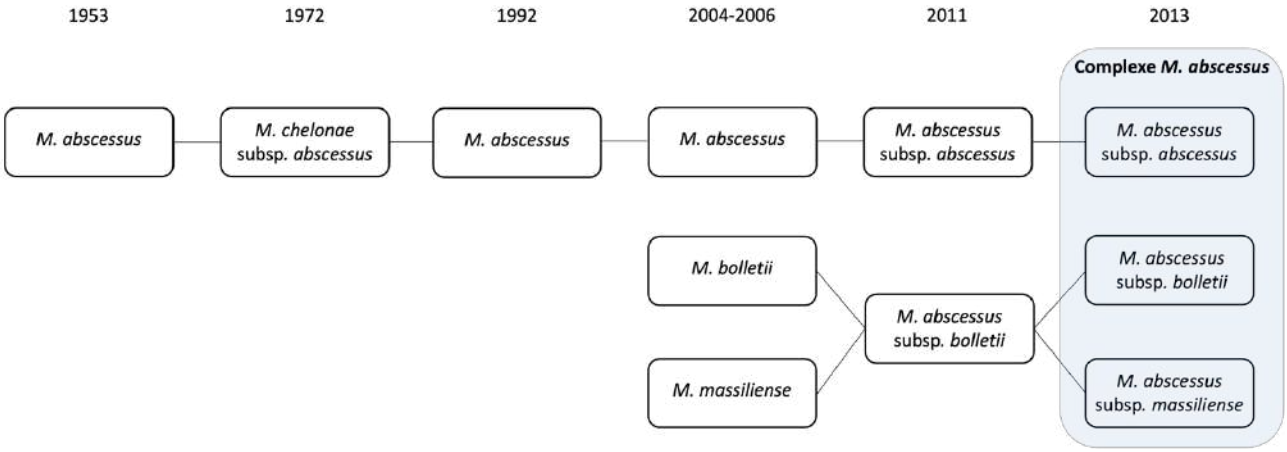


Figure 4. *Changements dans la classification et la nomenclature de M. abscessus depuis sa découverte en 1953.*

Adaptée de (Lee et al., 2015).

III. Spécificités génomiques de *M. abscessus*

Le génome de *M. abscessus* a été entièrement séquencé en 2009. Il est constitué d'un chromosome circulaire de 5 067 172 paires de bases (pb) comprenant 4920 séquences codantes (CDS) prédites, d'un prophage de 81 kb, de cinq séquences d'insertion (IS) agissant comme éléments transposables, et d'un plasmide de résistance au mercure de 23 kb. Ce plasmide présente 99,9% d'identité de séquence nucléotidique avec le plasmide de résistance au mercure de *M. marinum* (Ripoll *et al.*, 2009; Pawlik *et al.*, 2013).

M. abscessus est l'une des rares mycobactéries à croissance rapide (MCR) capables d'infecter l'hôte humain. Le séquençage de son génome a ainsi révélé la présence de plusieurs gènes absents des génomes des bactéries saprophytes telles que *M. smegmatis*. Parmi ces gènes, se trouvent des facteurs de virulence mycobactériens conservés chez *M. tuberculosis*, mais également des facteurs de virulence non-mycobactériens acquis par transferts horizontaux à partir d'autres espèces (Ripoll *et al.*, 2009).

A) Facteurs de virulence mycobactériens

Le séquençage du génome de *M. abscessus* a révélé la présence de trois loci codants pour des systèmes de sécrétion ESX ainsi que les loci PE et PPE associés (Ripoll *et al.*, 2009). Ces 3 loci sont très similaires au locus ESX-3 de *M. tuberculosis*, un système de sécrétion impliqué dans la lutte contre les mécanismes de défense de l'hôte visant à limiter la disponibilité en fer (Tufariello *et al.*, 2016). À l'instar de *M. tuberculosis*, le système de sécrétion ESX-3 de *M. abscessus* joue également un rôle important dans la pathogénie lors de l'infection des macrophages murins et humains (Kim *et al.*, 2017).

D'autres facteurs de virulence mycobactériens tels que les protéines MCE (mammalian cell entry) ou les protéines LpqH-like sont également retrouvés dans le génome de *M. abscessus* (Ripoll *et al.*, 2009). Chez *M. tuberculosis*, ces protéines sont impliquées dans la pathogénie de la bactérie, respectivement en interférant avec la réponse

immunitaire de l'hôte (Fenn *et al.*, 2020) ou en induisant l'apoptose des cellules macrophagiques (Sánchez *et al.*, 2012).

Enfin, le génome de *M. abscessus* exprime également un régulateur transcriptionnel VirS dont l'orthologue chez *M. tuberculosis* est impliqué dans la virulence et qui est absent chez *M. smegmatis* (Ripoll *et al.*, 2009).

B) Facteurs de virulence non-mycobactériens

En plus des facteurs de virulence précédemment décrits, le génome de *M. abscessus* a la particularité de présenter des groupes (« clusters ») de gènes non-mycobactériens, acquis par transferts horizontaux. Ces « clusters » présentent une forte homologie de séquence avec des gènes de microorganismes du genre des *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* parmi lesquels on trouve les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*, des pathogènes majoritairement retrouvés chez les patients atteints de mucoviscidose (Ripoll *et al.*, 2009).

Parmi ces facteurs non-mycobactériens se trouve par exemple le gène *MAB_0555,* qui code pour une probable phospholipase C et dont la délétion est délétère pour la survie dans les amibes (Bakala N'Goma *et al.*, 2015). Très ressemblante aux phospholipases de *P. aeruginosa* et *B. cepacia*, il est probable que *M. abscessus* ait acquis le gène codant cette protéine lors de transferts horizontaux avec l'une de ces deux espèces (Ripoll *et al.*, 2009; Bakala N'Goma *et al.*, 2015).

Le génome de *M. abscessus* contient également le gène *MAB_3593*, codant le facteur de virulence MgtC, dont l'expression augmente lorsque la bactérie réside au sein des macrophages ou dans un environnement carencé en Mg^{2+} (Le Moigne *et al.*, 2016). Retrouvé au sein des génomes d'espèces pathogènes distinctes, dont *M. tuberculosis* et *B. cepacia*, ce gène aurait été acquis par transferts horizontaux répétés au cours de l'évolution bactérienne (Blanc-Potard and Lafay, 2003).

D'autres facteurs non-mycobactériens acquis par transferts horizontaux semblent plus particulièrement impliqués dans la survie dans un contexte de mucoviscidose (Ripoll *et al.*, 2009). C'est notamment le cas du cluster de gènes *MAB_0295-MAB_0298*, probablement hérité de *P. aeruginosa,* qui est impliqué dans la biosynthèse de la phénazine. Chez *P. aeruginosa*, la phénazine, ou plus précisément la pyocyanine, participe à la virulence du pathogène chez l'hôte atteint de mucoviscidose en exerçant une action cytotoxique sur les cellules eucaryotes suite à la production de composés oxydants (Hall *et al.*, 2016).

Hérité de *B. cepacia*, *M. abscessus* présente également un cluster de gènes (*MAB_0906-MAB_0910*) impliqué dans la transformation de composés aromatiques en intermédiaires du cycle de Krebs (Luengo *et al.*, 2005). Chez *B. cepacia*, l'homologue de *MAB_0910* est essentiel à la survie dans le modèle murin en contexte de mucoviscidose, suggérant une importance de ce cluster dans la virulence de *M. abscessus* chez les patients atteints de cette maladie génétique (Hunt *et al.*, 2004).

La présence de nombreux facteurs de virulence mycobactériens et non-mycobactériens dans le génome de *M. abscessus* explique pourquoi cette bactérie environnementale a la faculté de proliférer chez l'hôte humain. La présence de déterminants génétiques non-mycobactériens acquis par transferts horizontaux avec d'autres espèces pathogènes pulmonaires de l'Homme, telles que *P. aeruginosa* et *B. cepacia*, justifie également l'impressionnante adaptation de *M. abscessus* à la colonisation des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (voir Chapitre II, Partie I et II).

IV. Morphotypes de *M. abscessus*

M. abscessus est une mycobactérie existant sous deux morphotypes différenciables par l'aspect de leurs colonies sur milieu solide. Le morphotype lisse (« smooth », S) présente un aspect homogène, lisse et brillant, alors que le morphotype rugueux (« rough », R) forme des colonies à l'allure sèche et irrégulière (Figure 5A). Cette différence morphologique est associée à la perte d'expression des glycopeptidolipides (GPL) chez le variant R suite à des mutations dans le locus des GPL. Il s'agit de mutations spontanées telles que des substitutions d'un nucléotide ou des petites insertions/délétions dans les gènes impliqués dans la production (gènes *mps1* et *mps2*) ou le transport (gènes *mmpL4a/b* et *gap*) des GPL vers la surface de l'enveloppe mycobactérienne (Pawlik *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2018). L'absence de GPL à la surface du variant R se traduit en milieu liquide par une diminution de la formation de biofilms au détriment de structures filamenteuses, appelées « cordes » (Figure 5B) (Howard, 2006; Sánchez-Chardi *et al.*, 2011).

Les deux morphotypes de *M. abscessus* se différencient également par leur comportement au sein des cellules immunitaires de l'hôte. Cet aspect sera développé plus en détails dans le Chapitre II, Partie II de l'introduction.

Mon travail de thèse a été réalisé sur le morphotype lisse de *M. abscessus*.

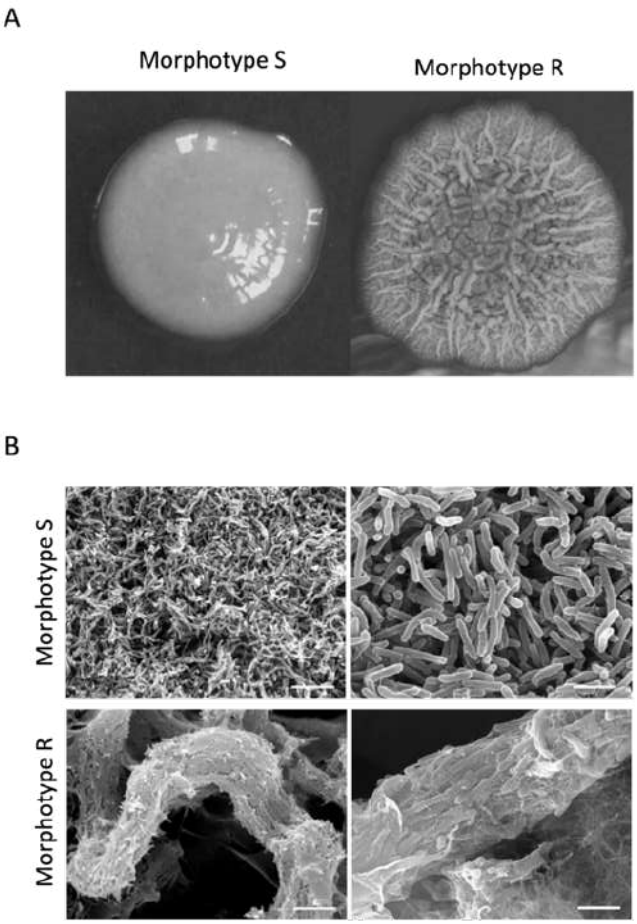


Figure 5. *Morphotypes lisse (S) et rugueux (R) de M. abscessus.*

A. *Morphologies des colonies du variant S ou R de M. abscessus sur milieu solide. Issues de* (Ruger et al., *2014*). *B. Images de microscopie électronique à transmission des morphotypes S et R de M. abscessus. Le variant S s'organise principalement sous forme de biofilms homogènes alors que le variant R s'organise en « cordes ». Barres correspondant à 7,5 µm (gauche) et 1,9 µm (droite). Issues de* (Sánchez-Chardi et al., *2011*).

Chapitre II. Infections associées à *Mycobacterium abscessus*

I. Pathologies dues à *M. abscessus*

M. abscessus est responsable d'un large spectre d'infections, allant de l'infection pulmonaire à l'infection de la peau, du système nerveux central ou des yeux. Dans certains cas, ces infections localisées peuvent évoluer en infections disséminées, notamment chez des individus immunodéprimés HIV-positifs (Lee *et al.*, 2015).

A) Infections pulmonaires

M. abscessus est la deuxième espèce de MNT la plus fréquemment associée aux maladies pulmonaires (Prevots and Marras, 2015). Parmi les souches du complexe de *M. abscessus*, *M. abscessus* subsp. *abscessus* est l'agent pathogène le plus commun (représente 45 à 65 % des infections pulmonaires), suivi de *M. abscessus* subsp. *massiliense* (20 à 55 %). *M. abscessus* subsp. *bolletii* est un pathogène plus rarement isolé, représentant moins de 5 % de l'ensemble des infections du complexe de *M. abscessus* (Koh *et al.*, 2014).

La manifestation clinique pulmonaire de *M. abscessus* est très similaire à celle de *M. avium*. Elle se traduit par une bronchectasie bilatérale et multilobaire associée à la formation de multiples nodules et cavités pulmonaires (Jarand *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2014). Les individus atteints souffrent généralement de toux, d'obstruction respiratoire, de fatigue et de perte de poids (Griffith *et al.*, 2007; Jarand *et al.*, 2011).

Une infection par *M. abscessus* peut s'établir chez des individus ne présentant pas de facteur de risques (Jeong *et al.*, 2004; Griffith *et al.*, 2007), mais touche plus particulièrement des individus avec une pathologie pulmonaire sous-jacente telle que la mucoviscidose.

B) Infections pulmonaires dans un contexte de mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique humaine causée par des mutations dans le gène *CFTR* (« Cystic fiboris transmembrane conductance regulator ») qui code pour un canal transmembranaire responsable du transport des ions chlorures et présent à la surface des cellules épithéliales. Chez les individus atteints de mucoviscidose (patients CF pour « cystic fibrosis »), le défaut d'activité du canal CFTR entraine un épaississement et une accumulation de mucus dans les voies respiratoires, formant un environnement hyper-oxydant. Celui-ci entraine une inflammation persistante des tissus, une limitation de la capacité de clairance mucociliaire et favorise l'établissement d'infections bactériennes chroniques (Lopes-Pacheco, 2019; Moliteo *et al.*, 2022).

D'après les rapports de ces dernières années, les mycobactéries sont responsables de 10% des infections pulmonaires des patients CF. *M. avium* et *M. abscessus* sont les principales espèces identifiées et causent respectivement 45% et 35% des infections (https://www.cff.org/sites/default/files/2021-11/Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf).

Les conséquences d'une infection par *M. abscessus* chez les patients CF, en plus de celles précédemment citées, sont le développement d'une maladie pulmonaire chronique responsable de l'accélération du déclin des fonctions respiratoires (Skolnik *et al.*, 2016). En comparaison des autres espèces bactériennes isolées chez les patients CF, telles que *P. aeruginosa* ou *B. cepacia*, *M. abscessus* est celle ayant le pire impact sur la fonction respiratoire (Qvist *et al.*, 2016). Ainsi les individus infectés par *M. abscessus* sont susceptibles de rapidement nécessiter une transplantation pulmonaire afin d'éradiquer l'infection (Lobo *et al.*, 2013). Il arrive cependant que les patients décèdent prématurément malgré les traitements administrés (Skolnik *et al.*, 2016; Qvist *et al.*, 2016).

C) Infections extra-pulmonaires

Suite à un traumatisme ou un acte chirurgical, une infection par *M. abscessus* peut également s'établir au niveau de la peau, des tissus mous ou encore atteindre le système nerveux central ou les yeux (Bechara *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015).

L'infection cutanée ou des tissus mous se traduit par le développement de nodules violacés ou la formation d'abcès, de pustules ou de papules (Moore and Frerichs, 1953; Griffith *et al.*, 2007).

L'infection du système nerveux central, bien que rare, entraine des méningites et des abcès cérébraux. Ce type d'infection s'établit principalement suite à la dissémination de la bactérie dans l'organisme après une première atteinte des poumons ou de la peau (Lee *et al.*, 2015).

Enfin, l'infection des yeux par *M. abscessus* est également peu fréquente. Elle entraîne des conjonctivites (inflammation de la conjonctive), des sclérites (inflammation nécrosante de l'œil), des kératites (inflammation de la cornée) ou une endophtalmie (infection à l'intérieur de l'œil) pouvant entrainer une perte définitive de la vision (Matieli *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2015).

II. Physiopathologie de l'infection pulmonaire

A) Réservoir environnemental et infection de l'hôte humain

Comme les autres MNT, *M. abscessus* est décrite comme une mycobactérie environnementale. Elle est retrouvée dans les sources d'eaux domestiques, municipales et hospitalières (Thomson *et al.*, 2013b; Thomson *et al.*, 2013a; Davidson *et al.*, 2022) et est capable de survivre plusieurs semaines sur des fomites (vecteurs passifs de transmission) tels que la poussière (Malcolm *et al.*, 2017). Son réservoir environnemental n'est pour le moment pas clairement identifié puisqu'elle est principalement isolée à proximité

d'environnements hospitaliers ou dans des environnements où résident des individus infectés (Thomson *et al.*, 2013a; Davidson *et al.*, 2022). Les informations apportées par le séquençage de son génome, telles que la présence de la phospholipase C (*MAB_0555*), coïncident cependant avec une adaptation de ce pathogène à un mode de vie intracellulaire aquatique, en particulier au sein des amibes (Voir Chapitre I, Partie III) (Ripoll *et al.*, 2009).

Les amibes sont des organismes unicellulaires capables d'établir une relation symbiotique avec différentes espèces microbiennes, dont celles du genre *Pseudomonas* ou *Mycobacterium* (Shi *et al.*, 2021). Les interactions amibes-bactéries permettent de sélectionner, notamment par transferts horizontaux de gènes, des facteurs de virulence ou des traits génétiques favorisant un mode de vie intracellulaire (Shi *et al.*, 2021). Bien que plusieurs publications démontrent la capacité de *M. abscessus* à survivre dans ces organismes aquatiques (Drancourt, 2014; Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Dubois *et al.*, 2019), cette mycobactérie n'a pour le moment jamais été isolée à partir d'amibes prélevées dans l'environnement. L'identification de facteurs de virulence non-mycobactériens dans le génome de *M. abscessus* et sa pathogénicité dans les cellules eucaryotes corroborent cependant l'hypothèse selon laquelle les amibes pourraient être l'un de ses réservoirs environnementaux et vecteurs de transmission (Ripoll *et al.*, 2009).

Au-delà de la transmission passive à partir des fomites ou de l'eau, l'hypothèse d'une transmission interhumaine directe est explorée. En effet, la dissémination de certains isolats dominants de *M. abscessus* au sein des populations de patients CF et sa capacité à survivre sous forme d'aérosol suggèrent l'éventualité d'une transmission d'individu infecté à individu sain (Bryant *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2016; Bryant *et al.*, 2021; Ruis *et al.*, 2021). Des études supplémentaires sont cependant requises pour étayer de manière concluante cette hypothèse.

B) Réponse immunitaire face à l'infection

L'infection pulmonaire à *M. abscessus* débute par l'entrée de la bactérie dans les voies respiratoires et sa migration jusqu'aux bronches (Figure 6).

D'après plusieurs publications, c'est le morphotype S, décrit comme le variant environnemental, qui serait responsable de la phase initiale de colonisation des voies respiratoires. En effet, il est le variant principalement isolé lors des premières années d'infection, avant d'être progressivement remplacé par le morphotype R (Jönsson *et al.*, 2007; Catherinot *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2016). Il est associé à une infection silencieuse liée à l'expression de GPL à sa surface qui masquent la détection des lipides immunomodulateurs de l'enveloppe, tels que les PIM, par les récepteurs TLR2 des cellules épithéliales pulmonaires, retardant l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte (Roux *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2011). Au sein des voies respiratoires des patients CF, l'accumulation de mucus et la diminution des mouvements mucociliaires viennent s'ajouter à la non-activation de la réponse immunitaire innée pour empêcher l'élimination de la bactérie. *M. abscessus* se retrouve alors dans un environnement pulmonaire au sein duquel il peut proliférer librement. Il semblerait qu'il tire également profit de l'environnement oxydant associé à la mucoviscidose pour accélérer sa multiplication (Oberley-Deegan *et al.*, 2010).

Une fois la colonisation des voies respiratoires engagée, *M. abscessus* est détecté par les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages. À ce stade, les données publiées sur des macrophages humains ou murins ou sur le modèle poisson-zèbre suggèrent un comportement différent des deux morphotypes (Figure 6).

Sous sa forme S, *M. abscessus* est facilement phagocyté par les macrophages alvéolaires (Bernut *et al.*, 2014b; Roux *et al.*, 2016). Il limite l'acidification du phagosome et sa maturation en phagolysosome, induisant un défaut de déclenchement de l'apoptose dans 50% des cas (Roux *et al.*, 2016). Malgré une plus faible induction que le morphotype R, le variant S stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), par les macrophages (Bernut *et al.*, 2016). La production de

cette cytokine favorise le recrutement d'autres cellules immunitaires, dont celles de la réponse immunitaire adaptative, telles que les neutrophiles ou les lymphocytes T. Comme démontré dans le modèle du poisson-zèbre, ce recrutement contribue à l'établissement d'une structure multicellulaire organisée, le granulome, permettant généralement de contenir l'infection mycobactérienne (Ulrichs and Kaufmann, 2006; Rottman *et al.*, 2007; Bernut *et al.*, 2016). Il se met alors en place une infection chronique (Figure 6).

Contrairement au morphotype S, le variant R est plus difficilement phagocyté par les macrophages en raison de son organisation en cordes multicellulaires (Bernut *et al.*, 2014b; Roux *et al.*, 2016). L'absence de GPL à sa surface induit une réponse pro-inflammatoire (production de TNFα) plus importante que pour le variant S en facilitant sa reconnaissance par les récepteurs TLR2 des macrophages et des cellules épithéliales pulmonaires (Nessar *et al.*, 2011; Roux *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2011). Le variant R est donc lui aussi en mesure de favoriser la formation des granulomes. Cependant, contrairement au variant S qui reste contenu dans les granulomes, le variant R se multiplie efficacement dans les macrophages (Nessar *et al.*, 2011) et induit l'apoptose de la majorité (90%) d'entre eux (Roux *et al.*, 2016). Cette propriété pro-apoptotique favorise sa libération dans l'environnement sous une forme difficilement phagocytable et entraine la formation de granulomes nécrotiques incapables de contenir l'infection (Bernut *et al.*, 2014b; Roux *et al.*, 2016; Kam *et al.*, 2022). Il se met alors en place une infection aigüe (Figure 6).

Bien que les déclencheurs biologiques ne soient pas connus, le variant S de *M. abscessus* peut subir une transition irréversible vers sa variante rugueuse. Cet évènement se produit avec une fréquence de 1 bactérie sur 10^5-10^6 bactéries chez les patients atteints de mucoviscidose ou dans le modèle murin (Howard, 2006; Rottman *et al.*, 2007; Catherinot *et al.*, 2009). Cette transition S vers R entraine la déstructuration massive des tissus granulomateux et se traduit par le déclenchement d'une infection aigüe hypervirulente (Figure 6) (Catherinot *et al.*, 2007). Chez d'autres espèces mycobactériennes, telles que *M. tuberculosis, M. kansasii* ou *M. avium*, l'existence sous un morphotype rugueux augmente également la virulence de l'infection (Belisle and Brennan, 1989; Torrelles *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2006; Julián *et al.*, 2010; Kalsum *et al.*, 2017; Nishimura *et al.*, 2020).

Chez les patients CF, le maintien de l'infection sous une forme chronique semble compromis. En effet, des données obtenues sur des poissons-zèbres déficients en CFTR suggèrent que la perte d'activité du canal entraîne une diminution de production des défenses oxydantes et de l'activité bactéricide des macrophages. La prolifération bactérienne intracellulaire favorise alors la lyse des macrophages ce qui est corrélé avec une diminution du recrutement des neutrophiles. Par conséquent, les bactéries se disséminent plus facilement dans l'environnement extracellulaire, entrainant la rupture du granulome et la mise en place d'une infection aigüe aggravant les conditions pulmonaires des individus CF (Bernut *et al.*, 2019).

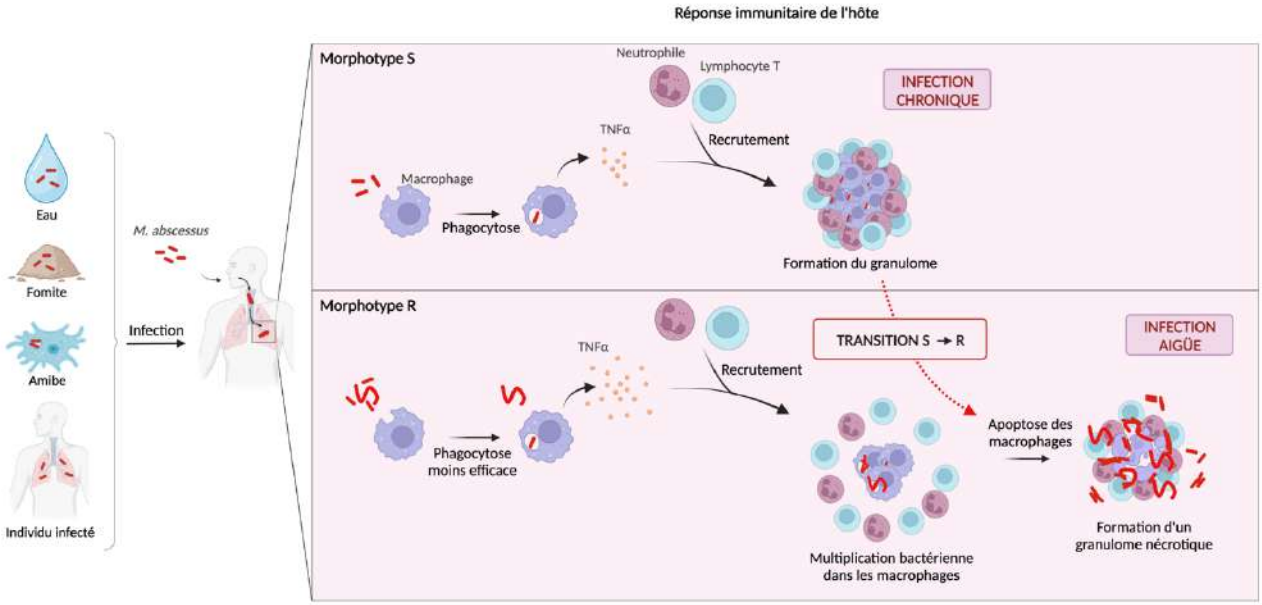


Figure 6. *Cycle infectieux des morphotypes S et R de M. abscessus.*

Les voies de transmission de M. abscessus sont pour l'instant inconnues. Cette mycobactérie survivant dans l'environnement, il est possible que la transmission s'établisse suite à une exposition à des échantillons d'eau ou de sols contaminés, à l'exposition à du matériel médical mal stérilisé ou à l'exposition à des amibes ou des individus infectés.
Au contact des cellules immunitaires se trouvant dans les voies respiratoires, les deux morphotypes de M. abscessus adoptent des comportements différents. La phagocytose du variant S par les macrophages stimule la production de cytokines (TNFα) nécessaires au recrutement d'autres cellules immunitaires (neutrophiles et lymphocytes) et à la formation du granulome. La formation du granulome empêche la propagation de la bactérie qui reste viable, et entraîne une infection chronique. La phagocytose du morphotype R se produit de manière moins efficace en raison de son organisation en cordes multicellulaires. De nombreuses bactéries restent dans l'environnement extracellulaire. L'absence de GPL à la surface du variant R entraîne une activation plus importante de la réponse immunitaire innée ainsi qu'une plus grande sécrétion de TNFα. Les neutrophiles et lymphocytes sont alors recrutés au site de l'infection pour former le granulome. Cependant, la multiplication du variant R dans les cellules phagocytaires entraîne l'apoptose des macrophages et conduit à la formation d'un

granulome nécrotique et à la dissémination de la bactérie dans l'organisme. L'infection devient aigüe en raison de la colonisation de l'organisme par la bactérie. A la suite d'un stimulus inconnu, le variant S contenu dans les granulomes peut transitionner vers un morphotype rugueux en accumulant des mutations dans le locus des GPL. Le granulome initialement stable devient nécrotique et l'infection chronique se transforme en infection aigüe.

III. Modèles d'études actuels et futurs des infections à *M. abscessus*

Afin de mieux comprendre l'établissement et la physiopathologie de l'infection par *M. abscessus* chez l'Homme, différents modèles cellulaires et animaux ont été développés (Bernut *et al.*, 2017).

A) Les amibes comme réservoirs environnementaux

Des études réalisées sur l'amibe *Ancathamoeba castellanii* proposent cet organisme unicellulaire comme un réservoir environnemental de *M. abscessus* (Ripoll *et al.*, 2009; Bakala N'Goma *et al.*, 2015). La surexpression de certains gènes de virulence, tels que *MAB_0555* codant la phospholipase C (PLC), après passage dans ce modèle, se traduit ainsi par une meilleure capacité d'infection pulmonaire chez la souris ou une virulence accrue au sein des macrophages. Il est ainsi proposé que le passage de *M. abscessus* dans ce réservoir environnemental lui confère un avantage pour l'infection de son hôte humain (Bakala N'Goma *et al.*, 2015; Dubois *et al.*, 2019).

L'avantage du modèle amibe est qu'il permet de facilement étudier les interactions entre un organisme procaryote et un organisme eucaryote (Shi *et al.*, 2021). Dans le cas de *M. abscessus*, il permet d'étudier ses facteurs de virulence dans son environnement naturel.

Cependant, bien qu'il existe chez les amibes des similitudes avec les mécanismes intracellulaire d'élimination des bactéries chez l'Homme (par exemple la phagocytose, la maturation du phagosome en phagolysosome et la production de ROS), les limites du modèle sont l'absence des différents types cellulaires permettant de reproduire la réponse immunitaire innée ou adaptative de l'hôte (Shi *et al.*, 2021).

B) Les macrophages comme modèle d'étude de la réponse immunitaire innée

L'utilisation des macrophages humains ou murins a permis de décomposer une partie des mécanismes impliqués dans la réponse immunitaire précoce lors d'une infection par *M. abscessus* et de mettre en évidence les différences immunologiques des deux morphotypes (voir Chapitre II, Partie III, B). Ainsi, le variant R favorise une réponse pro-inflammatoire des macrophages en comparaison du variant S, du fait de sa plus forte reconnaissance par les récepteurs de l'immunité TLR2 (Rhoades *et al.*, 2009; Nessar *et al.*, 2011; Roux *et al.*, 2016; Clary *et al.*, 2018).

L'avantage du modèle macrophage est qu'il peut facilement être manipulé génétiquement pour reproduire des mutations de certaines maladies génétiques, dont la mucoviscidose. Roux et ses collaborateurs ont ainsi démontré que la perte d'activité du canal CFTR associée à la mutation $CFTR^{\Delta F508}$ la plus fréquemment retrouvée chez les patients CF, n'impactait pas la croissance intracellulaire de *M. abscessus* (Roux *et al.*, 2016).

Ce modèle présente cependant quelques limitations. L'une d'elles est que le macrophage n'est pas le seul type cellulaire rencontré par *M. abscessus* lorsqu'il colonise les voies respiratoires. Il rencontre également les cellules épithéliales, les neutrophiles ou les lymphocytes (voir Chapitre II, Partie III, B). Ainsi la simplicité de ce modèle ne permet qu'une étude partielle des interactions entre la bactérie et les cellules immunitaires de l'hôte.

C) La souris comme modèle d'étude des infections mycobactériennes

La souris est l'un des modèles animaux les plus fréquemment utilisés dans la modélisation des infections mycobactériennes, en particulier par *M. tuberculosis*. Il permet l'étude de la réponse immunitaire eucaryote, de l'efficacité de certains médicaments ou candidats vaccins, ainsi que l'étude phénotypique de diverses mutations génétiques bactériennes (Flynn, 2006).

Lorsque des souris immunocompétentes sont infectées par *M. abscessus*, la clairance de l'infection est atteinte dans les premières semaines. Il est par conséquent nécessaire de travailler avec des lignées murines immunodéprimées pour prolonger les cinétiques d'infection (Ordway *et al.*, 2008; Lerat *et al.*, 2014). De telles lignées ont permis l'identification de facteurs centraux au contrôle de l'infection causée par *M. abscessus*, tels que les lymphocytes T et les cytokines TNF et INF (Rottman *et al.*, 2007). Le modèle murin permet également de mesurer l'efficacité de certaines molécules antibiotiques *in vivo* lors d'une infection par *M. abscessus* (Lerat *et al.*, 2014; Pandya *et al.*, 2019; Dick *et al.*, 2020; Maggioncalda *et al.*, 2020).

La protéine CFTR humaine présentant une identité de séquence primaire de 78% avec la protéine murine, des lignées de souris « humanisées » censées reproduire les caractéristiques de la mucoviscidose ont été construites (Lavelle *et al.*, 2016). Cependant, comme décrit dans la revue publiée par Lavelle et ses collaborateurs (2016), les manifestations phénotypiques des modèles murins présentant des mutations pourtant pertinentes dans le gène *CFTR*, ne sont pas similaires à celles de l'Homme. Par exemple, le déclenchement de l'inflammation pulmonaire ne se fait pas de manière spontanée. Ainsi, le principal inconvénient du modèle souris est qu'il ne récapitule que partiellement les caractéristiques pulmonaires de la mucoviscidose.

D) L'embryon de poisson-zèbre comme modèle des premières étapes de l'infection

Les embryons de poissons-zèbres sont également très utilisés dans l'étude de la physiopathologie des infections par *M. abscessus*. Leur transparence permet une visualisation facilitée et non-invasive de la prolifération bactérienne. Ils ont permis la mise en évidence de plusieurs différences entre les morphotypes S et R de *M. abscessus*, dont la capacité du variant R à échapper au système immunitaire grâce à sa capacité à former des cordes (Bernut *et al.*, 2014a; Bernut *et al.*, 2015). Ces modèles permettent également de visualiser le recrutement des neutrophiles et macrophages au site de l'infection et mettent en évidence le rôle de certaines cytokines dans la formation et le maintien des granulomes

(Bernut *et al.*, 2016). Enfin, ils offrent également la possibilité de mesurer *in vivo* l'efficacité des antibiotiques *in vivo* dans le traitement d'une infection aigüe à *M. abscessus* et sont proposés comme une alternative à l'*in vitro* dans la mise au point de stratégies thérapeutiques contre des isolats cliniques (Bernut *et al.*, 2014b; Dupont *et al.*, 2017).

Récemment, une lignée d'embryons de poissons-zèbres délétés du gène *CFTR* a été construite pour étudier la contribution du canal CFTR dans l'immunité innée contre *M. abscessus* (Bernut *et al.*, 2019). Les données rapportées indiquent que la perte du canal diminue l'activité bactéricide des macrophages entrainant une prolifération bactérienne accrue dans l'organisme (voir Chapitre II, Partie III, B).

Bien que les avantages de ce modèle soient multiples, il présente des inconvénients non négligeables dans la modélisation d'une infection par un pathogène pulmonaire tel que *M. abscessus* (Bernut *et al.*, 2017). Le premier est que contrairement au poisson-zèbre mature, les embryons ne présentent pas d'immunité adaptative. Ils ne peuvent donc pas être utilisés dans un contexte d'infection chronique. Le deuxième inconvénient est que par rapport aux modèles mammifères, les poissons-zèbres présentent des branchies et non des poumons, ne permettant pas la modélisation d'une infection pulmonaire.

E) Les organoïdes comme modèles futurs de l'infection dans un contexte de mucoviscidose

Récemment, un nouveau modèle d'étude eucaryote a été mis au point. Il s'agit des organoïdes, des structures cellulaires en trois dimensions capables de récapituler les caractéristiques physiologiques de l'organe à partir duquel ils sont développés (Figure 7A). Ils peuvent modéliser de nombreux organes, tels que l'estomac, le foie ou encore les poumons en présentant une organisation similaire à la partie bronchiale des voies respiratoires humaines (Clevers, 2016; Sachs *et al.*, 2019).

Les organoïdes sont déjà utilisés en clinique afin d'étudier les interactions hôte-pathogènes et de modéliser des maladies génétiques (Clevers, 2016; Dutta and Clevers, 2017). Des organoïdes pulmonaires générés à partir de cellules souches de

patients atteints de mucoviscidose, permettent de récapituler de manière unique l'impact des mutations *CFTR* sur le dysfonctionnement pulmonaire, notamment l'accumulation de mucus et la diminution des mouvement ciliaires (Figure 7B) (Sachs *et al.*, 2019).

A ce jour, les organoïdes pulmonaires n'ont été utilisés que dans le cadre d'infections virales (Dutta and Clevers, 2017), cependant la récapitulation des caractéristiques pulmonaires de la mucoviscidose en fait des modèles de choix pour la modélisation d'une infection par *M. abscessus*. Leur utilisation pourrait amener de nouvelles informations sur l'étude des interactions hôte-pathogènes et la mise en place d'une stratégie thérapeutique efficace et personnalisée à chaque patient.

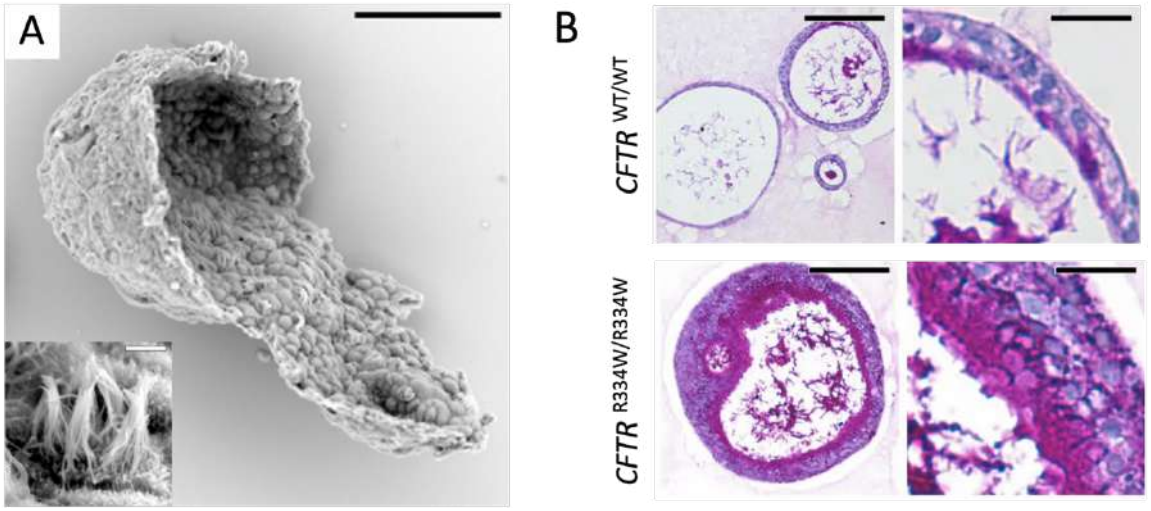


Figure 7. *Organoïdes pulmonaires d'individu sain ou de patient atteint de mucoviscidose.*

A. Images de microscopie électronique à balayage d'un organoïde pulmonaire et des cils présents au pôle apical de ses cellules épithéliales. Barre : 50 µm (structure complète) et 2 µm (détails des cils). B. Sections histologiques d'organoïdes sains (panel du haut) et issus de patient atteint de mucoviscidose présentant la mutation CFTR$^{R334W/R334W}$ (panel du bas). L'accumulation de mucus dans l'organoïde malade est mise en évidence par la coloration violette au PAS (Periodic Acid Shiff). Barre : 50 µm (structure complète) et 2 µm (détails). Issues de (Sachs et al., *2019).*

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec les Dr Stephen Leon-Icaza, Céline Cougoule et Etienne Meunier afin de mettre à profit l'utilisation des organoïdes pulmonaires dans l'étude de la sensibilité de *M. abscessus* aux antibiotiques et aux stress de l'hôte. Les données obtenues sont présentées dans la partie « Résultats et discussion » de ce manuscrit.

IV. Adaptation de *M. abscessus* aux stress lors de l'infection

A) Les différents stress rencontrés lors de l'infection

En tant que pathogène pulmonaire, *M. abscessus* fait face à divers environnements (Figure 6) et types de stress pendant son cycle infectieux (Figures 8 et 9) (Stallings and Glickman, 2010).

Lorsqu'il pénètre dans les voies respiratoires des individus, il reste exposé à des quantités élevées d'oxygène (pO2 = 60 à 150 mmHg contre ~150-160 mmHg dans l'atmosphère) et de composés oxydants issus de la pollution de l'air (ozone, azote, vapeurs d'essence ou fumée de tabac) pouvant altérer sa viabilité (Kumar *et al.*, 2011). Ce stress oxydatif est d'autant plus marqué chez les patients atteints de mucoviscidose où la production de molécules antioxydantes est moins efficace (Miranda-CasoLuengo *et al.*, 2016; Moliteo *et al.*, 2022).

En colonisant les voies respiratoires, *M. abscessus* se confronte également à des protéines et peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales et les neutrophiles, tels que les défensines ou les cathélicidines, jouant un rôle important dans la perturbation de la perméabilité membranaire de la bactérie (Méndez-Samperio, 2008). D'autres stress liés à l'infection proviennent de l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte et plus spécifiquement de la migration des cellules phagocytaires vers le site de l'infection. Lorsque *M. abscessus* est phagocyté par les macrophages, la fusion du phagosome avec les lysosomes entraîne une acidification de l'environnement au sein du phagolysosome, favorisant l'activation d'hydrolases (protéases ou lipases) et l'élimination de la bactérie (Hackam *et al.*, 1999). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'acidification du phagolysosome est perturbée, ce qui peut contribuer aux difficultés de ces individus à éradiquer une infection par *M. abscessus* (Di *et al.*, 2006). L'activation de la transcription de gènes codant les oxydes nitriques (NO) synthases iNOS/NOS2 ou la NADPH oxydase NOX2 contribue également à l'élimination de la bactérie dans les macrophages en générant des composés réactifs de l'oxygène (ROS, pour "Reactive

oxygen species") ou de l'azote (RNS, pour "Reactive nitrogen species") délétères pour la bactérie (Nicholson *et al.*, 1996; MacMicking *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2019).

Enfin, sous sa forme latente et non-réplicative au sein des granulomes, *M. abscessus* est également soumis à un stress multifactoriel lié non seulement à l'activité antibactérienne des macrophages infectés (acidification du pH et production de ROS et RNS), mais également à des conditions hypoxiques (pO2 = 1,9 mmHg) et des carences en nutriments et en fer (Figure 8) (Kumar *et al.*, 2011; Qualls and Murray, 2016; Kurthkoti *et al.*, 2017).

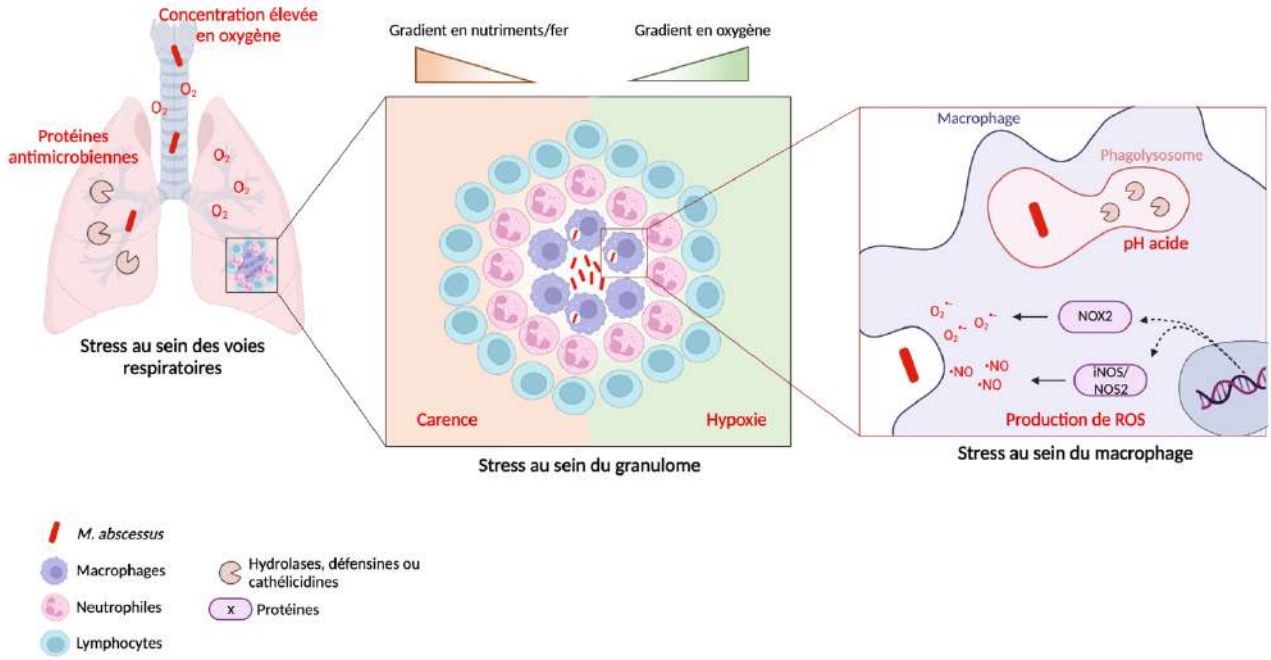


Figure 8. *Les différents stress rencontrés par M. abscessus lors d'une infection pulmonaire.*

L'entrée et la colonisation des voies respiratoires exposent M. abscessus à une forte concentration en oxygène et composés oxydants issus de la pollution de l'air. Il y rencontre également des protéines et des peptides antimicrobiens, tels que les défensives ou les cathélicidines, sécrétés par les cellules épithéliales et immunitaires de l'hôte. Au sein du granulome, M. abscessus est exposé à une carence en nutriments et en fer ainsi qu'à des conditions de croissance hypoxiques pouvant altérer sa viabilité. Enfin, dans les macrophages, la libération de ROS ou RNS l'expose à un stress oxydatif auquel s'ajoute également un pH acide au sein des phagolysosomes.

Dans le cadre du traitement de l'infection, *M. abscessus* subit également un stress lié à l'activité bactéricide d'un traitement antibiotique lourd s'étalant sur plus de 12 mois (voir Chapitre III, Partie A). La nature de ce stress peut dépendre de la fonction ciblée par l'antibiotique (Figure 9); par exemple, la traduction pour les macrolides et aminoglycosides ou l'assemblage du peptidoglycane pour les bêta-lactamines, mais aussi d'un processus commun à toutes les familles d'antibiotiques reposant sur la production de ROS (Kohanski *et al.*, 2007; Van Acker and Coenye, 2017). En effet, les antibiotiques induisent un stress oxydatif chez la bactérie en provoquant une hyperactivité en cascade de la chaîne respiratoire, du cycle de Krebs et de la réaction de Fenton, ce qui entraîne la production de ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$). Ces ROS hautement réactifs altèrent les molécules d'ADN, les protéines et les lipides de la cellule, contribuant ainsi, en conjonction avec l'inhibition de la cible directe des antibiotiques, à la mort de la bactérie (Figure 9).

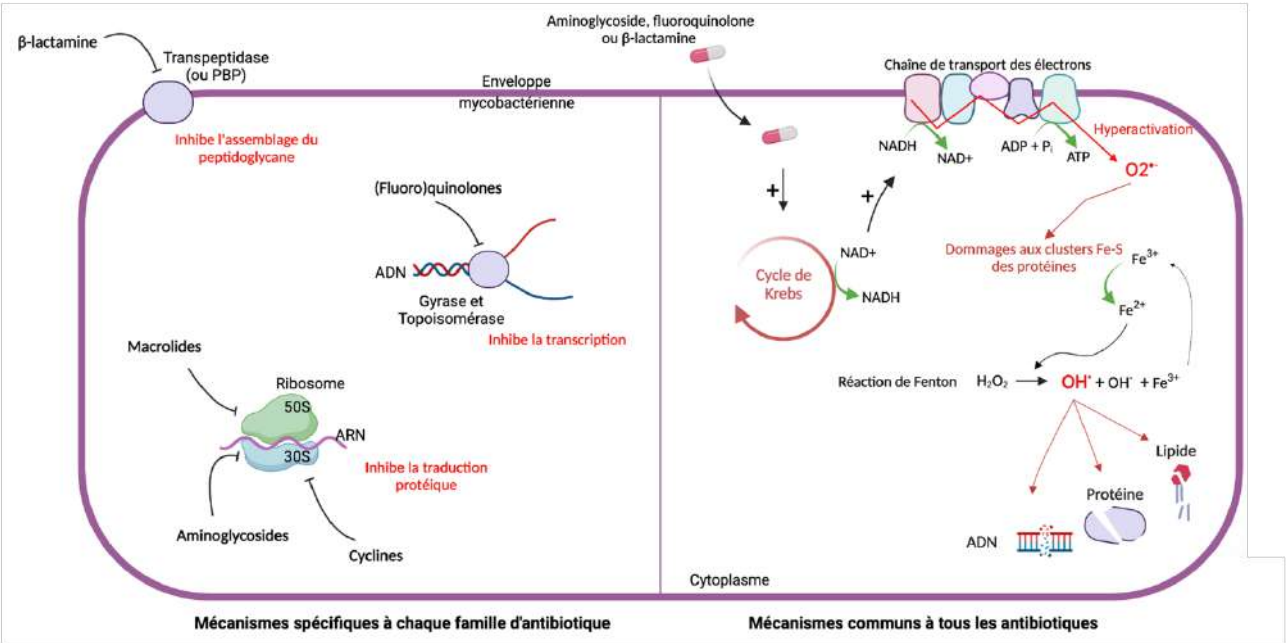


Figure 9. *Stress spécifiques et non spécifiques rencontrés par la bactérie lors d'un traitement antibiotique.*

L'exposition à un traitement antibiotique induit sur la bactérie une perturbation de différents processus cellulaires dont la nature est spécifique à chaque famille de molécules utilisées. Les antibiotiques entrainent également la mort de la bactérie par des mécanismes communs reposant sur la génération de ROS. Ce stress oxydatif médié par les antibiotiques fait intervenir une suractivation du cycle de Krebs et de la chaîne de transport des électrons, qui se traduit par la génération d'ions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) causant des dommages aux clusters fer-souffre des protéines. Au travers de la réaction de Fenton, les ions ferreux Fe^{2+} produits stimulent la production d'hydroxydes ($OH^{\bullet}$) capables de détruire les molécules d'ADN, protéines et lipides, conduisant à la mort de la bactérie.

L'induction du stress oxydatif par les antibiotiques, initialement décrite chez la bactérie modèle *Escherichia coli* (Van Acker and Coenye, 2017), semble être conservée chez les mycobactéries. En effet, l'exposition de *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis* à des antibiotiques tels que la rifampicine, l'isoniazide ou la moxifloxacine conduit à une augmentation significative de composés oxydés dans la cellule (Piccaro *et al.*, 2014; Nair *et al.*, 2019; Shee *et al.*, 2022). De plus, une perturbation de la chaîne respiratoire ou du cycle de Krebs coïncide avec une diminution de la sensibilité aux antibiotiques chez ces deux espèces, en accord avec leur rôle dans la production de ROS en réponse à un traitement antibiotique (Nandakumar *et al.*, 2014; Adolph *et al.*, 2022; Oh *et al.*, 2022).

L'induction d'un stress oxydatif apparait donc comme un mécanisme clé dans l'élimination des bactéries à la fois par les antibiotiques et par les défenses de l'hôte. Cependant, les mycobactéries telles que *M. tuberculosis* ou *M. abscessus* possèdent des mécanismes moléculaires sophistiqués leur permettant de contrôler le niveau de composés oxydants et d'assurer le maintien de l'homéostasie rédox.

B) Maintien de l'homéostasie rédox chez les mycobactéries

L'homéostasie redox désigne le maintien de la concentration intracellulaire en intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Ces composés oxydants, tels que l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxyde nitrique ($^{\bullet}NO$), sont produits dans la bactérie suite à l'activation du système immunitaire de l'hôte ou d'un traitement antibiotique (Figures 8 et 9). Ils oxydent les résidus cystéines ou méthionines des protéines, les acides gras insaturés ainsi que la base nucléique guanine de l'ADN et l'ARN, provoquant des dommages cellulaires tels que des cassures ADN ou la déstabilisation et dégradation des protéines et lipides de la cellule (Ezraty *et al.*, 2017; Poetsch, 2020). Le maintien de l'homéostasie rédox et de la concentration intracellulaire en ROS et RNS est ainsi primordial pour la survie bactérienne. Il repose sur la détection du stress oxydatif par des molécules senseurs, et sur le rétablissement de l'état redox initial par des molécules effectrices.

La plupart des espèces bactériennes, dont *E. coli*, détectent une perturbation de l'homéostasie rédox par les protéines senseurs OxyR et SoxR. Ce sont des régulateurs transcriptionnels dont l'activation en conditions de stress oxydatif permet la synthèse de protéines antioxydantes (Pomposiello and Demple, 2001). Il n'existe pas d'orthologue de SoxR chez les mycobactéries. Quant à OxyR, il est présent chez certaines espèces mycobactériennes, telles que *M. marinum*, *M. leprae*, *M. abscessus* (*MAB_4409*), ou *M. tuberculosis* mais non fonctionnel chez cette dernière et absent chez *M. smegmatis* (Deretic *et al.*, 1997; Pagán-Ramos *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent que d'autres types de protéines senseurs pourraient réguler l'homéostasie rédox des mycobactéries (Voskuil *et al.*, 2011; Cumming *et al.*, 2014). Ces senseurs, ainsi que les protéines effectrices mycobactériennes, sont discutées dans les prochains paragraphes.

i) Les protéines senseurs de l'homéostasie rédox mycobactérienne

Chez les mycobactéries, la détection d'un stress oxydatif est médiée principalement par les régulateurs transcriptionnels WhiB, les facteurs sigma, le système à trois composantes DosRST et les régulateurs FurA et IdeR.

Les protéines WhiB

Les protéines WhiB constituent une famille de protéines exclusivement retrouvées chez les Actinobactéries telles que les Streptomycètes, les Mycobactéries et les Corynébactéries (Bush, 2018; Elchennawi and Ollagnier de Choudens, 2022). *M. tuberculosis* exprime sept protéines WhiB numérotées de 1 à 7. Des orthologues à ces protéines sont retrouvées chez *M. abscessus* pour cinq d'entre elles (Tableau 1).

Tableau 1 : Protéines WhiB de *M. tuberculosis* et leurs orthologues chez *M. abscessus*

Protéine	Locus	
	M. tuberculosis	*M. abscessus*
WhiB1	*Rv3219*	*MAB_3539*
WhiB2	*Rv3260c*	*MAB_3606c, MAB_1756*
WhiB3	*Rv3416*	*MAB_3726, MAB_3446, MAB_4343c*
WhiB4	*Rv3681c*	*MAB_0409*
WhiB5	*Rv0022c*	-
WhiB6	*Rv3862c*	-
WhiB7	*Rv3197A*	*MAB_3508c*

Les protéines WhiB sont des régulateurs transcriptionnels. Chez *M. tuberculosis*, toutes les protéines WhiB, à l'exception de WhiB3, régulent leur propre transcription en plus de l'expression de nombreux gènes (Rybniker *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010; Casonato *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2021; Zhai *et al.*, 2022). Ces protéines présentent un domaine de liaison à l'ADN (« AT-hook ») au niveau de leur extrémité C-terminale ainsi qu'un motif central conservé composé de quatre résidus cystéines impliqués dans la fixation d'un cluster fer-souffre [4Fe-4S] (Figure 10A) (Raghunand and Bishai, 2006; Burian *et al.*, 2012a; Wan *et al.*, 2021; Zhai *et al.*, 2022).

En conditions réductrices, les protéines WhiB existent principalement sous une forme holo au sein de laquelle, les quatre cystéines fixent un cluster [4Fe-4S] nécessaire aux interactions avec des facteurs de transcription sigma et au recrutement de l'ARN polymérase (Figure 10B) (Kudhair *et al.*, 2017; Bush, 2018; Elchennawi and Ollagnier de Choudens, 2022). Dans des conditions de stress oxydatif, les clusters [4Fe-4S] sont détruits par nitrosylation ou oxydation et la forme apo-WhiB devient prédominante. L'absence des clusters [4Fe-4S] favorise la formation de ponts disulfures entre les cystéines de plusieurs protéines apo-WhiB et libère leur extrémité C-terminale permettant l'établissement de liaisons à l'ADN plus stables (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Chawla *et al.*, 2012; Kudhair *et al.*, 2017; Zhai *et al.*, 2022). Ce changement conformationnel modifie la spécificité d'interaction des protéines WhiB avec l'ADN et permet une modification de l'expression des gènes (Figure 10B). Il est suggéré que la forme apo-WhiB qui présente une

forte affinité pour l'ADN malgré son incapacité à interagir avec le facteur sigma SigA, nécessaire au recrutement de l'ARN polymérase, agisse comme un répresseur transcriptionnel (Smith *et al.*, 2010; Kudhair *et al.*, 2017; Zhai *et al.*, 2022). Certaines protéines apo-WhiB présentent néanmoins une fonction d'activateur (Singh *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). Dans ce contexte, bien qu'il n'existe pas à ce jour de preuve expérimentale, il est envisageable que la forme apo-WhiB puisse être reconnue par des facteurs sigmas alternatifs à SigA, permettant la transcription de certains gènes uniquement en conditions de stress oxydatifs. Cette régulation permettrait l'expression de protéines effectrices nécessaires au maintien de l'homéostasie rédox uniquement lorsque les conditions environnementales les nécessitent.

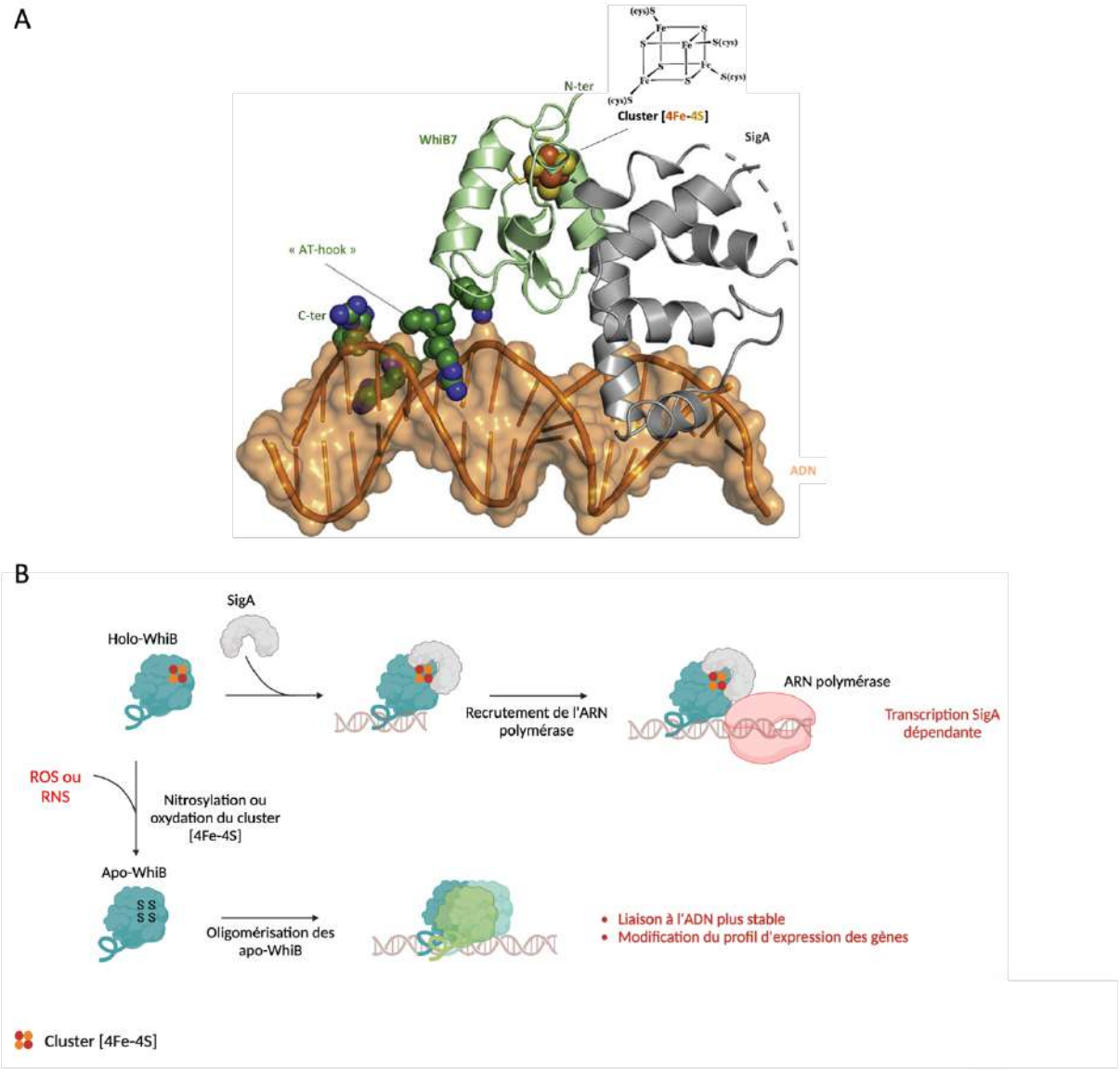


Figure 10. *L'interaction entre SigA et les protéines WhiB est dépendante de l'état rédox de la cellule.*

A. Structure de la forme holo-WhiB7 (en vert) fixant un cluster [4Fe-4S] au niveau de ses quatre résidus cystéines. La liaison à l'ADN (en orange) au niveau d'une région riche en AT est assurée par le domaine C-terminal (« AT-hook ») de la protéine WhiB7. La présence du cluster [4Fe-4S] favorise l'interaction avec le facteur SigA (en gris), permettant le recrutement de l'ARN polymérase sur la molécule d'ADN. (Wan et al., 2021). B. Les interactions entre une protéine WhiB, un cluster [4Fe-4S], et SigA sont dépendantes des conditions d'oxydation. En conditions réductrices, la forme holo-WhiB est prédominante dans la cellule. Celle-ci fixe un cluster [4Fe-4S] au niveau de ses quatre résidus cystéines conservés, permettant une interaction avec SigA. L'extrémité C-terminale de WhiB assure la fixation du complexe au niveau de séquences promotrices riches en AT. La présence de SigA sur le promoteur favorise le recrutement de l'ARN polymérase et permet une transcription des gènes SigA-dépendante. En conditions oxydantes, lors de l'exposition à des ROS ou RNS, la nitrosylation ou oxydation des clusters [4Fe-4S] libère les groupements souffre des quatre résidus cystéines de la protéine WhiB et permet son passage sous une forme apo. L'absence des clusters favorise les interactions entre plusieurs protéines apo-WhiB et la formation de ponts disulfures entre leurs résidus cystéines. Leur oligomérisation en dimère ou tétramère entraine l'établissement de liaisons à l'ADN plus stables responsables d'une modification du profil d'expression des gènes. Les formes apo-WhiB peuvent être responsables à la fois d'une répression ou d'une activation de la transcription par des mécanismes encore mal caractérisés.

Parmi les sept protéines WhiB de *M. tuberculosis*, quatre sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie rédox (WhiB3, WhiB4, WhiB6 et WhiB7) en permettant la transcription de gènes codant pour des protéines effectrices. Ces protéines effectrices sont présentées plus en détails dans la partie ii) de ce chapitre.

Ainsi, lors de l'exposition à un environnement oxydatif, la protéine WhiB3 de *M. tuberculosis* active l'expression des gènes de biosynthèse de l'ergothionéine, un thiol participant à la détoxification des ROS (Saini *et al.*, 2016). En conditions réductrices, WhiB4 agit comme un répresseur de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la réponse aux stress oxydatifs. Cependant, lors d'une exposition aux ROS, la forme apo-WhiB4 devient majoritaire, entraînant une meilleure efficacité de fixation sur son propre promoteur et une auto-régulation négative de l'expression de son gène. La diminution de quantité de protéines WhiB4 dans la cellule, favorise la dérépression des gènes *ahpCD* permettant la synthèse des alkyl hydropéroxydases (Chawla *et al.*, 2012; Chawla *et al.*, 2018). WhiB6 participe aussi au maintien de l'homéostasie redox. Les informations actuellement disponibles indiquent que la forme apo-WhiB6 active l'expression du régulon DosR, un acteur du maintien de l'homéostasie rédox mycobactérienne (Voir ci-dessous) (Chen *et al.*, 2016).

WhiB7 est quant à elle impliquée dans la modulation de l'expression des mycothiols chez *M. smegmatis*, un thiol participant à la détoxification des ROS (Burian *et al.*, 2012b). Chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus,* WhiB7 module également l'expression de gènes codant pour des protéines effectrices de l'homéostasie rédox, telles que des oxydoréductases, des alkyls hydropéroxydases et des protéines de réduction des ponts disulfures (Morris *et al.*, 2005; Hurst-Hess *et al.*, 2017; Dubois *et al.*, 2019). Actuellement, le lien entre l'état d'oxydo-réduction de la protéine WhiB7 et la régulation de l'expression de ces gènes n'est pas clairement établi. Il semblerait que l'interaction de la forme holo-WhiB7 avec SigA soit nécessaire à l'activation de la transcription de *whiB7* et des gènes de son régulon (Burian *et al.*, 2013), et que cette interaction soit abolie en conditions oxydantes en raison de la perte de fixation des clusters [4Fe-4S]. Un article récent propose cependant que la sensibilité à l'oxydation du cluster [4Fe-4S] soit réduite lorsque la protéine WhiB7 forme un complexe avec le facteur SigA et l'ARN polymérase, permettant alors sa propre transcription et celle de son régulon, même en présence d'un stress oxydatif (Wan *et al.*,

2021). Cette protection à l'oxydation semble être spécifique de WhiB7 et liée à l'absence d'un résidu aromatique dans la séquence protéique de WhiB7 en comparaison de WhiB1 (Wan *et al.*, 2021).

Les facteurs sigma et anti-sigma

Les facteurs sigma constituent des sous-unités de l'ARN polymérase impliquées dans la reconnaissance des promoteurs. Le génome de *M. tuberculosis*, code pour treize facteurs sigma annotés de A à M. Tous les facteurs sigma de *M. tuberculosis*, à l'exception de SigK, sont conservés chez *M. abscessus*. Cette bactérie exprime sept protéines sigma supplémentaires n'ayant pas d'orthologue chez *M. tuberculosis* (Tableau 2). Cette particularité à posséder de nombreux facteurs sigma est également retrouvée chez *M. smegmatis* et semble liée à la capacité des espèces de MNT à s'adapter à différents environnements (Rodrigue *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Facteurs sigma et anti-sigma de *M. tuberculosis* et leurs orthologues chez *M. abscessus*

Facteur sigma/anti-sigma	Gène(s)	Fonctions	Orthologues chez *M. abscessus*
SigA/-	*Rv2703/-*	Transcription des gènes de ménage et virulence	*MAB_3009/-*
SigB/-	*Rv2710/-*	Adaptation aux stress (antibiotique, oxydatif, hypoxie, carence en nutriments)	*MAB_3028/-*
SigC/-	*Rv2069/-*	Virulence	*MAB_3428c/-*
SigD/RsdA	*Rv3414c/Rv3413c*	Virulence et adaptation aux stress (carence en nutriments)	*MAB_3224c/MAB_3723c*
SigE/RseA	*Rv1221/Rv1222*	Virulence et adaptation aux stress (antibiotique, oxydatif)	*MAB_1362/MAB_1363*
SigF/RsbW	*Rv3286c/Rv3287c*	Adaptation aux stress (antibiotique, oxydatif, carence en nutriments)	*MAB_2511/MAB_2513c*
SigG/RsgA	*Rv0182c/Rv0181c*	Détoxification de la cellule	*MAB_4553/-*
SigH/RshA	*Rv3223c/Rv3221A*	Adaptation aux stress oxydatifs, régule l'expression de SigB et SigE	*MAB_3543c/MAB_3542c*
SigI/-	*Rv1189/-*	Résistance à l'isoniazide (régule la transcription de *katG*)	*MAB_2999c/-*
SigJ/-	*Rv3328c/-*	Adaptation aux stress oxydatifs	*MAB_3678c/-*
SigK/RskA	*Rv0445c/Rv0444c*	Virulence	-
SigL/RslA	*Rv0735/Rv0736*	Virulence	*MAB_2163/MAB_2164*
SigM/RsmA	*Rv3911/Rv3912*	Virulence et métabolisme du fer	*MAB_4938/MAB_4939*
	-		*MAB_1248/-*
	-		*MAB_4200/-*
	-		*MAB_1126c/-*
	-		*MAB_4459c/-*
	-		*MAB_3888/-*
	-		*MAB_4652/MAB_4653*
	-		*MAB_4733/-*

Comme indiqué précédemment, toutes les protéines WhiB interagissent avec des facteurs sigma, en particulier SigA, pour permettre le recrutement de l'ARN polymérase et la transcription des gènes de leur régulon (Guiza Beltran *et al.*, 2022). De ce fait les facteurs sigma participent au maintien de l'homéostasie rédox (Figure 10).

De plus, l'expression de certains facteurs sigma est régulée en réponse à un stress oxydatif. Par exemple, les facteurs SigE, SigF, SigH et SigJ de *M. tuberculosis* sont surexprimés en conditions oxydantes ou lors de traitements antibiotiques (Rodrigue *et al.*, 2006; Sachdeva *et al.*, 2010). Leur surexpression active l'expression de systèmes senseurs ou de protéines effectrices impliquées dans l'homéostasie rédox. Ainsi SigH induit l'expression des facteurs *sigB* et *sigE* quand SigB favorise la transcription de *furA* et *ideR*, d'autres systèmes senseurs de l'état rédox (voir les paragraphes suivants) (Raman *et al.*, 2001; Fontán *et al.*, 2009). SigH régule également l'expression du système effecteur thiorédoxine/thiorédoxine réductase (Raman *et al.*, 2001). SigE participe à la régulation de l'expression du système effecteur *katG,* qui code pour une catalase-peroxydase (Hu *et al.*, 2016), et de divers gènes impliqués dans la résistance naturelle des mycobactéries aux antibiotiques (Pisu *et al.*, 2017). La croissance de *M. abscessus* en milieu synthétique et oxydatif SCFM2, dont la composition nutritionnelle mime celle des expectorations de patients atteints de mucoviscidose, induit la surexpression des facteurs sigma SigB, SigE, SigH et SigF, confirmant également leur importance dans l'adaptation aux stress et plus particulièrement au stress oxydatif chez cette mycobactérie (Miranda-CasoLuengo *et al.*, 2016).

Les autres facteurs sigma sont quant à eux davantage impliqués dans la virulence ou la physiopathologie des infections bactériennes (Tableau 2) (Raman *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2004; Calamita *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2012; Gaudion *et al.*, 2013; Manganelli, 2014; Singha *et al.*, 2023; Sankey *et al.*, 2023).

L'activité transcriptionnelle des facteurs sigma est également soumise à une régulation post-traductionnelle impliquant des protéines antagonistes, appelées facteurs anti-sigma (Thakur *et al.*, 2010a). Exprimés en opéron avec leurs facteurs correspondants, les facteurs anti-sigma forment des complexes stables avec les facteurs sigma, limitant le recrutement de l'ARN polymérase. Chez *M. tuberculosis*, huit facteurs anti-sigma ont été

identifiés (Tableau 2). Pour la plupart des couples sigma/anti-sigma, ces interactions sont dépendantes de l'état rédox de la cellule. Ainsi, en conditions oxydantes, les couples SigE/RseA, SigH/RshA, et SigL/RslA sont déstabilisés (Song *et al.*, 2003; Barik *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2010b) alors que les interactions entre SigK/RskA et SigF/UsfX y sont favorisées (Beaucher *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2009; Shukla *et al.*, 2014). La libération de SigE et SigH lors d'un stress oxydatif permet la transcription de gènes codant pour des systèmes effecteurs de l'homéostasie rédox pour assurer un retour vers un état favorable à la survie mycobactérienne.

Une recherche dans la banque de données spécialisée Mycobrowser, suggère également la présence de six facteurs anti-sigma chez *M. abscessus* (Tableau 2). Cependant, à l'exception du complexe MAB_3543c/MAB_3542c (Ng and Ngeow, 2022), aucune preuve expérimentale d'interaction entre ces facteurs et les facteurs sigma n'est actuellement disponible.

Le système DosRST

Le système DosR(ST) pour « Dormancy Survival Regulator » est le troisième des systèmes senseurs majoritaires impliqué dans le maintien de l'homéostasie rédox mycobactérienne (Boon and Dick, 2002). Ce système de régulation à trois composantes comprend deux histidines kinases, DosS et DosT, capables de phosphoryler une protéine régulatrice DosR.

Chez *M. tuberculosis*, le régulon Dos est activé lors de l'entrée de la bactérie dans les phagosomes des macrophages ou lors d'un stress oxydatif ou hypoxique (Voskuil *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Sevalkar *et al.*, 2022). L'expression de la cinquantaine de gènes du régulon Dos permet la synthèse de nitro- ou oxydo-réductases, ferrédoxines et diverses protéines de réponse aux stress (« Universal stress proteins »), qui assurent la détoxification des ROS et RNS mais également l'entrée de la bactérie dans un état non-réplicatif assurant sa persistance chez l'hôte (Kumar *et al.*, 2007; Converse *et al.*, 2009; Gerasimova *et al.*, 2011; Selvaraj *et al.*, 2012).

Le régulon Dos étant conservé chez les mycobactéries non-tuberculeuses, l'exposition de *M. abscessus* à un environnement hypoxique, physiologiquement proche de celui des poumons de malades atteints de mucoviscidose, ou oxydatif comme celui rencontré dans les macrophages, favorise également son activation (Miranda-CasoLuengo *et al.*, 2016; Dubois *et al.*, 2019; Belardinelli *et al.*, 2022; Simcox *et al.*, 2023). Sur la base d'une analyse bio-informatique, 12 gènes ont été initialement identifiés dans le régulon DosR de *M. abscessus*. La construction d'un double mutant délété des composantes DosR et DosS a cependant permis de réévaluer ce nombre en identifiant finalement 38 (Belardinelli *et al.*, 2022) ou 127 gènes (Simcox *et al.*, 2023). Tout comme chez *M. tuberculosis*, le régulon DosR de *M. abscessus* contribue au maintien de l'homéostasie rédox en permettant l'expression de plusieurs protéines effectrices pour le rétablissement d'un environnement oxydo-réducteur favorable (Gerasimova *et al.*, 2011; Simcox *et al.*, 2023).

Autres systèmes senseurs

D'autres systèmes senseurs de l'homéostasie rédox existent chez les mycobactéries. Il s'agit des régulateurs transcriptionnels FurA et IdeR. FurA module la production des alkyls hydropéroxydes réductases AhpC et AhpD (Eckelt *et al.*, 2015) alors que IdeR contrôle l'expression de la catalase-peroxydase KatG et de la superoxyde dismutase SodA (Dussurget *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2002; Anand *et al.*, 2021).

ii) Les protéines effectrices de l'homéostasie rédox mycobactérienne

La détection d'un stress oxydatif par les protéines senseurs précédemment décrites permet la synthèse de nombreuses molécules et protéines appelées génériquement oxydoréductases, nitroréductases ou ferrédoxines. Ces protéines effectrices de l'homéostasie rédox permettent la détoxification des ROS et des RNS en catalysant le

transfert d'électrons d'une molécule réduite vers une molécule oxydée (Cumming *et al.*, 2014).

Les paragraphes suivants présentent les différentes protéines effectrices régulées par les systèmes senseurs de l'homéostasie rédox mycobactérienne, ainsi que le rôle du mycothiol et de l'ergothionéine comme principales molécules donneuses d'électrons chez les mycobactéries.

Les thiorédoxines

Les thiorédoxines (Trx) sont des protéines de la famille des oxydoréductases qui réduisent les ponts disulfures des protéines crées suite à l'exposition de la bactérie à un environnement oxydant, pour restaurer leurs fonctions (Akif *et al.*, 2008). Retrouvées au nombre de trois chez *M. tuberculosis,* les thiorédoxines TrxA (*Rv1470*), TrxB (*Rv1471*) et TrxC (*Rv3914*) assurent leur fonction disulfure réductase grâce à la présence de deux résidus cystéines au niveau de leur site catalytique (Akif *et al.*, 2008). Elles réduisent des composés oxydants ou des molécules oxydées en cédant un de leurs électrons et en formant un pont disulfure au niveau de leurs résidus cystéines. Cet électron leur est ensuite restitué par l'intervention de la thiorédoxine réductase (TrxR codée par *Rv3913*) et l'oxydation du NADPH en NADP+ (Figure 11) (Zhang *et al.*, 1999). L'importance de cette voie de détoxification des ROS dans la survie et la pathogénicité a été démontrée chez *M. tuberculosis* dans le modèle murin (Lin *et al.*, 2016).

Chez *M. tuberculosis*, l'expression des systèmes thiorédoxine/thiorédoxine réductase est sous le contrôle du facteur sigma SigH et induite en contexte oxydant (Raman *et al.*, 2001; Manganelli *et al.*, 2002; Akif *et al.*, 2008).

M. abscessus possède deux thiorédoxines potentielles, codées par les gènes *MAB_2739c* (orthologue de TrxA et TrxB de *M. tuberculosis*) et *MAB_4941* (orthologue de TrxC) ainsi qu'une thiorédoxine réductase codée par le gène *MAB_4940*.

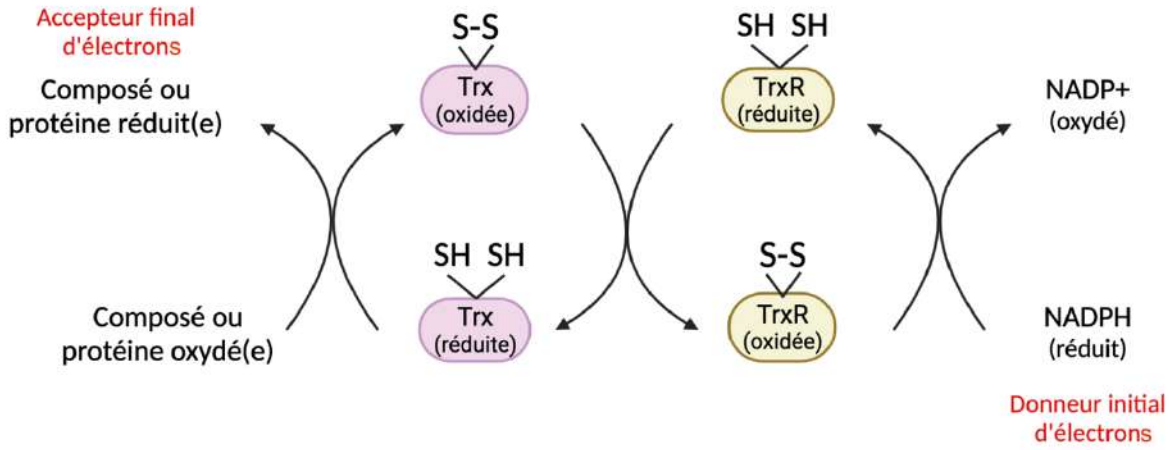


Figure 11. *Mécanismes de réduction des composés ou protéines oxydé(e)s par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.*

Les alkyls hydropéroxydes réductases

Le génome de *M. tuberculosis* code pour trois alkyls hydropéroxydes réductases, AhpC (*Rv2428*), AhpD (*Rv2429*) et AhpE (*Rv2238c*) dont l'expression génique est régulée par les protéines senseurs WhiB4, WhiB7 et FurA (Lee *et al.*, 2014; Eckelt *et al.*, 2015; Chawla *et al.*, 2018). Ce sont des péroxydases qui assurent la réduction du péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou d'alkyls hydropéroxydes (ROOH) tels que l'hydropéroxyde de cholestérol ou de cumène (Hillas *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2011) par oxydation des groupements thiols de leurs résidus cystéines. Les ponts disulfures formés sont ensuite réduits par d'autres protéines Ahp et par les protéines SucB/Lpd (Figure 12A), ou par l'intervention des thiorédoxines et de la thiorédoxine réductase (Figure 12B) (Bryk *et al.*, 2002; Jaeger *et al.*, 2004). La voie de détoxification des mycothiols intervient également dans la réduction des protéines Ahp oxydées (voir la partie « mycothiol ») (Hugo *et al.*, 2014).

Des orthologues de AhpCDE sont retrouvés chez *M. abscessus* codés par les gènes *MAB_4408c, MAB_4407c* et *MAB_1887* respectivement.

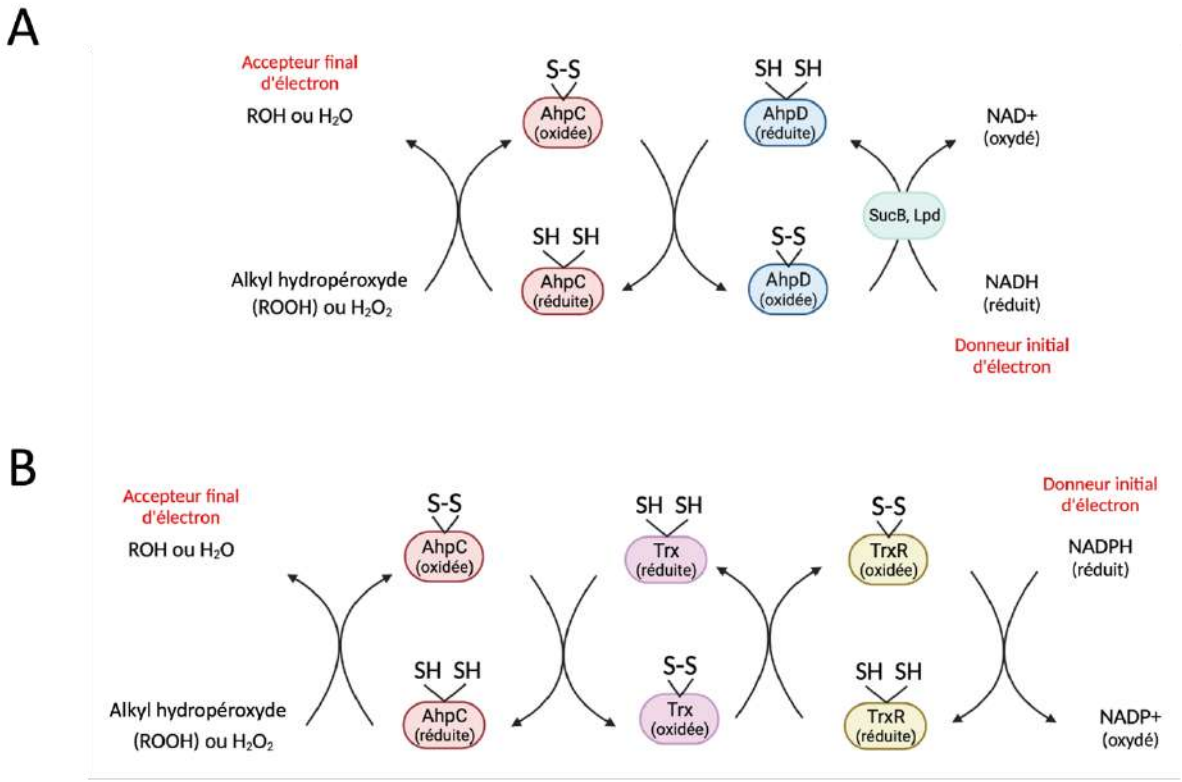


Figure 12. *Mécanismes de réduction des ROS par les alkyls hydropéroxydes réductases et leur lien avec le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.*

La catalase péroxydase KatG

La catalase péroxydase KatG est une autre protéine de la famille des péroxydases. Ses activités péroxydase et catalase lui permettent de détoxifier les ROS respectivement en utilisant le cofacteur NAD(P)H comme donneur d'électrons (Figure 13A) ou au travers d'une réaction de dismutation impliquant la réduction et l'oxydation de deux molécules de H_2O_2 (Figure 13B) (Johnsson *et al.*, 1997; Vidossich *et al.*, 2012). KatG étant également impliquée dans l'activation de l'antibiotique isoniazide (INH), sa délétion chez *M. tuberculosis* conduit à une résistance à l'INH, une sensibilisation à l'H_2O_2 et une atténuation dans le modèle murin (Johnsson *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2004).

La régulation d'expression du gène *katG* (*Rv1908c*) en conditions oxydantes est sous le contrôle de la protéine senseur FurA (Pym *et al.*, 2001; Zahrt *et al.*, 2001) et du facteur de transcription SigE (Hu *et al.*, 2016). Chez *M. abscessus*, la protéine KatG est codée par le gène *MAB_2470c*.

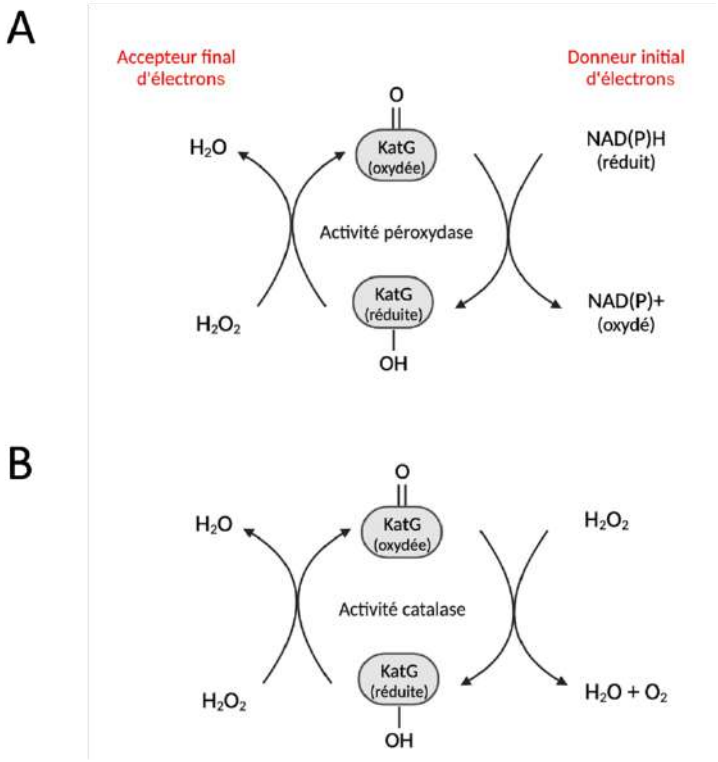


Figure 13. *Mécanismes de réduction des ROS par l'activité péroxydase (a) ou catalase (b) de KatG.*

Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases constituent la dernière famille de protéines majoritaires impliquées dans la régulation de l'homéostasie rédox. Ce sont des métalloenzymes impliquées dans la dismutation de deux radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) en H_2O_2 et O_2 (Dussurget *et al.*, 2001). Chez *M. tuberculosis*, la superoxyde dismutase majoritaire SodA (*Rv3846*) utilise l'ion divalent Fe^{2+} comme cofacteur de son activité d'oxydo-réduction. Sous le contrôle du régulateur transcriptionnel IdeR, cette métalloenzyme est impliquée dans la prolifération de *M. tuberculosis* dans les macrophages ou lors d'un stress oxydatif (Dussurget *et al.*, 1996; Dussurget *et al.*, 2001; Piddington *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2013).

M. abscessus code également pour une probable superoxyde dismutase sous le gène *MAB_0118c*.

Le mycothiol comme principale molécule donneuse d'électrons

Le mycothiol (MSH) est un thiol de faible poids moléculaire majoritaire chez les mycobactéries. Spécifique du genre *Actinobacterium*, cette molécule est composée d'une N-acétyl L-Cystéine, d'un D-glucosamine et de 1D-myo-inositol. Chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus*, sa synthèse fait intervenir cinq enzymes ; la glycosyltransférase MshA, la phosphatase MshA2, la déacétylase MshB, la mycothiol ligase MshC et enfin la mycothiol synthase MshD (Karthik Jothivasan and J. Hamilton, 2008; Reyes *et al.*, 2018). Participant également à la synthèse des mycothiols, l'enzyme tbINO catalyse la synthèse du précurseur L-myo-inositol-1-phosphate à partir du glucose-6-phosphate (Norman *et al.*, 2002) (Figure 14). Bien que l'essentialité du mycothiol dans la viabilité mycobactérienne reste aujourd'hui encore sujet à débats (Rawat *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2003; Sareen *et al.*, 2003; Vilchèze *et al.*, 2008), son implication dans la réponse des mycobactéries aux stress oxydatifs ou aux antibiotiques a clairement été mise en évidence (Rawat *et al.*, 2002; Buchmeier *et al.*, 2003; Buchmeier *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2017).

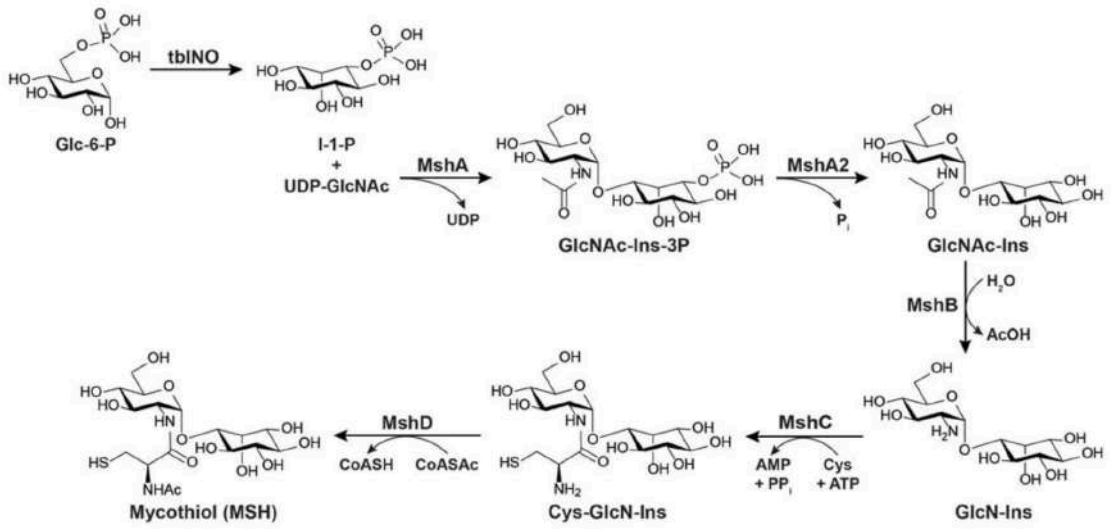


Figure 14. *Enzymes impliquées dans la biosynthèse du mycothiol chez M. tuberculosis et M. abscessus.*

La synthèse du mycothiol nécessite la production d'un précurseur par l'enzyme tbINO (Rv0046c ou MAB_4007). Une fois synthétisé, le précurseur L-myo-inositol-1-phosphate est pris en charge par la glycosyltransférase MshA (Rv0486 ou MAB_4057c), la phosphatase MshA2 (gène non identifié), la déacétylase MshB (Rv1170 ou MAB_1316), la mycothiol ligase MshC (Rv2130c ou MAB_2116) et enfin la mycothiol synthase MshD (Rv0819 ou MAB_0745) pour former la molécule de mycothiol nécessaire à l'homéostasie rédox. Issue de (Cumming et al., 2014).

Le mycothiol est considéré comme l'équivalent fonctionnel du glutathion des eucaryotes et des autres bactéries. Absent chez les mycobactéries, le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine) (Couto *et al.*, 2016).

En l'absence de stress, le mycothiol existe principalement sous une forme réduite (MSH). Lors d'une exposition à des ROS, la proportion de mycothiol réduit diminue au détriment de sa forme oxydée et dimérisée en mycothione (MSSM) (Ung and Av-Gay, 2006). La principale fonction du mycothiol est de permettre la réduction de composés ou protéines oxydé(e)s en cédant un électron au niveau de son groupement thiol. L'oxydation qui en résulte rend son groupement thiol très réactif, favorisant la formation d'un pont disulfure avec une deuxième molécule de mycothiol oxydée, entrainant sa dimérisation en disulfure de mycothiol ou mycothione (MSSM). Pour maintenir la balance MSH/MSSM et rétablir un niveau suffisant en MSH en réponse au stress oxydatif, la mycothiol disulfide réductase Mtr (*Rv2855*) réduit les dimères MSSM de manière NAD(P)H dépendante (Figure 15A) (Holsclaw *et al.*, 2011).

Le mycothiol participe également à la détoxification d'autres composés toxiques de manière Mtr-indépendante (Cumming *et al.*, 2014). Lors de l'exposition à des toxines telles que des agents alkylants ou des radicaux libres, la mycothiol-S-transférase (MST) catalyse la formation d'un complexe entre le résidu cystéine du mycothiol et la toxine (complexe MSH-toxine). La protéine mycothiol-S-conjugate amidase (Msa), homologue fonctionnel à la protéine MshB impliquée dans la synthèse du mycothiol, clive ensuite la liaison glycosaminyl-amide pour produire une toxine marquée à l'acide mercapturique (AcCys-toxine) et l'intermédiaire de synthèse du MSH, le GlcN-Ins. La toxine marquée sera sécrétée de la cellule et la molécule GlcN-Ins recyclée dans la biosynthèse du mycothiol par les protéines MshC et MshD (Figure 15B). Parmi les toxines détoxifiées par cette voie se trouvent des composés oxydants utilisés pour le traitement d'une infection à *M. tuberculosis,* tels que la ménadione ou les antibiotiques rifamycine et streptomycine (Steffek *et al.*, 2003; Rawat *et al.*, 2004).

Enfin, l'exposition de la bactérie à du NO ou du formaldéhyde implique une dernière voie de détoxification à partir du mycothiol. Celle-ci repose sur une réaction directe entre

le composé toxique et la molécule de MSH, conduisant à la formation de S-nitrosomycothiol (MSNO). Le MSNO est ensuite réduit par une S-nitrosomycothiol réductase (MscR) de manière NADH-dépendante, conduisant à la formation de mycothiol-N-hydroxysulfenamide (MSNHOH) qui s'hydrolyse spontanément en une molécule de mycothiol oxydée (MSSM) et en nitrate. Le MSSM est ensuite réduit en MSH comme décrit précédemment par l'enzyme Mtr (Figure 15C).

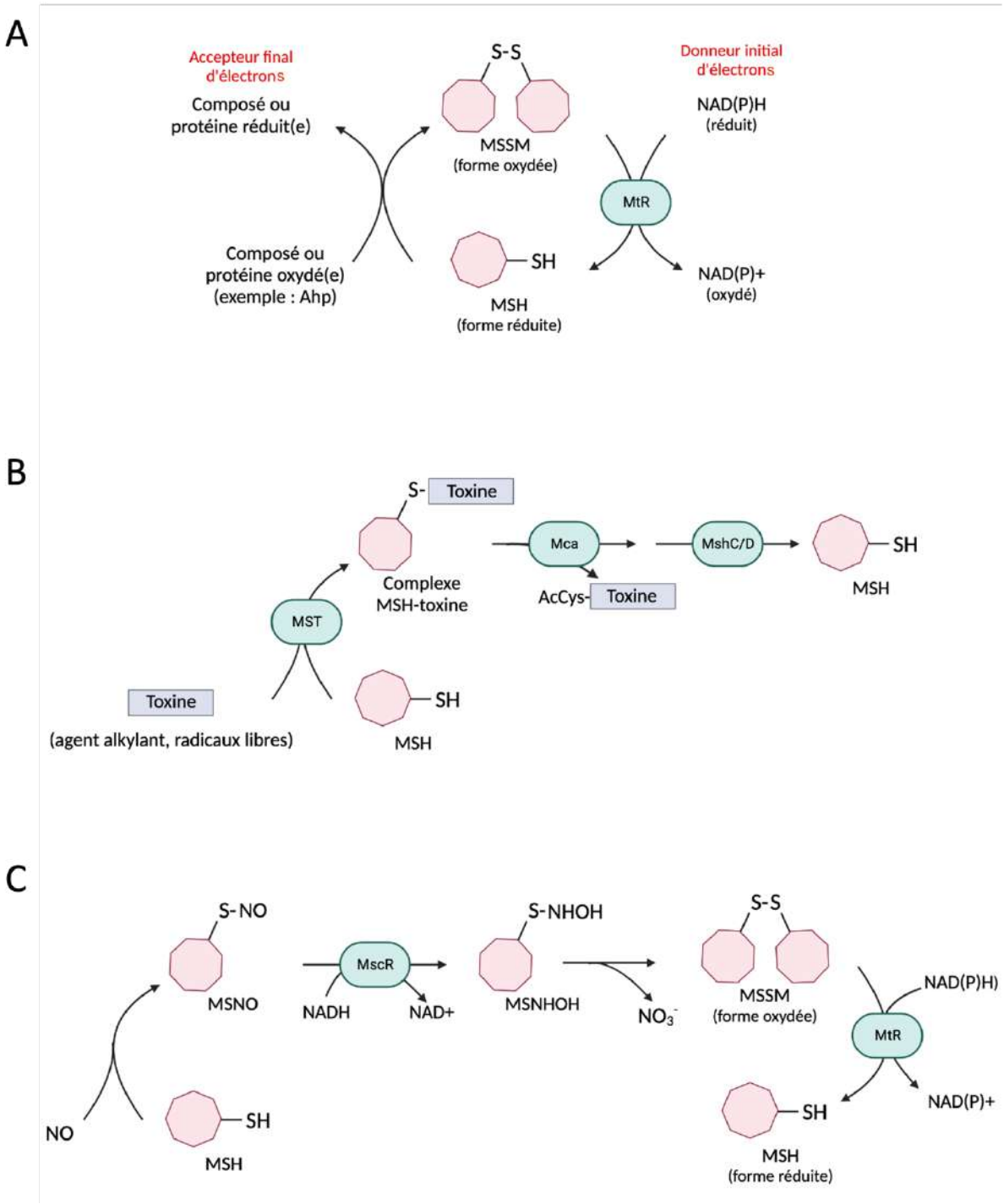


Figure 15. *Mécanismes de réduction et de détoxification des composés oxydants et toxiques assurés par le mycothiol.*

A. La réduction des composés ou protéines oxydés par les mycothiols fait intervenir la Mycothiol disulfide réductase Mtr
B. La détoxification des toxines par les mycothiols fait intervenir la Mycothiol-S-transférase (MST) pour la formation du complexe MSH-toxine, la protéine Mycothiol-S-conjugate amidase (Msa) pour le clivage de la liaison glycosaminyl-amide et les protéines MshC et MshD pour le recyclage du GlcN-Ins en MSH.
C. La détoxification du NO ou du formaldéhyde repose sur une réaction directe entre le composé toxique et la molécule de MSH, sur la réduction du MSNO produit par une S-nitrosomycothiol reductase (MscR) en MSNHOH et par son hydrolyse en MSSM et nitrate. La réduction du MSSM fait ensuite intervenir la protéine Mtr.

Les mécanismes de régulation de la biosynthèse des mycothiols chez les mycobactéries ne sont pas encore clairement élucidés. Plusieurs articles suggèrent cependant une implication directe ou indirecte des facteurs WhiB3, WhiB4 et WhiB7 dans la régulation de l'expression de *mshA* et de *mca* (Burian *et al.*, 2012b; Mehta *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017).

Les mycobactéries, dont *M. abscessus*, produisent également un second thiol, minoritaire, l'ergothionéine (EGT), qui en plus de participer à la détoxification des ROS, est également impliqué dans la virulence de *M. tuberculosis* (Saini *et al.*, 2016). C'est un acide aminé dérivé de l'histidine qui contient un atome de souffre (Figure 16) et dont la synthèse chez *M. tuberculosis* est régulée par WhiB3 (Saini *et al.*, 2016). Lorsqu'une souche de *M. tuberculosis* est déficiente en MSH, la concentration en EGT augmente de manière importante, indiquant un lien physiologique entre la production de MSH et de EGT chez les mycobactéries (Saini *et al.*, 2016). De la même manière qu'une perte de production de MSH augmente la sensibilité aux ROS, l'absence de EGT sensibilise la bactérie au péroxyde d'hydrogène, au paraquat, à la ménadione, et au cumène hydropéroxyde et augmente la sensibilité aux antibiotiques tels que la rifampicine, l'isoniazide, la bédaquiline, et la clofazimine (Saini *et al.*, 2016). L'ergothionéine participe donc également au maintien de l'homéostasie rédox, mais les processus impliqués sont encore très mal caractérisés.

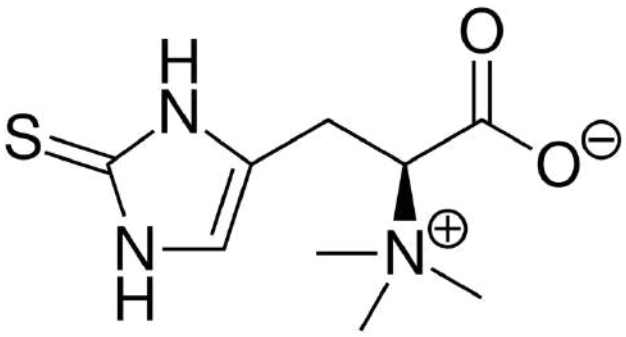


Figure 16. *Structure chimique de l'ergothionéine.*

Pour conclure sur cette partie, un schéma récapitulatif reprenant les différents systèmes senseurs et effecteurs de l'homéostasie rédox, ainsi que leurs relations, est présent en Figure 17. Il met en avant les nombreux systèmes de détection et de détoxification des ROS et des RNS présents chez les mycobactéries.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude portant sur les mécanismes de l'homéostasie rédox chez *M. abscessus*. Cependant, la présence de nombreux gènes orthologues à ceux de *M. tuberculosis*, suggèrent des mécanismes généralisables à cette espèce également.

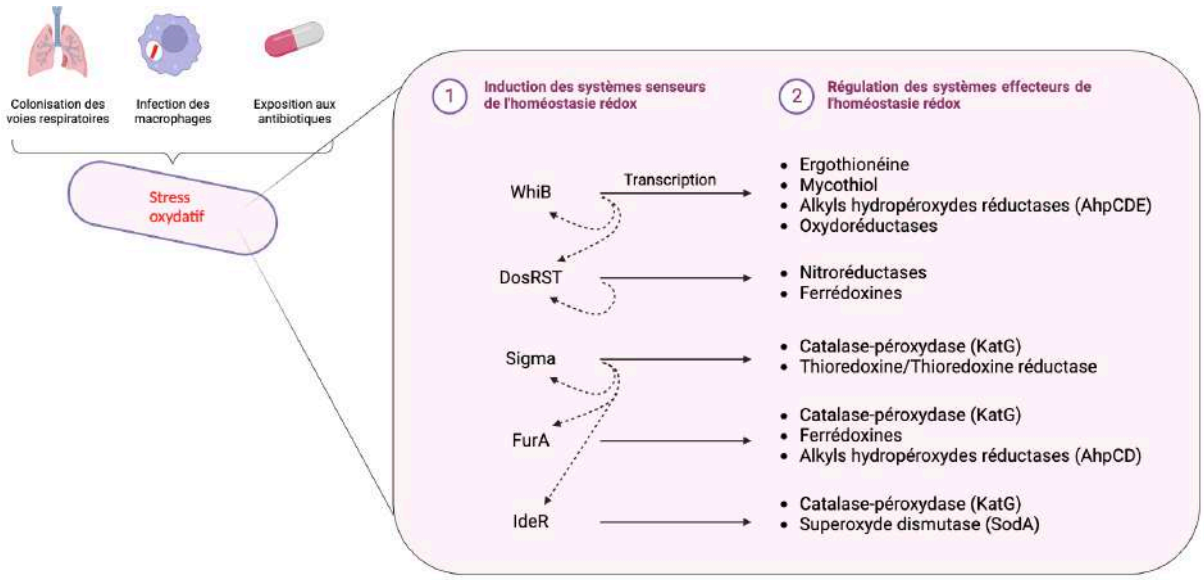


Figure 17. *Mécanismes senseurs et effecteurs impliqués dans le maintien de l'homéostasie rédox mycobactérienne.*

Lors de la colonisation des voies respiratoires, de la phagocytose par les macrophages ou lors d'un traitement antibiotique, les mycobactéries sont exposées à des niveaux importants d'espèces réactives dérivées de l'oxygène ou de l'azote, respectivement des ROS et des RNS. Ces molécules engendrent des dégâts irréversibles aux constituants bactériens. Pour y survire, les mycobactéries sont équipées de plusieurs systèmes senseurs impliqués dans la détection du stress oxydatif. Ces systèmes favorisent la transcription (traits peins) de nombreuses molécules ou protéines effectrices de l'homéostasie rédox, impliquées dans la détoxification des composés toxiques. En plus d'induire la transcription de ces molécules effectrices, les systèmes senseurs de l'homéostasie rédox régulent également l'expression d'autres systèmes de détection des ROS ou participent à leur propre régulation (traits pointillés).

Chapitre III. Antibiothérapie des infections liées à *Mycobacterium abscessus*

I. L'antibiothérapie contre *M. abscessus*

L'ATS (American Thoracic Society), l'ERS (European Respiratory Society), l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) et l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) ont édité diverses recommandations pour le diagnostic et le traitement des infections causées par *M. abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose (Griffith *et al.*, 2007; Daley *et al.*, 2020). Au travers de ces recommandations il apparait très important de diagnostiquer de manière précoce l'infection avant qu'elle ne rentre en phase aigüe, au cours de laquelle *M. abscessus* devient hyper-virulent et insensible aux traitements antibiotiques (Ravnholt *et al.*, 2018).

La première recommandation vise à identifier l'espèce mycobactérienne (*M. avium* ou *M. abscessus)* et la sous-espèce du complexe de *M. abscessus* responsable de l'infection. En effet, *M. abscessus* subsp. *abscessus, M. abscessus* subsp. *bolletii* et *M. abscessus* subsp. *massiliense* présentent des sensibilités différentes aux antibiotiques, notamment à la clarithromycine (Bastian *et al.*, 2011).

Il convient ensuite, selon la seconde recommandation, de mesurer la sensibilité de l'isolat clinique envers divers antibiotiques *in vitro,* afin d'utiliser des concentrations appropriées plutôt que des valeurs empiriques. Ces données orienteront le traitement afin d'augmenter la probabilité d'éradication de l'infection.

Selon les recommandations des grandes instances Américaines, le traitement contre les infections à *M. abscessus* s'organise en deux phases : une phase d'initiation s'étalant sur 1 à 3 mois et une phase continue d'au moins 12 mois. Les antibiotiques utilisés appartiennent à des familles de molécules différentes et ciblent des processus bactériens distincts (Figure 9) (Skolnik *et al.*, 2016; Floto *et al.*, 2016; Lopeman *et al.*, 2019; Daley *et al.*, 2020; Abdelaal *et al.*, 2022).

La phase d'initiation comprend trois antibiotiques :

- un macrolide, l'azithromycine ou la clarithromycine, qui bloque la synthèse protéique en interagissant avec la sous-unité ribosomale 50S au niveau du tunnel de sortie de la protéine néosynthétisée (NPET en anglais) (Vázquez-Laslop and Mankin, 2018). L'azithromycine est préférentiellement choisie en raison de la résistance naturelle de la plupart des isolats de *M. abscessus* subsp. *abscessus* ou *M. abscessus* subsp. *bolletii* à la clarithromycine.
- un aminoglycoside, l'amikacine, qui interagit avec le site A de l'ARN 16S, un constituant de la sous-unité ribosomique 30S, et entraine une perturbation conformationnelle des ribosomes et une inhibition de la traduction (Krause *et al.*, 2016).
- et une bêta-lactamine, telle que la céfoxitine ou l'imipénème. La céfoxitine est généralement utilisée en première intention puisqu'elle est bien tolérée par les patients. Les bêta-lactamines (ou β-lactamines), sont des molécules bactéricides empêchant la réticulation des chaines glycanes du peptidoglycane en formant des liaisons covalentes avec les transpeptidases. Elles contiennent toutes un noyau β-lactame mais se différencient en pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes, pénèmes et monobactames selon la nature chimique des groupements liés à leur noyau (Lima *et al.*, 2020). Leurs différences de structures influencent la reconnaissance des transpeptidases qui s'organisent en deux familles, les DDT qui réalisent des liaisons 4 → 3 et les LDT qui réalisent des liaisons 3 → 3 (voir Chapitre I, Partie I, B) (Gokulan and Varughese, 2019). Toutes les β-lactamines inhibent efficacement les DDT, mais seules les céphalosporines, dont fait partie la céfoxitine inhibent les LDT (Gokulan *et al.*, 2018), justifiant son activité contre *M. abscessus* dont la liaison 3 → 3 prédomine dans l'assemblage du peptidoglycane (Lavollay *et al.*, 2011).

La phase continue associe également trois à quatre antibiotiques :

- un macrolide, azithromycine ou clarithromycine
- un aminoglycoside, l'amikacine
- et selon le profil de sensibilité de l'isolat, deux autres antibiotiques seront choisis parmi la minocycline (une cycline ciblant la synthèse protéique), le linézolide (une molécule inhibant la traduction), la clofazimine (un antilépreux inhibant la réplication de l'ADN) ou la moxifloxacine. Cette dernière appartient à la famille des fluoroquinolones et inhibe l'activité topoisomérase de l'ADN gyrase et de la Topoisomérase de type IV impliquées dans le superenroulement de la molécule d'ADN, bloquant la transcription et la division cellulaire.

Le succès de l'antibiothérapie actuelle contre *M. abscessus* reste faible (~40%) en raison de ses nombreux mécanismes de résistance intrinsèques et acquis discutés dans la partie suivante. Par conséquent il est finalement souvent (dans ¼ des cas) recommandé de procéder à la résection chirurgicale des tissus infectés (Qvist *et al.*, 2015; Pasipanodya *et al.*, 2017; Kwak *et al.*, 2019; Daley *et al.*, 2020). Le taux de mortalité des patients infectés par *M. abscessus* augmente également avec le temps et peut atteindre 50% après 15 ans d'infection (Jhun *et al.*, 2020).

En réponse à ces échecs, la communauté scientifique cherche à développer de nouvelles stratégies de traitement contre *M. abscessus* (Recchia *et al.*, 2023). Ces thérapies alternatives incluent (i) l'exposition des patients à des inhalations d'oxyde nitrique (NO) qui semblent améliorer la fonction pulmonaire et réduire la quantité de bactéries dans leurs expectorations (Yaacoby-Bianu *et al.*, 2018), (ii) une thérapie phagique ayant déjà fait ses preuves sur une jeune patiente atteinte de mucoviscidose (Dedrick *et al.*, 2019; Nick *et al.*, 2022), et (iii) l'utilisation de peptides anti-microbiens (da Silva *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022) ou de nanoparticules pour améliorer la délivrance de l'antibiotique au plus proche du site d'infection (Choi *et al.*, 2018). Ces stratégies ne sont pour le moment qu'au stade de test et ne sont pas recommandées par les différentes instances Américaines de lutte contre les MNT.

II. La résistance aux antibiotiques chez *M. abscessus*

La résistance aux antibiotiques désigne la capacité d'une population bactérienne à proliférer en présence d'une concentration en antibiotique normalement létale. C'est un phénotype qui se transmet de génération en génération et qui se traduit par une augmentation de la CMI, définie comme la concentration minimale en antibiotique inhibitrice de la croissance bactérienne. Ainsi, en comparaison d'une population bactérienne dite sensible, une souche résistante nécessitera d'être exposée à une concentration antibiotique plus importante pour que soit observée une inhibition de sa croissance (Brauner *et al.*, 2016; Balaban *et al.*, 2019).

Tel que mentionné précédemment, le traitement antibiotique contre *M. abscessus* est généralement voué à l'échec car cette mycobactérie est l'une des plus résistantes du genre *Mycobacterium* (Yang *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2015b; Pang *et al.*, 2015a; Hatakeyama *et al.*, 2017). Elle est en conséquence qualifiée de « cauchemar antibiotique et clinique » (Nessar *et al.*, 2012; Lopeman *et al.*, 2019).

Les échecs des traitements antibiotiques sur *M. abscessus* sont principalement liés à ses mécanismes de résistance intrinsèques ou acquis au travers de mutations génétiques. Ils reposent sur la présence i) de facteurs bactériens limitant la concentration intracellulaire en antibiotique, ii) d'enzymes capables d'inactiver les antibiotiques, iii) de protéines responsables de la protection de la cible, iv) ou sur un polymorphisme génétique au niveau du gène codant la cible des antibiotiques (Figure 18). La régulation des différents gènes impliqués dans ces mécanismes joue également un rôle fondamental dans le niveau de sensibilité de *M. abscessus*. Par conséquent, des régulateurs transcriptionnels tels que TetR et WhiB7 sont aussi des acteurs majeurs de la résistance aux antibiotiques de cette mycobactérie.

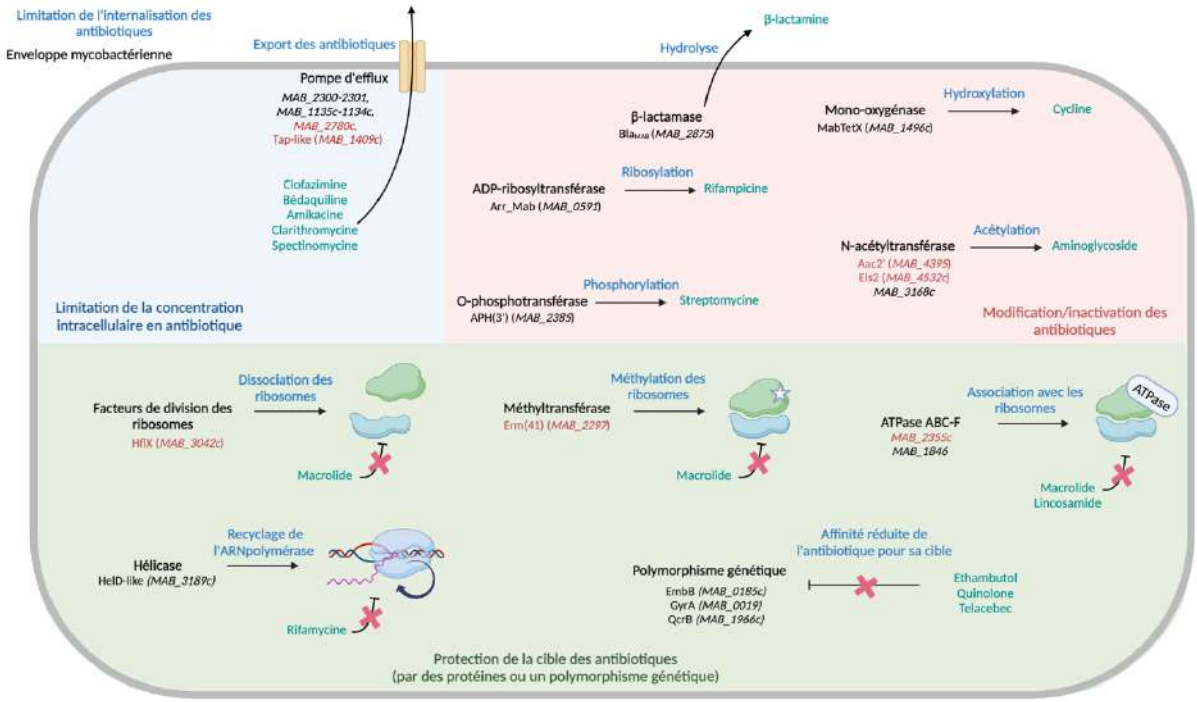


Figure 18. *Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez M. abscessus.*

L'échec des traitements contre M. abscessus est en grande partie lié à ses nombreux facteurs de résistance aux antibiotiques. Ceux-ci reposent sur des processus visant à limiter la concentration intracellulaire en antibiotique (fond bleu), à modifier ou inactiver les antibiotiques (fond rouge) ou à protéger la cible de l'action des antibiotiques (fond vert). Un grand nombre de ces gènes sont régulés par des facteurs de transcription tels que le répresseur transcriptionnel TetR ou l'activateur transcriptionnel WhiB7. Les gènes dont l'expression est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel WhiB7 sont indiqués en rouge.

A) Limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique

La limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique chez *M. abscessus* repose premièrement sur la présence d'une enveloppe mycobactérienne complexe (voir Chapitre I, Partie I, B) limitant l'entrée passive des petites molécules hydrophiles et des antibiotiques. L'enveloppe mycobactérienne, et en particulier celle de *M. chelonae* ou *M. abscessus,* est 10 à 1000 fois moins perméable aux céphalosporines et au glucose que les enveloppes de *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement (Jarlier and Nikaido, 1990; Jarlier and Nikaido, 1994). Cette faible perméabilité s'explique en premier lieu par une composition de l'enveloppe très riche en lipides (Nguyen *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2017; Lefebvre *et al.*, 2018; Hohl *et al.*, 2019), ainsi que par une faible densité de

porines. Les porines sont des canaux protéiques transmembranaires, responsables de l'internalisation passive de certaines molécules hydrophiles (Kessel *et al.*, 1988; Engelhardt *et al.*, 2002). Les mycobactéries, telles que *M. smegmatis,* qui en possèdent significativement moins que la bactérie modèle *E. coli*, respectivement ~1000 et 10 000 pores/µm^2 (Kessel *et al.*, 1988; Engelhardt *et al.*, 2002), présentent une meilleure protection vis-à-vis des antibiotiques. Ainsi, lorsque la porine majoritaire MspA de *M. smegmatis* est surexprimée chez différentes espèces mycobactériennes, une augmentation de la sensibilité générale aux antibiotiques est observée (Mailaender *et al.*, 2004; Svetlíková *et al.*, 2009).

La limitation de la concentration intracellulaire en antibiotique chez *M. abscessus* est également assurée par la présence de nombreuses pompes d'efflux au niveau de l'enveloppe. Ces protéines transmembranaires sont responsables de l'expulsion d'une grande variété de molécules (sucres, acides aminés, lipides et protéines). Elles jouent un rôle prépondérant dans la résistance en réduisant la concentration intracellulaire en antibiotique en dessous du seuil critique de létalité (Mishra and Daniels, 2013; da Silva *et al.*, 2016; Blanco *et al.*, 2016). L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux antibiotiques chez *M. abscessus* est démontrée par l'augmentation de sensibilité à la clarithromycine, l'amikacine, la clofazimine ou la bédaquiline lors d'un traitement combiné avec des inhibiteurs de pompes d'efflux (Viljoen *et al.*, 2019; Vianna *et al.*, 2019b; Ramis *et al.*, 2019; Vianna *et al.*, 2019a; Guo *et al.*, 2020) ou lors de la délétion génétique de certains couples de transporteurs MmpL-MmpS (Richard *et al.*, 2018a; Gutiérrez *et al.*, 2019) (Figure 18).

B) Modification ou inactivation des antibiotiques

La modification ou l'inactivation des antibiotiques est un autre mécanisme de résistance de *M. abscessus*. Il fait intervenir des enzymes capables de dégrader les antibiotiques ou d'ajouter des groupements chimiques à leur surface, diminuant ainsi leur affinité pour leurs cibles. Les enzymes de modification ou d'inactivation des antibiotiques

chez *M. abscessus* sont renseignées dans la Figure 18. Il s'agit par exemple de β-lactamases responsables de l'hydrolyse des noyaux β-lactames des β-lactamines (Dubee *et al.*, 2014; Rominski *et al.*, 2017b), d'ADP-ribosyltransférases responsables de l'inactivation des rifampicines par ajout d'un groupement ADP-ribose (Ganapathy *et al.*, 2021), de mono-oxygénases responsables de l'inactivation des cyclines (Rudra *et al.*, 2018) ou encore de N-acétyltransférases et O-phosphotransférases responsables de la modification des antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Tsai *et al.*, 2013; Rominski *et al.*, 2017a; Rominski *et al.*, 2017c; Dal Molin *et al.*, 2017; Ung *et al.*, 2019). De manière intéressante, certaines de ces enzymes ne sont pas en mesure de modifier ou d'inactiver toutes les molécules d'une même famille. Ainsi, la β-lactamase BlaMab n'est pas en mesure d'hydrolyser la céfoxitine ou l'imipénème, expliquant l'activité bactéricide de ces deux antibiotiques sur les isolats cliniques de *M. abscessus* (Rominski *et al.*, 2017b), et la O-phosphotransférase APH(3') n'est spécifique que de la streptomycine (Dal Molin *et al.*, 2017).

C) Protection de la cible des antibiotiques par des protéines

Un autre mécanisme participant à la résistance naturelle de *M. abscessus* aux antibiotiques consiste en la présence d'enzymes impliquées dans la protection de la cible. Dans ce contexte, la concentration intracellulaire effective en antibiotique n'est pas modifiée, mais l'activité de certaines enzymes sur la cible des antibiotiques permet d'empêcher leur inhibition. Parmi ces enzymes de protection, nous retrouvons chez *M. abscessus* le facteur de séparation des ribosomes, HflX, assurant le recyclage des ribosomes piégés et la redirection des ARNm en cours de traduction vers des ribosomes fonctionnels (Rudra *et al.*, 2020), des enzymes impliquées dans la méthylation des ribosomes (protéine Erm(41)) pour diminuer leur affinité de reconnaissance et de fixation par les macrolides (Nash *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2020), des ATPases impliquées dans la stabilisation des ribosomes et leur protection vis-à-vis des macrolides ou lincosamides (Hurst-Hess *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2021; Hurst-Hess *et al.*, 2021), ou encore

des hélicases impliquées dans le recyclage des ARN polymérases inhibées par les rifamycines (Hurst-Hess *et al.*, 2022; Surette *et al.*, 2022) (Figure 18).

Comme discuté précédemment, les différentes sous-espèces du complexe de *M. abscessus* n'expriment pas toutes une protéine Erm(41) fonctionnelle. En effet, la sous-espèce *M. abscessus* subsp. *massiliense* ne présente qu'une copie partielle du gène *MAB_2297* et ne présente donc pas le même niveau de résistance intrinsèque aux macrolides (notamment à la clarithromycine) que *M. abscessus* subsp. *abscessus* ou *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Nash *et al.*, 2009).

D) Protection de la cible des antibiotiques par le polymorphisme génétique (naturel ou acquis)

Enfin, *M. abscessus* présente également une résistance à certaines molécules antibiotiques en raison d'un polymorphisme génétique qui peut résulter de mutations génétiques ou être naturellement présent dans son génome, différenciant ainsi cette espèce des autres mycobactéries.

L'acquisition de mutations génétiques conduit souvent à l'émergence de souches résistantes ou multi-résistantes, compliquant ainsi le traitement clinique des infections. Chez *M. abscessus*, de telles mutations peuvent apparaître au niveau des gènes codant pour les protéines ciblées par les antibiotiques. Par exemple, la substitution d'une adénine par une guanine en position 2059 du gène *rrl* codant la sous-unité ribosomal 23S, se traduit par une résistance acquise à la clarithromycine, car elle diminue l'affinité de liaison de l'antibiotique pour sa cible (Wallace *et al.*, 1996). De même, une simple substitution nucléotidique en position 1408 de l'*ARN16S* au sein d'isolats cliniques de *M. abscessus*, confère une résistance acquise à l'amikacine, la kanamycine et la gentamycine (Prammananan *et al.*, 1998).

Certaines souches cliniques de *M. abscessus* peuvent également développer un phénotype de résistance grâce à l'acquisition de mutations génétiques qui améliorent l'activité d'efflux des antibiotiques. Des exemples concrets de ce mécanisme incluent des

mutations dans le répresseur *MAB_4384* ou le régulateur transcriptionnel TetR (*MAB_2299*). Ces mutations entraînent une surexpression des pompes d'efflux MmpS5/MmpL5 ou MAB_2300-MAB_2301 respectivement, se traduisant par une augmentation de la résistance à la bédaquiline ou à la clofazimine (Li *et al.*, 2018; Richard *et al.*, 2018a). Il est à noter que la bédaquiline agit en tant qu'inhibiteur de l'ATP synthase du métabolisme énergétique de *M. tuberculosis*, tandis que la clofazimine inhibe la réplication de l'ADN.

En plus des mutations acquises, l'existence d'un polymorphisme naturel dans le génome de *M. abscessus* peut également contribuer à sa meilleure résistance à certains antibiotiques par rapport à d'autres bactéries. Les antibiotiques concernés sont notamment l'éthambutol qui cible la synthèse de l'enveloppe, les quinolones qui ciblent la réplication et la transcription de l'ADN, et le télacébec qui inhibe le complexe III de la chaine respiratoire mycobactérienne. Ainsi, la présence de l'allèle QMGM (glutamine-méthionine-glycine-méthionine) de *M. abscessus* qui remplace l'allèle ILGM (isoleucine-leucine-glycine-méthionine) de *M. tuberculosis* au niveau de la région ERDG (« embB resistance-determining region ») des arabinosyltransférases, confère à *M. abscessus* un niveau de résistance à l'éthambutol 25 fois supérieur à celui de *M. tuberculosis* (Alcaide *et al.*, 1997). De même, des variations génétiques dans les gènes *gyrA* (*MAB_0019*) et *qcrB* (*MAB_1966c*) confèrent à *M. abscessus* une résistance naturelle aux quinolones et au télacébec respectivement, par rapport à *M. tuberculosis* (Guillemin *et al.*, 1998; Sorayah *et al.*, 2019). Ces polymorphismes contribuent donc à l'augmentation de la résistance naturelle de *M. abscessus* à ces antibiotiques spécifiques.

E) Rôle des régulateurs transcriptionnels dans la résistance de *M. abscessus* aux antibiotiques

i) Le régulateur TetR

Les régulateurs transcriptionnels de la famille TetR (TFR pour « TetR familly regulator ») sont des systèmes de transduction de signaux procaryotes qui s'organisent de manière hélicoïdale au niveau de leur extrémité N-terminale de liaison à l'ADN et qui contiennent une poche de liaison au ligand à l'extrémité C-terminale (Figure 19A). Cette famille de régulateur porte le nom du premier répresseur TetR découvert chez *E. coli* comme impliqué dans la résistance à la tétracycline (Izaki *et al.*, 1966). Comme TetR, la plupart des TFR sont des répresseurs transcriptionnels. Dans la majorité des cas, en l'absence de ligand, ils s'organisent en dimère de protéines et se fixent au niveau des séquences promotrices des gènes dont ils régulent l'expression pour inhiber leur transcription. En présence du ligand, celui-ci interagit directement avec les extrémités C-terminale des protéines TetR, induisant un changement conformationnel libérant la molécule d'ADN. Chez *E. coli*, ce changement conformationnel après fixation de la tétracycline lève la répression du gène *tetA* codant pour une pompe d'efflux responsable du phénotype de résistance à cet antibiotique (Figure 19B) (Cuthbertson and Nodwell, 2013).

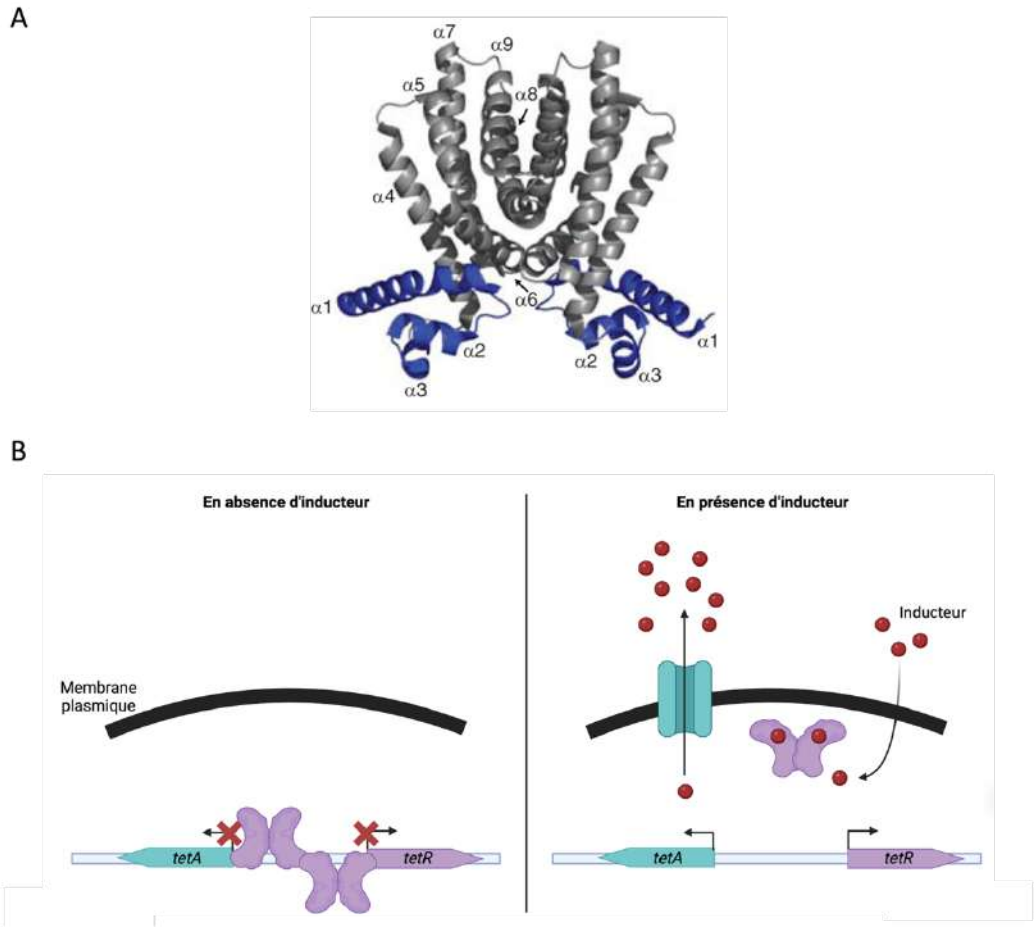


Figure 19. *Structure de TetR et fonctionnement du système de régulation en absence et en présence d'inducteur.*

A) Structure d'un dimère de protéines TetR de Rhodococcus sp. Rha1 (Rha06780) en tant que modèle représentatif des protéines TetR. La liaison à l'ADN du dimère TetR se fait au niveau des hélices α1-α3. La fixation du ligand se fait au niveau de la poche formée entre les hélices α5 et α7 de chaque protomère. La liaison des deux protomères de TetR se fait au niveau de leurs hélices α8-α9 respectives.(Cuthbertson and Nodwell, 2013). B) Régulation du système TetR de E. coli en absence et en présence de tétracycline. En absence d'inducteur, les protéines TetR s'organisent en dimère et fixent certaines séquences promotrices de l'ADN, inhibant ainsi la transcription des gènes. En présence d'inducteur, ici l'antibiotique tétracycline, un changement conformationnel au niveau du dimère TetR s'opère, ne permettant plus au complexe de fixer l'ADN. L'inhibition de la transcription du gène tetA est ainsi levée, permettant la production de la pompe d'efflux TetA, assurant la sécrétion de l'antibiotique vers le milieu extracellulaire.

Les TFR représentent la famille de régulateur les plus abondants chez les mycobactéries. Par exemple, *M. tuberculosis* code pour 49 TFR et les isolats environnementaux *M. abscessus* et *M. smegmatis* en codent 138 et 137 respectivement (Cuthbertson and Nodwell, 2013). Ces protéines interviennent dans la régulation de différents processus bactériens (métabolisme, quorum sensing et physiologie bactérienne)

mais parmi les voies métaboliques sous le contrôle de ces régulateurs, c'est probablement l'efflux des antibiotiques qui est la plus étudiée.

Chez *M. tuberculosis* par exemple, le régulateur TetR codé par le gène *Rv3066* réprime la transcription de la pompe d'efflux Rv3065 impliquée dans la résistance à plusieurs antibiotiques chez des isolats cliniques (Gupta *et al.*, 2010; Bolla *et al.*, 2012; Shahi *et al.*, 2021). Un autre répresseur transcriptionnel TetR de *M. tuberculosis*, EthR, favorise également un phénotype de résistance à l'éthionamide en inhibant la transcription de la protéine EthA, une mono-oxygénase impliquée dans l'activation de la pro-drogue (Engohang-Ndong *et al.*, 2004). Le système EthR/EthA, bien qu'impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis*, n'est pas représentatif du fonctionnement des autres systèmes TetR car il ne s'agit pas ici d'une modulation de la transcription de pompes d'efflux.

Chez *M. abscessus*, le régulateur transcriptionnel TetR codé par le gène *MAB_2299c* est responsable du phénotype de résistance à la clofazimine et la bédaquiline en contrôlant l'expression des pompes d'efflux *MAB_2300-MAB_2301* et *MAB_1135c-MAB_1134c* (Richard *et al.*, 2018a; Gutiérrez *et al.*, 2019). Un autre régulateur TetR, *MAB_4384* réprime également la transcription du couple de pompes d'efflux *MAB_4383c-MAB_4382c* impliqué dans la résistance aux antibiotiques dérivés de la thiacétazone (Halloum *et al.*, 2017; Richard *et al.*, 2018b).

Ainsi, l'ensemble de ces données expérimentales démontrent l'importance des régulateurs TetR dans la résistance aux antibiotiques chez les mycobactéries, et plus particulièrement leur implication dans la modulation de l'expression des pompes d'efflux responsables d'une diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique.

ii) Le régulateur WhiB7

Les protéines WhiB sont des régulateurs transcriptionnels exclusivement retrouvée chez les Actinobactéries (voir Chapitre II, Partie IV, B, i). Ce sont des protéines qui régulent l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus bactériens, y compris dans la résistance aux antibiotiques.

Parmi les sept protéines WhiB de *M. tuberculosis*, WhiB7 est le principal acteur de la résistance aux antibiotiques. Son expression est augmentée au sein d'isolats cliniques de *M. abscessus* ou *M. tuberculosis* résistants à la kanamycine ou l'amikacine (Reeves *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019) et sa délétion corrèle avec une hypersensibilité des bactéries à diverses familles d'antibiotiques, dont les aminoglycosides, les fluoroquinolones, les macrolides et la tétracycline (Morris *et al.*, 2005; Burian *et al.*, 2012b; Hurst-Hess *et al.*, 2017; Hurst-Hess *et al.*, 2023a). L'augmentation de sensibilité aux antibiotiques observée chez des souches de *M. abscessus* délétées du gène *whiB7*, s'explique par les nombreux gènes de résistance au sein de son régulon (gènes indiqués en rouge sur la Figure 18) (Hurst-Hess *et al.*, 2017; Hurst-Hess *et al.*, 2023a). On retrouve notamment les pompes d'efflux *MAB_1409c* et *MAB_2780c* impliquées dans la résistance à la clarithromycine, l'amikacine et la spectinomycine (Guo *et al.*, 2020; Hurst-Hess *et al.*, 2023b), la N-acétyltransférase Eis2 (*MAB_4532c*) impliquée dans l'inactivation des aminoglycosides (Pryjma *et al.*, 2017) et la méthyltransférase Erm(41) (*MAB_2297*) qui confère une résistance accrue aux macrolides (Pryjma *et al.*, 2017). Le régulateur WhiB7 de *M. abscessus* régule également l'expression de la protéine HflX (*MAB_3042c*) impliquée dans la résistance aux macrolides et lincosamide (Hurst-Hess *et al.*, 2017) ainsi que celle de l'ATPase MAB_2355c impliquée dans la protection des ribosomes (Guo *et al.*, 2021). Parmi les gènes du régulon WhiB7, on retrouve également de nombreuses pompes d'efflux dont l'implication dans la résistance aux antibiotiques n'a pas été démontrée (Hurst-Hess *et al.*, 2017; Hurst-Hess *et al.*, 2023a).

La régulation d'expression du régulateur transcriptionnel WhiB7 est différente de celle observée sur les protéines TetR. En absence d'antibiotique, l'expression du gène *whiB7* est réprimée par la formation d'un terminateur rho-indépendant suite à la

transcription d'un petit uORF (« upstream ORF ») localisée en amont (Figure 20A). En présence d'antibiotiques perturbant la synthèse protéique, ou lors d'une diminution de l'activité des ribosomes lors de l'entrée en phase stationnaire par exemple, l'efficacité de traduction de l'uORF est diminuée, conduisant à la formation d'une structure anti-terminateur empêchant la formation du terminateur rho-indépendant et permettant la transcription du gène *whiB7*. La protéine WhiB7 étant un activateur de sa propre transcription, l'auto-activation transcriptionnelle de *whiB7* par sa fixation sur son promoteur permet une augmentation progressive de la quantité de WhiB7 dans la cellule et l'activation de son régulon (Figure 20B) (Reeves *et al.*, 2013; Burian and Thompson, 2018; Lee *et al.*, 2022).

Il est à noter que de nombreux antibiotiques utilisés en clinique contre *M. abscessus* favorisent la transcription de *whib7* et des gènes de résistance de son régulon. Les β-lactamines, dont fait partie la céfoxitine, ne semblent cependant pas concernés. En effet, chez *M. tuberculosis*, les β-lactamines n'induisent pas l'expression de *whiB7* et la délétion de ce gène chez *M. abscessus* ne semble pas non plus modifier sa sensibilité à la céfoxitine ou à l'imipénème (Burian *et al.*, 2012b; Pryjma *et al.*, 2017).

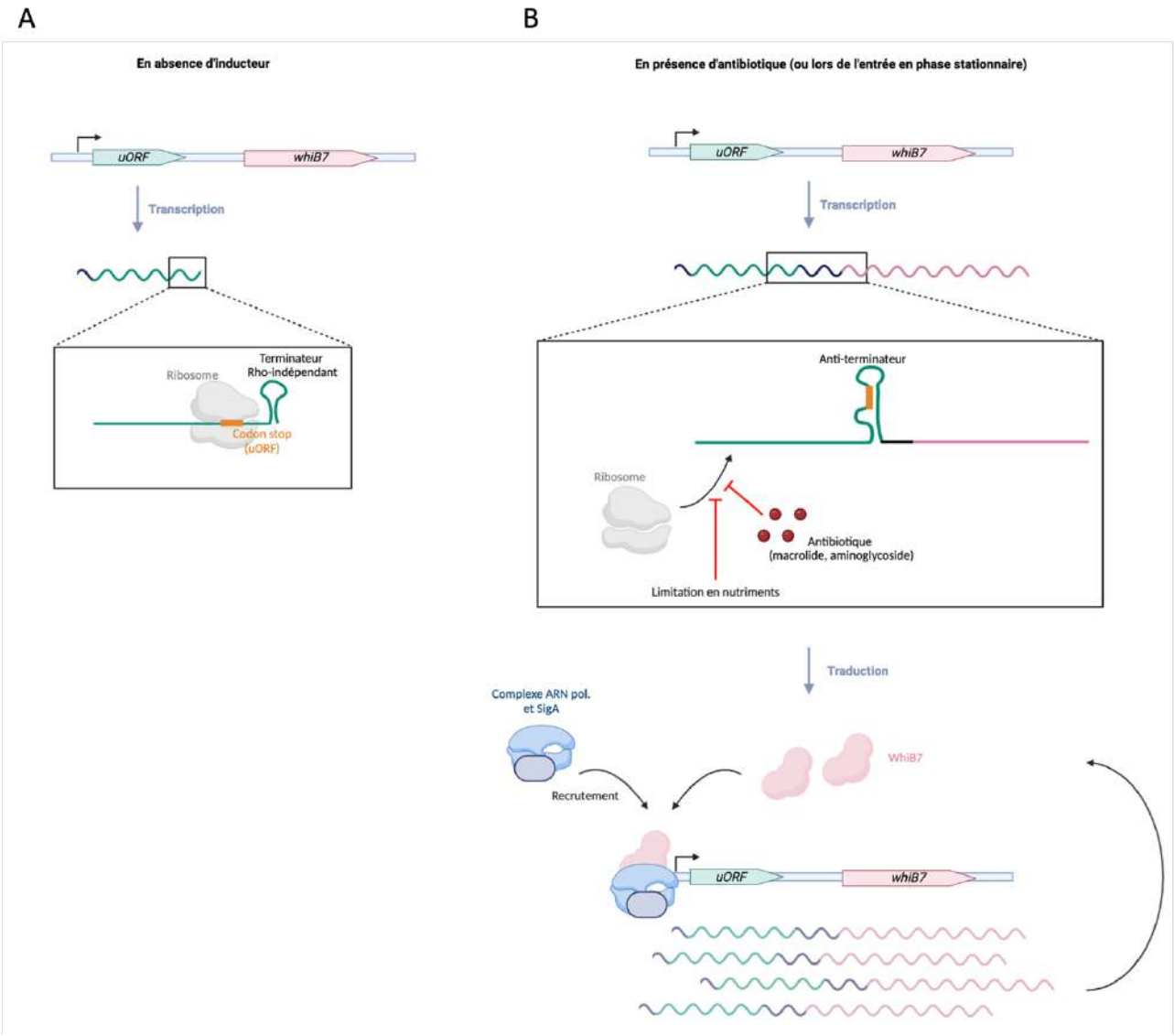


Figure 20. *La transcription de whiB7 est régulée par la traduction d'un petit ORF localisé en amont (uORF).*

A. Chez les bactéries, la transcription et la traduction se fait simultanément. En absence d'inducteur, l'arrêt des ribosomes sur le codon stop de l'ARNm de l'uORF entraîne la formation d'un terminateur Rho-indépendant responsable du décrochage de l'ARN polymérase. L'ORF de whiB7 n'est pas transcrit.
B. Lors d'un stress antibiotique ou d'une carence en nutriments, l'efficacité de traduction de l'uORF diminue. En l'absence des ribosomes sur le codon stop de l'uORF, l'ARNm transcrit s'organise en une structure anti-terminateur stable en raison de la complémentarité des nucléotides. Cet anti-terminateur favorise le passage de l'ARN polymérase vers l'ORF de whiB7 et assure sa transcription. Les protéines WhiB7 ainsi traduites reconnaissent leur séquence promotrice et assurent le recrutement du complexe ARN polymérase-facteur SigA pour augmenter le nombre de transcrits dans la cellule selon une boucle autocatalytique. Les protéines WhiB7 se fixent également sur d'autres séquences promotrices et assurent l'expression des gènes de leur régulon, dont certains sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques.
Adaptée de (Burian and Thompson, 2018; Lee et al., 2022).

Chapitre IV. La tolérance aux antibiotiques

Dans le chapitre précédent, nous avons discuté des nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques de *M. abscessus*. Dans le chapitre qui suit, nous allons nous intéresser à la tolérance, un phénomène très peu étudié chez *M. abscessus*, contribuant également à l'échec des traitements antibiotiques.

La tolérance aux antibiotiques a été observée pour la première fois en 1944 par Joseph Bigger. Lors d'un traitement d'une culture de *Staphylococcus* à la pénicilline, Bigger s'est aperçu qu'une fraction de la population bactérienne ($1/10^5$ – $1/10^6$ bactéries), appelée par la suite bactéries persistantes ou « persisters » en anglais, tolérait l'exposition à des concentrations létales en antibiotique plus longtemps que le reste de la population clonale (Bigger, 1944). Quelques années plus tard, Harris Moyed et Kevin Bertrand ont découvert que la fraction de bactéries persistantes au sein d'une culture de *E. coli* était génétiquement déterminée, et que l'acquisition de mutations génétiques pouvait ainsi l'augmenter (Moyed and Bertrand, 1983). Depuis ces découvertes, nos connaissances sur ces phénomènes de persistance et de tolérance aux antibiotiques se sont consolidées et de nombreuses études ont mis en évidence leurs importances dans l'échec des traitements antibiotiques de diverses infections bactériennes.

I. Notions de tolérance et de persistance aux antibiotiques

Lors d'un traitement antibiotique bactéricide sur une population bactérienne non résistante, la majorité des bactéries est rapidement éliminée suivant une vitesse constante. Aux temps plus tardifs du traitement, la vitesse d'élimination des bactéries ralentit, se traduisant par une cinétique de survie biphasique (Figure 21).

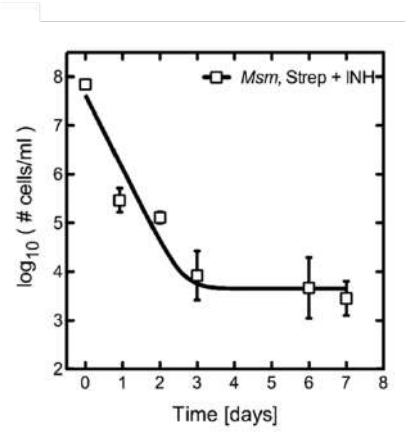


Figure 21. *La sous-population de bactéries persistantes au sein d'une population clonale de M. smegmatis explique la cinétique de survie biphasique lors d'un traitement antibiotique à la streptomycine et l'isoniazide.*

Issue de (Grant et al.*, 2012).*

Cette courbe biphasique traduit la présence de bactéries persistantes au sein de la population (Brauner *et al.*, 2016; Balaban *et al.*, 2019). Retrouvées chez toutes les espèces bactériennes testées, les bactéries persistantes constituent une sous-population de bactéries plus tolérantes au traitement (Van den Bergh *et al.*, 2017). Elles sont capables de survivre plus longtemps au traitement antibiotique sans pour autant être en mesure de se multiplier. Leur valeur de CMI reste identique à celle de la majorité de la population clonale contrairement aux bactéries résistantes dont la CMI est augmentée (Figure 22A) (Brauner *et al.*, 2016; Balaban *et al.*, 2019).

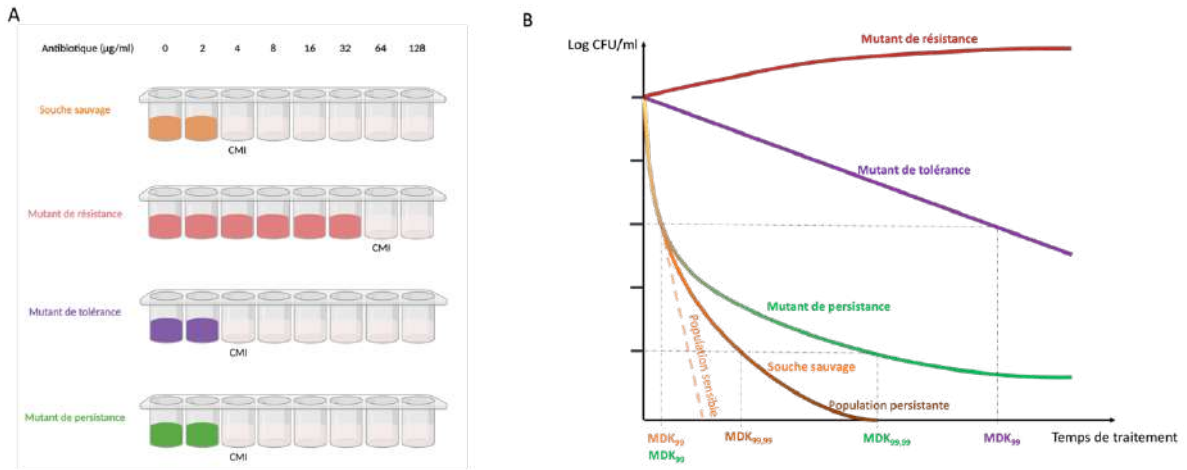


Figure 22. *Paramètres distinctifs entre les phénotypes de tolérance, persistance et résistance aux antibiotiques.*

A. Valeurs de CMI d'un antibiotique entre la souche sauvage et des mutants de résistance, tolérance et persistance aux antibiotiques. Seul le mutant de résistance présente une augmentation de sa CMI en comparaison de la souche sauvage. Les valeurs de CMI sont généralement déterminées en milieu liquide par la dilution de 2 en 2 de l'antibiotique.
B. Cinétiques de survie en présence d'antibiotique de la souche sauvage et de mutants de résistance, tolérance et persistance. La souche sauvage présente une cinétique de survie biphasique en raison de l'hétérogénéité de sensibilité de la population clonale. La majeure partie de la population sensible est rapidement éliminée par le traitement. Une sous-population de bactéries persistantes survit pendant une période plus longue. Un mutant de persistance présente un taux de bactéries persistantes plus important (ou plus faible) que la souche sauvage. Sa cinétique de survie est également biphasique en raison de l'hétérogénéité de la population clonale. Au sein d'un mutant de tolérance, la sensibilité à l'antibiotique de la population clonale est homogène. La totalité de la population bactérienne survit plus longtemps que la souche sauvage. Enfin, un mutant de résistance présente une insensibilité au traitement lui permettant de se multiplier malgré l'antibiotique. L'augmentation du niveau de survie du mutant de persistance est mise en évidence par une valeur de $MDK_{99,99}$ augmentée en comparaison de celle de la souche sauvage. L'augmentation du niveau de survie du mutant de tolérance se traduit par une augmentation de valeur de sa MDK_{99} vis-à-vis de la souche sauvage. Inspirée de (Brauner et al., 2016).

Les bactéries persistantes sont des variants phénotypiques transitoires qui apparaissent selon un taux constant dans la population de manière spontanée ou suite à un stress (Balaban *et al.*, 2004; Van den Bergh *et al.*, 2017). Leur phénotype de tolérance est un phénomène physiologique n'impliquant aucune mutation génétique. Lorsque les bactéries persistantes sont remises en croissance puis réexposées à l'antibiotique dans les mêmes conditions, la cinétique de survie conserve une allure biphasique et la proportion de bactéries persistantes dans la population reste inchangée (Balaban *et al.*, 2019). Le phénotype de tolérance des bactéries persistantes repose sur des fluctuations d'expression génique et des mécanismes qui seront discutés plus en détails dans les paragraphes suivants (Van den Bergh *et al.*, 2017; Wilmaerts *et al.*, 2019).

Le taux de bactéries persistantes au sein de la population bactérienne est constant mais il peut être modulé par des mutations génétiques. On parlera de mutant de persistance (« mutant hip » en anglais) lorsque la proportion de bactéries persistantes dans la population clonale est augmentée (Figure 22B). Il existe également des mutants de persistance présentant une diminution du taux de bactéries persistantes. Certaines mutations génétiques peuvent aussi rendre toute la population clonale plus tolérante à l'antibiotique en comparaison de la souche sauvage. Dans ce contexte, nous parlerons de mutants de tolérance (Figure 22B). Les mutations responsables de l'émergence des mutants de tolérance et de persistance seront discutées plus en détails dans la partie III de ce chapitre.

Comme indiqué précédemment, le phénotype de tolérance n'est pas associé à une modification de la CMI de l'antibiotique (Figure 22A). Les méthodes utilisées pour mettre en évidence un phénotype de résistance ne permettent donc pas d'étudier le niveau de tolérance d'une population ou d'une sous-population bactérienne. Ainsi, le paramètre proposé pour mesurer le niveau de tolérance d'une population bactérienne est la MDK, acronyme de « Minimum Duration Killing », qui correspond à la durée nécessaire à l'élimination d'une certaine proportion de la population bactérienne (Brauner *et al.*, 2016; Balaban *et al.*, 2019). Plus la valeur de MDK est élevée et plus le phénotype de tolérance est marqué. Comme indiqué en Figure 22B, la comparaison de la MDK_{99}, qui rend compte du temps minimal nécessaire à l'élimination de 99% de la population bactérienne, permet de distinguer quantitativement une souche susceptible d'un mutant de tolérance. Elle ne permet cependant pas de mettre en évidence la persistance, car le taux de bactéries persistantes dans une population bactérienne est généralement inférieur à 1%. Pour comparer le niveau de persistance, c'est-à-dire la proportion de bactéries persistantes, entre deux populations bactériennes, il est ainsi préférable d'utiliser la valeur de $MDK_{99,99}$ (Figure 22B) (Brauner *et al.*, 2016; Balaban *et al.*, 2019).

II. Mécanismes associés à la formation des bactéries persistantes

La formation des bactéries persistantes peut être stochastique ou reposer sur une adaptation physiologique des bactéries à leur environnement. Les processus engagés dans la formation des bactéries persistantes reposent sur des fluctuations d'expression génétique en réponse à des stimuli conduisant généralement à l'établissement d'un état de dormance (Lewis, 2010; Van den Bergh *et al.*, 2017; Wilmaerts *et al.*, 2019; Verstraete *et al.*, 2022). La persistance peut également être le résultat d'erreurs dans la réplication bactérienne qui entraînent des périodes transitoires de ralentissement du métabolisme dans certaines cellules composants les populations. L'hypothèse PaSH (« Persistence as Stuff Happens) postule que ce phénomène se produit de façon aléatoire dans toutes les populations bactériennes, expliquant le caractère ubiquitaire des bactéries persistantes (Johnson and Levin, 2013).

A) Relation entre l'état de dormance, le ralentissement du métabolisme et la formation de bactéries persistantes

Les antibiotiques nécessitant d'interagir avec leurs cibles pour exercer leur activité antimicrobienne, un ralentissement du métabolisme général ou l'entrée dans un état de dormance favorisent le phénotype de tolérance des bactéries persistantes. Bien que l'induction de cet état de dormance puisse être spontanée, des conditions de croissance limitées en nutriments ou l'exposition à un stress oxydatif ou antibiotique peut favoriser la formation des bactéries persistantes suite à l'activation de différentes voies de réponse aux stress.

i) La réponse stringente

La réponse stringente est une voie de signalisation permettant aux bactéries de répondre aux stress générés par un environnement limité en nutriments. C'est un système qui repose sur la production de l'alarmone guanosine tétraphosphate (ppGpp), dont l'accumulation dans la bactérie ralentit divers processus essentiels à la prolifération bactérienne. Parmi ces processus, les ppGpp altèrent l'activité de réplication de l'ADN, diminuent la synthèse des nucléotides, modifient le profil de transcription et diminuent l'activité de traduction des ribosomes. Ces altérations conduisent à un ralentissement général de la croissance et favorisent la formation des bactéries persistantes (Figure 23) (Van den Bergh *et al.*, 2017; Irving *et al.*, 2021).

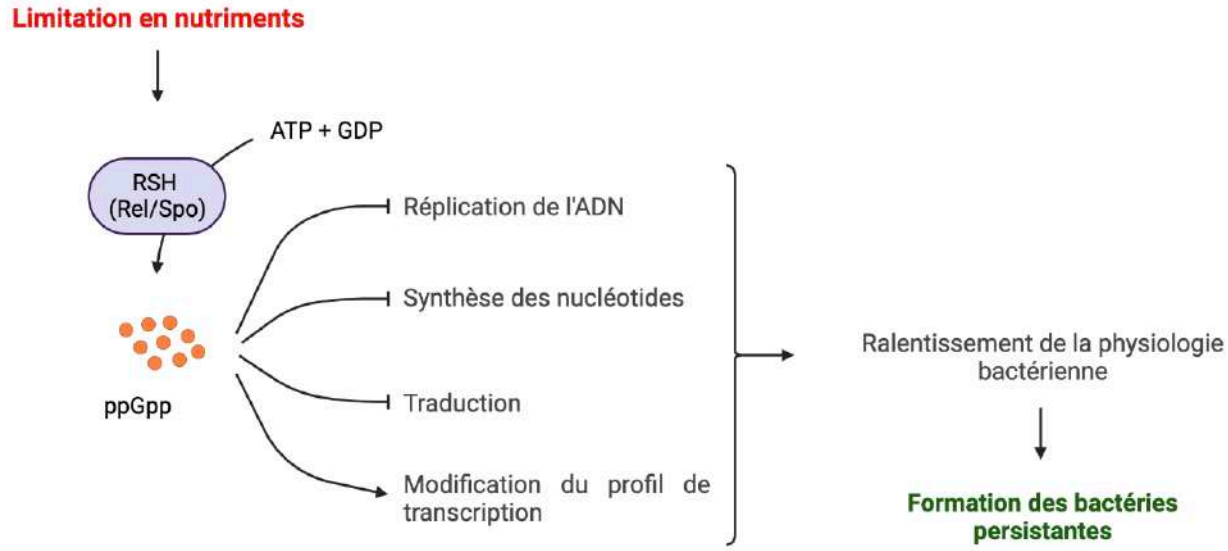


Figure 23. *L'activation de la réponse stringente conduit à la formation de bactéries persistantes.*

Des conditions environnementales limitées en nutriments activent la synthèse de l'alarmone ppGpp par les protéines RSH (Rel/Spo homologues). Les molécules de ppGpp reconnaissent des enzymes impliquées dans divers processus cellulaires et altèrent leur fonction. L'inhibition ou le ralentissement de la réplication de l'ADN, de la synthèse des nucléotides et de la traduction, couplés à une modification du profil de transcription de la cellule entraînent un ralentissement de la croissance bactérienne responsable de la formation des bactéries persistantes. Les cibles des molécules de ppGpp sont discutées plus en détails dans la revue Irving et al., (2021).

L'implication de la réponse stringente dans la formation des bactéries persistantes a été démontrée chez plusieurs espèces bactériennes. Son inhibition chez une souche de *P. aeruginosa ΔrelAΔspoT* entraîne ainsi une diminution de la fréquence des bactéries persistantes d'un facteur ~67, lors d'un traitement à l'ofloxacine en conditions de limitation en nutriments (Nguyen *et al.*, 2011). Chez *E. coli*, la délétion des gènes *relA* et *spoT* induit une diminution de plus d'un facteur 100 du nombre de bactéries persistantes à la ciprofloxacine (Chowdhury *et al.*, 2016).

Chez *M. tuberculosis* une seule enzyme, Rel, est impliquée dans la synthèse de l'alarmone ppGpp (Prusa *et al.*, 2018). L'inhibition de son activité par un composé pharmaceutique conduit également à une diminution de la quantité de bactéries persistantes lors d'un traitement à l'isoniazide (Dutta *et al.*, 2019).

ii) La réponse SOS

La réponse SOS est une voie de réparation de l'ADN induite suite à l'exposition à un stress antibiotique ou oxydatif. Elle est contrôlée par deux protéines régulatrices, LexA, qui agit comme un répresseur, et RecA, l'inducteur. En cas de dommages à l'ADN, l'activation de RecA par les molécules d'ADN simple brin conduit à l'auto-élimination de LexA et la dérépression de la 50aine de gènes du régulon SOS. Certains de ces gènes codent pour des protéines de réparation de l'ADN, de recombinaison homologue, de réplication de l'ADN ainsi que pour des protéines impliquées dans l'arrêt de la division cellulaire du temps de la réparation des lésions (Maslowska *et al.*, 2019).

Plusieurs évidences démontrent l'implication de l'activation de la réponse SOS dans la formation des bactéries persistantes. Chez *E. coli*, la détection de dommages à l'ADN entraîne la dérépression du gène codant la toxine TisB et la formation de bactéries persistantes tolérantes à la ciprofloxacine. En effet, lorsque la concentration de TisB dépasse celle de son antitoxine ItsR, la toxine rejoint la membrane bactérienne et diminue la force protomotrice et la concentration en ATP, interrompant ainsi le métabolisme cellulaire jusqu'à un état de dormance (Figure 24) (Dörr *et al.*, 2010; Berghoff *et al.*, 2017).

La réponse SOS participe également à la formation de bactéries persistantes capables de tolérer l'ofloxacine, au sein des biofilms de *E. coli*, et cela de manière indépendante à l'activation des modules toxine-antitoxine (Bernier *et al.*, 2013).

Contrairement aux autres bactéries, les mycobactéries présentent deux systèmes de réponse aux dommages de l'ADN ; la réponse SOS dépendante de RecA/LexA, et un système de réponse alternatif faisant intervenir les régulateurs transcriptionnels PafBC (Müller *et al.*, 2018).

iii) Les modules toxine-antitoxine

Les modules toxine-antitoxine (TA) sont composés de deux éléments : une toxine stable qui interfère avec un processus cellulaire essentiel, tel que la traduction ou la polarisation de la membrane, et une antitoxine instable dont le rôle est de neutraliser la toxine associée. Les mécanismes de neutralisation de la toxine par l'antitoxine varient en fonction du type du module TA (Wang *et al.*, 2021). Parmi les sept types de modules décrits, les types I et II sont ceux pour lesquels il existe le plus d'évidences d'implication dans la formation des bactéries persistantes. Une liste non exhaustive des gènes codant des modules TA impliqués dans la formation des bactéries persistantes chez différentes espèces bactériennes est présente dans la revue (Van den Bergh *et al.*, 2017) et dans l'article (Ronneau and Helaine, 2019). De nombreux modules TA sont également induits au sein des cellules persistantes de *M. tuberculosis*, en accord avec leurs implications dans les phénotypes de tolérance aux antibiotiques des mycobactéries (Keren *et al.*, 2011).

Le module TA le plus étudié pour son implication dans la formation de bactéries persistantes est HipAB (module TA de type II). Au début des années 1980, afin d'identifier les gènes impliqués dans la formation des bactéries persistantes, Moyed et Bertrand ont exposé de manière cyclique une culture de *E. coli* à de fortes concentrations en ampicilline. Le mutant de persistance isolé présentait des substitutions dans le gène codant la toxine HipA (Moyed and Bertrand, 1983). Ces substitutions diminuent l'affinité d'interaction de la toxine avec l'anti-toxine HipB, permettant à la toxine HipA d'inhiber l'aminoacylation des

ARNt et la traduction des protéines. Cette inhibition active la réponse stringente et favorise l'entrée des bactéries dans un état de dormance responsable de la formation des bactéries persistantes (Figure 24) (Korch *et al.*, 2003; Germain *et al.*, 2013). L'implication du module HipAB dans la formation des bactéries persistantes est également vérifiée au sein de la souche sauvage de *E. coli* où une surexpression de *hipA* a été observée au sein de la sous-population de bactéries tolérantes (Schumacher *et al.*, 2015).

De manière intéressante, l'activation de certains modules TA dépend de (ou se traduit par) l'activation de la réponse stringente et du système SOS lors de conditions spécifiques, établissant une connexion entre les différents mécanismes de formation des bactéries persistantes (Figure 24) (Ronneau and Helaine, 2019). Par exemple, la régulation de la toxine HokB, suite à la production de l'alarmone ppGpp, contribue à la formation des bactéries persistantes chez *E. coli* et *P. aeruginosa* en perturbant le potentiel membranaire et en induisant la dormance de certaines bactéries (Verstraeten *et al.*, 2015). L'activation de la réponse SOS contribue également à la formation des bactéries persistantes au travers du module TA TisAB/ItsR comme discuté dans le paragraphe précédent (Dörr *et al.*, 2010).

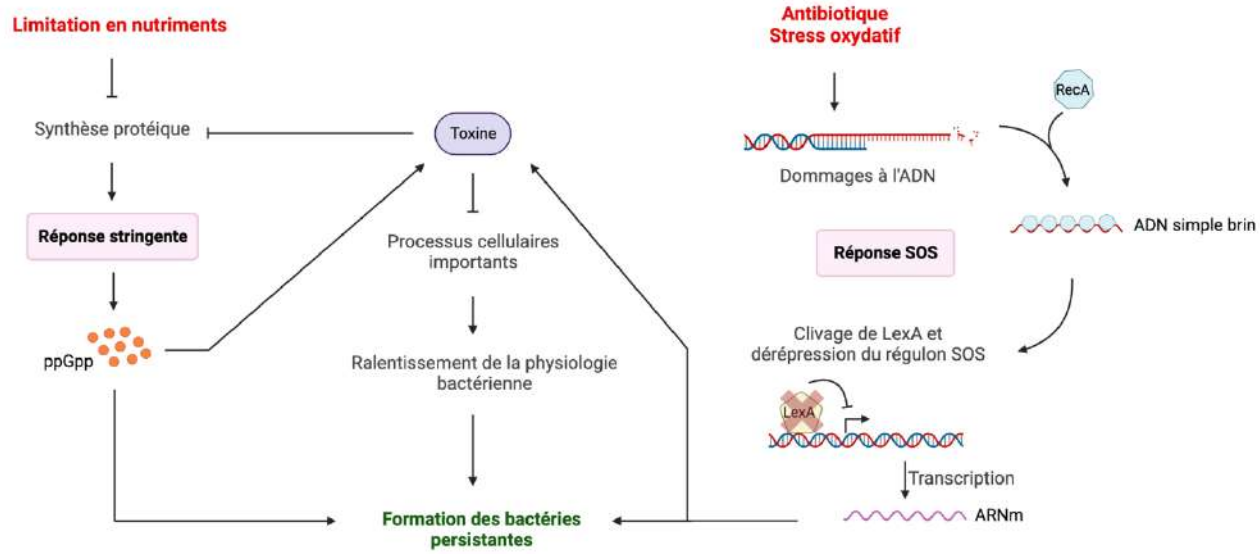


Figure 24. *Les modules Toxine-Antitoxine jouent un rôle central dans la formation des bactéries persistantes.*

Indépendamment d'autres voies de réponse aux stress, les modules TA inhibent ou ralentissent des processus cellulaires importants entrainant la formation de bactéries persistantes suite au ralentissement de la physiologie bactérienne. Une communication entre différentes voies de réponse aux stress s'établit également autour des modules TA, renforçant leur implication dans la formation des bactéries persistantes. Ainsi, en cas de limitation en nutriments, l'activation de la réponse stringente et la production de ppGpp favorisent l'expression de la toxine

HokB en plus de permettre l'entrée dans un état de dormance. Dans le même contexte, l'activation de la réponse SOS suite à une exposition à un stress antibiotique ou oxydatif module également l'expression de certaines toxines, telles que le module TisAB/ItsR, en plus de favoriser la formation des bactéries persistantes.

iv) L'organisation en biofilms

Les biofilms sont des communautés bactériennes organisées où les microorganismes prolifèrent dans une matrice extracellulaire qu'ils sécrètent afin de former une structure compacte. De telles structures se forment suite à la détection de signaux spécifiques tels qu'une carence en nutriments ou l'exposition à un traitement antibiotique (Stanley and Lazazzera, 2004; Hoffman *et al.*, 2005).

Bien qu'ils soient composés d'une population clonale, les biofilms sont des structures hétérogènes où l'expression génétique et les caractéristiques phénotypiques des bactéries sont susceptibles de varier au cours du temps. En effet, plus le biofilm s'agrandit, plus un gradient de nutriments et d'oxygène s'installe et perturbe la physiologie bactérienne (Stewart and Franklin, 2008). Les cellules au centre du biofilm se retrouvent alors dans un environnement carencé en nutriments et fortement hypoxique, ce qui cause un ralentissement de leur métabolisme (Werner *et al.*, 2004). Corrélé à l'induction de plusieurs mécanismes de réponse aux stress, le métabolisme ralenti au centre du biofilm favorise la formation des bactéries persistantes tolérantes aux traitements antibiotiques. Chez *P. aeruginosa* par exemple, la formation de bactéries persistantes est associée à une induction de la réponse stringente suite à la limitation en acides aminés au centre du biofilms (Nguyen *et al.*, 2011). L'induction de la réponse SOS est également nécessaire à la tolérance à l'ofloxacine des biofilms de *E. coli* lors d'une carence en nutriments et sources carbonées (Bernier *et al.*, 2013). Chez des isolats de *Staphylococcus aureus*, l'absence de l'opéron *icaAD* impliqué dans la formation des biofilms est également associé à une diminution de la capacité à former des bactéries persistantes (Manandhar *et al.*, 2022). Chez les mycobactéries telles que *M. tuberculosis* et *M. abscessus*, l'organisation en biofilms est également associée à une diminution de sensibilité à divers antibiotiques, mais les mécanismes en charge n'ont pour le moment pas encore été précisés (Ojha *et al.*, 2008;

Clary *et al.*, 2018; Chakraborty *et al.*, 2021). Il est important de noter qu'au-delà de la formation de bactéries persistantes, l'organisation sous forme de biofilm confère également un avantage de survie à la population bactérienne en réduisant la vitesse de diffusion de l'antibiotique dans les cellules ou en le séquestrant dans la matrice (Hall and Mah, 2017).

B) Implication des voies de détoxification des ROS dans les phénotypes de tolérance

Les données précédemment relatées démontraient l'implication d'un état de dormance et d'un métabolisme ralenti dans la formation des bactéries persistantes. Cependant si la dormance augmente la probabilité de former des bactéries persistantes, elle n'est pas toujours suffisante ou nécessaire à la tolérance. En effet, en utilisant un indicateur fluorescent de la division cellulaire, Orman et Brynildsen (2013) ont démontré que i) les bactéries qui étaient en phase active de croissance avant l'exposition aux antibiotiques pouvaient devenir des bactéries persistantes et que ii) la faible activité métabolique ou l'absence de croissance avant le traitement ne faisait qu'augmenter la probabilité qu'une cellule devienne persistante mais n'était pas suffisante. Dans les faits, la majorité des cellules de *E. coli* composant une sous-population de bactéries « dormantes » (>99 %) n'est pas tolérante aux traitements (Orman and Brynildsen, 2013).

Deux années plus tard, ces mêmes auteurs constatent que la respiration cellulaire pendant la phase stationnaire est un processus impliqué dans la formation des bactéries persistantes et que son inhibition réduit de 1000 fois la quantité de bactéries persistantes chez *E. coli* (Orman and Brynildsen, 2015). Ces premières données obtenues chez *E. coli* suggèrent donc que la tolérance aux antibiotiques des bactéries persistantes ne dépend pas que d'un ralentissement de la croissance ou du métabolisme, mais également d'une modulation de l'homéostasie rédox des cellules.

Comme décrit précédemment dans le Chapitre II, l'homéostasie rédox est un processus essentiel à la survie cellulaire qui permet le maintien d'un état d'équilibre entre la proportion d'espèces oxydantes et d'espèces réductrices dans la cellule. Elle repose sur

des protéines senseurs et effectrices qui assurent la détoxification des ROS (Reactive Oxygen Species) ou des RNS (Reactive Nitrogen Species) détectés dans l'environnement ou produits par les antibiotiques.

Plusieurs évidences montrent que les mécanismes impliqués dans le maintien de l'homéostasie rédox des bactéries contribuent à la formation des bactéries persistantes aux antibiotiques. Par exemple, chez la bactérie *B. cepacia*, la délétion des gènes codant les catalases-peroxydases KatA et KatB, impliquées dans la détoxification des ROS, diminue la proportion de bactéries persistantes lors d'un traitement à la tobramycine (Acker *et al.*, 2013). Il est également démontré que la sous-population de bactéries persistantes d'*E. coli* accumulent moins de ROS lors du traitement antibiotique en raison d'une expression plus élevée des systèmes de production et de réduction du fumarate (Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016). Ces données démontrent la relation causale entre l'adaptation au stress oxydatif et une meilleure tolérance aux antibiotiques chez ces espèces bactériennes.

Chez les mycobactéries, il existe également des mécanismes impliqués à la fois dans le maintien de l'homéostasie rédox (voir Chapitre II. Partie IV) et dans la tolérance aux antibiotiques. Ainsi chez *M. tuberculosis,* des mutants de délétion des facteurs sigma SigE et SigB, tous deux impliqués dans le maintien de l'homéostasie rédox (Fontán *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2016), présentent une proportion de bactéries persistantes diminuée lors d'un traitement à l'isoniazide, la vancomycine, la streptomycine ou l'éthambutol (Pisu *et al.*, 2017). Chez *M. smegmatis*, la surexpression du régulateur transcriptionnel *whiB7*, qui contribue à l'homéostasie rédox et à la résistance intrinsèque mycobactérienne, permet une augmentation générale du niveau de tolérance de la population bactérienne lors d'un traitement à la kanamycine (Schrader *et al.*, 2021). Plus récemment, une étude menée chez *M. abscessus* a démontré qu'une perturbation du système DosRST contribuait également à diminuer le niveau de tolérance à l'amikacine, l'azithromycine et la clofazimine lors d'une exposition des bactéries à un stress hypoxique (Belardinelli *et al.*, 2022), renforçant l'hypothèse d'un lien entre adaptation aux stress oxydatifs et tolérance aux antibiotiques chez les mycobactéries.

III. Modulation de la persistance par accumulation de mutations génétiques

Le taux de bactéries persistantes dans une population bactérienne est génétiquement déterminé mais l'apparition de mutations génétiques peut modifier ce taux et permettre l'émergence de mutants de persistance (si la proportion de bactéries persistantes est augmentée) ou de tolérance (si l'ensemble de la population bactérienne devient tolérant à l'antibiotique) (Figure 22).

De telles mutations génétiques peuvent apparaitre spontanément. C'est le cas par exemple en clinique où certains isolats de *P. aeruginosa* ou de *E. coli* présentent une augmentation du taux de bactéries persistances suite à l'acquisition de mutations dans le gène hypermutateur *mutS* ou *hipA*, respectivement (Mulcahy *et al.*, 2010; Schumacher *et al.*, 2015).

Suite à la découverte de l'implication des bactéries persistantes dans le développement de la résistance (voir Partie IV) et dans l'échec des traitements en clinique (voir Partie V), des efforts considérables ont été consacrés à l'étude des mécanismes de développement de la tolérance chez les bactéries. Pour ce faire, de nombreuses expériences d'évolution *in vitro* ont été conduites en laboratoire. Leur principe repose sur le traitement de populations bactériennes de manière répétitive avec de fortes doses d'antibiotiques, jusqu'à sélection de souches plus tolérantes ou plus persistantes que la souche ancestrale.

Ainsi, les mécanismes conduisant à la tolérance ou la persistance dans les populations évoluées apparaissent dépendants des conditions de traitement. Des mutations et des phénotypes différents sont observés en fonction de la phase de croissance dans laquelle se trouvent les bactéries lors de l'ajout de l'antibiotique, de la famille d'antibiotiques utilisée et de la durée du traitement. Par exemple, le traitement d'une culture de *E. coli* en sortie de phase stationnaire avec de l'ampicilline (β-lactamine) conduit à l'obtention de mutants de tolérance avec une phase de latence (aussi appelée « phase de lag ») prolongée (Fridman *et al.*, 2014). Cette prolongation du temps de lag semble

associée à des mutations dans des gènes codant pour des systèmes TA (*vapB*) ou une aminoacyl-ARNt synthétase (*metG*) dont l'implication dans la persistance avait déjà été démontrée (Fridman *et al.*, 2014). Lors d'une autre étude, le traitement à l'amikacine (aminoglycoside) d'une culture de *E. coli* en phase stationnaire a conduit à l'obtention de mutants tolérants à de multiple antibiotiques (amikacine et ofloxacine), mais pour lesquels la durée de la phase de latence n'était pas modifiée (Van den Bergh *et al.*, 2016). Les mutations associées, localisées dans les gènes *oppB*, *nuoN* et *gadC,* corrèlent davantage avec une diminution de l'activité traductionnelle ou un ralentissement de la croissance bactérienne (Van den Bergh *et al.*, 2016). Enfin, lorsqu'une culture de *E. coli* en phase exponentielle est exposée à de l'ampicilline, d'autres types de mutations apparaissent. L'une d'entre elles concerne par exemple le gène *cyaA* qui code pour une adénylate cyclase responsable de la production de l'AMP cyclique (Sulaiman and Lam, 2020). L'altération de ce gène induit l'activation de la réponse au stress oxydatif et de la réponse SOS (Molina-Quiroz *et al.*, 2018; Sulaiman and Lam, 2020).

Il apparait ainsi clairement que les mutations de tolérance ou de persistance détectées dans les expériences d'évolution en laboratoire sont très hétérogènes. Ceci peut s'expliquer par des variations de conditions expérimentales, des souches ancestrales différentes ou la nature aléatoire de la mutagénèse (Sulaiman and Lam, 2021). Le nombre important de gènes pouvant être impliqués dans la persistance/tolérance participe également à la diversité des mutations observées. En effet, contrairement à la résistance qui résulte de l'altération de gènes en nombre restreint, la tolérance peut apparaître suite à des mutations dans des voies biologiques plus générales participant à la croissance bactérienne, à la synthèse de pompe d'efflux, à la réponse aux stress ou à l'organisation en biofilms.

Cette diversité de mutations génétiques associées à la tolérance s'observe également chez les mycobactéries. Par exemple, des mutations dans le facteur de transcription PrpR augmente la durée de latence et le niveau de tolérance à l'isoniazide et l'ofloxacine de *M. tuberculosis* (Hicks *et al.*, 2018). Une perte d'activité de la RNase J entraine également une augmentation du niveau de tolérance de *M. tuberculosis* à plusieurs antibiotiques en perturbant son métabolisme général (Martini *et al.*, 2022). Les voies de

biosynthèse des lipides et des acides aminés sont également une cible potentielle pour augmenter le niveau de persistance à la streptomycine et la rifampicine chez *M. tuberculosis* (Torrey *et al.*, 2016). Enfin, la surexpression du régulateur transcriptionnel *whiB7* dans un mutant de *M. smegmatis* présentant une altération du métabolisme de biosynthèse de l'arginine conduit également à un phénotype de tolérance aux antibiotiques tels que la kanamycine (Schrader *et al.*, 2021).

IV. Lien entre tolérance et résistance

L'observation d'un maintien de la croissance et du métabolisme bactérien au sein des bactéries persistantes a soulevé l'éventualité de la tolérance comme état intermédiaire à l'établissement de la résistance aux antibiotiques. La réplication de l'ADN lors de la division cellulaire, ainsi que l'activation de certaines voies de réponse aux stress pouvant en effet augmenter le taux de mutations génétiques dans la population persistante.

Afin de vérifier cette hypothèse, Levin-Reisman et ses collaborateurs ont réalisé une expérience d'évolution *in vitro* à partir de trois souches différentes d'*E. coli* (Levin-Reisman *et al.*, 2017). Ayant démontré dans une étude précédente que l'exposition intermittente à de fortes concentrations en ampicilline favorisait l'émergence de mutants de tolérance avec une phase de latence prolongée (Fridman *et al.*, 2014), les auteurs ont reproduit une expérience d'évolution similaire jusqu'à observer une augmentation de la CMI de cet antibiotique (traduisant l'apparition de mutations de résistance). Au cours de chaque expérience d'évolution, ils ont remarqué que la tolérance précédait systématiquement la résistance (Levin-Reisman *et al.*, 2017). Cette relation entre tolérance et émergence de mutations de résistance a également été vérifiée chez d'autres espèces bactériennes telles que *M. tuberculosis* (Sebastian *et al.*, 2016), *S. aureus* (Liu *et al.*, 2020) et *P. aeruginosa* (Santi *et al.*, 2021).

La relation entre tolérance et résistance fait intervenir trois principaux facteurs. Le premier est qu'en protégeant la population bactérienne de l'effet de l'antibiotique, la tolérance augmente la proportion de bactéries viables à la fin du traitement. Chacune de

ces cellules survivantes étant susceptible d'acquérir des mutations génétiques lors de la reprise de croissance, cela augmente la probabilité d'obtention de mutants de résistance. Le deuxième facteur est que le taux de mutation dans la population persistante est supérieur à celui de la population sensible (Windels *et al.*, 2019), par conséquent la probabilité d'obtenir un mutant de résistance sera plus élevée dans la sous-population persistante. La suractivation de certaines voies de réponses aux stress telles que la réponse stringente ou la réponse SOS au sein des bactéries persistantes, peut en effet augmenter la fréquence de mutations de la population survivantes (Cohen *et al.*, 2013; Swaminath *et al.*, 2020; Salini *et al.*, 2022). Enfin, le troisième facteur est que la tolérance (ou la persistance) protège les bactéries n'ayant acquis qu'une mutation de résistance partielle à la concentration en antibiotique utilisée. Levin-Reisman et al., ont en effet calculé que la probabilité d'acquérir une mutation de résistance était plus importante dans le fond génétique d'une souche tolérante, et que plus de cent cycles d'évolution au lieu d'une dizaine auraient été nécessaires à l'obtention d'un mutant de résistance à partir de bactéries non tolérantes (Levin-Reisman *et al.*, 2017). Autrement dit, la tolérance permet l'établissement d'une mutation de résistance en diminuant sa probabilité de se perdre pendant le traitement antibiotique.

V. Conséquences de la tolérance aux antibiotiques en clinique

Bien que seule la résistance aux antibiotiques soit considérée comme une menace de santé publique, l'émergence de souches mutantes tolérantes, multi-tolérantes ou d'isolats cliniques enrichis en bactéries persistantes contribue également à l'échec des traitements antibiotiques (Fauvart *et al.*, 2011; Van den Bergh *et al.*, 2017).

En plus de contribuer à l'émergence de bactéries résistantes, l'importance clinique de la tolérance est démontrée par la relation s'établissant entre la présence de bactéries persistantes ou multi-tolérantes, et la nature chronique des infections bactériennes. En survivant aux premières phases de traitement, les bactéries persistantes ou les mutants de tolérance sont capables de recoloniser l'hôte une fois l'antibiothérapie stoppée, rendant

très compliqué l'éradication de l'infection. Dans ce contexte, des niveaux importants de bactéries persistantes sont retrouvés au sein d'isolats cliniques de *P. aeruginosa* associés à des infections récalcitrances à l'antibiothérapie chez des patients atteints de mucoviscidose (Mulcahy *et al.*, 2010). Chez *S. aureus* également, de nombreux isolats cliniques formant des biofilms et réfractaires aux traitements antibiotiques présentent une augmentation de la proportion de bactéries persistantes à plusieurs familles de molécules antibactériennes *in vitro*, telles que les β-lactamines, les aminoglycosides et les fluoroquinolones (Manandhar *et al.*, 2022). Ce phénotype de persistance semble principalement associé à la capacité des isolats à former des biofilms, puisque les isolats ne présentant plus l'opéron *icaAD* sont moins susceptibles de former des bactéries persistantes (Manandhar *et al.*, 2022). Chez *E. coli*, une augmentation du taux de bactéries persistantes est observée au sein d'isolats cliniques obtenus à partir de patients présentant une infection urinaire. Ces isolats présentent tous des mutations dans le gène *hipA*, codant la toxine HipA, associées à un phénotype de tolérance à de multiple antibiotiques (Schumacher *et al.*, 2015). Enfin, l'association entre le taux de persisters et la récalcitrance des infections est également vérifiée chez *M. tuberculosis*, où des isolats cliniques issus de patients atteints de tuberculose réfractaires aux traitements, présentent une augmentation d'un facteur 10 de la fréquence de bactéries persistantes, en comparaison d'isolats plus facilement traitables (Torrey *et al.*, 2016).

Il apparait ainsi clairement que les bactéries persistantes ou l'émergence de mutants de tolérance et de persistance participent à l'établissement des infections chroniques et entravent l'efficacité des traitements. Cette difficulté est par ailleurs entretenue par le manque de techniques vouées au diagnostic de la persistance/tolérance en clinique, et le manque d'informations concernant les mécanismes de tolérance de certains pathogènes particulièrement réfractaires aux traitements, tels que *M. abscessus*, l'objet d'étude de ce manuscrit.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux déterminants génétiques de la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*, un pathogène mycobactérien émergent posant de nombreux problèmes en clinique.

OBJECTIFS DE THÈSE

Mycobacterium abscessus est un pathogène émergent responsable d'infections sévères chez les patients atteints de mucoviscidose (patients CF) (Jeong *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2023). Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques, intrinsèques ou acquis suite à des mutations génétiques, participent à l'échec des traitements cliniques de ces infections (Nessar *et al.*, 2012; Lopeman *et al.*, 2019).

Récemment, il a été mis en évidence que la tolérance aux antibiotiques participait également à la récalcitrance aux traitements et au caractère chronique de certains infections bactériennes, notamment chez *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *M. tuberculosis* (Mulcahy *et al.*, 2010; Fauvart *et al.*, 2011; Torrey *et al.*, 2016; Van den Bergh *et al.*, 2017; Manandhar *et al.*, 2022). En plus de ralentir l'élimination du pathogène, la tolérance facilite aussi l'acquisition de mutations de résistance (Cohen *et al.*, 2013; Sebastian *et al.*, 2016; El Meouche and Dunlop, 2018; Levin-Reisman *et al.*, 2019; Windels *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020; Santi *et al.*, 2021).

Alors que la plupart des mécanismes associés à la résistance sont caractérisés chez *M. abscessus* (Nessar *et al.*, 2012; Lopeman *et al.*, 2019; Johansen *et al.*, 2020), lorsque j'ai initié mes travaux de thèse, il n'existait que très peu d'études sur sa tolérance aux antibiotiques. Les seules données disponibles décrivaient une plus forte tolérance aux antibiotiques des bactéries organisées en biofilms, par rapport aux bactéries planctoniques (Clary *et al.*, 2018) et une sensibilité au traitement différente en fonction du milieu de croissance utilisé (Hunt-Serracin *et al.*, 2019). Aucune étude ne portait sur les mécanismes moléculaires responsables de cette tolérance.

Dans ce contexte, mon **1er objectif de thèse** visait à identifier les mécanismes associés à la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*. Les résultats obtenus font l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise au journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)*, sur laquelle j'apparais première auteure.

Tel qu'énoncé précédemment, la tolérance aux antibiotiques participe à l'établissement d'infections chroniques en favorisant l'acquisition de mutations de résistance. D'autre part, il a été démontré que des bactéries capables de persister chez l'hôte, c'est-à-dire de survivre au système immunitaire de l'hôte ou au sein des

macrophages, étaient plus aptes à survivre à l'exposition aux traitements antibiotiques (Rowe *et al.*, 2020). Ces dernières données suggèrent qu'il existe une relation entre la tolérance aux antibiotiques et la persistance *in vivo* des bactéries.

Dans ce contexte, mon **2ème objectif de thèse** a été de déterminer i) si l'augmentation de la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus* était corrélée à une augmentation de la persistance de la bactérie dans le modèle murin et ii) si une tolérance accrue aux antibiotiques impactait la fréquence d'acquisition de mutations de résistance. Ces études ont été rendues possibles suite à l'obtention du mutant de tolérance évoqué ci-dessus.

Un autre problème lié aux traitements des infections chroniques est la difficulté à corréler l'activité *in vitro* des antibiotiques, déterminée par la CMI, et l'efficacité observée chez le patient infecté. Le niveau de sensibilité d'une bactérie à un antibiotique donné étant en partie dépendant des conditions environnementales auxquelles elle est exposée. Quelques études utilisant des modèles animaux ont été réalisées pour évaluer la CMI de certains antibiotiques dans des conditions se rapprochant de l'environnement retrouvé chez l'hôte, mais ces modèles ne miment qu'approximativement l'hôte humain, sont coûteux, et soulèvent des problèmes éthiques.

En conséquence, mon **3ème objectif de thèse** a porté sur le développement d'un modèle d'organoïdes récapitulant certaines des caractéristiques pulmonaires humaines de la mucoviscidose. L'intérêt de ce modèle est de permettre une étude plus spécifique de l'infection par *M. abscessus* et de tester l'efficacité des antibiotiques dans des conditions proches de l'environnement pulmonaire des patients. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Etienne Meunier (IPBS-CNRS) et a fait l'objet de deux publications scientifiques où j'apparais co-auteure ; une dans la revue *Molecular Microbiology* et une dans *PLOS Pathogens*.

RÉSULTATS & DISCUSSION

Objectif I. Identification des déterminants génétiques et mécanismes associés à la tolérance chez *Mycobacterium abscessus*.

I. Contexte et résumé de l'étude

Afin d'identifier les fonctions associées à la tolérance à la céfoxitine, un antibiotique de 1ère ligne ciblant l'assemblage du peptidoglycane de l'enveloppe, nous avons tenté d'obtenir des mutants avec une tolérance accrue de toute la population clonale (mutants de tolérance) ou conduisant à une augmentation du taux de bactéries persistantes (mutants de persistance) en présence de cet antibiotique. Pour sélectionner de tels mutants, nous avons réalisé une expérience d'évolution consistant à exposer de manière intermittente la souche sauvage de laboratoire *M. abscessus* ATCC 19977 (souche WT) à de fortes concentrations en antibiotique.

Ce procédé expérimental permet un enrichissement de la population de départ par des bactéries mutantes présentant un niveau de sensibilité à l'antibiotique diminué. Appliquée à différentes espèces bactériennes, telles que *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *M. tuberculosis,* cette approche a permis d'isoler divers mutants de tolérance ou de persistance (Torrey *et al.*, 2016; Sulaiman and Lam, 2021; Santi *et al.*, 2021). Il apparait dans ces différentes études, que les mutations conduisant à l'augmentation de la tolérance ou de la persistance sont dépendantes des conditions dans lesquelles ont été réalisées les expériences. Afin d'éviter l'apparition de mutants de résistance au cours de l'expérience d'évolution, il est important de se placer à des concentrations en antibiotique supérieures aux valeurs de CMI et de MPC, définies respectivement comme les concentrations en antibiotique inhibant la croissance bactérienne ou prévenant l'apparition de mutations de résistance. Les valeurs de MPC des β-lactamines chez les bactéries du genre *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* n'excèdent généralement pas 5 à10 fois la valeur de CMI (Dahdouh *et al.*, 2014).

Compte tenu de ces éléments, nous avons exposé la souche sauvage de *M. abscessus* à 400 µg/ml de céfoxitine, soit une valeur 50 fois supérieure à la CMI. Nous avons utilisé un protocole adapté de la publication de Fridman et ses collaborateurs (Fridman *et al.*, 2014) : au cours de chaque cycle d'évolution une fraction d'une culture en phase stationnaire est diluée dans du milieu frais contenant l'antibiotique. Après une période de traitement définie, l'antibiotique est retiré du milieu et les bactéries survivantes

sont resuspendues dans un milieu sans antibiotique pour une croissance jusqu'à la phase stationnaire. Afin d'adapter ce protocole à la croissance lente de *M. abscessus*, j'ai choisi de fixer une durée de croissance et de traitement de 72h. Suivant ce protocole, nous nous attendions, comme ce fut le cas dans l'article de Fridman, à isoler au moins un mutant de tolérance présentant une phase de latence prolongée d'une durée similaire au temps d'exposition à l'antibiotique (Fridman *et al.*, 2014).

Après dix cycles d'évolution, nous avons isolé un mutant, nommé MABserB2 présentant une tolérance accrue à la céfoxitine lors de la reprise de croissance des bactéries en sortie de phase stationnaire. Celui-ci présente une diminution de sensibilité à deux antibiotiques supplémentaires ; l'imipénème et la moxifloxacine. Nous avons identifié une unique mutation dans le gène *serB2* (*MAB_3388c*), codant pour une phosphosérine phosphatase impliquée dans la dernière étape de biosynthèse de la L-sérine, responsable du phénotype de tolérance. Bien que le phénotype de tolérance ne soit observé qu'en sortie de phase stationnaire, MABserB2 ne présente pas d'augmentation de la durée de sa phase de latence ni de retard de croissance. Des analyses métabolomiques réalisées sur cette souche ont cependant montré une altération du métabolisme du mutant lors de la phase stationnaire, associée en particulier à une dérégulation du métabolisme des acides-aminés et du cycle TCA. Ces altérations conduisent à une perturbation de l'homéostasie rédox intracellulaire vers un environnement plus réducteur, induisant la surexpression du régulateur transcriptionnel *whiB7*. Cette surexpression est requise pour le phénotype de tolérance du mutant MABserB2.

Sans avoir identifié les gènes contrôlés par WhiB7 et responsables du phénotype de tolérance, ce travail a cependant permis de mettre en évidence pour la première fois, l'implication de ce régulateur transcriptionnel dans la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*.

II. Résultats

Les résultats obtenus ont été soumis au journal *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* :

Altered serine metabolism promotes drug tolerance in *Mycobacterium abscessus* via a WhiB7-mediated adaptive stress response

Célia Bernard, Yi Liu, Gérard Larrouy-Maumus, Christophe Guilhot, Kaymeuang Cam, and Christian Chalut

Les données de métabolomique ont été obtenues en collaboration avec le Dr Gérald Larrouy-Maumus et le Dr Yi Liu de l'Imperial College of London. Toutes les autres expériences publiées dans ce papier ont été réalisées par moi-même, sous la direction du Dr Christian Chalut et du Dr Kaymeuang Cam.

Publication n°1: "Altered serine metabolism promotes drug tolerance in *Mycobacterium abscessus* via a WhiB7-mediated adaptive stress response"

La Table S1 peut être téléchargée au lien suivant : https://mycore.core-cloud.net/index.php/s/TD0gkcPnqgjQ1lC

Altered serine metabolism promotes drug tolerance in *Mycobacterium abscessus* via a WhiB7-mediated adaptive stress response

Célia Bernard[a], Yi Liu[b], Gérard Larrouy-Maumus[b], Christophe Guilhot[a], Kaymeuang Cam[a], and Christian Chalut[a]

[a]Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III - Paul Sabatier (UT3), Toulouse, France

[b]Faculty of Natural Sciences, Department of Life Sciences, Centre for Bacterial Resistance Biology, Imperial College London, England

Address correspondence to Christian Chalut, christian.chalut@ipbs.fr, or Kaymeuang Cam, kaymeuang.cam@ipbs.fr

Running title: Antibiotic tolerance in *Mycobacterium abscessus*

Keywords: Mycobacteria, *Mycobacterium abscessus*, antibiotic tolerance, β-lactam, serine metabolism, WhiB7.

ABSTRACT

Mycobacterium abscessus is an emerging opportunistic mycobacteria pathogen responsible for chronic lung diseases, especially in patients with cystic fibrosis. Treatment failure of *M. abscessus* infections is primarily associated with intrinsic or acquired antibiotic resistance. However, there is growing evidence that antibiotic tolerance, *i.e.* the ability of bacteria to transiently survive exposure to bactericidal antibiotics through physiological adaptations, contributes to the relapse of chronic infections and the emergence of acquired drug resistance. Yet, our understanding of the molecular mechanisms that underlie antibiotic tolerance in *M. abscessus* remains limited. In the present work, a mutant with increased cross-tolerance to the first-line and second-line antibiotics cefoxitin and moxifloxacin, respectively, has been isolated by experimental evolution. This mutant harbours a mutation in *serB2*, a gene involved in L-serine biosynthesis. Metabolic changes caused by this mutation alter the intracellular redox balance to a more reduced state that induce overexpression of the transcriptional regulator WhiB7 during the stationary phase, promoting tolerance through activation of a WhiB7-dependant adaptive stress response. These findings suggest that alteration of amino acid metabolism and, more generally, conditions that trigger *whiB7* overexpression, make *M. abscessus* more tolerant to antibiotic treatment.

Importance

Beyond classic resistance mechanisms, antibiotic tolerance is responsible of treatment failure, relapse of bacterial infections and in fine paves the way to acquired resistance. Therefore identifying and characterizing pathways and effectors leading to antibiotic tolerance are of highest importance for the management of patients with chronic infections as well as fighting antibiotics resistance. This study shows that WhiB7, a transcriptional regulator previously found to control intrinsic drug resistance in mycobacteria, mediates tolerance as well in *Mycobacterium abscessus*, an emerging opportunistic pathogen causing lung infections in human. These results provide new insights into the molecular mechanisms of antibiotic tolerance in *M. abscessus*, which remain poorly understood and underscore WhiB7 as a potential target for fighting mycobacterial pathogens.

INTRODUCTION

Treatment failure of bacterial infections is mostly associated with intrinsic and acquired bacterial resistance. However, beyond bacterial resistance, drug tolerance has significant clinical implications in the management of chronic infections since it contributes to extended duration of antibiotic treatment (1). Tolerance is an adaptive trait that relies on the ability of a whole bacterial population or a subpopulation, known as persisters, to transiently survive lethal doses of antibiotics without developing resistance (2-4). In contrast to resistant bacteria, which exhibit higher antibiotic minimal inhibitory concentration (MIC) values compared to susceptible bacteria, tolerant bacteria show no difference in MIC (2, 5). Albeit governed by physiological adaptations, drug tolerance is an evolvable trait and it is possible to isolate mutants with high level of antibiotic tolerance over the whole population (tolerant mutants) or conferring higher level of persister formation (persistent mutants) through repeated exposure to high doses of antibiotics (1, 2). There is substantial evidence that drug tolerance contributes to treatment failure and relapse of chronic infections, including infections caused by major microbial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Mycobacterium tuberculosis* (6-8). In addition, it has been shown, both *in vitro* and *in vivo*, that tolerance promotes the emergence of drug-resistant bacteria (1, 9-13). Therefore, understanding the genetic basis and physiology of antibiotic-tolerant cells and the paths leading to high tolerance is of paramount importance for designing strategies to not only reduce tolerance, but also combat resistance. Numerous mechanisms and pathways associated with drug tolerance have been identified. These include toxin-antitoxin systems, factors involved in cellular respiration, cell-size heterogeneity, biofilm formation, or the stringent response (4). Interestingly, it has been observed that reducing the level of reactive oxygen species (ROS) that accumulate in bacteria during antibiotic treatments, through the production of antioxidant scavenger enzymes or ROS-degrading enzymes, promotes the formation of tolerant cells (14).

Mycobacterium abscessus is an emerging nontuberculous mycobacteria pathogen causing chronic lung diseases in human, especially in patients with cystic fibrosis (15-17). *M. abscessus* infections are notoriously difficult to treat because this bacterium has intrinsic resistance to a wide range of antibiotics and many clinical strains have acquired drug-resistance genes (18-20). As with other pathogenic bacteria, antibiotic tolerance in *M. abscessus* is probably associated with poor treatment outcomes and evolution towards resistance. However, current knowledge of the mechanisms leading to antibiotic tolerance in this bacterial species remains limited. In this study, we sought to target this problem using cefoxitin, a β-lactam used as first-line therapy for treating *M. abscessus* infections, as a model antibiotic (16, 21). We report that impairment in serine metabolism promotes cefoxitin tolerance through activation of a WhiB7-dependant stress response during growth resumption of *M. abscessus* from the stationary phase. These results pinpoint for the first time the transcriptional regulator WhiB7, previously found to contribute to adaptive antibiotic resistance in mycobacteria, as a mediator of drug tolerance in *M. abscessus* and suggest that a subset of genes within the WhiB7 regulon regulates protective responses against antibiotic-induced oxidative damage.

RESULTS

Isolation of a cefoxitin tolerant mutant of *M. abscessus* by experimental evolution

Recent studies have shown that under both clinical and laboratory conditions, bacteria can rapidly evolve towards higher tolerance in response to repetitive antibiotic treatments by accumulation of genetic mutations (1). Investigating these genetic changes might provide valuable information on the adaptive processes that contribute to tolerance. Therefore, to identify pathways involved in cefoxitin tolerance in *M. abscessus*, an experimental evolution was performed, alternating cycles of growth of bacteria to stationary phase in an antibiotic-free medium for 72 hours and dilution in a medium containing 400 μg/mL of cefoxitin for 72 hours (Fig. 1a). An antibiotic concentration far above the MIC (50x) (Fig. 1b, Table 1), was chosen to achieve an effective killing of the bacteria as well as to prevent the emergence of antibacterial resistance (22). For each cycle, the bacterial survival rate was determined as the ratio of CFU at the beginning and at the end of the antibiotic treatment. This rate gradually increased over the cycles from 0.001% to 10% at the end of cycle 10, indicating that the bacterial population has evolved towards an increased tolerance to cefoxitin (Fig. 1c). Ten independent clones were then selected from the cycle 10 population and assayed for cefoxitin tolerance with the same protocol than the one used for the experimental evolution. Of these, seven showed markedly increased tolerance to cefoxitin compared to the parental strain (Fig. S1).

A mutation in *serB2* confers tolerance to several classes of antibiotics used to treat *M. abscessus* upon exit from the stationary phase

The genome sequences of the seven evolved clones as well as that of the parental strain used for the experimental evolution (hereafter referred to as WT) were determined and compared to the CIP104536^T (ATCC19977T) reference sequence (23). Of note, the WT was supposed to correspond to the 19977-IP-S variant of CIP104536^T (24). The genome sequence of 19977-IP-

S was previously found to contain single nucleotide polymorphisms (SNP) and small insertion/deletion mutations (Indels) relative to the CIP104536^T sequence (Table 2). Intriguingly, some of these mutations were absent in the WT and in the evolved clones. In addition, our sequencing analyses revealed 2 SNPs common to the WT and the evolved clones, but absent in both the original 19977-IP-S variant and in CIP104536^T (Table 2). Apart from these genomic differences, a frameshift mutation common to the seven high tolerance clones but absent in the WT was detected in gene *serB2* (*MAB_3388c*), which encodes a key metabolic enzyme of the L-serine synthesis pathway that converts L-3-phosphoserine into L-Serine (25) (Fig. 2a). This mutation results in the production of a SerB2 protein with a substitution on the last amino acid followed by an extension of 17 extra residues (Fig. 2b). Interestingly, the crystal structure of SerB2 from *M. avium* revealed a homodimeric organization, with the C-terminus of each protomer located close to the dimer interface (26), suggesting that this C-terminal extension may hinder dimerization and reduce enzymatic activity. One clone with increased tolerance, named thereafter MABserB2, was selected for further analyses. We confirmed that the decreased susceptibility of MABserB2 to cefoxitin was associated with tolerance and not resistance, as the WT and the mutant strains had an identical MIC value for this antibiotic (Fig. 1b and Table 1). To firmly establish the involvement of the *serB2* mutation in cefoxitin tolerance, the DNA region encompassing the mutation site was substituted by the corresponding WT sequence to restore the WT allele of *serB2* in MABserB2 (Fig. S2). As expected, the resulting strain (MABserB2-rev) displayed a killing curve similar to that of the WT (Fig. 3a). During the experimental evolution and characterization of the selected clones, bacteria were cultured for 72 hours before being diluted and exposed to cefoxitin. At the end of the growth stage, the bacterial concentration was around 10^9 CFU/mL, indicating that bacteria have entered the stationary phase. Therefore, the increased tolerance phenotype of MABserB2 was observed on bacteria transitioning from stationary to exponential phase. We investigated whether this

strain also exhibited increased tolerance during the exponential phase. As shown in Fig. 3b, both WT and MABserB2 strains showed similar survival rates, indicating that the tolerance phenotype of MABserB2 was specifically associated with growth resumption upon exit from the stationary phase. We also examined whether MABserB2 exhibited cross-tolerance to other antibiotics used to treat *M. abscessus* infections (imipenem, moxifloxacin, amikacin, and rifabutin). Cross-tolerance was observed with imipenem and moxifloxacin, but not with amikacin or rifabutin (Fig. 3c). As with cefoxitin, only bacteria emerging from the stationary phase displayed an increase tolerance and that was not related to an increase in the MIC of these antibiotics (Fig. S3 and Table 1).

The tolerance of MABserB2 to cefoxitin is not associated with reduced growth rate or extended lag phase

Since antibiotic tolerance can be promoted by reduced bacterial growth rate or prolonged lag phase, we tested whether changes in one of these microbial growth parameters would account for cefoxitin tolerance in MABserB2 (27). Actually, the later explanation was expected given the way the experimental evolution was performed. Indeed, bacteria were in stationary phase before antibiotic exposure, therefore delaying the exit from the lag phase may provide protection from cefoxitin which is much more effective against actively replicating bacteria (28). As shown on Fig. 4a, the growth rates of the WT and MABserB2 in exponential phase were similar in 7H9 and in M9 minimal medium, indicating that reduction of the growth rate is not responsible for MABserB2 tolerance. Note that 7H9 and M9 media do not contain serine, indicating that MABserB2 is not a serine auxotroph mutant. We then measured the lag time of these strains after inoculation of stationary-phase bacteria into fresh culture medium. Unexpectedly, an identical lag time of 8 hours and similar growth kinetics after growth recovery were observed for the two strains (Fig. 4b). To confirm these results, we used a plasmid-based

fluorescence reporter system (pTIGc) constitutively expressing the green fluorescent protein (GFP) and conditionally the red fluorescent protein TurboFP635 upon induction with theophylline. This plasmid allows direct quantification of bacterial multiplication by tracking the dilution of red fluorescence in cells after removal of the inducer (29). WT and MABserB2 bacteria harboring pTIGc were cultivated to stationary phase in the presence of theophylline and then diluted into fresh medium without inducer. The fluorescence intensity of TurboFP635 remained unchanged for both strains during the first 2 hours of incubation, indicating that bacteria were not dividing, and then started to decline at a similar rate for the two strains to reach 31% and 38% of the initial intensity for the WT and MABserB2, respectively, after 8 hours of incubation (Fig. 4c and 4d). Therefore, a prolonged lag phase is neither the explanation for the tolerance phenotype of MABserB2.

Alteration in the L-serine biosynthesis pathway is responsible for the tolerance phenotype of MABserB2

serB2 encodes a phosphoserine phosphatase involved in the last step of the L-serine biosynthesis pathway (Fig 2a), suggesting that the increased tolerance phenotype of MABserB2 could be associated, directly or indirectly, with altered L-serine metabolism (26). To test this hypothesis, MABserB2 was cultivated to stationary phase in the presence of either serine or glycine, an amino acid primarily synthesized from serine, and then assayed for cefoxitin tolerance after dilution into fresh medium. As shown on Fig. 5a, the tolerance phenotype of MABserB2 was completely suppressed, indicating that impaired serine metabolism was indeed responsible for the tolerance of the mutant to cefoxitin. This result also suggested that MABserB2 produced either an inactive SerB2 enzyme or one with altered activity. The former possibility was unlikely, as MABserB2 was not auxotroph for serine (see above) and an exhaustive transposon mutagenesis in 7H9 medium recorded *serB2* as essential for *M.*

abscessus (30). To confirm this hypothesis, we investigated the requirement for SerB2 in *M. abscessus* using a CRISPR interference (CRISPRi) approach (31). Silencing *serB2* resulted in growth inhibition on standard 7H10 medium in agreement with the transposition mutagenesis data (Fig. 5b). As expected, the defect was rescued by adding serine in the culture medium, indicating that reducing the expression of *serB2* in *M. abscessus* led to serine auxotrophy. Accordingly, the control vector carrying no sgRNA did not impact the growth on 7H10 medium containing or not serine whereas silencing the control gene *MAB_3117c*, encoding an essential phosphopantetheinyl transferase, inhibited bacterial growth on both media (32). This result, in addition to the observation that MABserB2 could grow in 7H9 and M9 media lacking serine (Fig. 4a), indicated that the mutation present in *serB2* did not abolish the activity of the SerB2 protein but rather altered its function.

MABserB2 exhibits metabolic disorders resulting in reduced intracellular redox-state

To get hints that would explain why a mutation in the serine biosynthesis pathway would lead to antibiotics tolerance, metabolic changes induced in MABserB2 were further characterized by comparing the relative abundance of selected metabolites in the WT and MABserB2 strains in both stationary and exponential phases. As one might have expected, L-serine was found 2- to 3-fold less abundant in MABserB2 than in WT in both growth phases (Fig. 6a and Table S1). Supplementation of the growth medium with L-serine increased the abundance of this amino acid in stationary-phase for both MABserB2 and WT without, however, modifying the abundance ratio between the two strains. Of note the amount of L-serine in stationary phase for MABserB2 grown in serine supplemented medium was higher than for WT grown without supplementation, probably explaining the loss of the tolerance phenotype of MABserB2 in serine supplemented medium (Fig. 5a and Table S1). Because amino acid metabolic pathways are intimately interconnected in cells, we also examined whether change in serine homeostasis

in MABserB2 affected the metabolism of other amino acids. Indeed, the abundance of glycine, proline, asparagine, valine, and isoleucine was lower in MABserB2 than in WT in stationary phase, whereas that of aspartate, glutamate, and glutamine, which play a central role in nitrogen assimilation, was higher (33) (Fig. 6a and Table S1). Interestingly, intracellular glutamate accumulation in MABserB2 correlated with a decreased in α-ketoglutarate abundance relative to the WT (Fig. 6a and Table S1). It has been shown that low nitrogen availability, a situation encountered when bacteria enter stationary phase, results in an increase of the α-ketoglutarate/glutamate ratio in bacterial cells (34). In line with this, we observed an increase of this ratio both in the MABserB2 and WT strains during transition from exponential to stationary phase, but that of MABserB2 was 1 log of magnitude lower than that of the mutant strain, suggesting that MABserB2 kept using α-ketoglutarate from the TCA cycle to produce glutamate and nitrogenous compounds despite being in stationary phase (Fig. 6b). Furthermore, an accumulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) and succinate in MABserB2 was observed, suggesting that an upregulation of the GABA shunt might refuel the TCA cycle (35). Taken together, these data showed that alteration of the L-serine biosynthetic pathway in MABserB2 induced metabolic changes likely affecting central metabolism. Because the intracellular redox environment is directly coupled to central metabolism and the efficiency of antibiotics is strongly dependent on the redox state of the bacteria (36-39), we investigated changes in the redox balance in MABserB2 by quantifying NADH and NAD+ in stationary-phase. In two independent assays, both NADH and NAD+ were found more abundant in MABserB2 than in the WT (Table 3). Importantly, the NADH/NAD+ ratio was about twice as high in MABserB2 than in WT, indicating a more reduced intracellular redox state in the mutant.

The enhance tolerance of MABserB2 to cefoxitin is mediated by the antibiotic resistance master transcription regulator WhiB7

The transcriptional regulator WhiB7 was known to be required for adaptive resistance to antibiotics targeting the translation machinery both in *M. tuberculosis* and *M. abscessus* (40-42). However, recently WhiB7 has been shown to also promote antibiotic tolerance in *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* mutants impaired in the arginine biosynthetic pathway, suggesting that modifications in amino acid metabolism induce stress response that can trigger expression and activation of this transcriptional regulator (43). These findings prompted us to investigate the potential role of WhiB7 in the enhanced tolerance of MABserB2 to cefoxitin. We first compared the expression of *whiB7* in the WT and MABserB2 strains grown in exponential or stationary phase by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). In exponential phase the expression level of *whiB7* in MABserB2 was merely twice of that of the WT, whereas, in stationary phase, it was 120-fold higher (Fig. 7a). Therefore the growth phase-dependent differential expression of *whiB7* was positively correlated with the growth phase-dependent tolerance phenotype of MABserB2. Interestingly, supplementing the growth medium with serine dramatically reduced the magnitude of *whiB7* overexpression to only 9-fold in stationary phase (Fig. 7a), in agreement with the observation that supplementation with serine suppressed the tolerance phenotype of MABserB2. These results therefore suggested that as for *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*, alteration of amino acid metabolism in *M. abscessus* might lead to antibiotic tolerance through the overexpression of WhiB7 as well. We then directly tested this hypothesis by silencing *whiB7* using CRISPRi. As shown on Fig. 7b, abolishing the overexpression of *whiB7* of MABserB2 in stationary phase was correlated to a marked decrease in tolerance of MABserB2. To strengthen this conclusion, *whiB7* was deleted in both the WT and MABserB2 strains and the mutants challenged with cefoxitin. The deletion had no effect in the WT background but in MABserB2, it led to a significant decrease in cefoxitin tolerance

(Fig. 7c). Accordingly, complementation with a plasmid harboring the wild-type allele of *whiB7* fully restored the tolerance phenotype (Fig. 7c). Interestingly, as observed upon silencing of *whiB7* with CRIPSRi, deletion of *whiB7* in MABserB2 did not fully suppress the tolerance level, suggesting that additional determinants unrelated to WhiB7 contribute to the tolerance phenotype of the strain. Altogether, these data demonstrated that alteration in serine metabolism in MABserB2 promoted cefoxitin tolerance, at least in part through the overexpression of the transcription regulator *whiB7*.

An oxidative environment enhances the tolerance of *M. abscessus* WT to cefoxitin treatment

WhiB7 is a redox-sensitive transcription factor controlling a regulon of about 80 genes in *M. abscessus*, including its own gene (40, 44). The activity of WhiB7 is higher in reducing environments but up-regulation of *whiB7* by an oxidative stress was also reported (40, 44-46). The higher NADH/NAD+ ratio in MABserB2 than in WT in stationary phase indicated a shift in the intracellular redox balance to a more reduced state in the mutant that could activate WhiB7, leading both to the overexpression of the gene and the tolerance phenotype. This suggested that a more reducing environment would be sufficient to promote the tolerance to cefoxitine and moxifloxacin. We challenged this hypothesis by treating the WT strain with the reducing agent DTT during both the growth phase and the antibiotic treatment period but no overexpression of *whiB7* was observed in stationary-phase bacteria and only a limited impact on tolerance was detected (Fig. S4). Because activation of WhiB7 and a shift to a more reducing cytosolic environment may arise from an adaptive response of bacteria to oxidative stress, we also monitored cefoxitin tolerance under oxidative culture conditions. Accordingly, exposure of bacteria to oxidizing agent diamide during growth phase and antibiotic treatment resulted in enhanced tolerance of the WT strain (Fig. 8a). This effect was dependent on WhiB7 but,

intriguingly, was not associated with an overexpression of WhiB7 in stationary-phase bacteria, although some genes of the WhiB7 regulon, such as *eis2*, were overexpressed (Fig. 8a and S5). Importantly, the WTΔ*whiB7* strain displayed similar killing curves in the presence or absence of diamide, ruling out any direct effect of this compound on the antibacterial activity of cefoxitin. We noted that the WhiB7-dependent effect of diamide on tolerance was only observed when diamide was added along with the antibiotic during dilution from the stationary phase and not when diamide was added during the growth to stationary phase, before antibiotic treatment (Fig 8b and 8c). Together these data suggested that the enhanced tolerance of the WT strain to cefoxitin did not result from an overexpression of *whiB7* triggered by oxidative conditions but rather arose from activation by diamide of one or several WhiB7-dependant factors during antibiotic treatment. Interestingly, a high tolerant phenotype was also observed but in a WhiB7-independent way, by simultaneously adding diamide and cefoxitin to a log-phase culture of the WT (Fig. 8d). This may reflect a different contribution of WhiB7 in regulating the expression of factors involved in tolerance between exponential and stationary phases.

DISCUSSION

Despite its probable contribution in treatment failure and relapse of *M. abscessus* infections, antibiotic tolerance remains poorly documented in this pathogen. In this study, we report the isolation and characterization of *M. abscessus* mutant (MABserB2) with increased tolerance to cefoxitin, imipenem, and moxifloxacin. The mutation mapped in *serB2*, a gene encoding a phosphoserine phosphatase involved in the biosynthesis of L-serine, and led to the production of a protein with altered activity. The tolerance did not result from changes in bacterial growth rate or lag period, two mechanisms previously found to elicit drug tolerance in other bacterial species (27, 47). MABserB2 exhibits metabolism disorders, inducing a shift of the intracellular redox balance toward a more reducing state at stationary phase. Correlatively, the enhanced tolerance to cefoxitin was only observed during the transition of bacteria from the stationary to the exponential phase. We also found that MABserB2 overexpresses the transcription regulator WhiB7 during the stationary phase and that overexpression is required for the tolerance phenotype. However, we have evidence that other factors unrelated to WhiB7 may synergically contribute to the level of tolerance of this mutant to cefoxitin.

Mechanisms involved in the overexpression of *whiB7* in MABserB2 at the stationary phase have yet to be elucidated. Expression of *whiB7* was reported to be enhanced in reducing, but not in oxidizing environments, both by *in vitro* transcription assays and *in vivo* in *M. smegmatis* (44, 45). This observation is consistent with MABserB2 displaying a reduced cytosolic redox state when compared to the WT in stationary phase. On the other hand, transcription of *whiB7* was also reported to be activated by diverse stresses, such as nutrient starvation, entry into stationary phase, or antibiotic treatments, conditions that induce a shift of the redox balance towards a more oxidized state through the generation of reactive metabolic byproducts (RMB) such as ROS and RNS (40, 42, 48). To reconciliate these seemingly conflicting data, one could imagine that upon oxidative stress, bacteria mount an adaptive response to limit intracellular

RMB levels, resulting into a more reductive cellular environment and overexpression of *whiB7* (Fig. 9). In line with this hypothesis, it has been observed an increase of the intracellular NADH/NAD+ ratio in *M. tuberculosis* exposed to antimycobacterial drugs or recovered from infected mice (49). A shift of the redox balance towards a reductive environment would prevent the cellular accumulation of the oxidized *apo* form of WhiB7, which is unable to activate its own gene, and therefore promote *whiB7* overexpression through the formation of *holo*-WhiB7 (44, 50). In addition, accumulation of WhiB7 in cells likely potentiates the oxidative stress response, as this factor has been shown to control redox homeostasis in mycobacteria (36, 45, 51). Nevertheless, oxidative stress is not sufficient to induce an adaptive response triggering WhiB7 overexpression. Indeed, *whiB7* expression is controlled by an upstream open reading frame (uORF) -mediated transcription attenuation mechanism. Ribosome-targeting antibiotics as well as amino acid starvation were found to enhance *whiB7* transcription by inhibiting uORF synthesis, resulting in the formation of an antiterminator structure and transcriptional readthrough (52). Therefore, up-regulation of *whiB7* in response to an oxidative stress, may require conditions that inhibit translation of the uORF. Such a scenario may occur in stationary-phase MABserB2 bacteria, in which the altered metabolism induces oxidative stress, whereas the reduced availability of active ribosomes promotes anti-termination at the uORF, in line with the finding that WhiB7 is upregulated during the stationary phase in *M. tuberculosis* (42). *whiB7* overexpression could be further enhanced by the low abundance of certain amino acids, such as serine, which can cause ribosome stalling at specific codons of the uORF, thereby blocking translation. Accordingly, it has been reported that production of the VapC5 toxin in *M. abscessus*, which targets the anticodon of the serine $tRNA^{Ser}$(CGA), leads to the overexpression of *whiB7*, likely due to ribosomes stalling at ser codons in the uORF mRNA of *whiB7*, and promotes tolerance to cefoxitin as well as to translation-targeting antibiotics amikacin and tedizolid (53).

The relationship between overexpression of *whiB7* and cefoxitin tolerance in MABserB2 also remains to be clarified. We assume that the stress response induced in MABserB2 during the stationary phase makes the bacteria more apt to cope with harmful RMB generated by cefoxitin treatment during growth resumption, leading to reduced cell death rate, when compared to the WT (Fig. 9). In such a context, the lack of tolerance phenotype for the MABserB2-derived strains depleted in WhiB7 suggests that one or several WhiB7-dependent genes involved in redox homeostasis are upregulated in stationary-phase MABserB2 bacteria and promote tolerance. However, the WhiB7 regulon includes numerous genes encoding proteins with either broad or uncharacterized functions making difficult to predict which gene(s) might be involved (40). In addition, potential transcriptional regulators of the WhiB7 regulon could indirectly contribute to tolerance by controlling the expression of genes outside of the regulon (54). Future studies are needed to determine which genes of the WhiB7 regulon are involved in antibiotic tolerance in *M. abscessus* and to elucidate the precise mechanisms by which they contribute to this process.

Our finding that impairment in serine metabolism promotes tolerance through activation of a WhiB7-dependant stress response during growth resumption of *M. abscessus* echoes a recent study reporting that perturbation in arginine biosynthesis elicits antibiotic tolerance by a WhiB7-mediated mechanism in *M. smegmatis* (43). Therefore altered amino acid metabolism could be a common theme for promoting drug tolerance triggered by WhiB7 in mycobacteria, although with some specificity, as alteration of the arginine biosynthesis pathway leads to cross-tolerance only to aminoglycosides and rifampicin, whereas alteration of the serine pathway in MABserB2 has led to cross-tolerance to different classes of antibiotics, i.e. β-lactam and moxifloxacin. Beyond dysregulation of amino acid metabolism, other conditions encountered in the host, such as hypoxia, nutrient or iron starvation, could potentially induce oxidative stress and trigger a WhiB7-mediated adaptive response that would promote tolerance by protecting

cells against antibiotic-induced damage. In this regard, WhiB7 has been found to be significantly upregulated in *M. tuberculosis* during infection of human macrophages or mice, probably in response to stress generated by the cellular environment (46, 55). To the best of our knowledge, the expression of *whiB7* has not been addressed in *M. abscessus* in the context of infection but it would be interesting to study whether this is the case and whether potential overexpression of this transcriptional regulator modulates tolerance to cefoxitin and other antibiotics *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, growth media and culture conditions

Plasmids were propagated at 37°C in *E. coli* DH5α grown in LB broth or on LB agar (Invitrogen) supplemented with either kanamycin (Km) (40 µg/mL) or zeocin (Zeo) (50 µg/mL). *M. abscessus* WT and derivatives (Table 4) were grown at 37°C in Middlebrook 7H9 broth (DB Difco) containing OADC (0.005% oleic acid, 0.2% dextrose, 0.5% BSA fraction V, 0.0003% beef catalase) and 0.05% Tween 80 and either on 7H10 or 7H11 agar supplemented with OADC or on LB agar. When required, Km and Zeo were used at a concentration of 40 µg/mL and 50 µg/mL, respectively.

Strain and plasmid constructions

Plasmids and primers used in this study are listed in Table S2 and S3, respectively. Details of strains and plasmid constructions are described in Supplemental Experimental Procedures.

Experimental evolution of *M. abscessus*

The evolution experiment was performed with the laboratory strain *M. abscessus* 19977-IP-S, a variant of the CIP104536^T strain (23, 24). Bacteria were grown in 5 mL of 7H9/Tween80 without antibiotic for 72 hours at 37°C with shaking (120 rpm). At this stage, the bacterial concentration was approximately 10^9 CFU/mL, indicating that bacteria have reached the stationary phase. 500 µL of culture were used to inoculate 50 mL of 7H9/Tween80 medium supplemented with 400 µg/mL of cefoxitin (Merck). Bacteria were incubated at 37°C for 72 hours with shaking, then cefoxitin was removed by washing bacteria twice by centrifugation (10 min, 3500 rpm) followed by resuspension in 50 mL (first centrifugation) or 5 mL (second centrifugation) of 7H9/Tween80. Bacteria resuspended after the last centrifugation step were used for the next cycle of evolution. For each cycle, 500 µL of stationary phase culture were

used to prepare bacterial glycerol stocks to preserve the genetic diversity of the evolved population and the survival rate was measured by determining the numbers of CFU at the beginning and end of the antibiotic treatment.

Time-kill kinetics assays

To assess antibiotic survival at exit from the stationary phase, bacteria were grown to stationary phase in 7H9/Tween80 for 72 hours at 37°C with shaking (120 rpm). 100 µl of cultures were used to inoculate 10 mL of 7H9/Tween80 containing antibiotics at a concentration of at least 25x MIC [cefoxitin (400 µg/mL), amikacin (200 µg/mL), moxifloxacin (25 µg/mL), imipenem (200 µg/mL), rifabutin (12.5 µg/mL)] and incubated at 37°C with shaking for 72 hours. When required, the medium was supplemented with L-serine (15 mM), glycine (10 mM), DTT (1 mM) or diamide (5 mM). To assess antibiotic survival on exponential phase cultures, bacteria were grown in 7H9/Tween80 for 20 hours with shaking (120 rpm). Antibiotics were then added at concentrations indicated above and bacteria were further incubated at 37°C with shaking for 48 hours. In the two series of experiments, bacterial survival was evaluated by enumerating CFU on LB agar at 0, 24, 48 and 72 hours antibiotic exposure times. Amikacin, imipenem and rifabutin were reintroduced in bacterial cultures at 200 µg/mL, 200 µg/mL, and 12.5 µg/mL, respectively, 30 hours after the start of antibiotic treatment because of their relatively short half-life.

Antimicrobial susceptibility testing

Antibiotic susceptibility of *M. abscessus* strains was assessed by MIC measurements using the broth dilution method. 50 µL of exponential cultures of *M. abscessus* were used to inoculate 5 mL of 7H9/Tween 80 containing 2-fold serially diluted cefoxitin (128 to 2 µg/mL), amikacin (64 to 2 µg/mL), moxifloxacin (8 to 0.25 µg/mL), imipenem (32 to 0.25 µg/mL) or rifabutin

(16 to 0.025 µg/mL) in McFarland glass tubes. Tubes were incubated for 72 hours at 37 °C and bacterial growth was evaluated by turbidity measurement of microbial cultures. MIC corresponds to the lowest concentration of antibiotic inhibiting measurable growth of bacteria.

Growth rate determination and lag time measurement

To investigate the growth kinetics of *M. abscessus* WT and the MABserB2 mutant during the exponential phase, log-phase bacterial cultures were diluted either 1:1000 in 10 mL 7H9/Tween80 or 1:100 in 5 mL M9 medium/Tween80 and incubated at 37°C with shaking (120 rpm). Bacterial growth was evaluated by enumerating CFU on LB agar at different incubation times. To estimate the lag phase duration of *M. abscessus* WT and the MABserB2 mutant, bacteria were grown to stationary phase (72 hours) in 7H9/Tween80 at 37°C with shaking (120 rpm). Cultures were then diluted 1:100 in 10 mL of 7H9/Tween80 and further incubated at 37°C with shaking. Concentrations of bacteria in cultures were determined by enumerating CFU on LB agar at different incubation times. Lag phase length was also assessed using the fluorescence dilution dual reporter plasmid pTIGc (AddGene #78314) (29). WT and MABserB2 bacteria containing pTIGc were grown for 72 hours in 7H9/Tween80 supplemented with Km and 4 mM of theophylline at 37°C with shaking (120 rpm). Bacteria were then washed twice with PBS to remove theophylline and diluted 1:100 in fresh 7H9/Tween80 medium containing Km for further incubation at 37°C. 1 mL of each culture was recovered at different incubation times and bacteria were fixed by 4% paraformaldehyde (PFA) for 2 hours before washing with PBS. Fixed samples were then filtered and analyzed using a LSRFortessa flow cytometer system (Becton Dickinson). GFP and TurboFP635 fluorescence intensity and flow cytometry data were monitored and analyzed by the last version of FlowJo software as described previously (29).

Silencing of *serB2* and *whiB7* by CRISPR interference (CRISPRi)

To investigate the essentiality of SerB2 in *M. abscessus* by CRISPRi, plasmid p965MAB3388, a pLJR965-derivative expressing a sgRNA that targets *serB2* upon induction with ATc, as well as the pLJR965 empty vector (31), were introduced into the WT strain of *M. abscessus*. An additional strain harboring a CRISPRi plasmid targeting *MAB_3117c* (p965MAB3117), which encodes the ortholog of an essential enzyme (PptT) from *M. tuberculosis* (32), was included in these experiments as control for the functionality of the CRISPRi system in *M. abscessus*. Strains were grown in 7H9/Tween80 liquid medium and 7 µL of serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) of these cultures were spotted on 7H10 solid medium supplemented or not with ATc (250 ng/mL) and/or L-serine (15 mM). Plates were incubated at 37°C for 3 days. To examine the impact of *whiB7* silencing on the tolerance phenotype, plasmid p965MAB3508 that targets *whiB7* was introduced into MABserB2. In parallel, the control plasmid pLJR965 was transferred into the MABserB2 and WT strains to assess the potential effect of ATc and dCas9 production on bacterial growth and cefoxitin killing. The resulting strains were then grown to stationary phase in the presence of ATc and assessed for cefoxitin tolerance.

RT-qPCR analyses

Information about total RNA samples and cDNA preparation, primer sequences and PCR reaction conditions are provided in Supplemental Experimental Procedures.

Whole genome sequencing

See Supplemental Experimental Procedures.

Metabolomic analyses and liquid chromatography-mass spectrometry for targeted metabolomic analysis

See Supplemental Experimental Procedures.

NADH/NAD^+ ratio

Reaction buffer containing 0.2 M bicine (pH = 8.0, Sigma), 20% ethanol, 8 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 6.6 mM phenazine ethosulfate (PES, Sigma) and 0.84 mM thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT, Sigma) was prepared away from light. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+ and NADH, both from Sigma) standards were prepared in ddH_2O with different concentration ranges (NAD+: 0-2.5 µM; NADH: 0-1 µM). Alcohol dehydrogenase (from *Saccharomyces cerevisiae*, purchased from Sigma) solution was prepared at 1 mg/mL (314 units/mL) in ddH_2O. *M. abscessus* strains were harvested from 1 mL culture stationary phase aliquots in microtubes by centrifugation at 15,000 x g for 10 minutes. Pellets were cooled on ice and resuspended in 250 µL of either 0.2 M HCl (NAD^+ samples) or 0.2 M NaOH (NADH samples) and heated to 55 °C for 10 minutes. Samples were neutralized with 0.2 M NaOH (NAD^+ samples) or HCl (NADH samples), and the pH was verified by using pH strips to be close to pH = 7. The neutralized samples were centrifuged at 15,000 x g and 4 °C for 10 minutes. Clear-bottomed black 96-well plates (Greiner Bio-One) were loaded with 90 µL aliquots of standards and samples, and 100 µL of reaction buffer was added to each well. The plates were incubated in the dark for 5 minutes, after which 10 µL of enzyme solution was loaded into each well, and the plates were immediately introduced to a plate reader for kinetic measurement at λ=570 nm every 30 seconds over 10 minutes. Data were retrieved and processed by using Microsoft Excel. Standard curves with different concentrations of NADH/NAD^+ were produced to correlate the changes in the OD per minute with increasing concentrations and were then used to quantify concentrations of NADH/NAD^+ in samples.

Statistical analyses

All statistical tests were performed with GraphPad Prism. The normality of variables was checked using the Shapiro-Wilk test. The Mann-Whitney test was used to determine whether distributions of data were statistically significant. P-value are as follow: *: $P<0.0332$, **: $P<0.0021$, ***: $P<0.0002$ and ****: $P<0.0001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Wladimir Malaga (IPBS, University of Toulouse) for his technical assistance in processing whole genome sequencing data.

Funding: This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (Grant Equipe FRM EQU202203014634 to C.G.). C.B. was the recipient of a fellowship from the Ministry of Teaching and Scientific Research. G.L-M. received funding from the Medical Research Council MR/W018756/1.

Author contributions: C.B., K.C., and C.C. designed research; C.B., Y.L. and G.L.-M. performed research; C.B., G.L.-M., K.C., Y.L., and C.C. interpreted and analyzed the data; and C.B., C.C., K.C. and C.G. wrote the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

Data availability: The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request. The raw data of MabSerB2 sequencing were submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive database with accession number PRJNA1013065.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Isolation of *M. abscessus* cefoxitin tolerant mutants by experimental evolution. **(a)** Schematic representation of the experimental evolution protocol. **(b)** MIC determination of cefoxitin for *M. abscessus* WT and MABserB2. **(c)** Evolution of the survival rate over the experimental evolution.

Figure 2. Genomic characterization of cefoxitin tolerant mutants. (**a**) The phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis and its connection with other metabolic pathways. **(b)** Mapping of the frame-shift mutation in the last codon of *serB2*. The frameshift mutation along with amino acid changes are shown in red.

Figure 3. Antibiotic cross-tolerance of tolerant mutant MABserB2. **(a)** Bactericidal activity of cefoxitin on stationary-phase cultures diluted 1:100 in fresh medium of *M. abscessus* WT, MABserB2, and MABserB2 complemented with the WT allele of *serB2* (MABserB2-rev) (n=6). (**b**) Bactericidal activity of cefoxitin on log-phase cultures of *M. abscessus* WT and MABserB2 (n=3). (**c**) Bactericidal activity of imipenem (n=6), moxifloxacin (n=8), amikacin (n=3), rifabutin (n=3) on stationary phase cultures diluted 1:100 in fresh medium of *M. abscessus* WT and MABserB2. Statistical analyses were performed using Mann–Whitney U test. Errors bars represent SEM. P-value: *: P<0.0332, **: P<0.0021, ***: P<0.0002 and ****: P<0.0001.

Figure 4. Similar growth rate and lag time of *M. abscessus* WT and MABserB2. (**a**) Growth curves of the WT and MABserB2 strains in 7H9 (upper) (n=3) or M9 minimum medium (lower) (n=2). (**b**) Determination of the lag time by dilution of stationary-phase bacteria into fresh media and CFU counting (n=3). (**c**) Determination of the lag time using the fluorescence

dilution dual reporter plasmid pTIGc. Flow cytometric detection of TurboFP635 fluorescence is shown at time points 2, 4 and 8 hours for *M. abscessus* WT:pTIGc (dashed black lines) and MABserB2:pTIGc (dashed red lines). Gray and red plain colored histograms correspond the TurboFP635 fluorescence at time point 0 hour for the WT:pTIGc and MABserB2:pTIGc strains, respectively. (**d**) Percentage of TurboFP635 fluorescence intensity (FI) over time compared to fluorescence at t0 in the WT:pTIGc and MABserB2:pTIGc strains. Errors bars represent SEM.

Figure 5. Altered serine metabolism is responsible of the cefoxitin tolerance of MABserB2. (**a**) Supplementation with either serine or glycine suppresses the tolerant phenotype. Bactericidal activity of cefoxitin on stationary phase cultures diluted 1:100 in fresh medium of *M. abscessus* WT and MABserB2, cultivated in presence or not of serine (left) (n=4) or glycine (right) (n=6). Statistical analyses were performed using Mann–Whitney U test. Errors bars represent SEM. P-value: *: P<0.0332, **: P<0.0021, ***: P<0.0002 and ****: P<0.0001. (**b**) Down-regulating *serB2* expression by CRISPRi confers auxotrophy to serine. Growth of the strain WT transformed with pLJR965 (vector control) (1), p965MAB3117 (targeting essential control gene *MAB_3117c*) (2) or p965MAB3388 (targeting *serB2*, two independent clones) (3 and 4) on 7H10 solid medium containing various combinations of ATc and serine. 7 µL of serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) of cultures of these strains grown in the absence of ATc were spotted on plates.

Figure 6. Metabolomics analysis of MABserB2. (**a**) Relative abundance of selected metabolites in the MABserB2 and WT strains, grown either in stationary phase without (stat.) and with serine (stat./serine) or in exponential phase (expo.). Each point represents the ratio of the mean

abundance of the metabolite in the MABserB2 strain to that in the WT strain within one experiment, calculated from 3 biological replicates of each strain, each performed in duplicate. (**b**) α-ketoglutarate/glutamate ratio in the MABserB2 and WT strains, grown in stationary phase in the absence (stat.) or presence of serine (stat./serine) or in exponential phase (expo.). Each point represents the ratio of the mean abundance of α-ketoglutarate and glutamate for each strain within one experiment, calculated from 3 biological replicates, each performed in duplicate,

Figure 7. Tolerance of MABserB2 to cefoxitin is mediated by WhiB7. (**a**) RT-qPCR analysis of the expression of *whiB7* in MABserB2 compared to the WT strain. Analyzes were carried out on bacteria cultured in exponential phase (expo.) (n=4) or in stationary phase without (stat.) (n=6) or with serine (stat. + serine) (n=4). (**b**) Bactericidal activity of cefoxitin on stationary-phase cultures diluted 1:100 in fresh medium of the WT and MABserB2 strains transformed with pLJR965 (control vector targeting no gene) and of MABserB2 transformed with p965MAB3508 (targeting *whiB7*) (left) (n=5). RT-qPCR analysis of the expression of *whiB7* in MABserB2 transformed with either pLJR965 or p965MAB3508 compared to the WT strain harboring pLJR965 (right) (n=2). Analyzes were done on bacteria grown to stationary phase in the presence of ATc to induce the production of the dCAS9 protein and expression the sgRNA. (**c**) Bactericidal activity of cefoxitin on stationary phase cultures diluted 1:100 in fresh medium of the WT, MABserB2, WTΔ*whiB7* and MABserB2Δ*whiB7* strains and of the MABserB2Δ*whiB7* mutant complemented with the wild-type allele of *whiB7* (n=3). Statistical analyses were performed using Mann–Whitney U test. Errors bars represent SEM. P-value: *: P<0.0332, **: P<0.0021, ***: P<0.0002 and ****: P<0.0001.

Figure 8. WhiB7-dependent and -independent impacts of the oxidative stress inducer diamide on the tolerance of the WT *M. abscessus* to cefoxitin. Bactericidal activity of cefoxitin on stationary phase cultures diluted 1:100 in fresh medium without or with diamide added (**a**) both during the growth phase to the stationary phase and during cefoxitin treatment (after dilution) for the WT and Δ*whiB7* strains (n=4) and (**b**) during the growth phase only for the WT strain (n=2). Bactericidal activity of cefoxitin on stationary phase cultures diluted 1:100 in fresh medium (left, n=3) (**c**) or log-phase cultures (right, n=3) (**d**) of the WT and WTΔ*whiB7* strains without or with diamide only added during the cefoxitin treatment. Inset boxes depict temporal addition of diamide in experiments. Errors bars represent SEM.

Figure 9. Proposed mechanism for cefoxitin tolerance in MABserB2. Metabolic disorders when MABserB2 reaches the stationary phase cause oxidative stress through reactive metabolic byproducts (RMB) generation such as ROS and RNS. This would activate a stress response resulting in a shift of the redox balance towards a more reducing cellular environment, as reflected by a higher NADH/NAD+ ratio. This reduced environment along with a decreased availability of ribosomes in stationary phase, would trigger the activation and overexpression of *whiB7*, which would also contribute to the adaptive stress response via upregulation of WhiB7 regulon genes involved in redox homeostasis. The stress response induced in MABserB2 during the stationary phase would make the bacteria more apt to efficiently antagonize the production of RMB generated by the antibiotic, resulting in decreased cell death rate and higher tolerance.

Table 1: MIC values (µg/mL) of different antibiotics against *M. abscessus* WT and MABserB2.

Antibiotic	WT	MABserB2
Cefoxitin	8	8
Imipenem	2	2-4
Moxifloxacin	1-2	1
Amikacin	8	4-8
Rifabutin	0.5	0.5

Table 2: SNP and indels mutations detected in the 19977-IP-S strain (24), the parental strain used for the experimental evolution (WT) and the evolved cefoxitin-tolerant mutants (Evol. mut.), including MABserB2, compared to the CIP104536^T published sequence (23). The mutation in the *serB2* gene (*MAB_3388c*) of tolerant evolved mutants is indicated in bold.

Position (CIP104536^T)	Locus	19977-IP-S	WT	Evol. mut.
SNP				
280,242	*MAB_0280*	T → C	T → C	T → C
769,846	*MAB_0771c*	none	G → A	G → A
4,069,374	*MAB_4024c*	none	G → A	G → A
Indels				
81,392 81,393	*MAB_0084*	1C insertion	none	none
2,635,537 2,635,539	*MAB_2592c*	1G deletion	1G deletion	1G deletion
2,896,546 2,896,547	Intergenic *MAB_2847c-MAB_2848c*	58 bp insertion	none	none
3,437,618 3,437,619	***MAB_3388c***	**none**	**none**	**1T insertion**
4,948,086 4,948,088	upstream *MAB_4836c*	1G deletion	1G deletion	1G deletion

Table 3: NADH / NAD+ concentrations and ratios in *M. abscessus* WT and MABserB2 during stationary phase.

strain	NAD+ concentration (µM)	NADH concentration (µM)	NADH/NAD+ ratio	MABserB2 ratio / WT ratio
Experiment 1				
WT	1.0689	0.2605	0.2437	1.9519
MABserB2	2.8088	1.3361	0.4757	
Experiment 2				
WT	3.75	0.1923	0.0513	1.7647
MABserB2	4.25	0.3846	0.0905	

Table 4: Strains used in this study

Name	Relevant characteristics	Ref./source
WT	*M. abscessus* strain 19977-IP-S	(24)
MABserB2	19977-IP-S mutant with a single-base insertion in *serB2* (A insertion between nt 1233 and 1234)	This study
MABserB2-rev	MABserB2 containing the suicide plasmid pCB3 at the *serB2* locus to restore WT *serB2* sequence, Km^R	This study
WTΔ*whiB7*	*M. abscessus* 19977-IP-S disrupted in *whiB7*, Zeo^R	This study
MABserB2Δ*whiB7*	MABserB2 disrupted in *whiB7*, Zeo^R	This study

REFERENCES

1. Sulaiman JE, Lam H. 2021. Evolution of Bacterial Tolerance Under Antibiotic Treatment and Its Implications on the Development of Resistance. Front Microbiol 12:617412.
2. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, Dehio C, Fortune S, Ghigo JM, Hardt WD, Harms A, Heinemann M, Hung DT, Jenal U, Levin BR, Michiels J, Storz G, Tan MW, Tenson T, Van Melderen L, Zinkernagel A. 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat Rev Microbiol 17:441-448.
3. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. 2011. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. J Med Microbiol 60:699-709.
4. Wilmaerts D, Windels EM, Verstraeten N, Michiels J. 2019. General Mechanisms Leading to Persister Formation and Awakening. Trends Genet 35:401-411.
5. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nat Rev Microbiol 14:320-30.
6. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. 2010. Emergence of Pseudomonas aeruginosa strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. J Bacteriol 192:6191-9.
7. Conlon BP. 2014. Staphylococcus aureus chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in S. aureus disease. Bioessays 36:991-6.
8. Dhar N, McKinney JD. 2010. Mycobacterium tuberculosis persistence mutants identified by screening in isoniazid-treated mice. Proc Natl Acad Sci U S A 107:12275-80.
9. Sebastian J, Swaminath S, Nair RR, Jakkala K, Pradhan A, Ajitkumar P. 2017. De Novo Emergence of Genetically Resistant Mutants of Mycobacterium tuberculosis from the Persistence Phase Cells Formed against Antituberculosis Drugs In Vitro. Antimicrob Agents Chemother 61.
10. Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoresh N, Balaban NQ. 2017. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. Science 355:826-830.
11. Windels EM, Michiels JE, Fauvart M, Wenseleers T, Van den Bergh B, Michiels J. 2019. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. Isme J 13:1239-1251.
12. Liu J, Gefen O, Ronin I, Bar-Meir M, Balaban NQ. 2020. Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. Science 367:200-204.
13. Santi I, Manfredi P, Maffei E, Egli A, Jenal U. 2021. Evolution of Antibiotic Tolerance Shapes Resistance Development in Chronic Pseudomonas aeruginosa Infections. mBio 12.
14. Kim JS, Heo P, Yang TJ, Lee KS, Jin YS, Kim SK, Shin D, Kweon DH. 2011. Bacterial persisters tolerate antibiotics by not producing hydroxyl radicals. Biochem Biophys Res Commun 413:105-10.
15. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Jr., Winthrop K. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 175:367-416.
16. Skolnik K, Kirkpatrick G, Quon BS. 2016. Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. Curr Treat Options Infect Dis 8:259-274.

17. Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR, Riabova O, Makarov V, Pasca MR. 2019. Mycobacterium abscessus, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. Int J Mol Sci 20.
18. Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. 2020. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. Nat Rev Microbiol 18:392-407.
19. Nessar R, Cambau E, Reyrat JM, Murray A, Gicquel B. 2012. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother 67:810-8.
20. Gorzynski M, Week T, Jaramillo T, Dzalamidze E, Danelishvili L. 2021. Mycobacterium abscessus Genetic Determinants Associated with the Intrinsic Resistance to Antibiotics. Microorganisms 9.
21. Martiniano SL, Davidson RM, Nick JA. 2017. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis: Updates and the path forward. Pediatr Pulmonol 52:S29-S36.
22. Canton R, Morosini MI. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev 35:977-91.
23. Ripoll F, Pasek S, Schenowitz C, Dossat C, Barbe V, Rottman M, Macheras E, Heym B, Herrmann JL, Daffe M, Brosch R, Risler JL, Gaillard JL. 2009. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus. PLoS One 4:e5660.
24. Pawlik A, Garnier G, Orgeur M, Tong P, Lohan A, Le Chevalier F, Sapriel G, Roux AL, Conlon K, Honore N, Dillies MA, Ma L, Bouchier C, Coppee JY, Gaillard JL, Gordon SV, Loftus B, Brosch R, Herrmann JL. 2013. Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus. Molecular microbiology 90:612-29.
25. Haufroid M, Wouters J. 2019. Targeting the Serine Pathway: A Promising Approach against Tuberculosis? Pharmaceuticals (Basel) 12.
26. Yadav GP, Shree S, Maurya R, Rai N, Singh DK, Srivastava KK, Ramachandran R. 2014. Characterization of M. tuberculosis SerB2, an essential HAD-family phosphatase, reveals novel properties. PLoS One 9:e115409.
27. Fridman O, Goldberg A, Ronin I, Shoresh N, Balaban NQ. 2014. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. Nature 513:418-21.
28. Berube BJ, Castro L, Russell D, Ovechkina Y, Parish T. 2018. Novel Screen to Assess Bactericidal Activity of Compounds Against Non-replicating Mycobacterium abscessus. Front Microbiol 9:2417.
29. Mouton JM, Helaine S, Holden DW, Sampson SL. 2016. Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level. Microbiology (Reading) 162:966-978.
30. Rifat D, Chen L, Kreiswirth BN, Nuermberger EL. 2021. Genome-Wide Essentiality Analysis of Mycobacterium abscessus by Saturated Transposon Mutagenesis and Deep Sequencing. mBio 12:e0104921.
31. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, Pritchard JR, Church GM, Rubin EJ, Sassetti CM, Schnappinger D, Fortune SM. 2017. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. Nat Microbiol 2:16274.
32. Leblanc C, Prudhomme T, Tabouret G, Ray A, Burbaud S, Cabantous S, Mourey L, Guilhot C, Chalut C. 2012. 4'-Phosphopantetheinyl transferase PptT, a new drug target required for Mycobacterium tuberculosis growth and persistence in vivo. PLoS Pathog 8:e1003097.
33. Xu Y, Ma S, Huang Z, Wang L, Raza SHA, Wang Z. 2023. Nitrogen metabolism in mycobacteria: the key genes and targeted antimicrobials. Front Microbiol 14:1149041.

34. Doucette CD, Schwab DJ, Wingreen NS, Rabinowitz JD. 2011. alpha-Ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition. Nat Chem Biol 7:894-901.
35. Feehily C, Karatzas KA. 2013. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. J Appl Microbiol 114:11-24.
36. Kumar A, Farhana A, Guidry L, Saini V, Hondalus M, Steyn AJ. 2011. Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? Expert Rev Mol Med 13:e39.
37. Lemire J, Alhasawi A, Appanna VP, Tharmalingam S, Appanna VD. 2017. Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. J Appl Microbiol 123:798-809.
38. Lobritz MA, Belenky P, Porter CB, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, Dwyer DJ, Khalil AS, Collins JJ. 2015. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. Proc Natl Acad Sci U S A 112:8173-80.
39. Stokes JM, Lopatkin AJ, Lobritz MA, Collins JJ. 2019. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. Cell Metab 30:251-259.
40. Hurst-Hess K, Rudra P, Ghosh P. 2017. Mycobacterium abscessus WhiB7 Regulates a Species-Specific Repertoire of Genes To Confer Extreme Antibiotic Resistance. Antimicrob Agents Chemother 61.
41. Pryjma M, Burian J, Kuchinski K, Thompson CJ. 2017. Antagonism between Front-Line Antibiotics Clarithromycin and Amikacin in the Treatment of Mycobacterium abscessus Infections Is Mediated by the whiB7 Gene. Antimicrob Agents Chemother 61.
42. Geiman DE, Raghunand TR, Agarwal N, Bishai WR. 2006. Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven Mycobacterium tuberculosis whiB-like genes. Antimicrob Agents Chemother 50:2836-41.
43. Schrader SM, Botella H, Jansen R, Ehrt S, Rhee K, Nathan C, Vaubourgeix J. 2021. Multiform antimicrobial resistance from a metabolic mutation. Sci Adv 7.
44. Burian J, Yim G, Hsing M, Axerio-Cilies P, Cherkasov A, Spiegelman GB, Thompson CJ. 2013. The mycobacterial antibiotic resistance determinant WhiB7 acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor SigA (RpoV). Nucleic Acids Res 41:10062-76.
45. Burian J, Ramon-Garcia S, Sweet G, Gomez-Velasco A, Av-Gay Y, Thompson CJ. 2012. The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. J Biol Chem 287:299-310.
46. Larsson C, Luna B, Ammerman NC, Maiga M, Agarwal N, Bishai WR. 2012. Gene expression of Mycobacterium tuberculosis putative transcription factors whiB1-7 in redox environments. PLoS One 7:e37516.
47. Pontes MH, Groisman EA. 2019. Slow growth determines nonheritable antibiotic resistance in Salmonella enterica. Sci Signal 12.
48. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell 130:797-810.
49. Bhat SA, Iqbal IK, Kumar A. 2016. Imaging the NADH:NAD(+) Homeostasis for Understanding the Metabolic Response of Mycobacterium to Physiologically Relevant Stresses. Front Cell Infect Microbiol 6:145.
50. Wan T, Horova M, Beltran DG, Li S, Wong HX, Zhang LM. 2021. Structural insights into the functional divergence of WhiB-like proteins in Mycobacterium tuberculosis. Mol Cell 81:2887-2900 e5.

51. Nambi S, Long JE, Mishra BB, Baker R, Murphy KC, Olive AJ, Nguyen HP, Shaffer SA, Sassetti CM. 2015. The Oxidative Stress Network of Mycobacterium tuberculosis Reveals Coordination between Radical Detoxification Systems. Cell Host Microbe 17:829-37.
52. Lee JH, Lee EJ, Roe JH. 2022. uORF-mediated riboregulation controls transcription of whiB7/wblC antibiotic resistance gene. Mol Microbiol 117:179-192.
53. Troian EA, Maldonado HM, Chauhan U, Barth VC, Woychik NA. 2023. Mycobacterium abscessus VapC5 toxin potentiates evasion of antibiotic killing by ribosome overproduction and activation of multiple resistance pathways. Nat Commun 14:3705.
54. Hunt-Serracin AC, Parks BJ, Boll J, Boutte CC. 2019. Mycobacterium abscessus Cells Have Altered Antibiotic Tolerance and Surface Glycolipids in Artificial Cystic Fibrosis Sputum Medium. Antimicrob Agents Chemother 63.
55. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. 2010. Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. PLoS Pathog 6:e1000988.

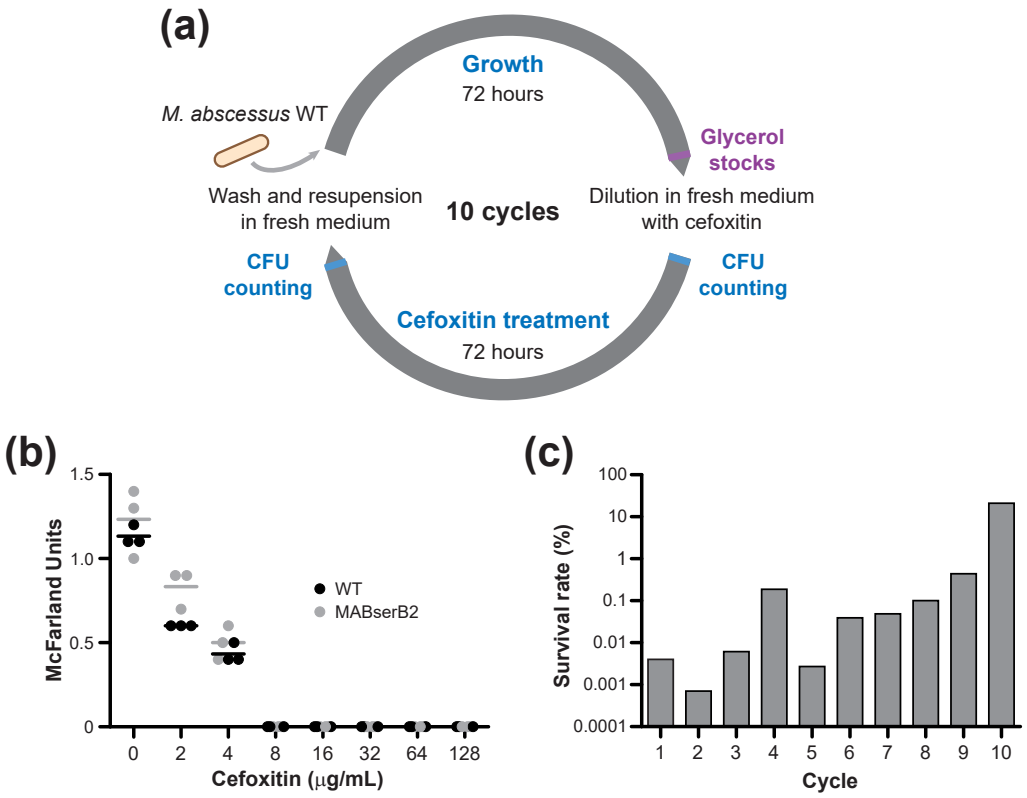
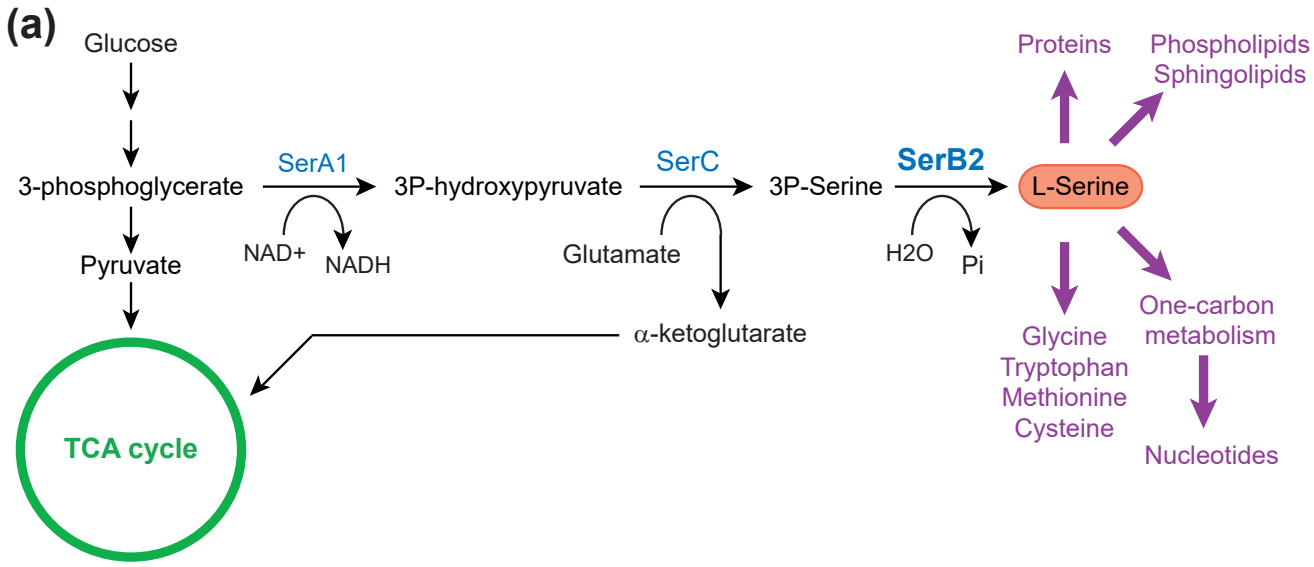

(a)
Growth
72 hours
M. abscessus WT
Glycerol stocks
Wash and resupension in fresh medium
10 cycles
Dilution in fresh medium with cefoxitin
CFU counting
CFU counting
Cefoxitin treatment
72 hours
(b)
McFarland Units
1.5
1.0
0.5
0
WT
MABserB2
0
2
4
8
16
32
64
128
Cefoxitin (µg/mL)
(c)
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Cycle

Fig. 1



(b)

WT

GAC ATT CCC GAC GAC TGA CCT TTC CTG GCG CGA GCA TGC CCA AAT GTG CCC AAA TAT GCG GTA TTT AGG CAC
D I P D D *

Isolated mutants

GAC ATT CCC GAC GAA CTG ACC TTT CCT GGC GCG AGC ATG CCC AAA TGT GCC CAA ATA TGC GGT ATT TAG GCA
D I P D E L T F P G A S M P K C A Q I C G I *

Fig. 2

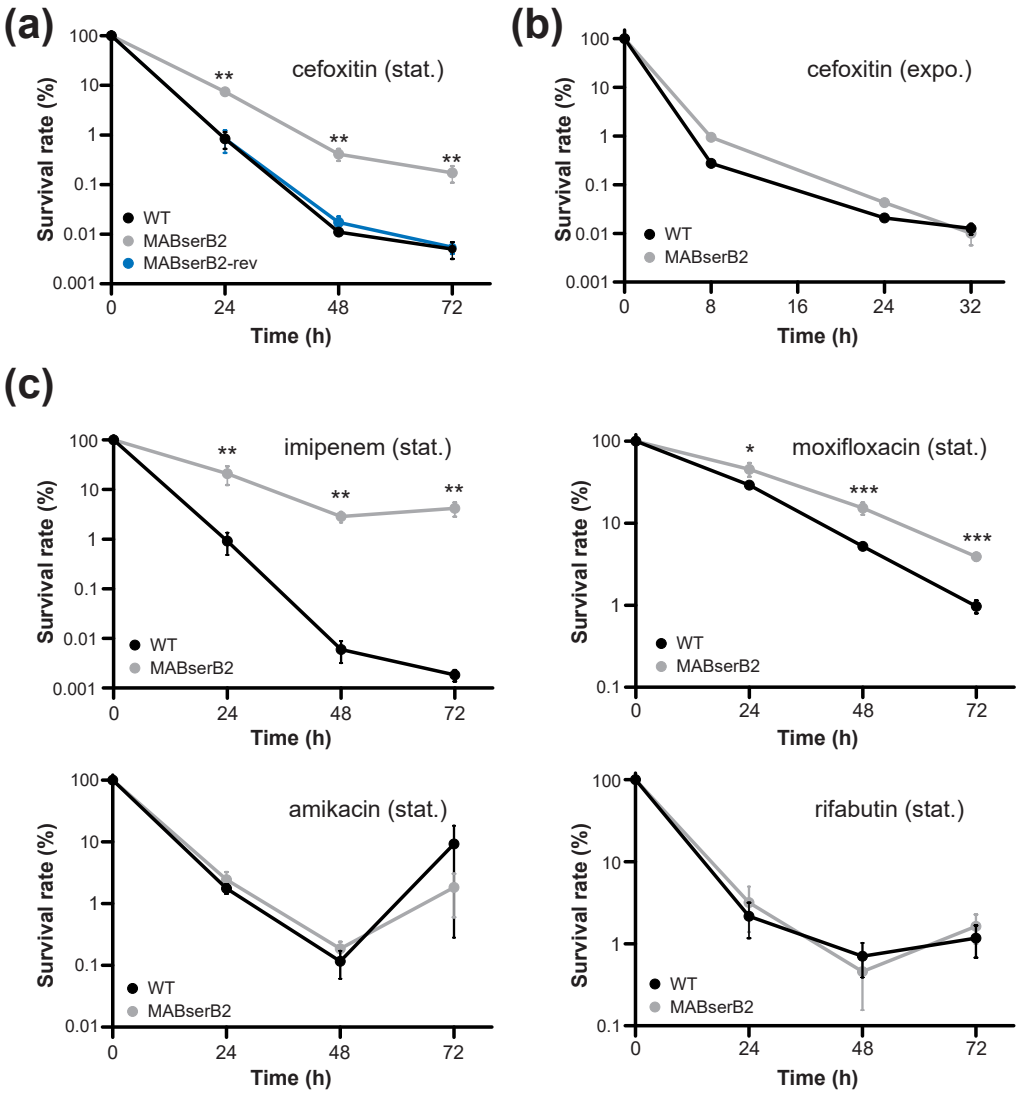
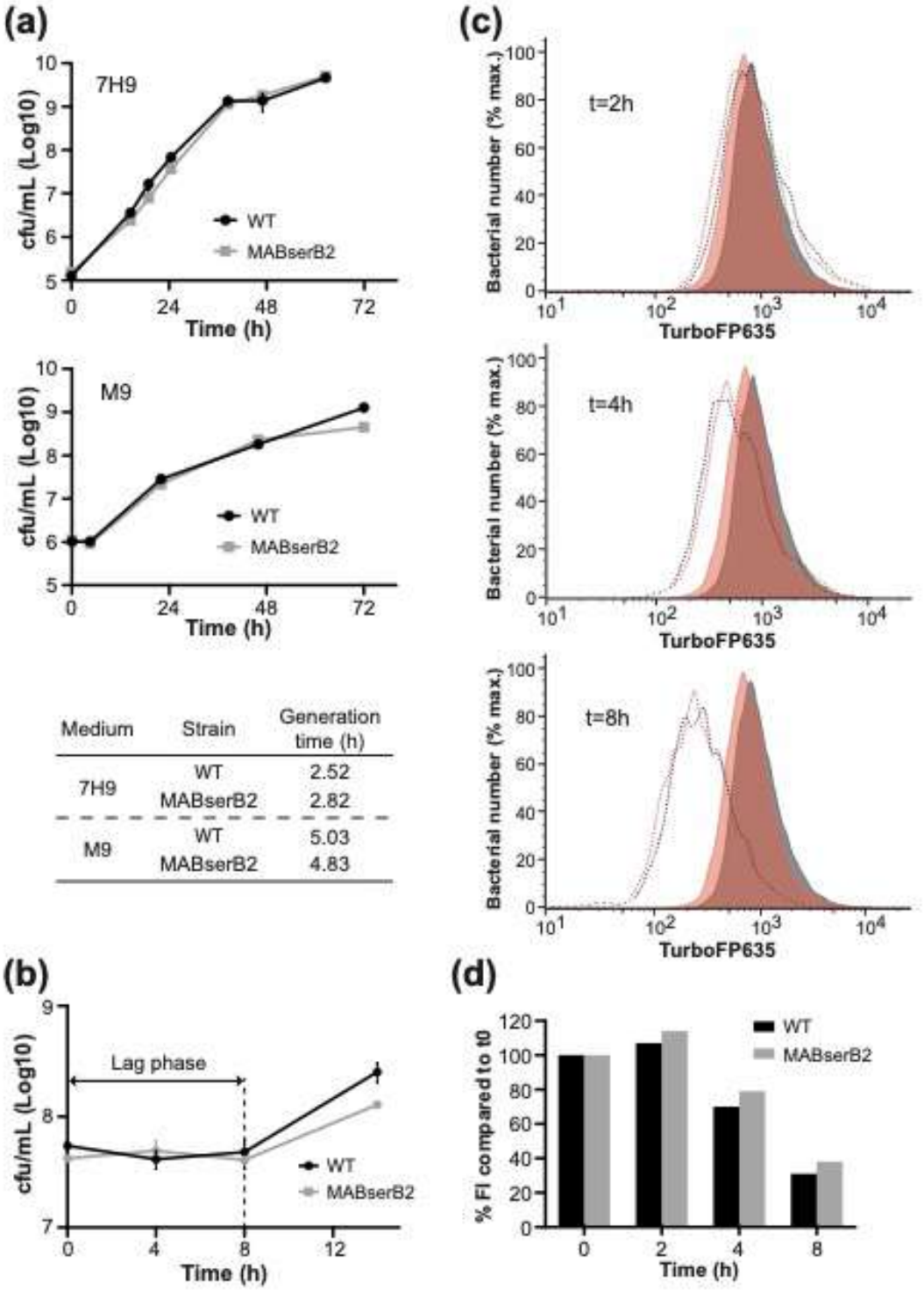

(a)
cefoxitin (stat.)
Survival rate (%)
Time (h)
WT
MABserB2
MABserB2-rev
(b)
cefoxitin (expo.)
(c)
imipenem (stat.)
moxifloxacin (stat.)
amikacin (stat.)
rifabutin (stat.)

Fig. 3



Medium	Strain	Generation time (h)
7H9	WT	2.52
	MABserB2	2.82
M9	WT	5.03
	MABserB2	4.83

Fig. 4

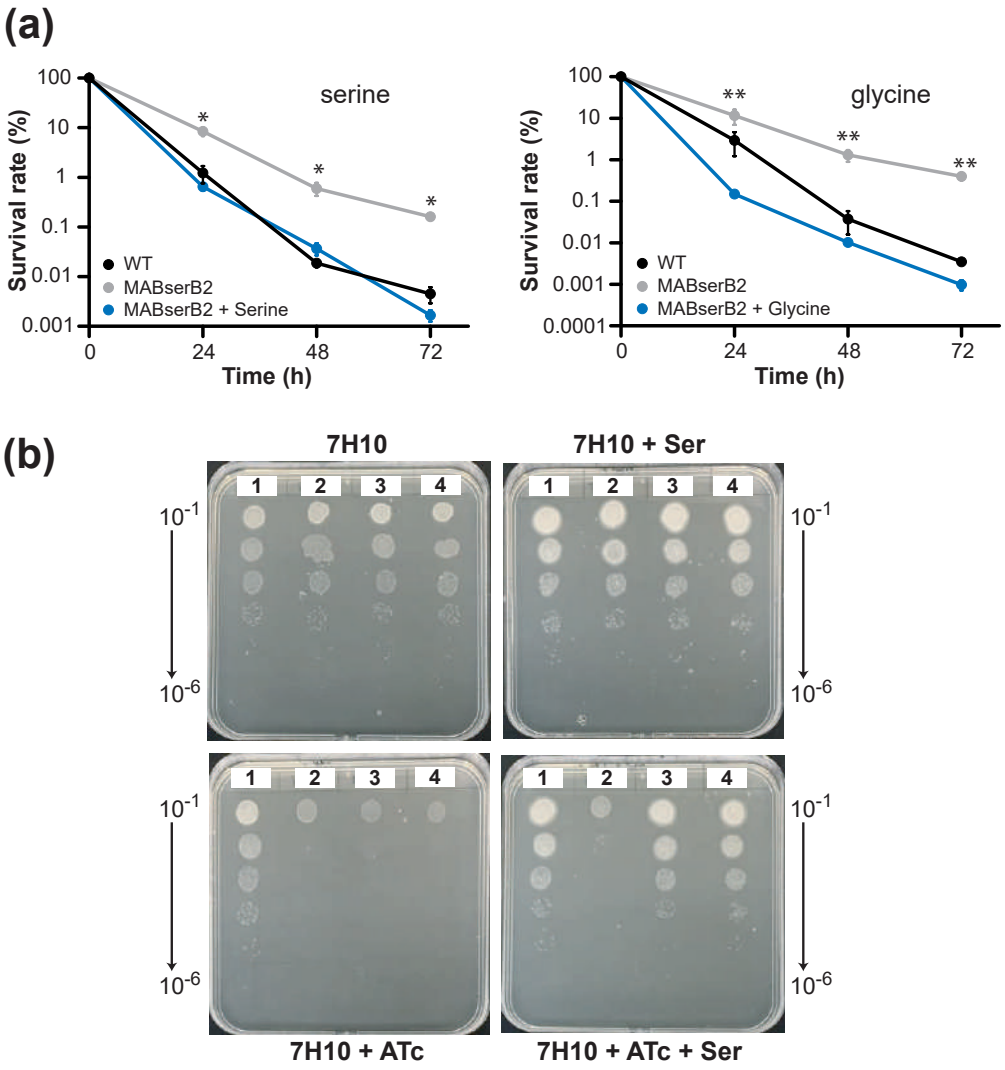

(a)
serine
glycine
Survival rate (%)
Time (h)
WT
MABserB2
MABserB2 + Serine
MABserB2 + Glycine
(b)
7H10
7H10 + Ser
7H10 + ATc
7H10 + ATc + Ser
1
2
3
4
10-1
10-6

Fig. 5

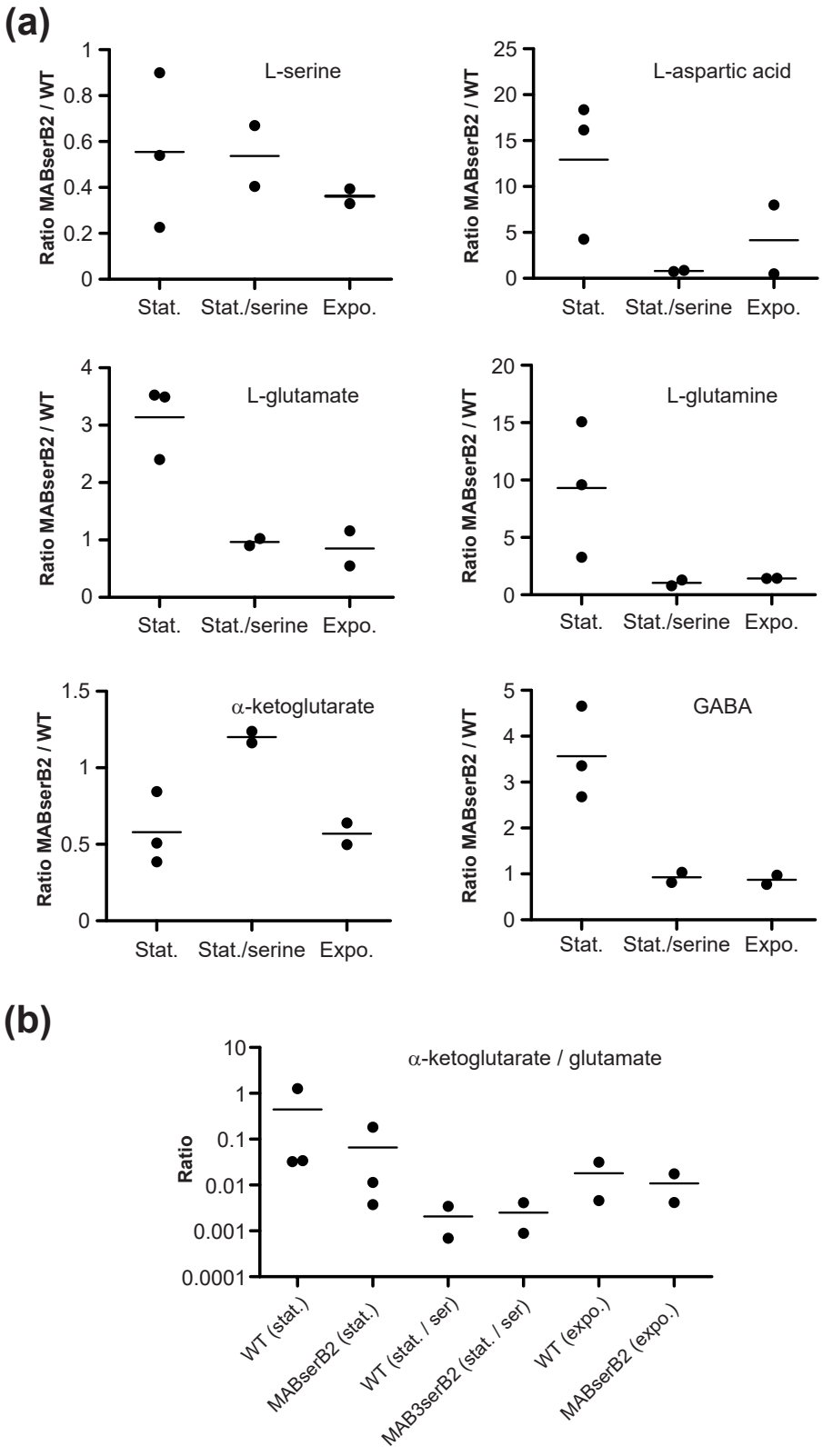

(a)
L-serine
L-aspartic acid
L-glutamate
L-glutamine
α-ketoglutarate
GABA
Ratio MABserB2 / WT
Stat.
Stat./serine
Expo.
(b)
α-ketoglutarate / glutamate
Ratio
WT (stat.)
MABserB2 (stat.)
WT (stat. / ser)
MAB3serB2 (stat. / ser)
WT (expo.)
MABserB2 (expo.)

Fig. 6

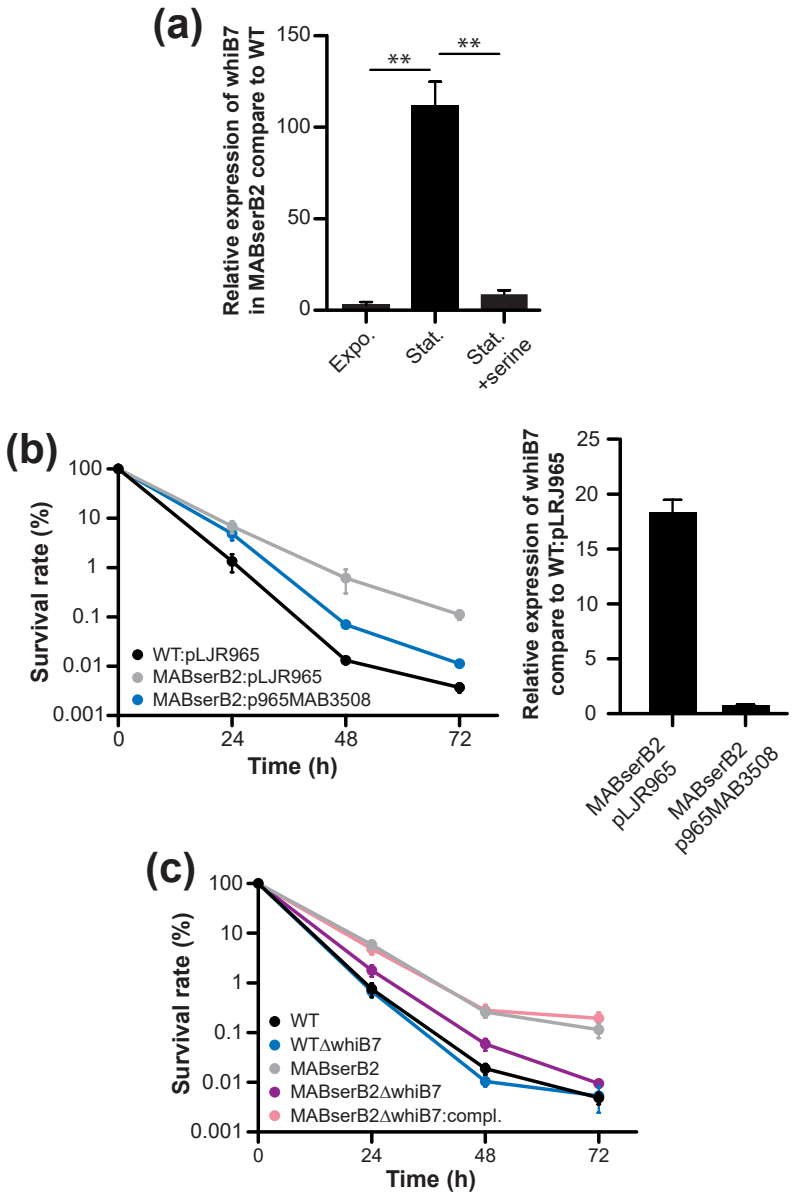

(a)
Relative expression of whiB7 in MABserB2 compare to WT
150
100
50
0
**
**
Expo.
Stat.
Stat. +serine
(b)
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
WT:pLJR965
MABserB2:pLJR965
MABserB2:p965MAB3508
0
24
48
72
Time (h)
Relative expression of whiB7 compare to WT:pLRJ965
25
20
15
10
5
0
MABserB2 pLJR965
MABserB2 p965MAB3508
(c)
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
WT
WTΔwhiB7
MABserB2
MABserB2ΔwhiB7
MABserB2ΔwhiB7:compl.
0
24
48
72
Time (h)

Fig. 7

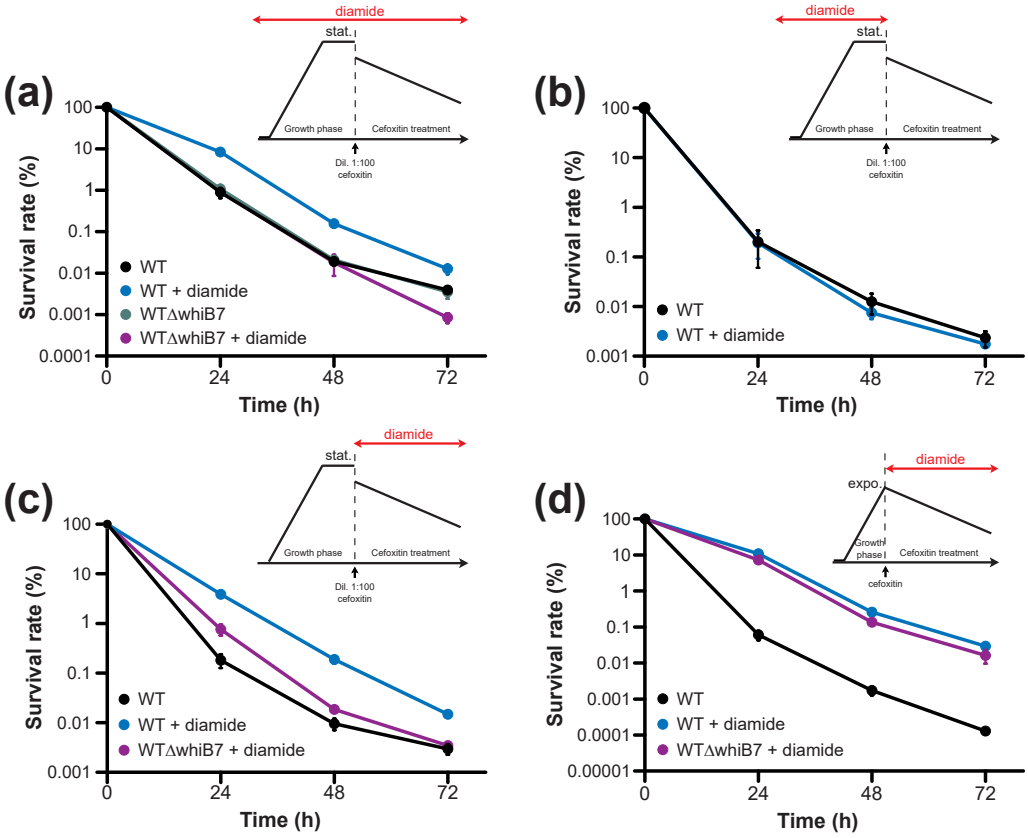

(a)
diamide
stat.
Growth phase
Cefoxitin treatment
Dil. 1:100
cefoxitin
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
WT
WT + diamide
WTΔwhiB7
WTΔwhiB7 + diamide
0
24
48
72
Time (h)
(b)
diamide
stat.
Growth phase
Cefoxitin treatment
Dil. 1:100
cefoxitin
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
WT
WT + diamide
0
24
48
72
Time (h)
(c)
diamide
stat.
Growth phase
Cefoxitin treatment
Dil. 1:100
cefoxitin
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
WT
WT + diamide
WTΔwhiB7 + diamide
0
24
48
72
Time (h)
(d)
diamide
expo.
Growth phase
Cefoxitin treatment
cefoxitin
Survival rate (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
WT
WT + diamide
WTΔwhiB7 + diamide
0
24
48
72
Time (h)

Fig. 8

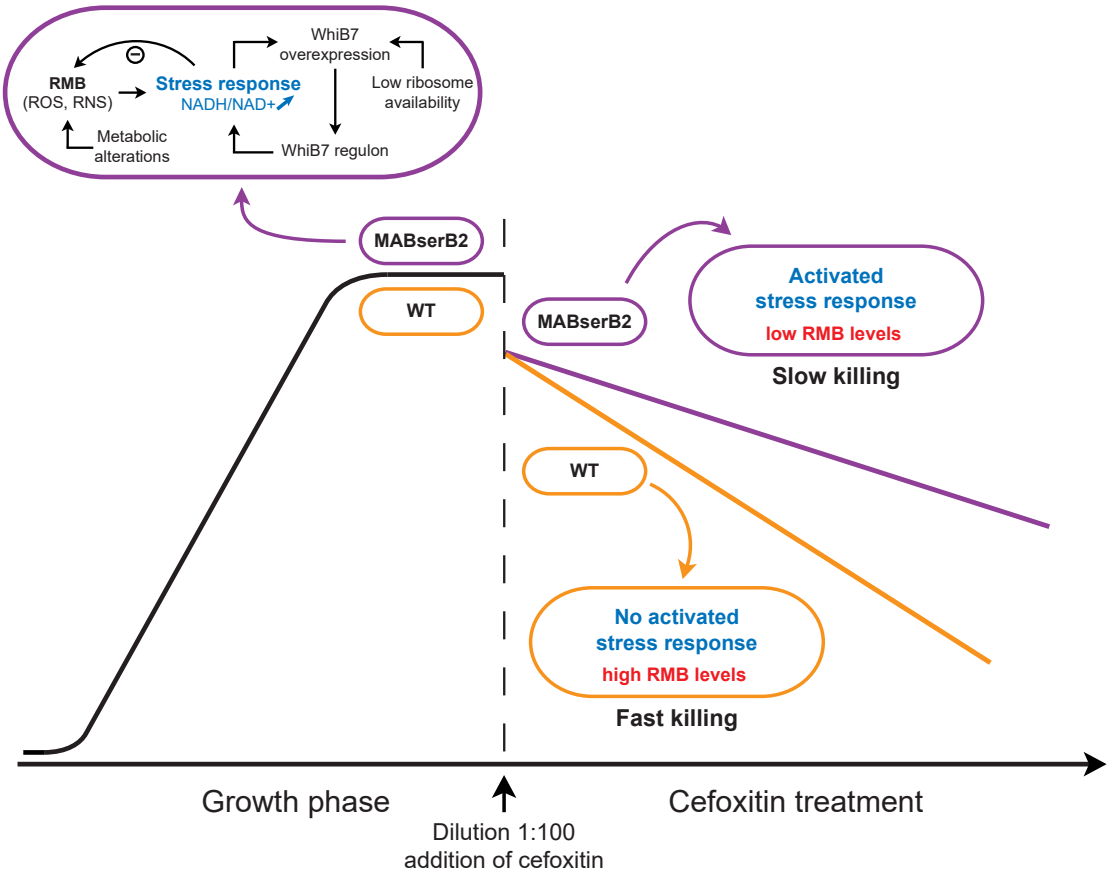

WhiB7
overexpression
RMB
(ROS, RNS)
Stress response
NADH/NAD+
Low ribosome
availability
Metabolic
alterations
WhiB7 regulon
MABserB2
WT
MABserB2
Activated
stress response
low RMB levels
Slow killing
WT
No activated
stress response
high RMB levels
Fast killing
Growth phase
Cefoxitin treatment
Dilution 1:100
addition of cefoxitin

Fig. 9

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Altered serine metabolism promotes drug tolerance in *Mycobacterium abscessus* via a WhiB7-mediated adaptive stress response

Célia Bernard[1], Yi Liu[2], Gérard Larrouy-Maumus[2], Christophe Guilhot[1], Kaymeuang Cam[1], and Christian Chalut[1]

List of the material included

Supplemental experimental procedures
Legend of Supplemental Table S1 (provided in excel format)
Supplemental Table S2
Supplemental Table S3
Supplemental Figure S1
Supplemental Figure S2
Supplemental Figure S3
Supplemental Figure S4
Supplemental Figure S5
Supplemental references

Supplemental experimental procedures

Strain and plasmid constructions

Restoration of the *serB2* (*MAB_3388c*) WT allele in MABserB2 was achieved by single homologous recombination event using a suicide plasmid (Fig. S2). A DNA fragment spanning the region of *serB2* that contains the frameshift mutation in MABserB2 (nucleotides 266-1236) plus 79 nucleotides of the downstream region, was amplified by PCR (primers SerF1 and SerR1) from *M. abscessus* WT total DNA and cloned between the *Eco*RI and *Hind*III restriction sites of a pUC19 derivative carrying a Km resistance gene. The resulting plasmid (pCB3) was transformed into MABserB2 with selection on 7H11 containing Km. Several colonies were analyzed by PCR (primers SerF2 and SerR2) to check for the integration of the suicide plasmid at the *serB2* locus. One positive clone (MABserB2-rev) was selected and the recovery of the WT allele of *serB2* was confirmed by DNA sequencing.

Disruption of *whiB7* (*MAB_3508c*) in the WT strain and MABSerB2 was performed using the mycobacterial recombineering system (1). 1-kb DNA fragments upstream and downstream of *whiB7* were amplified by PCR from *M. abscessus* genomic DNA with primer pairs WhiF1/WhiR1 and WhiF2/WhiR2. A third DNA fragment containing a Zeo resistance gene *Sh ble* was amplified from pMV361zeo with primers ZeoF1 and ZeoR1. The three PCR fragments were fused by PCR amplification with primers WhiF3 and WhiR3 to obtain the allelic exchange substrate. This DNA product was transformed by electroporation into *M. abscessus* WT or MABserB2 carrying the pJV53 plasmid, pre-treated with acetamide to induce the phage recombinase as previously described (1). Transformants were selected on 7H11 containing Zeo at 37 °C and several colonies were analyzed by PCR with primer pairs WhiF1/ZeoR2 and ZeoF2/WhiR1 to check for the replacement of the WT copy of *whiB7* by the mutated *whiB7*::*zeo* allele. For each strain, one mutant with the correct deletion was selected and the recombineering plasmid pJV53 cured from the mutants by successive growth in drug-free media. Loss of the plasmid was checked by plating bacteria on Km-containing solid medium. To generate pBS2, a DNA sequence overlapping the *whiB7* gene plus its upstream promoter sequence was amplified by PCR from *M. abscessus* total DNA using primers WhiF6 and WhiR6 and cloned between the *Hind*III and *Pac*I site of a pMIP12 derivative (2). To construct the CRISPRi plasmids p965MAB3388, p965MAB3508, and p965MAB3117, primer pairs SerF3/SerR3, WhiF4/WhiR4, and PptF1/PptR1, were annealed and inserted between the two *Bsm*B1 sites of pLJR965 (Addgene #115163) (3).

RT-qPCR analyses

Total RNA samples of each strain were prepared from exponential or stationary phase cultures using the Qiagen RNeasy Kit (Cat. No. 74106) followed by DNase I treatment (Invitrogen Kit DNase I treatment, Fisher scientific Cat. No. 10729525). cDNA was generated using random hexamers and Invitrogen reverse transcriptase SuperScript III (Fisher Scientific Cat. No. 10308632). Gene-specific primers (SigF1 / SigR1 for *sigA*, WhiF5 / WhiR5 for *whiB7*, AacF / AacR for *aac(2')*, EisF / EisR for *eis2*, ErmF / ErmR for *erm41* and MAB_2355cF / MAB_2355cR for *MAB_2355c*, Table S3), were designed using the online platform Primer3Plus (https://www.primer3plus.com/). All real-time PCR reactions were performed using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) and the amplifications were done using a SensiFAST SYBR Hi-ROX kit (Ozyme, Cat. No. BIO-92020). The PCR cycling conditions were as follows: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec; followed by dissociation at 95°C for 15 sec, 60°C for 60 sec, 95°C for 15 sec and 60°C for 15 sec. The relative changes in gene expression were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using *sigA* as reference gene (4).

Whole genome sequencing
DNA genomic extractions were done from 5 ml bacterial exponential cultures using a Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration were determined using a NanoDrop-1000 spectrophotometer. Whole genome sequencing was performed with paired-ends Illumina technology by Eurofins. Analyses of data sequencing were performed online using the available tools of the GenoToul platform (Toulouse).

Metabolomic analyses
For the targeted metabolomics profiling studies, the mycobacteria were initially grown as described in the bacterial strains, growth media and culture conditions section. At the chosen growth phase, the bacteria were metabolically quenched by the extraction solution composed of acetonitrile/methanol/H_2O (2:2:1) precooled to 4 °C. Small molecules were extracted by the mechanical lysis of the entire bacteria-containing solution with 0.1-mm acid-washed zirconia beads for 1 minute using a FastPrep system (MP Bio®) set to 6.0 m/s. The lysates were filtered twice through 0.22-µm Spin-X column filters (CoStar®). The bacterial biomass of the individual samples was determined by measuring the residual protein content of the metabolite extracts using the BCA assay kit (Thermo®) (5, 6). A 100-µL aliquot of the metabolite solution was then mixed with 100 µL of acetonitrile with 0.2% acetic acid at -20 °C, and the mixture was centrifuged for 10 minutes at 17,000 x g and 4 °C. The final concentration of 70% acetonitrile was compatible with the starting conditions of HILIC-Z and Diamond Hydride chromatography. The supernatant was then transferred into LC/MS V-shaped vials (Agilent 5188-2788), and a 4 µL aliquot was injected into the LC/MS instrument.

Liquid chromatography-mass spectrometry for targeted metabolomic analysis
Aqueous normal-phase liquid chromatography was performed using an Agilent 1290 Infinity II LC system equipped with a binary pump, temperature-controlled autosampler (set at 4 °C) and temperature-controlled column compartment (set at 25 °C) containing a Cogent Diamond Hydride Type C silica column (150 mm × 2.1 mm; dead volume of 315 µl). A flow rate of 0.4 mL/min was used. The elution of polar metabolites was performed using solvent A, which consisted of deionized water (resistivity ~18 MΩ cm) and 0.2% acetic acid, and solvent B, which consisted of 0.2% acetic acid in acetonitrile. The following gradient was applied at a flow rate of 0.4 ml/min: 0 min, 85% B; 0-2 min, 85% B; 3-5 min, 80% B; 6-7 min, 75% B; 8-9 min, 70% B; 10-11 min, 50% B; 11.1-14 min, 20% B; 14.1-25 min, 20% B; and 5-min of re-equilibration at 85% B. Accurate mass spectrometry was performed using an Agilent Accurate Mass 6545 QTOF apparatus. Dynamic mass axis calibration was achieved by continuous infusion after the chromatography of a reference mass solution using an isocratic pump connected to an ESI ionization source operated in positive-ion mode. The nozzle and fragmentor voltages were set to 2,000 V and 100 V, respectively. The nebulizer pressure was set to 50 psig, and the nitrogen drying gas flow rate was set to 5 l/min. The drying gas temperature was maintained at 300 °C. The MS acquisition rate was 1.5 spectra/sec, and *m*/*z* data ranging from 50 to 1,200 were stored. This instrument enabled accurate mass spectral measurements with an error of less than 5 parts per million (ppm), a mass resolution ranging from 10,000 to 45,000 over the *m*/*z* range of 121-955 atomic mass units, and a 100,000-fold dynamic range with picomolar sensitivity. The data were collected in centroid 4-GHz (extended dynamic range) mode. The detected *m*/*z* data were deemed to represent metabolites, which were identified based on unique accurate mass-retention times and MS/MS fragmentation identifiers for masses exhibiting the expected distribution of accompanying isotopomers. The typical variation in the abundance of most of the metabolites remained between 5 and 10% under these experimental conditions.

Legend of Supplemental Table S1 (provided in excel format): Relative abundance of selected metabolites (sheet 1) and α-ketoglutarate / L-glutamate ratio (sheet 2) in the WT and MABserB2 strains. Analyzes were done on stationary phase bacteria cultivated with or without serine or on exponential phase bacteria. For each culture condition, 3 independent experiments (labelled exp1 to 3) were performed. Each experiment includes 3 biological replicates, each performed in duplicate, of each strain. "mean WT" and "mean MABserB2" correspond to the average abundances of the metabolite in the WT and MABserB2 strains in a single experiment, expressed relative to protein concentration (arbitrary units). n is the number of replicates used to calculate the mean value in each experiment. ND indicates that the abundance of the metabolite was not assessed in the experiment. "ratio" is the relative abundance of the metabolite in MABserB2 compared to the WT in each experiment (mean MABserB2 / mean WT) and "mean ratio" is the average of the ratios from each independent experiment.

Table S2: Plasmids used in this study

Name	Description	Ref./Source
pJV53	Mycobacterial plasmid expressing the mycobacteriophage Che9c gp60 and gp61 recombineering proteins, Km^R	AddGene # 26904
pTIGc	Mycobacterial dual reporter plasmid expressing constitutively the GFP and conditionally the TurboRed fluorescent protein, Km^R	AddGene #78314
pCB3	pUC19 derivative containing part of the WT *serB2* gene (nt 266-1236) plus 79 nucleotides of the downstream region, Km^R	This study
pBS2	pMIP12 derivative containing the *whiB7* gene plus its upstream promoter sequence, Km^R	This study
pLJR965	Tetracycline-inducible dCas9 attB-integrative vector for gene silencing, Km^R	Addgene #115163
p965MAB3117	pLJR965 derivative targeting *MAB_3117c*, Km^R	This study
p965MAB3388	pLJR965 derivative targeting *serB2* (*MAB_3388c*), Km^R	This study
p965MAB3508	pLJR965 derivative targeting *whiB7* (*MAB_3508c*), Km^R	This study

Table S3: oligonucleotides used in this study

Primer	Oligonucleotide sequence 5'-3'
AacF	CTGTGTCCAATATGCCAACC
AacR	GAATGCCTCAATGAGTAATTCAC
EisF	GAGGTCAACCGCAAATTCAC
EisR	CACGACATGACGGCTGAAC
ErmF	GGAGTTCGTTGTGGATCTGG
ErmR	AAACCGTGAACGAAGGTGTC
MAB2355cF	CTGGCCAGCTCATACGGAAT
MAB2355cR	ACTCATGGAGTGCGACAGTG
PptF1	GGGAGCCCGTCCGCCCCACCACGGCCCC
PptR1	AAACGGGGCCGTGGTGGGGCGGACGGGC
SerF1	CATGATTACGAATTCACCGCACCGCGAGCATGC
SerF2	GGAATGGGAACTACAAGAGG
SerF3	GGGAGTCGGCCCCGGTGACGGTGA
SerR1	GGCCAGTGCCAAGCTTGATCAAGGATCCGTCGACG
SerR2	CGTTCTTGTGGAACGTGTTC
SerR3	AAACTCACCGTCACCGGGGCCGAC
SigF1	ACAAGGCTTCAGGCGATTTC
SigR1	TTGCCGATCTGCTTGAGGTAG
WhiF1	GCACAAGGGAGTATGGAAGG
WhiF2	AGGACTGACCGCTTCCTCTTCGGTTCCTC
WhiF3	GGATCTCAAACTCATTCAGC
WhiF4	GGGAGCGCCACAATGGTCCCCTGCT
WhiF5	ATGATGACCGTTGAAGTGGAG
WhiF6	ATATTTAATTAACACAACGTTGATTTCGGTGC
WhiR1	TCCTAGCATCATAACCATTGCTCCCCATCG
WhiR2	GTACAACATCGATATCTCTCC
WhiR3	TTCACCACCGACAAACTGG
WhiR4	AAACAGCAGGGGACCATTGTGGCGC
WhiR5	TTTCCGCGAACCACAGGTC
WhiR6	ATATAAGCTTGGGAGCAATGGTTATCAGGC
ZeoF1	CAATGGTTATGATGCTAGGACAATTGGAAAG
ZeoF2	GTCGTGTCCACGAACTTCC
ZeoR1	AAGAGGAAGCGGTCAGTCCTGCTCCTCG
ZeoR2	GAGACACAACGTGGCTTTCC

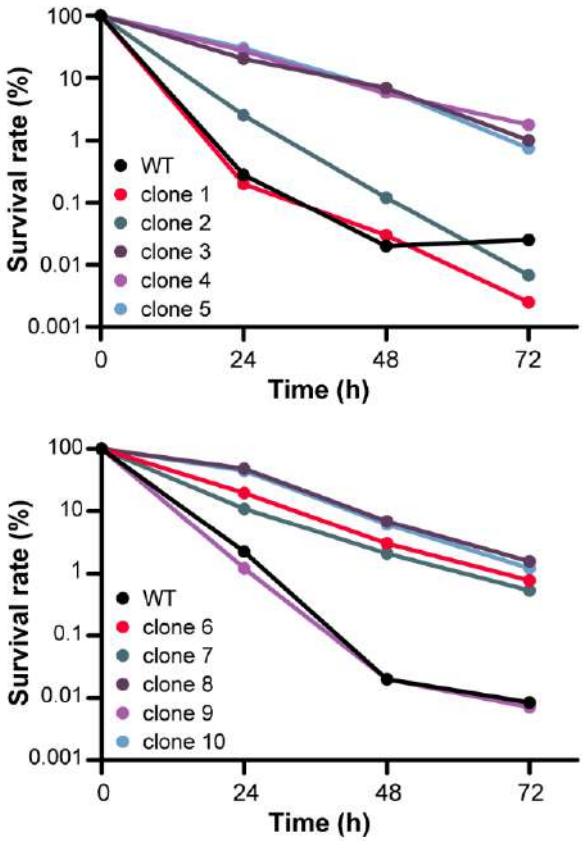


Figure S1. Bactericidal activity of cefoxitin on stationary-phase cultures diluted 1:100 in fresh medium of *M. abscessus* WT and of the ten independent clones selected from the cycle 10 population of the experimental evolution. Clone 3 was named MABserB2 and selected for further analyses.

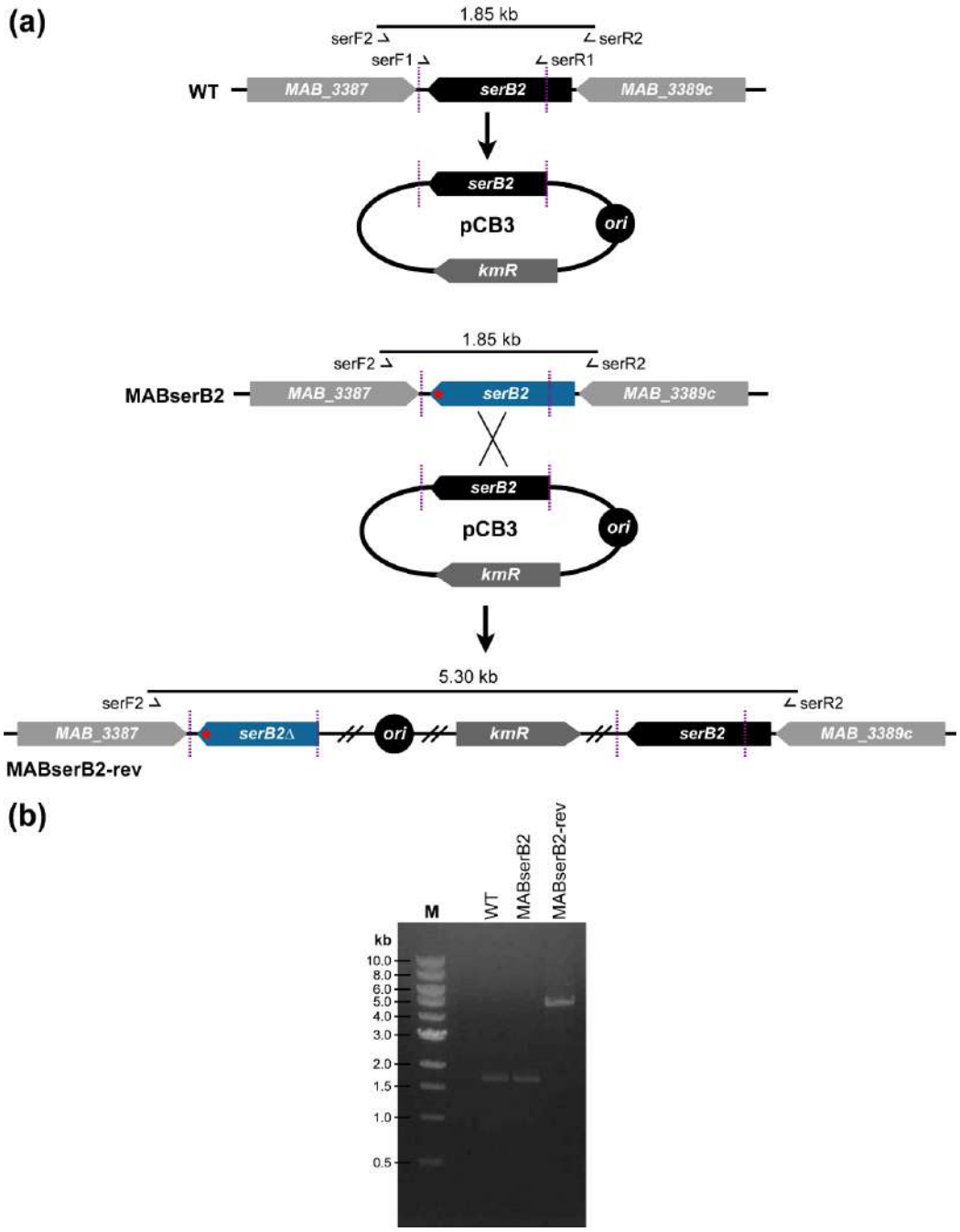


Figure S2. Generation and analysis of MABserB2-rev. (**a**) Cloning strategy for the construction of MABserB2-rev (for details see supplemental experimental procedures). The WT and mutated alleles of *serB2* in the WT and MABserB2 are represented in black and blue, respectively. The red star maps the position of the mutation in *serB2* of MABserB2. (**b**) PCR analysis of the MABserB2-rev strain. Genomic DNA from WT, MABserB2 and MABserB2-rev were isolated and analyzed by PCR using primer pairs SerF2/SerR2 (Supplemental Table S3). Positions of primers and the predicted sizes of PCR products are shown above each genetic structure. kb, kilobase.

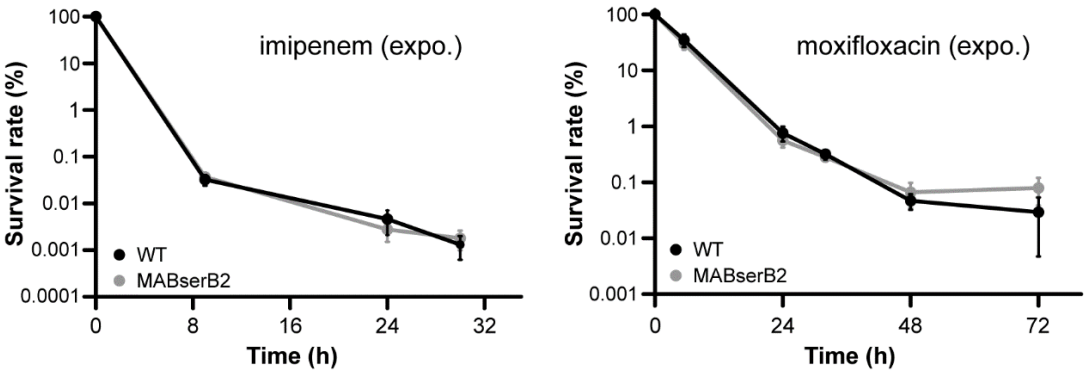


Figure S3. Bactericidal activity of imipenem and moxifloxacin on log-phase cultures of *M. abscessus* WT and MABserB2 (n=3). Error bars represent SEM.

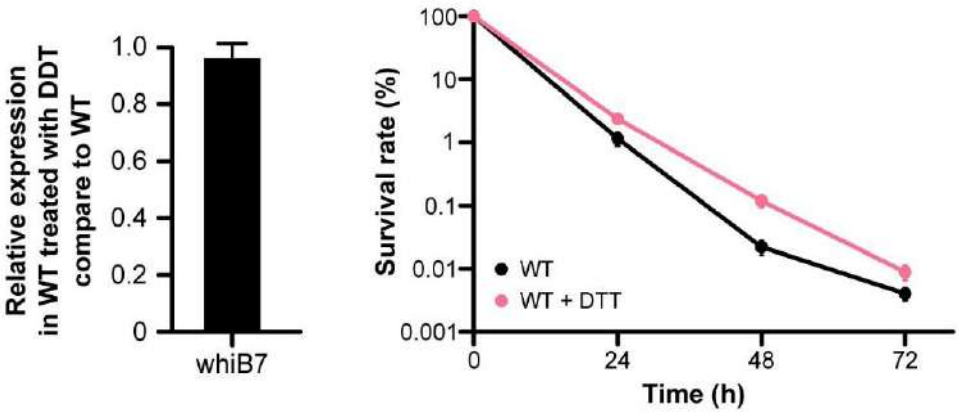


Figure S4. Left: RT-qPCR analysis of the expression of *whiB7* in the WT strain grown in presence of DTT compared to the WT strain grown in absence of DTT. Analyzes were carried out on bacteria cultured in stationary phase (n=2). Right: bactericidal activity of cefoxitin on stationary phase cultures of the *M. abscessus* WT strain diluted 1:100 in fresh medium without or with DTT added both during the growth phase and during cefoxitin treatment (n=2). Error bars represent SEM.

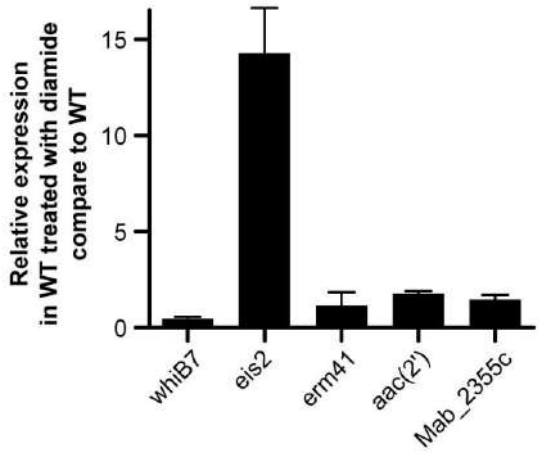


Figure S5. RT-qPCR analysis of the expression of *whiB7* and of selected genes of the WhiB7 regulon in the WT strain grown in presence of diamide compared to the WT strain grown in absence of diamide. Analyzes were carried out on bacteria cultured in stationary phase (n=4 for *eis2* and n=2 for the other genes).

Supplemental references

1. van Kessel JC, Hatfull GF. 2007. Recombineering in Mycobacterium tuberculosis. Nat Methods 4:147-52.
2. Le Dantec C, Winter N, Gicquel B, Vincent V, Picardeau M. 2001. Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. 183:2157-64.
3. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, Pritchard JR, Church GM, Rubin EJ, Sassetti CM, Schnappinger D, Fortune SM. 2017. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. Nat Microbiol 2:16274.
4. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-8.
5. de Carvalho LP, Fischer SM, Marrero J, Nathan C, Ehrt S, Rhee KY. 2010. Metabolomics of Mycobacterium tuberculosis reveals compartmentalized co-catabolism of carbon substrates. Chem Biol 17:1122-31.
6. Nandakumar M, Prosser GA, de Carvalho LP, Rhee K. 2015. Metabolomics of Mycobacterium tuberculosis. Methods Mol Biol 1285:105-15.

III. Résultats additionnels, discussion et perspectives

À l'instar d'autres pathogènes majeurs tels que *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *M. tuberculosis*, la persistance et la tolérance aux antibiotiques sont des phénomènes encore très peu étudiés chez *M. abscessus*, malgré leur probable contribution à l'échec des traitements antibiotiques chez les patients atteints de mucoviscidose. Dans ce contexte, le 1er objectif de ma thèse a été de rechercher et de caractériser les fonctions impliquées dans la persistance ou la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*. Pour cela, j'ai mis au point des expériences d'évolution expérimentale *in vitro* afin d'isoler des mutants de tolérance ou de persistance à la céfoxitine.

Après dix cycles d'évolution, nous n'avons pas isolé de mutant de persistance, mais un mutant de tolérance à la céfoxitine (Fig. 2a du papier). Ce résultat pourrait indiquer que la probabilité d'obtenir un mutant de persistance chez *M. abscessus* est plus faible que chez d'autres espèces bactériennes telles que *E. coli* (Fridman *et al.*, 2014). Ce résultat peut également être expliqué par la mise en place d'un protocole expérimental non optimisé à l'obtention d'un mutant de persistance. Afin de résoudre ce problème, une option envisageable serait d'augmenter la durée du traitement à la céfoxitine. Cette extension viserait à accroître la proportion de bactéries persistantes dérivées de populations mutantes par rapport à la proportion prédominante de bactéries persistantes issues de la souche sauvage, notamment pendant les premiers cycles d'évolution. Cette approche présente cependant des limites. Un rallongement excessif du temps de traitement conduirait en effet à l'élimination de la quasi-totalité de la population bactérienne, y compris des bactéries persistantes issues des populations mutantes. Ce problème pourrait être cependant contourné en réalisant une mutagénèse aléatoire de la population bactérienne à l'aide de méthanesulfonate d'éthyle, comme décrit chez *M. tuberculosis* ou *E. coli* (Moyed and Bertrand, 1983; Torrey *et al.*, 2016) pour favoriser l'acquisition de mutations génétiques avant l'évolution expérimentale.

L'unique mutation présente chez MABserB2 est une mutation ponctuelle dans le gène *serB2,* qui code pour une phosphosérine phosphatase (PSP) impliquée dans la

dernière étape de la voie phosphorylée de biosynthèse de la L-sérine à partir du 3-phosphoglycérate.

Actuellement seule la structure cristallographique de la phosphosérine phosphatase SerB de *M. avium* est disponible (Abendroth *et al.*, 2011). Cette protéine forme un homodimère, au sein duquel les deux protomères interagissent par entrelacement de domaines ou « domain swapping ». Des prédictions de structures sur AlphaFold des protéines SerB2 de la souche WT et de MABserB2, très similaires à la structure de la protéine SerB de *M.* avium, ont été obtenues (Figure 25). Il est envisageable que l'allongement des extrémités C-terminales des protéines SerB2 de MABserB2 impacte l'organisation de l'homodimère et modifie son activité catalytique.

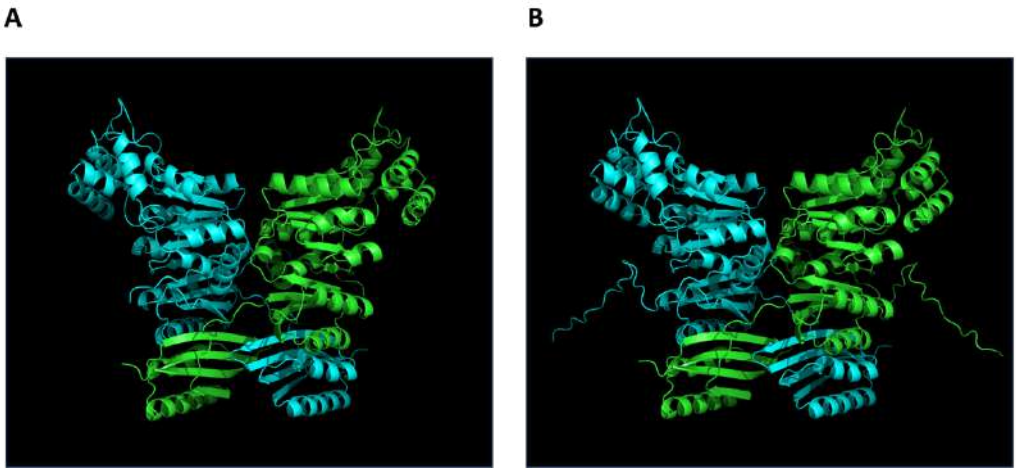


Figure 25. *Prédiction de structure des protéines SerB2 A) WT et B) MABserB2 avec le logiciel AlphaFold2-multimer.*

Chaque protomère est représenté par une couleur. L'organisation en homodimère s'effectue par échange de domaines. Les extrémités C-terminale des protéines SerB2 de MABserB2 sont rallongées suite à une mutation ponctuelle dans le gène. Elles semblent flottantes mais pourraient se replier vers l'intérieur de la protéine et impacter la dimérisation. Structures générées par le Dr Lionel Mourey (CNRS-IPBS).

D'après Arora et al., (2014), *M. abscessus* ne possèderait qu'une seule protéine PSP contrairement à *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* qui en présentent au moins deux (Arora *et al.*, 2014). Une recherche dans les banques de données suggère cependant l'existence d'une seconde protéine PSP chez *M. abscessus*. Codée par le gène *MAB_3995*, celle-ci serait l'orthologue de la protéine PSP non essentielle SerB1 de *M. tuberculosis* (Arora *et al.*,

2014). Nos résultats sont en accord avec les divergences d'essentialité observées entre les protéines SerB1 et SerB2 de *M. tuberculosis*. En effet, chez *M. abscessus,* une mutation dans le gène *serB2* suffit à elle seule pour entrainer une altération du métabolisme de la sérine (Fig. 6 et Table S1 du papier). Par ailleurs, la diminution d'expression de *serB2* par CRISPRi entraine un défaut de croissance sur milieu solide ne contenant pas de sérine (Fig. 5b du papier). Ces données indiquent donc que SerB1 ne peut compenser l'altération de fonction de la protéine SerB2 dans le mutant MABserB2.

Lors de la caractérisation de MABserB2, nous avons démontré que l'altération du métabolisme de la sérine induit une surexpression du régulateur transcriptionnel *whiB7* en phase stationnaire qui est responsable du phénotype de tolérance. Chez *M. abscessus*, le régulon WhiB7 comporte selon les études, entre 127 et 181 gènes (Hurst-Hess *et al.*, 2017; Hurst-Hess *et al.*, 2023a). Ces gènes codent pour de nombreux facteurs impliqués dans la résistance aux antibiotiques (pompes d'efflux, enzymes de modification de l'antibiotique ou de protection de la cible) mais aucun ne semble être impliqué dans une modification de sensibilité à la céfoxitine (voir Chapitre III, Partie II de l'introduction). En effet, la délétion de *whiB7* chez *M. abscessus* ne modifie pas la sensibilité aux β-lactamines contrairement à ce qui est observé sur les autres familles d'antibiotiques (Pryjma *et al.*, 2017). Parmi les autres gènes du régulon, on trouve diverses protéines du métabolisme et de biosynthèse des acides aminés, des acétyles transférases et des protéines associées aux ribosomes, des transporteurs et des régulateurs de transcription (Hurst-Hess *et al.*, 2023a). A l'heure actuelle, nos données ne nous permettent pas de dire lequel de ces gènes est impliqué dans la tolérance à la céfoxitine, la moxifloxacine et l'imipénème chez MABserB2. Pour les identifier, nous pourrions construire une banque de mutants de transposition dans le fond génétique de MABserB2 et identifier les mutations suppressives de la tolérance. Nous pourrions également réaliser des analyses transcriptomiques globales en se focalisant sur les gènes du régulon de WhiB7 présentant une augmentation significative d'expression dans le mutant MABserB2 en comparaison de la souche WT. Leur implication dans le phénotype de tolérance à la céfoxitine de MABserB2 pourrait ensuite être vérifiée en les délétant et en confirmant une augmentation de sensibilité aux antibiotiques.

Ainsi, bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans la tolérance de MABserB2 restent à préciser, un résultat majeur de ce travail est d'avoir montré que WhiB7, en plus de contrôler la résistance intrinsèque de *M. abscessus*, joue également un rôle dans sa tolérance aux antibiotiques.

La surexpression de *whiB7* dans le mutant MABserB2 corrèle avec un état rédox intracellulaire plus réducteur. Nous suspectons que l'établissement de cet environnement plus réducteur est la conséquence de l'activation de réponses adaptatives anti-oxydantes suite à la détection d'un stress oxydatif généré par l'altération de la voie de biosynthèse de la L-sérine. En effet, la sérine, par l'intermédiaire de la cystéine et de la glycine, est impliquée dans les voies de biosynthèse du gluthation et de son équivalent mycobactérien, le mycothiol, deux molécules effectrices de l'homéostasie rédox (Voir Chapitre II, Partie IV, B, ii) (Newton *et al.*, 2008; Bachhawat and Yadav, 2018). L'altération de la voie de biosynthèse de la L-sérine, pourrait conduire à un défaut de production du mycothiol provoquant un déséquilibre de l'homéostasie rédox et l'activation des voies de réponses aux stress oxydatifs, médiées notamment par WhiB7. Pour tester cette hypothèse nous pourrions mesurer la concentration en mycothiol dans la souche WT et le mutant de tolérance MABserB2 de *M. abscessus* (Yin *et al.*, 2010) (Ung and Av-Gay, 2006).

Un lien entre la surexpression de *whiB7* et l'altération du métabolisme des acides-aminés a également été mis en évidence chez *M. smegmatis* (Schrader *et al.*, 2021; Poulton *et al.*, 2023). Dans l'une de ces études, une mutation dans le gène *argD*, impliqué dans la synthèse de l'arginine, coïncide avec une surexpression de *whiB7* et une diminution de sensibilité à la kanamycine. Cette tolérance accrue est médiée par la surexpression de *eis*, un gène du régulon de WhiB7 qui est impliqué dans la résistance aux aminoglycosides (Schrader *et al.*, 2021). Lors de la caractérisation du mutant MABserB2, nous avons observé une surexpression des gènes *eis2, erm41 et MAB_2355c* en phase stationnaire, en cohérence avec l'augmentation d'expression de *whiB7* (Figure 26). L'augmentation d'expression de *eis2* ne semble cependant pas conférer de phénotype de tolérance à l'amikacine (Fig. 3c du papier), contrairement à ce qui est observé pour *eis* chez *M. smegmatis* (Schrader *et al.*, 2021), ni d'augmentation des valeurs de CMI de cet antibiotique (Table 1 du papier) (Zaunbrecher *et al.*, 2009). Ces différences pourraient

s'expliquer par le fait que la tolérance aux aminoglycosides a été mesurée lors de phases de croissance différentes, en sortie de phase stationnaire pour MABserB2 et en phase exponentielle pour le mutant *M. smegmatis ΔargD* (Schrader *et al.*, 2021). Il est possible que les acétyltransférases Eis et Eis2 de *M. smegmatis* et de *M. abscessus*, soient plus actives lorsque les bactéries sont en phase active de croissance. De plus, nos données sur l'expression de *eis2* chez MABserB2 sont basées sur des analyses par qRT-PCR qui n'apportent pas d'information directe sur le niveau de production des protéines. Il est ainsi possible que la protéine Eis2 soit présente en quantité équivalente dans MABserB2 et la souche WT lors de la dilution de la culture dans du milieu frais. Enfin, la surexpression de *eis* chez le mutant *ΔargD* de *M. smegmatis* conduit à une augmentation d'un facteur 2 de la CMI de la kanamycine (Schrader *et al.*, 2021). Cette légère augmentation pourrait être en partie responsable de la meilleure survie des bactéries *ΔargD* observée lors du traitement antibiotique.

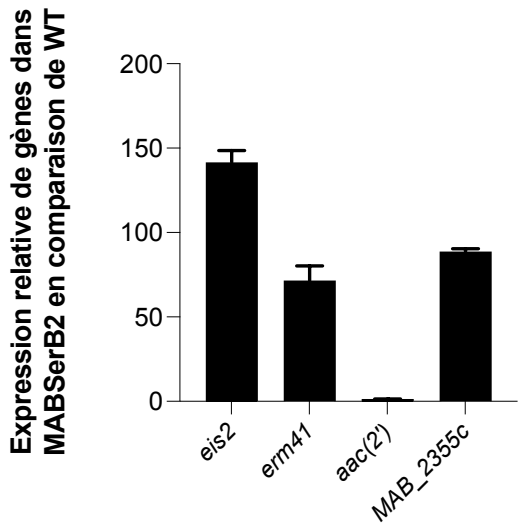


Figure 26. *Le mutant MABserB2 présente une surexpression de certains gènes du régulon de WhiB7 en phase stationnaire.*

Les histogrammes représentent les niveaux d'expression, obtenus par RT-qPCR, de gènes du régulon de WhiB7 dans MABserB2 en comparaison de la souche WT. Les analyses ont été réalisées sur des bactéries en phase stationnaire de croissance (n=2). Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (SEM).

Pour conclure sur cette partie, en accord avec le 1er objectif de ma thèse, ce travail a permis d'identifier des facteurs impliqués dans la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*, tels qu'une altération d'une voie métabolique, une altération de l'homéostasie rédox, ainsi que l'induction du régulon de résistance WhiB7. Afin de renforcer ces données, une perspective à ce travail serait d'isoler d'autres mutants de tolérance ou de persistance impactés dans d'autres fonctions que la synthèse de la L-sérine, soit par évolution expérimentale couplée ou non à de la mutagénèse chimique, soit par des approches alternatives telles que la construction d'une banque de transposition ou l'utilisation de la technique d'isolation de mutants sur filtre comme décrit dans l'article (Schrader *et al.*, 2021).

Objectif II. Impact de la tolérance sur la persistance de *Mycobacterium abscessus in vivo* et l'acquisition de mutations de résistance.

I. Contexte et objectifs de l'étude

L'implication de la tolérance dans l'échec des traitements antibiotique est bien documentée mais son impact sur la capacité des bactéries à faire face aux défenses immunitaires de l'hôte n'a été que très peu étudié. L'une de nos hypothèses est que la capacité des bactéries à tolérer transitoirement les antibiotiques permettrait également de mieux persister chez l'hôte. Plusieurs observations étayent cette hypothèse :

- Les traitements antibiotiques et les systèmes de défense de l'hôte induisent la production de ROS (Figures 8 et 9) (Voir Chapitre II, partie IV de l'introduction) (MacMicking *et al.*, 1997; Van Acker and Coenye, 2017; Shi *et al.*, 2019).
- Certaines protéines senseurs impliquées dans la détoxification des radicaux oxygénés, telles que les protéines WhiB ou le système DosRST, sont impliquées à la fois dans la tolérance aux antibiotiques et dans la persistance chez l'hôte (Voir Chapitre IV, Partie II, B de l'introduction) (Malhotra *et al.*, 2004; Converse *et al.*, 2009; Casonato *et al.*, 2012; Schrader *et al.*, 2021; Belardinelli *et al.*, 2022).
- Chez *S. aureus*, la capacité à persister dans la souris ou au sein des macrophages est associée à une tolérance accrue aux antibiotiques (Rowe *et al.*, 2020).

Par ailleurs, plusieurs études suggèrent un lien entre la tolérance et l'évolution vers la résistance par l'acquisition de mutations génétiques (Voir Chapitre IV, Partie IV de l'introduction) (Cohen *et al.*, 2013; Sebastian *et al.*, 2016; Levin-Reisman *et al.*, 2017; El Meouche and Dunlop, 2018; Levin-Reisman *et al.*, 2019; Windels *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020; Santi *et al.*, 2021).

Dans ce contexte, j'ai tenté de vérifier si le mutant de tolérance MABserB2 i) présentait une persistance accrue dans le modèle murin et ii) avait une propension à accumuler des mutations de résistance plus importante que la souche sauvage lors d'un traitement antibiotique.

II. Résultats

A) Lien entre tolérance aux antibiotiques et persistance *in vivo*

Pour mettre en évidence une éventuelle corrélation entre une augmentation de la tolérance chez *M. abscessus* et une meilleure persistance chez l'hôte, nous avons réalisé une expérience de co-infection de souris BALB/c avec le mutant MABserB2 et la souche sauvage de *M. abscessus*. L'utilisation de souris BALB/c est justifiée par la possibilité d'observer la persistance de *M. abscessus* dans ce modèle au-delà de 4 semaines (Lerat *et al.*, 2014; Bernut *et al.*, 2014b), contrairement aux souris C3H/Hej par exemple, qui éliminent plus rapidement les bactéries (Obregón-Henao *et al.*, 2015).

Pour les discriminer l'une de l'autre, les souches sauvage (WT) et MABserB2 ont été transformées avec un plasmide intégratif contenant un gène de résistance à la kanamycine (pMV361e) ou un gène de résistance à la zéocine (pMV361zeo), respectivement. Nous avons vérifié que l'introduction de ces plasmides n'avait pas d'impact sur le niveau de tolérance à la céfoxitine (Figure 27).

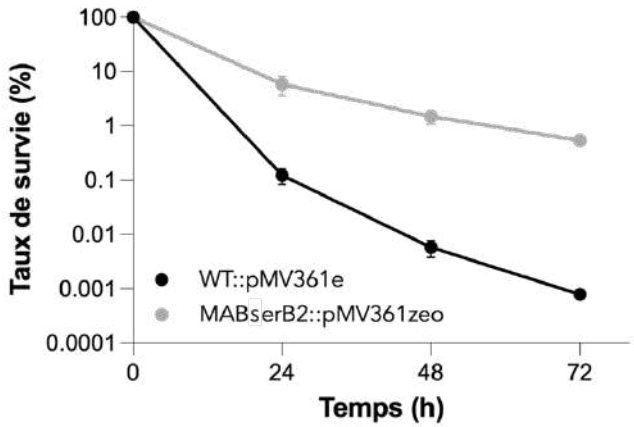


Figure 27. *Cinétiques de survie à la céfoxitine des souches WT::pMV361e et MABserB2::pMV361zeo.*

La sensibilité à la céfoxitine des souches WT::pMV361e et MABserB2::pMV361zeo a été mesurée après dilution au 1 :100 de cultures en phase stationnaire dans du milieu frais contenant 400 µg/ml de céfoxitine. Les points représentent la moyenne de 3 réplicats biologiques. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (SEM).

Avec la contribution de Céline Berrone et Flavie Moreau travaillant à l'animalerie ASB3 de l'IPBS, quinze souris BALB/c ont été infectées par voie intraveineuse avec un inoculum contenant ~1.10^7 bactéries de chacune des souches en proportion 1:1 (Figure 28A). A J1 post-infection (PI), trois souris ont été euthanasiées et des dilutions de broyats de leurs poumons, foie et rate ont été étalées sur milieu sélectif kanamycine ou zéocine, pour quantifier les bactéries de chaque souche présentes dans ces différents organes. Les douze souris restantes ont été euthanasiées par lots de quatre à J10, J21 et J30 PI afin de suivre les cinétiques de survie bactérienne (Figure 28B à D).

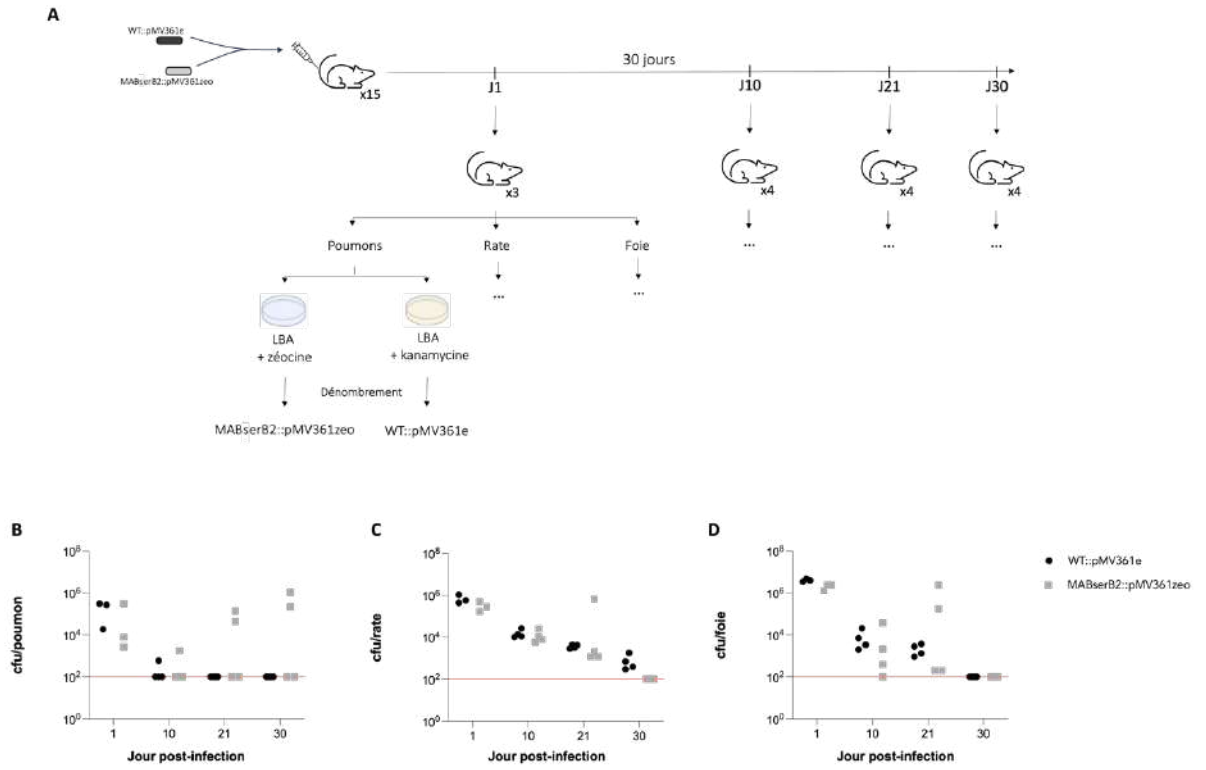


Figure 28. *Expérience de compétition réalisée avec les souches WT::pMV361e et MABserB2::pMV361zeo dans le modèle murin.*

A. Représentation schématique de l'expérience
B-D. Charge bactérienne des souches WT::pMV361e et MABserB2::pMV361zeo dans les B) poumons, C) rates et D) foies des souris BALB/c. Les traits horizontaux rouge représentent les seuils de détection.

A J1 post-infection le nombre de CFU est similaire pour les deux souches dans les différents organes (Figure 28B-D). Nous avons observé une charge bactérienne plus importante dans le foie (Figure 28C), comme attendue lors d'une injection des bactéries par voie intraveineuse (Bernut *et al.*, 2014b).

Au cours du temps, nous observons ensuite un déclin rapide de la charge bactérienne dans les différents organes pour les deux souches. Aucune différence remarquable en termes de charge bactérienne n'est cependant observable entre les foies et les rates sur la durée de l'expérience (Figure 28C-D). Concernant les poumons, nous observons une diminution similaire du nombre de CFU de chacune des souches aux temps précoces (Figure 28B). Aux temps tardifs d'infection (J21 et J30 PI), la souche sauvage est complètement éliminée des poumons. Le mutant MABserB2 est quant à lui éliminé dans deux souris sur les quatre infectées (Figure 28B). Dans les deux autres souris, on observe une reprise de la croissance bactérienne de MABserB2. Ces résultats sont inattendus car il n'existe aucune donnée dans la littérature montrant une multiplication de *M. abscessus* à des temps d'infection tardifs au sein de poumons de souris immunocompétentes. De plus, cette reprise de croissance n'est observable que pour la moitié des souris infectées, et n'est pas corrélée avec une augmentation de la charge bactérienne dans les autres organes. De façon étonnante, les bactéries isolées des poumons de ces deux souris aux temps tardifs forment des colonies de tailles hétérogènes présentant une morphologie atypique, suggérant la possibilité d'une contamination. À défaut de données supplémentaires, nos données actuelles semblent indiquer que le mutant MABserB2 ne persiste pas mieux que la souche sauvage dans la souris.

B) Lien entre tolérance et acquisition de mutations de résistance à la céfoxitine

Afin de déterminer si l'augmentation de la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus* favorise l'évolution vers la résistance, j'ai exposé de manière intermittente la souche sauvage de *M. abscessus* et le mutant MABserB2 à de fortes concentrations en antibiotique, au cours de deux expériences d'évolution réalisées en triplicat et menées en

parallèle. Au cours de ces expériences, nous avons utilisé une concentration en céfoxitine de 200 µg/ml, soit 25 fois la CMI, au lieu des 400 µg/ml utilisés lors de l'expérience d'évolution ayant permis l'isolation de MABserB2. Cette concentration permet de se placer dans des conditions plus proches de celles retrouvées dans le sérum des patients en clinique (Skolnik *et al.*, 2016; Moine *et al.*, 2016).

Les phénotypes de résistance se traduisant par une augmentation de CMI, à chaque cycle de l'évolution, les CMI de la céfoxitine des populations bactériennes ont été mesurées en utilisant des bandelettes à gradient de concentration (Figure 29A).

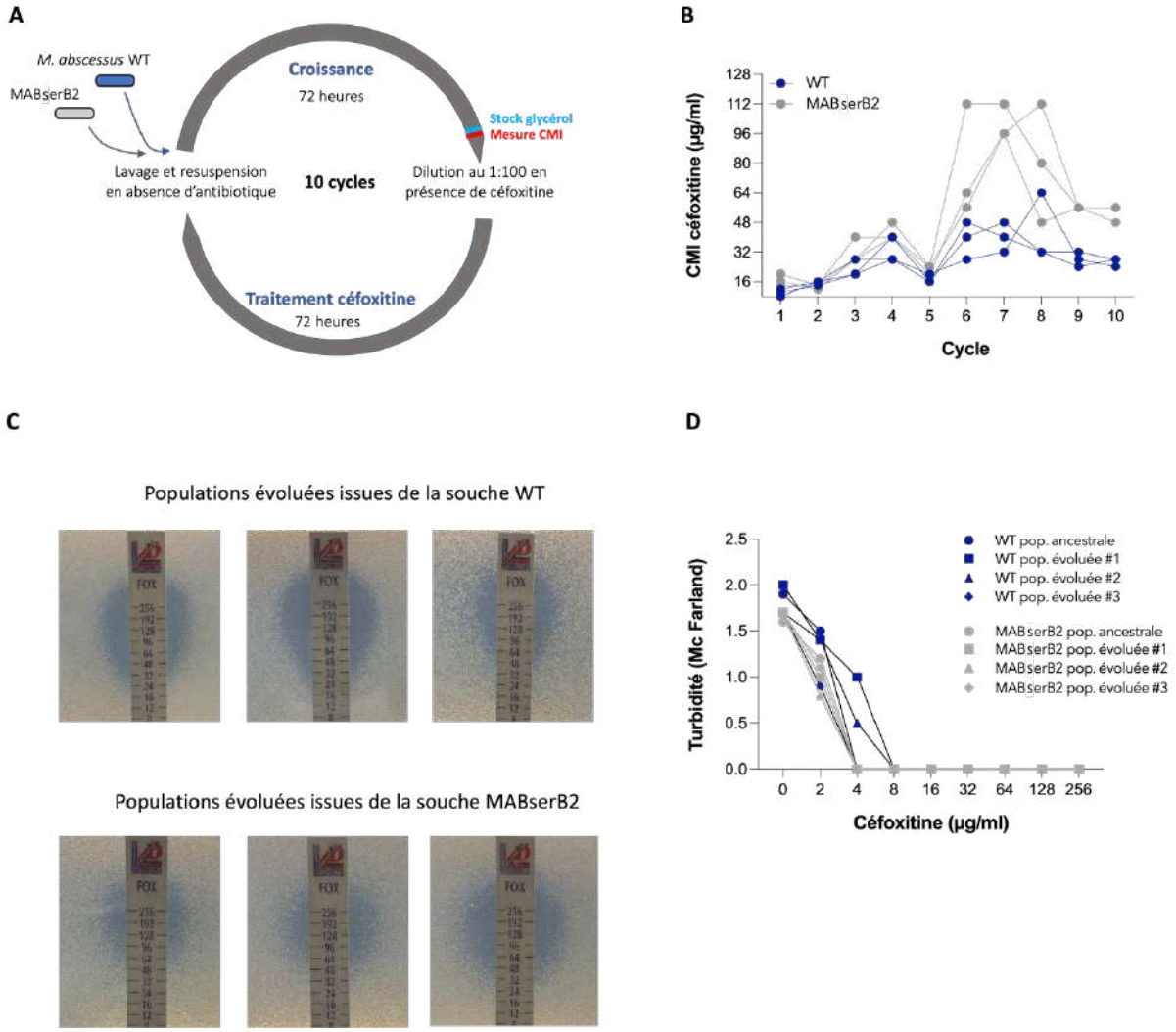


Figure 29. *Expérience d'évolution expérimentale pour établir un lien entre la tolérance et l'acquisition de mutations de résistance.*

A. Représentation schématique de l'expérience.
B. Évolution des valeurs de CMI de la céfoxitine au cours des différents cycles. Les mesures ont été réalisées au moyen de bandelettes à gradient de concentration. Sont représentées sur les graphiques les cinétiques d'augmentation de CMI pour chacune des six populations évoluées (n=1).
C. Photographies des boites de gélose permettant d'estimer la valeur de CMI de la céfoxitine des populations évoluées du cycle 7. Une bandelette imprégnée d'un gradient de concentration en céfoxitine est déposée sur une gélose ensemencée de bactéries. Les boites sont incubées 96h à 37°C. La valeur de la CMI (en µg/ml) se lit à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette.
D. Détermination de la CMI de la céfoxitine des populations ancestrales et évoluées issues du cycle 9 par la méthode de dilution de 2 en 2 de l'antibiotique en milieu liquide (n=1). La turbidité des cultures est mesurée après 72h d'incubation.

Au cours des dix cycles d'évolution, les CMI de la population bactérienne issue de la souche sauvage oscillent entre 8 µg/ml et 48 µg/ml. Les CMI de la céfoxitine des populations issues de MABserB2 présentent des valeurs similaires durant les cinq premiers cycles. Une augmentation de la CMI jusqu'à 112 µg/ml est observée entre les cycles 6 et 8. De façon surprenante la CMI revient à des valeurs comprises entre 24 et 48 µg/ml aux cycles tardifs (Figure 29B).

Ces fluctuations pouvant être liées à des erreurs de mesures avec les bandelettes (Figure 29C), nous avons voulu vérifier les valeurs de CMI par des méthodes de mesures alternatives. Sur milieu solide contenant 16, 32 ou 64 µg/ml de céfoxitine, nous avons étalé les populations du cycle 6 issues de la souche MABserB2 ou WT ayant présenté des valeurs de CMI respectivement à 112 et 48 µg/ml. Dans les deux cas, les populations évoluées ont présenté une inhibition de croissance à partir de 32 µg/ml de céfoxitine (données non montrées). Par la méthode conventionnelle de dilution de 2 en 2 de l'antibiotique en milieu liquide, nous avons ensuite remesurer les valeurs de CMI de chacune des six populations évoluées du cycle 9 et avons observé une inhibition de la croissance à partir de 4-8 µg/ml, de manière identique aux souches ancestrales (Figure 29D). Ces résultats confirment que les valeurs obtenues précédemment avec les bandelettes étaient erronées.

En conclusion nous n'avons pas pu mettre en évidence une évolution vers la résistance à la céfoxitine plus rapide de la souche tolérante MABserB2 par rapport à la souche sauvage.

III. Discussion et perspectives

Dans cette partie de ma thèse nous avons tenté de déterminer si une mutation associée à une augmentation de la tolérance à la céfoxitine chez *M. abscessus* conférait un avantage de survie des bactéries dans le modèle murin et si elle favorisait l'apparition de mutations de résistance.

A) La tolérance aux antibiotiques favorise-t-elle la persistance dans le modèle murin ?

Notre hypothèse de travail était que la mise en place d'une réponse au stress lié au dérèglement de la voie de biosynthèse de la sérine, permettrait aux bactéries de mieux tolérer les effets délétères du système immunitaire de l'hôte lors de l'infection. Cependant, nos expériences de co-infections de souris BALB/c avec la souche sauvage de *M. abscessus* et le mutant de tolérance MABserB2 n'ont pas permis d'établir un lien ferme entre une tolérance accrue à la céfoxitine et la persistance *in vivo* dans le modèle souris.

En effet, nous avons observé un déclin de la charge bactérienne très similaire entre les deux souches dans les différents organes. L'augmentation de la charge bactérienne de la souche MABserB2 dans les poumons de deux souris sur quatre à des temps tardifs (J21 et J30) reste à confirmer. Ce résultat pourrait en effet être lié à une contamination ou à une erreur de manipulation. Nous proposons donc de reproduire l'expérience de co-infection avec un nombre de souris plus important. S'il s'avère que ces résultats sont finalement reproductibles et que le mutant de tolérance MABserB2 présente bien un avantage de survie dans le modèle murin en comparaison de la souche sauvage, il sera possible d'établir un lien causal entre la tolérance aux antibiotiques *in vitro* et la persistance *in vivo*.

B) La tolérance à la céfoxitine du mutant MABserB2 ne semble pas accélérer l'acquisition de mutations de résistance à ce même antibiotique.

Plusieurs études démontrent que la tolérance favorise l'acquisition de mutations de résistance chez diverses espèces bactériennes (Sebastian *et al.*, 2016; Levin-Reisman *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Santi *et al.*, 2021). Cette relation entre tolérance et résistance peut s'expliquer par i) une augmentation de la proportion de bactéries viables capables d'acquérir des mutations génétiques à la fin du traitement antibiotique, ii) un taux de mutation élevé dans les bactéries tolérantes par rapport au reste de la population et iii) une protection par la tolérance des bactéries ayant acquis une mutation de résistance partielle à l'antibiotique utilisé (Voir Chapitre IV, Partie IV de l'introduction) (Levin-Reisman *et al.*, 2017; Windels *et al.*, 2019).

Nos expériences d'évolution n'ont pas permis de mettre en évidence une évolution plus rapide du mutant MABserB2 vers la résistance à la céfoxitine. Ce résultat peut avoir plusieurs explications.

La première serait liée à l'utilisation d'une concentration en céfoxitine trop importante, limitant l'apparition de mutations génétiques. En effet, la MPC (pour « Mutant prevention concentration ») qui définit la concentration en antibiotique à partir de laquelle il est très rare de voir apparaitre des mutants de résistance, n'excède pas 5 à 10 fois la valeur de la CMI pour les β-lactamines (Dahdouh *et al.*, 2014). Or, lors de nos évolutions expérimentales, nous avons utilisé une concentration de 200 µg/ml de céfoxitine, soit 25 fois la CMI, bien au-dessus de la valeur de la MPC prédite. Dans ces conditions, il est possible que les mutations de résistance partielle à l'antibiotique ne puissent pas s'accumuler, bloquant le processus d'évolution vers la résistance. Pour remédier à ce problème, nous pourrions reproduire ces expériences avec des concentrations en antibiotique plus faibles.

La seconde explication serait que le nombre de cycles réalisés au cours de l'expérience d'évolution ne soit pas suffisant. En effet, bien que d'après des résultats antérieurs, la tolérance favorise l'apparition de mutations de résistance après une dizaine

de cycles, il est possible que dans nos conditions ce nombre ne soit pas suffisant pour permettre l'émergence de mutants et leur envahissement dans la population bactérienne (Levin-Reisman *et al.*, 2017). Ce problème pourrait être résolu en prolongeant la durée de l'expérience d'évolution.

Enfin, la dernière explication serait liée au choix de l'antibiotique. Bien que des mutants de résistance à la céfoxitine apparaissent en clinique, leur émergence est extrêmement rare pour des raisons qui restent inexpliquées (entre 0 et 2% des isolats cliniques selon les études) (Park *et al.*, 2008; Lavollay *et al.*, 2014; Nie *et al.*, 2014). Pour se placer dans des conditions plus propices à l'évolution vers la résistance, il faudrait alors réaliser l'expérience d'évolution avec un antibiotique pour lequel l'émergence de mutants de résistance est plus fréquente, tel que la lévofloxacine, la tobramycine ou la doxycycline (Park *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2014). L'utilisation d'un antibiotique différent de celui pour lequel le mutant MABserB2 est tolérant serait d'autant plus pertinent qu'en clinique, l'antibiothérapie contre *M. abscessus* inclut 3 à 4 antibiotiques de familles différentes.

Objectif III. Mise au point d'un modèle d'organoïde pulmonaire pour l'étude de la sensibilité de *Mycobacterium abscessus* aux antibiotiques.

I. Objectifs et résumé de l'étude

La mucoviscidose est une maladie héréditaire causée par des mutations dans le gène *CFTR*. Ce gène code pour un transporteur transmembranaire présent à la surface des cellules épithéliales et impliqué dans le transport des ions chlorures. Son altération génétique entraîne une accumulation importante de mucus dans les voies respiratoires des patients, contribuant au développement d'infections bactériennes (Lopes-Pacheco, 2019; Moliteo *et al.*, 2022).

En plus des difficultés inhérentes à la maladie, les patients atteints de mucoviscidose sont confrontés à un risque plus élevé de mortalité lors d'une infection par *M. abscessus* qui accélère le déclin de leur fonction respiratoire (Skolnik *et al.*, 2016). Malheureusement, les traitements antibiotiques utilisés pour traiter ces infections sont généralement infructueux (Daley *et al.*, 2020). L'une des raisons est liée à la difficulté à établir une corrélation entre l'efficacité des antibiotiques sur les isolats cliniques *in vitro* et chez les patients. Bien qu'il existe des modèles animaux pour l'étude des infections par *M. abscessus*, tels que le poisson-zèbre et la souris, ceux-ci ne permettent pas de prédire avec précision l'efficacité des antibiotiques sur les souches cliniques (Guilbault *et al.*, 2007; Lavelle *et al.*, 2016; Bernut *et al.*, 2019). Dans ce contexte, il apparait primordial de développer un modèle humain *ex vivo* capable de mieux reproduire la physiopathologie des infections et permettant de tester la sensibilité des isolats cliniques dans des conditions plus proches de l'environnement pulmonaire des malades.

Les récentes avancées sur les cellules souches humaines, ont permis le développement de structures cellulaires tridimensionnelles appelées organoïdes. Ces organoïdes sont capables de reproduire certaines des caractéristiques structurales et fonctionnelles des organes humains à partir desquels ils sont synthétisés, tels que l'estomac, le foie et les poumons (Clevers, 2016; Sachs *et al.*, 2019). En laboratoire, ils permettent d'étudier les interactions hôte-pathogènes et de modéliser la physiopathologie de différentes maladies génétiques.

Jusqu'à présent, les organoïdes pulmonaires n'avaient été utilisés que pour étudier les infections virales et non les infections bactériennes (Dutta and Clevers, 2017). Ainsi, lors de ma thèse, j'ai collaboré avec les Dr Céline Cougoule et Stephen Leon-Icaza afin de développer un modèle d'organoïde pulmonaire permettant i) de modéliser l'infection par la mycobactérie *M. abscessus* et ii) d'évaluer l'efficacité d'antibiotiques de première ligne contre ce microorganisme dans un environnement proche de l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose.

Deux modèles d'organoïdes pulmonaires ont été développés par l'équipe du Dr Etienne Meunier. Le premier type d'organoïde, appelé organoïde sain, dérive de tissus pulmonaires issus d'individus non affectés par la mucoviscidose et permet d'étudier les infections à *M. abscessus* mais également à *M. tuberculosis* (Iakobachvili *et al.*, 2022). Le second type d'organoïde, appelé organoïde CF (pour « Cystic Fibrosis »), dérive de cellules souches provenant du liquide broncho-alvéolaire de patients atteints de mucoviscidose. La caractérisation de leur organisation cellulaire et de leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que l'étude de la réponse inflammatoire induite par l'infection à *M. abscessus*, ont montré que l'organoïde CF récapitule certaines des caractéristiques de l'environnement pulmonaire des patients. On observe en particulier, une accumulation de mucus, une diminution des mouvements ciliaires ainsi qu'une augmentation de la production en H_2O_2 intracellulaire et cytokines inflammatoires liées au dysfonctionnement du canal CFTR (Leon-Icaza *et al.*, 2023).

Ma participation à cette collaboration visait plus particulièrement à caractériser la croissance de *M. abscessus* et sa réponse aux antibiotiques dans l'environnement organoïde. Nous souhaitions également voir si les morphotypes S et R présentaient des différences en termes d'organisation, de virulence et de réponse aux stress. Nos données montrent que *M. abscessus* se multiplie mieux dans l'organoïde CF que dans l'organoïde sain et que sa croissance en organoïdes CF est ralentie en présence d'antioxydants (resvératrol / sulforaphane). Ceci indique que l'environnement oxydant de l'organoïde CF favorise la croissance de la bactérie. Nous avons également observé que le morphotype R forme des structures en cordes, induit une mort cellulaire des cellules épithéliales et une production de ROS plus importante que le morphotype S au sein de

l'organoïde CF, confirmant son caractère plus virulent. De façon intéressante, le traitement d'organoïdes sains avec des inhibiteurs de la protéine CFTR permet d'augmenter le niveau de stress oxydatif et de retrouver un comportement du morphotype R identique à celui observé dans l'organoïde CF.

Nous souhaitions par ailleurs étudier la sensibilité de *M. abscessus* à différents antibiotiques utilisés en clinique et déterminer l'impact d'un traitement combiné avec un antioxydant sur la prolifération bactérienne au sein de l'organoïde CF. Nos données démontrent qu'un traitement combiné de céfoxitine/sulforaphane sur des organoïdes CF infectés par *M. abscessus* conduit à une élimination des bactéries plus rapide qu'un traitement avec la céfoxitine seule, suggérant que des antioxydants pourraient être utilisés comme adjuvants pour améliorer l'efficacité des traitements antibiotiques.

L'ensemble de ces données démontrent que les organoïdes dérivés de patients atteints de mucoviscidose constituent un modèle pertinent pour l'étude de l'infection par *M. abscessus* et le développement de stratégies thérapeutiques innovantes, sans impliquer le sacrifice d'animaux.

II. Résultats

Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications :

- **Mycobacteria–host interactions in human bronchiolar airway organoids**
  Nino Iakobachvili, Stephen Adonai Leon-Icaza, Kèvin Knoops, Norman Sachs, Serge Mazères, Roxane Simeone, Antonio Peixoto, Célia Bernard, Marlène Murris-Espin, Julien Mazières, Kaymeuang Cam, Christian Chalut, Christophe Guilhot, Carmen López-Iglesias, Raimond B. G. Ravelli, Olivier Neyrolles, Etienne Meunier, Geanncarlo Lugo-Villarino, Hans Clevers, Céline Cougoule, Peter J. Peters.

  Publiée dans le journal *Molecular Microbiology* (2022), doi : 10.1111/mmi.14824

- **Druggable redox pathways against *M. abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids**
  Stephen Adonai Leon-Icaza, Salimata Bagayoko, Romain Vergé, Nino Iakobachvili, Chloé Ferrand, Talip Aydogan, Célia Bernard, Angelique Sanchez Dafun, Marlène Murris-Espin, Julien Mazières, Pierre Jean Bordignon, Serge Mazères, Pascale Bernes-Lasserre, Victoria Ramé, Jean-Michel Lagarde, Julien Marcoux, Marie Pierre Bousquet, Christian Chalut, Christophe Guilhot, Hans Clevers, Peter Peters, Virginie Molle, Geanncarlo Lugo-Villarino, Kaymeuang Cam, Laurence Berry, Etienne Meunier, Céline Cougoule

  Publiée dans le journal *Plos Pathogen* (2023), doi : 10.1371/journal.ppat.1011559

Ces publications font l'objet d'un travail collaboratif entre plusieurs équipes de recherche. Dans ce contexte, ma participation a porté sur l'aspect microbiologique du projet. J'ai ainsi eu la charge de la préparation des bactéries de *M. abscessus* pour la procédure d'injection et ai participé à la mise en évidence de sa prolifération dans les deux types d'organoïdes, en présence et en absence d'antibiotiques.

Publication n°2: "Mycobacteria-host interactions in human bronchiolar airway organoids"

Les données supplémentaires peuvent être récupérées en ligne au lien suivant : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.14824

Check for updates

Received: 23 September 2021 | Accepted: 27 September 2021

DOI: 10.1111/mmi.14824

RESEARCH ARTICLE

WILEY

Mycobacteria–host interactions in human bronchiolar airway organoids

Nino Iakobachvili[1] | Stephen Adonai Leon-Icaza[2] | Kèvin Knoops[1] | Norman Sachs[3] | Serge Mazères[2] | Roxane Simeone[4] | Antonio Peixoto[2] | Célia Bernard[2] | Marlène Murris-Espin[5] | Julien Mazières[5] | Kaymeuang Cam[2] | Christian Chalut[2] | Christophe Guilhot[2] | Carmen López-Iglesias[1] | Raimond B. G. Ravelli[1] | Olivier Neyrolles[2,6,7] | Etienne Meunier[2] | Geanncarlo Lugo-Villarino[2,6,7] | Hans Clevers[3] | Céline Cougoule[2,6,7] | Peter J. Peters[1]

[1]M4i Nanoscopy Division, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands

[2]Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

[3]Oncode Institute, Hubrecht Institute, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences and University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

[4]Institut Pasteur, Unit for Integrated Mycobacterial Pathogenomics, CNRS UMR3525, Paris, France

[5]Service de Pneumologie, Hôpital Larrey, CHU de Toulouse, Toulouse, France

[6]International Associated Laboratory (LIA) CNRS "IM-TB/HIV" (1167), Toulouse, France

[7]International Associated Laboratory (LIA) CNRS "IM-TB/HIV" (1167), Buenos Aires, Argentina

Correspondence
Céline Cougoule, Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France.
Email: Celine.Cougoule@ipbs.fr
Peter J. Peters, M4i Nanoscopy Division, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands.
Email: pj.peters@maastrichtuniversity.nl

Funding information
FRM "Amorçage Jeunes Equipes", Grant/Award Number: AJE20151034460; ZonMw,

Abstract

Respiratory infections remain a major global health concern. Tuberculosis is one of the top 10 causes of death worldwide, while infections with Non-Tuberculous Mycobacteria are rising globally. Recent advances in human tissue modeling offer a unique opportunity to grow different human "organs" in vitro, including the human airway, that faithfully recapitulates lung architecture and function. Here, we have explored the potential of human airway organoids (AOs) as a novel system in which to assess the very early steps of mycobacterial infection. We reveal that *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and *Mycobacterium abscessus* (Mabs) mainly reside as extracellular bacteria and infect epithelial cells with very low efficiency. While the AO microenvironment was able to control, but not eliminate Mtb, Mabs thrives. We demonstrate that AOs responded to infection by modulating cytokine, antimicrobial peptide, and mucin gene expression. Given the importance of myeloid cells in mycobacterial infection, we co-cultured infected AOs with human monocyte-derived macrophages and found that these cells interact with the organoid epithelium. We conclude that adult stem cell (ASC)-derived AOs can be used to decipher very early events of mycobacteria infection in human settings thus offering new avenues for fundamental and therapeutic research.

KEYWORDS

airways, infection, mycobacteria, organoids, tuberculosis

Nino Iakobachvili and Stephen Adonai Leon-Icaza are shared the first autorship.

Céline Cougoule and Peter J. Peters are shared the last autorship.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2021 The Authors. *Molecular Microbiology* published by John Wiley & Sons Ltd.

Grant/Award Number: 3R's 114021005; Campus France PHC Van Gogh, Grant/Award Number: 40577ZE; Nuffic Van Gogh Programme, Grant/Award Number: VGP.17/10; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-15-CE15-0012; LINK program; H2020 European Research Council, Grant/Award Number: INFLAME 804249

1 | INTRODUCTION

Pulmonary diseases due to mycobacteria cause significant morbidity and mortality to human health. Although the global burden of tuberculosis (TB) has declined over the last decades, *Mycobacterium tuberculosis* is still one of the deadliest infectious agent worldwide with an estimated 10 million disease cases and 1.4 million deaths in 2019 (World Health Organization, 2020). By contrast, Nontuberculous Mycobacteria (NTM) infections are rising globally, especially in developed countries, causing opportunistic pulmonary infections affecting individuals who are immunocompromised and who have underlying health conditions (Ratnatunga et al., 2020; To et al., 2020). Among them, *Mycobacterium abscessus* is considered one of the most antibiotic-resistant mycobacteria and is associated with pulmonary disease such as cystic fibrosis (Johansen et al., 2020).

The lung is the main entry port for mycobacteria and the main site of disease. Bacteria-containing droplets or aerosols first navigate through the respiratory tract interacting with airway epithelium functions in order for mycobacteria to reach the alveolar space and thrive in alveolar macrophages (Corleis & Dorhoi, 2020; Leiva-Juárez et al., 2018; Torrelles & Schlesinger, 2017). However, how mycobacteria interact with the airway to establish a successful primary infection remains poorly understood. One of the challenges to address remains the complexity of host–pathogen interactions, particularly within human multicellular tissue.

Conventional 2D cell cultures of epithelial and immune cells, in vitro human-based 3D granuloma, and animal models have contributed to deciphering key host–pathogen mechanisms at play during mycobacterial infection (Bermudez et al., 2002; Bernut et al., 2014, 2015; Bielecka et al., 2017; Cohen et al., 2018; Elkington et al., 2019; Fonseca et al., 2017; Parasa et al., 2014; Puissegur et al., 2007; Rampacci et al., 2020; Silva-Miranda et al., 2015). More recently, in vitro lung models have been developed based on organ-on-chip and organoid technologies to mimic the structural and biological properties of the in vivo human lung environment to better replicate human disease and drug profiles (Cidem et al., 2020; Dutta & Clevers, 2017; Rossi et al., 2018). Lung-on-chip technology reconstructs the alveolar epithelium/endothelium interface and has deciphered the crucial role of surfactant in controlling Mtb replication (Thacker et al., 2020). We, and others, have applied organoid technology for respiratory infection modeling, including *Cryptosporidium* (Heo et al., 2018), RSV (Sachs et al., 2019), influenza viruses (Hui et al., 2018; Zhou et al., 2018), SARS-CoV-2 (Lamers et al., 2020, 2021), and *Pseudomonas aeruginosa* (Bagayoko et al., 2021) to decipher pathogen fitness, cell tropism, and host responses.

While the ongoing COVID-19 pandemic has very recently fueled the development of new human lung organoid models (Salahudeen et al., 2020; Youk et al., 2020), the first human lung organoid model described was derived from lung adult stem cells (ASC's) and composed of a polarized, pseudostratified airway epithelium containing basal, secretory, and multi-ciliated cells, thus reproducing the bronchiolar part of the airway (Sachs et al., 2019). AOs display functional mucus secretion and ciliate beating (Sachs et al., 2019), therefore, constituting a human 3D system in which to model host–mycobacteria interactions (Iakobachvili & Peters, 2017).

Here, we have set out to use AOs as a model in which to study mycobacteria interaction with airway epithelial cells. Our data demonstrate that mycobacteria can be readily found in the lumen of AOs with some internalization by airway epithelial cells. While Mtb growth was overall controlled, Mabs readily replicated in the lumen of AOs. In response to Mtb infection, we showed that AOs induced the secretion of cytokines and antimicrobial peptides. Interestingly, both Mabs and Mtb inhibited the expression of mucins which function in pathogen clearance. The option to model innate cell recruitment by co-culturing human macrophages with bacteria-injected AOs was demonstrated in this work.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

First of all, we evaluated the morphology and cell composition of AOs. As shown in Figure S1, AOs displayed a cystic structure (Figure S1a) and are composed of basal cells lined with ciliated and goblet cells on the lumen facing side (Figure S1b and Movie S1). AOs presented functional ciliate beating (Movies S2 and S3) and evident from the live-cell imaging is the functional mucociliary system where cilia beat secreted mucus and cell debris around the lumen (Movie S4).

Due to the innate cystic structure of AOs, where the pathogen-sensing apical side faces the lumen, DsRed-expressing H37Rv Mtb or dTomato-expressing Mabs were microinjected via a BSL-3- or a BSL-2-approved custom-made micro-injection system (Figure 1a). Mycobacteria could be found in the lumen of AOs and occasionally making contact with epithelial cells but without causing obvious alterations to organoid architecture and ultrastructure (Figures 1b,c, S2 and Movie S5–S7). We evaluated whether mycobacteria infection could trigger cell death and found neither Mtb nor Mabs infection

triggered additional cell death compared to uninfected AOs, which undergo regular cell turnover (Figure 1d).

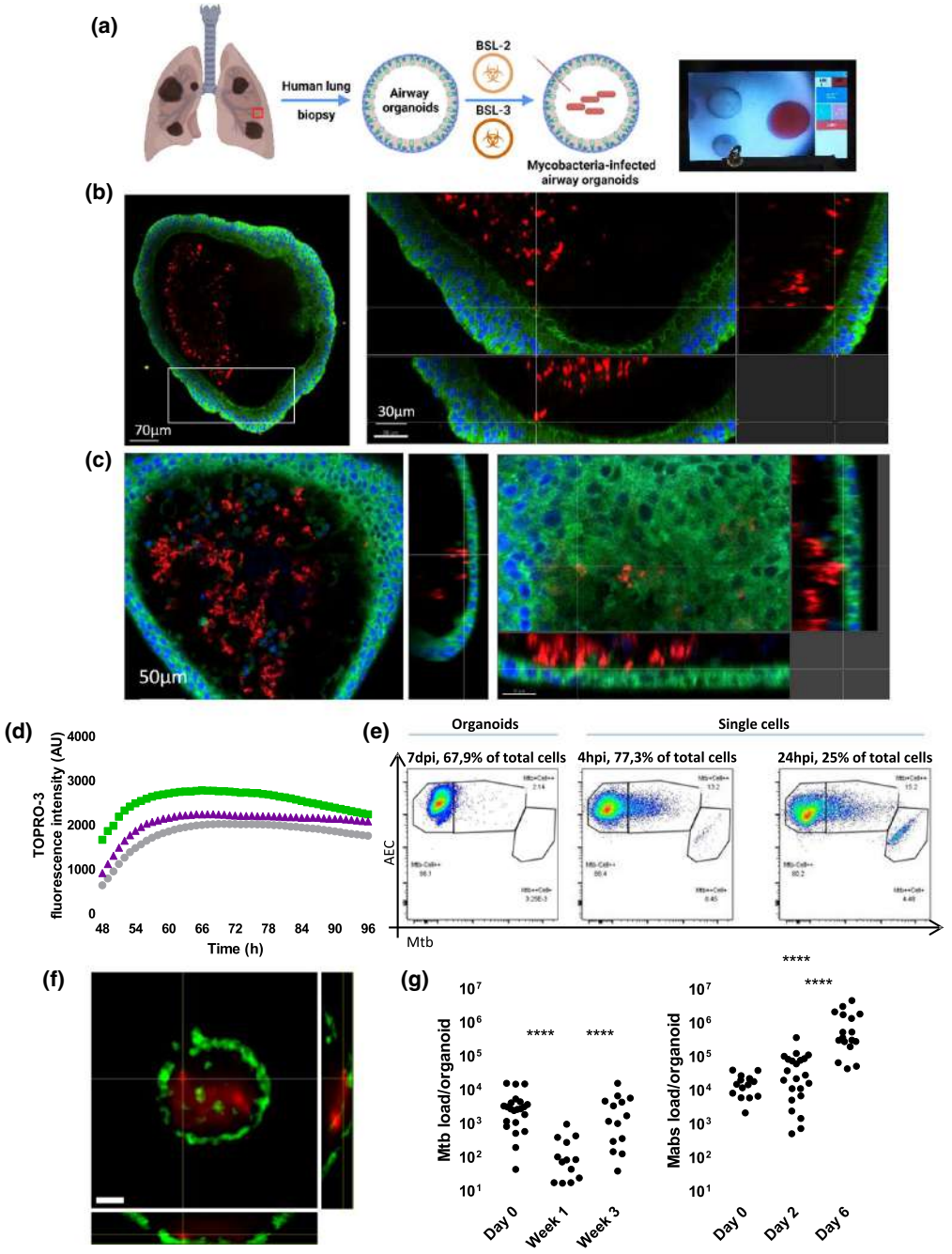
Mtb is known to infect bronchial epithelial cells in 2D conditions (Reuschl et al., 2017), and pneumocytes in vitro (Ryndak et al., 2015) and in vivo (Cohen et al., 2018), but with low efficiency. To determine whether Mtb could infect airway epithelial cells, Mtb-infected AOs were dissociated and analyzed by flow cytometry to quantify cells positive for Mtb in an unbiased manner. Only 2% of the cells composing the organoid were positive for Mtb (Figure 1e). As mucociliary movement could minimize bacteria interaction with epithelial cells, to favor optimal contact between epithelial cells and bacteria, AOs were dissociated, and single cells were infected with Mtb and analyzed by flow cytometry. Approximately 13% and 15% of epithelial cells were found associated with bacteria after 4 and 24 hr of infection, respectively (Figure 1e), confirming that Mtb has a low tropism for epithelial cells as already described with primary bronchial cells (Reuschl et al., 2017). To evaluate bacterial internalization by epithelial cells, double positive cells sorted after flow cytometry were imaged by confocal microscopy. As shown in Figure 1f, epithelial cells containing Mtb could be found, suggesting cell invasion by a yet unknown mechanism and confirming that the majority of mycobacteria are extracellular in the lumen of AOs. The functioning mucociliary system within AOs is likely responsible for preventing mycobacterial contact with, and internalization by, epithelial cells (Leiva-Juárez et al., 2018; Whitsett & Alenghat, 2015).

We next investigated mycobacterial survival in AOs. Bacteria-infected AOs were collected individually, lysed and analyzed for bacterial load by CFU assay. Mtb demonstrated a bi-phasic curve, with a significant decrease of bacterial load after 7 days followed by an increase at 21 days post-infection back to the initial load, without affecting AO viability (Figure 1d). This suggests an early stage of Mtb control by the AO microenvironment followed by bacterial adaptation and proliferation, with cell debris present in the lumen which could foster bacterial replication, as already shown in macrophages (Mahamed et al., 2017). By contrast, Mabs growth displayed a 2-day lag phase followed by significant bacterial replication and an increase in bacterial burden over 6 days (Figure 1g). These results also confirm that the airway constitutes a hospitable microenvironment for Mabs to thrive, compared to Mtb that establishes its replicative niche in alveolar macrophages (Corleis & Dorhoi, 2020; Johansen et al., 2020).

Next, we determined whether AOs mounted an inflammatory/antimicrobial response to mycobacteria infection. Mtb- or Mabs-infected AOs were collected and subjected to RT-qPCR analysis to evaluate cytokine, antimicrobial peptide, and mucin gene expression (Figure 2a). Mtb induced significant gene expression of IL-8 (Figure 2b), a immune cell chemoattractant (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992), while IL-8 secretion did not reach significance (Figure 2c). Non-significant expression of IP-10, GM-CSF, and CCL5, cytokines mediating the accumulation of neutrophils and macrophages for optimal granuloma formation and control of Mtb (Domingo-Gonzalez et al., 2016) was observed. The antimicrobial peptides β-defensin-1 and 2, lactoferrin, hepcidin, and RNAse7 were enhanced upon Mtb infection, being significant for only β-defensin-1 (Figure 2b). β-Defensin-1 and RNAse7 may participate in Mtb restriction during early infection, promoting pore formation on the bacteria cell membrane (Arranz-Trullén et al., 2017; Torres-Juarez et al., 2018), while β-defensin-2 improves the chemoattraction of macrophages (Rivas-Santiago et al., 2005; Semple & Dorin, 2012). Interestingly, β-defensin-3 and 4, which are related to long-term control of mycobacterial infection (Dong et al., 2016) were downregulated. The upregulation of Hepcidin and Lactoferrin could contribute to decrease the transmembrane transport of iron (Sow et al., 2007, 2009) and modulate its extracellular pool by hijacking it (Schaible et al., 2002), making the airway microenvironment more hostile for Mtb survival (Boelaert et al., 2007).

By contrast, Mabs infection did not enhance the expression of cytokines and antimicrobial peptides (Figure 2a). This could be due to the presence of glycopeptidolipids on the surface of its cell wall (Johansen et al., 2020), which mask other lipids and prevent the interaction of Mabs with pattern recognition receptors expressed by host cells (Rhoades et al., 2009), resulting in overall low responsiveness of lung epithelial cells to bacterial challenge (Matsuyama et al., 2018). Surprisingly, both Mabs and Mtb significantly downregulated the expression of mucins, including MUC5B and MUC4 (Figure 2b). Mucin expression and secretion are normally enhanced in response to inflammatory challenge and form part of an efficient clearance system for pathogen removal from the airway (Leiva-Juárez et al., 2018; Ridley & Thornton, 2018; Whitsett & Alenghat, 2015). Our data also showed that mycobacterial infection is associated with downregulation of NFkB-regulated genes such as IL-1b and IL-6 (Figure 2a), which could participate in mucin expression impairment as IL-1b is a powerful inducer of mucin expression in the airway (Chen

FIGURE 1 Human airway organoids (AOs) infected with Mtb and Mabs. (a) Experimental scheme and bright-field image of the microinjection procedure. Created with Biorender.com. (b) Confocal microscopy of DsRed-expressing H37Rv inside AOs, 4 days post-infection. Nuclei are labeled with DAPI (blue); cellular membranes with CellMask green (green). (c) Confocal microscopy of dTomato-expressing Mabs inside AOs, 4 days post-infection. Nuclei are labeled with DAPI (blue); cellular membranes with CellMask green (green). (d) AOs were injected with PBS (grey), H37Rv Mtb (green), or *Mycobacterium abscessus* (purple), stained with ToPRO3 and imaged hourly for four consecutive days after embedding in matrigel. Fluorescence intensity from ToPRO3 incorporation, and therefore epithelial cell death, was quantified using Fiji and plotted for each condition. The experiment was performed three times independently. (e) Representative flow cytometry dot plots of cells associated with H37Rv after 4 (left) or 24 hr (middle) incubation with AOs-derived single cells or 7 days incubation in whole organoids (right). (f) Representative image of a sorted epithelial cell with intracellular DsRed-expressing Mtb, scale bars = 5 μm. (g) Colony-forming unit (CFU) counts from individual organoids on the day of microinjection (day 0), 7 and 21 days post-infection. Each dot represents one organoid. Lines indicate median CFU counts. The experiment was performed at least three times independently. $^{***}p < .001$ by a two-tailed Mann-Whitney test



et al., 2019). Pathogens such as *Helicobacter pylori* have been shown to downregulate the expression of mucin genes to promote stomach tissue colonization (Cooke et al., 2009). How downregulation of mucin expression by mycobacteria might interfere with mucociliary function and infection outcome remains to be elucidated.

Upon Mtb infection, macrophages mount an inflammatory response that modulates the lung microenvironment (Fonseca et al., 2017; Lastrucci et al., 2015). AOs were stimulated with the supernatant of Mtb-infected human macrophages (cmMTB) and analyzed for gene expression compared to stimulation with the supernatant of non-infected macrophages (cmCTR). As shown in Figure 2d, the expression of IL-8 and GM-CSF, major cytokines for macrophage control of Mtb infection, were significantly enhanced in cmMTB-stimulated AOs compared to those treated with cmCTR which

mimics the paracrine macrophage-epithelial signaling naturally occurring during lung Mtb infection (Reuschl et al., 2017).

Finally, due to the essentiality of macrophages in TB disease (Cadena et al., 2016; Corleis & Dorhoi, 2020), we co-cultured human monocyte-derived macrophages, alongside mycobacteria-injected organoids, and observed hourly by confocal microscopy over the course of 4 days. Due to the complex nature of this experiment, it was optimized and set up under BSL-2 conditions using *Mycobacterium bovis* BCG. Human macrophages were found to migrate within the collagen matrix and in some instances, moved towards organoids containing mycobacteria (Movie S8). While we found no evidence of macrophages being able to traverse the basal side and enter the organoid lumen to clear mycobacteria, we did observe macrophages migrating to and interacting with the basal edge of the AO, capturing and ingesting bacteria (Movie S8). This resembles the natural process of peri-bronchiolar macrophage migration to the site of infection and phagocytosis of pathogenic material (Cambier et al., 2014).

Using AOs as a human 3D system to study the early steps of mycobacterial infection, we have shown that Mtb remains viable for up to 21 days within the lumen of AOs, while Mabs actively replicated over 7 days (Figure 1g). During this timeframe, while AO integrity remained uncompromised (Figures 1b,c, S2 and Movies S5 and S6), molecular interactions began as early as 48 hr after injection with the modulation of cytokines and antimicrobial peptides, and the inhibition of mucin expression (Figure 2b–d). Within 72 hr, innate immune cells can be recruited to the surface of infected AOs (Movie S8). Together, these data indicate that AOs offer a valuable 3D system to assess early interactions of mycobacteria with the human airway.

The ability to model these early timeframes in a responsive, multicellular and functionally similar system to the human airway, but without the complications, monetary and ethical restrictions of animal research, constitutes a major advance for the field. Organoid technology provides a complementary strategy to model in vitro human tissues, and infection by human-related pathogens. Organoids based on lung ASC's are advantageous as they generate AOs via a one-step proliferation and differentiation protocol and naturally self-organize in 3D to recapitulate the complexity of the lung epithelium. The resulting epithelium comprises all the different cell types and related secreted products (mucus, surfactant proteins), thus providing a reductionist system to assess host–pathogen interactions at the tissue level. Due to the self-renewal of ASC's, one of the most important advantages of organoids is that they are a genetically stable during long-term culture, allowing for their cryopreservation in biobanks.

One of the main limitations of the organoid system comes from the absence of air-liquid-mucosa interface due to their closed, cystic structure. Very recent advances in bioprinting and microfluidic approaches allowed intestinal organoid-based tissue engineering to create tube-shaped epithelia and a continuous lumen (Nikolaev et al., 2020), with the potential of extending such an approach to airway models. Lung-on-a-chip technology also constitutes an alternative approach to reproduce the air-liquid-mucosa interface and model mycobacterial infection (Huh et al., 2013; Thacker et al., 2020). However, lung-on-chips are generally developed using induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) or epithelial cell lines, require complex expertise in both iPSC cultures based on long stepwise differentiation protocols, and in nano-micro fabrication for chip devices. Therefore, organoids and on-chip organs are complementary approaches that provide alternatives to animal experimentation thus complying with the "3R's"—Replacement, Reduction, Refinement—which call for in vitro or a alternatives to model functional organs and pathologies (Gkatzis et al., 2018).

As mycobacteria, especially Mtb, establish their replicative niche in the alveolar part of the lung, another limitation comes from the absence of pneumocytes in the AO model. Recent advances in modeling the human alveolar part of the human lung as organoids (Salahudeen et al., 2020; Youk et al., 2020) will allow further modeling of the mycobacterial replicative niche. Finally, the ability to introduce human macrophages allows functional modeling of a key cell type and its cellular network, overcoming another limitation of organoid systems. Extension of the BALO technology, combining connected airway with alveoli and engraftment of macrophages (Vazquez-Armendariz et al., 2020), to human stem cells could open new venues for mycobacterial infection modeling. We believe that this work forms a starting point for modeling a wide range of human respiratory pathogens using lung organoids, as exemplified with SARS-CoV-2, (Lamers et al., 2020, 2021; Salahudeen et al., 2020; Si et al., 2021; Thacker et al., 2021), but also respiratory infections driven by host disorders such as cystic fibrosis.

3 | METHODS

3.1 | Ethic statements

The collection of patient data and tissue for AO generation was performed according to the guidelines of the European Network of Research Ethics Committees following European and national law. In the Netherlands and France, the responsible accredited ethical committees reviewed and approved this study in accordance with the Medical Research Involving Human Subjects Act. Human lung tissue was provided by the Primary Lung Culture Facility (PLUC) at MUMC+, Maastricht, The Netherlands. Collection, storage, use of tissue and patient data were performed in agreement with the "Code for Proper Secondary Use of Human Tissue in the Netherlands" (http://www.fmwv.nl). The scientific board of the Maastricht Pathology Tissue Collection approved the use of materials for this study under MPTC2010-019 and formal permission was obtained from the local Medical Ethical Committee (code 2017-087). The CHU of Toulouse and CNRS approved protocol CHU 19 244 C and Ref CNRS 205782. All patients participating in this study consented to scientific use of their material; patients can withdraw their consent at any time, leading to the prompt disposal of their tissue and any derived material.

Human buffy coats were obtained from volunteers with informed consent via Sanquin (NVT0355.01) or établissement français du sang (Agreement 21PLER2017-0035AV02).

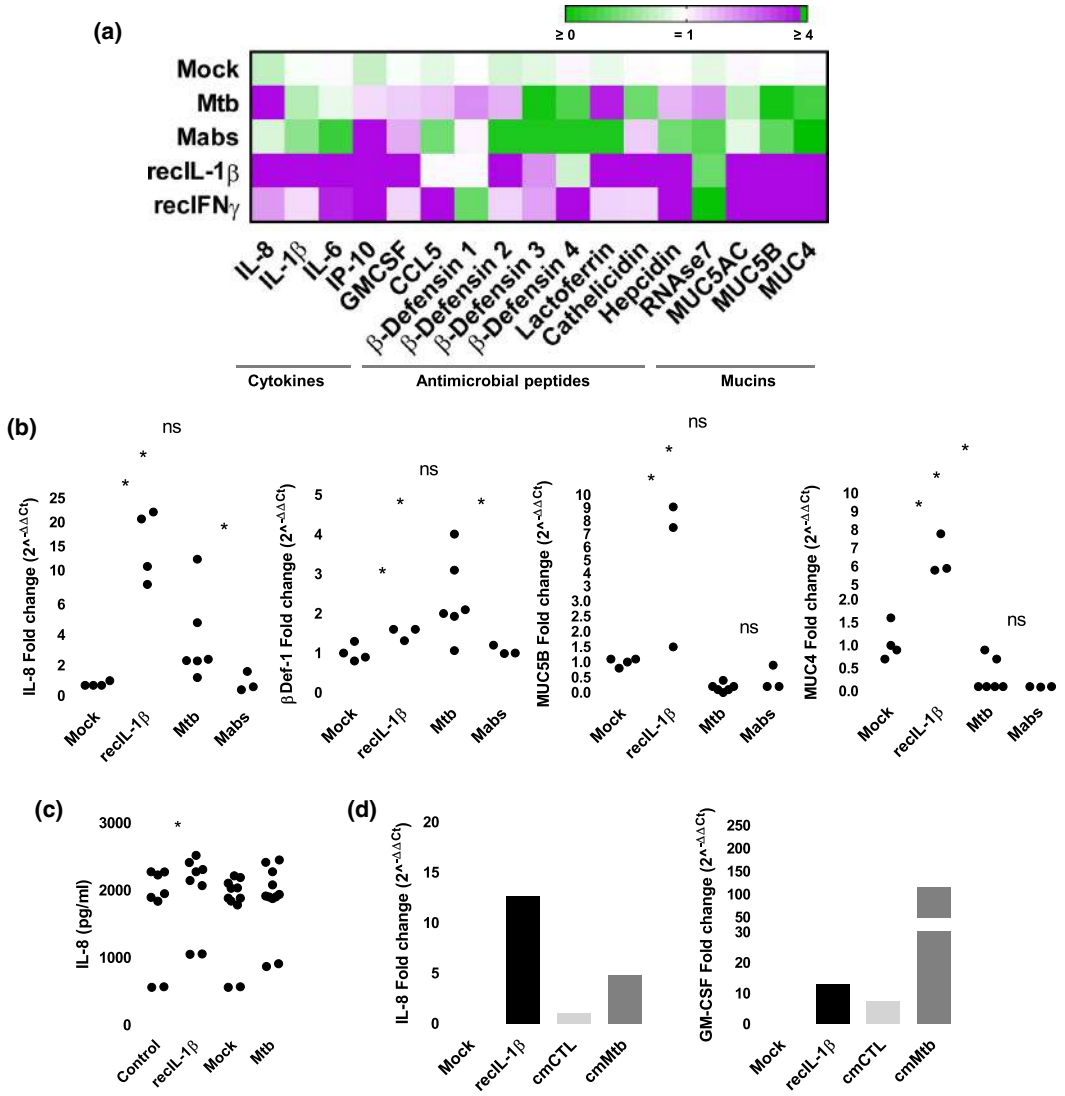


FIGURE 2 Mycobacteria-induced host responses in AOs. (a) Heat map displaying modulation of cytokines, antimicrobial peptides, and mucins in AOs in response to Mtb H37Rv or Mabs injection compared to mock-injected organoids. As positive controls, AOs were treated with recombinant IL-1β and IFNβ. The experiment was performed four times independently. (b) Statistically significant expression changes of IL-8, β-defensin-1, MUC5B, and MUC4 as determined by RT-qPCR at 48 hr post-infection. *$p < .05$ by a two-tailed Mann-Whitney test. (c) ELISA quantification of IL-8 secretion by H37Rv-infected AOs at 48 hr post-infection. IL-8 secretion in H37Rv-infected AOs was almost significantly ($p = .053$ by two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed-rank test), recIL-1β-treated AOs (recIL-1β) was used as positive control. The experiment was performed three times independently. (d) Expression changes of IL-8 and GM-CSF as determined by RT-qPCR at 72 hr after conditioning with cmCTR and cmMTB, defined as conditioned media from non-infected and Mtb-infected macrophages, respectively. The experiments were performed two times independently with pooled conditioned medium from three independent donors

3.2 | Organoid culture

Healthy tissue from five independent donors receiving surgical treatment for lung cancer were used to derive organoids. AOs were characterized as described (Sachs et al., 2019).

3.3 | Bacterial culture and microinjection

DsRed-WT H37Rv Mtb strains were obtained by complementation with the pMRF plasmid containing a DsRed cassette, and were cultured in the continuous presence of 20 μg/ml of the selective

antibiotic hygromycin under BSL-3 conditions (Simeone et al., 2015). Mtb strains (BSL-3) and GFP expressing *M. bovis* BCG (BSL-2) were grown under the selection of 20 μg/ml Kanamycin in BSL-2 conditions. *M. abscessus sensu stricto* (Mabs) strain CIP104536T (ATCC19977T) morphotype Smooth (S) carrying pASTA3 plasmid (Addgene, plasmid 24,657) that express red fluorescent protein (tdTomato), was cultured in presence of 500 μg/ml of the antibiotic hygromycin B as previously described (Bernut et al., 2014). All the bacterias were prepared for microinjection as described (Lastrucci et al., 2015). Bacterial density was adjusted to OD_{600} = 1, and phenol red was added at 0.005% to visualize successful microinjection (Bartfeld & Clevers, 2015). Pulled borosilicate capillaries (1.2 mm diameter, Harvard Apparatus Ltd.) were backfilled with the bacterial suspension using Microloader Tips (Eppendorf) and the tapered end broken off using tweezers until the smallest size droplet could be injected using a Femtojet microinjector (Eppendorf). We determined the CFU of these droplets that were destined for organoids by injecting them into 100 μl media and plating directly onto agar for enumeration. This was a reproducible way to quantify the initial bacterial load at the start of our experiments. An in-house custom-made Raspberry Pi-controlled digital camera was used to observe organoids and the capillary. The capillary was attached to a TransferMan micro-manipulator (Eppendorf) to facilitate semi-automated injection. Injected organoids were allowed to recover for 2 hr at 37°C, individually collected, washed to remove extracellular bacteria and re-seeded into fresh matrix for subsequent analysis.

3.4 | Microscopy

For time-lapse imaging, injected organoids were seeded in IBIDI 4 well chambers (IBIDI) and stained with CellMask™ Green Plasma Membrane Stain (1/1000, Molecular Probes) for 30 min at 37°C. Organoids were washed and fresh medium containing TOPRO-3 Iodide (1/1000, Molecular Probes) was added. Organoids were imaged using a FEI CorrSight at Maastricht University (BSL-2) or Andor/Olympus Spinning Disk Confocal CSU-X1 (10× Air 0,4 NA, 3,1 mm WD) at IPBS (BSL-3). Z-stacks were acquired every hour for the duration of experiments and data analyzed using Fiji/Image J and IMARIS. The fluorescent labels used in this work are summarized in Table 2.

For transmission electron microscopy (TEM), injected AOs were fixed in 4% PFA for a minimum of 3 hr at RT prior to removal from the containment lab and embedding in epon blocks as described in (Bartfeld & Clevers, 2015; Lamers et al., 2020). TEM data was collected autonomously as virtual nanoscopy slides on a 120 kV FEI Tecnai Spirit T12 Electron Microscope equipped with an Eagle CCD camera.

3.5 | Colony-forming unit (CFU) assay

Four to six Mtb or Mabs-injected organoids were collected manually using a 200 μl pipette, washed in PBS, seeded into 24-well plates, and cultured in complete AO medium for 2–21 days. At the relevant timepoint, organoids were lysed in 100 μl of 10% Triton X100 in water, serial dilutions were plated on 7H11 agar plates for Mtb or LB agar plates for Mabs and cultured for 3 weeks or 6 days respectively at 37°C.

TABLE 1 List of primers used for RT-qPCR experiments on airway organoids

Gene	Primers 5′–3′	Reference
Cytokines and chemokines		
CCL5 (NM_002985)	F- CCTCATTGCTACTGCCCTCT	In-house
	R- CGGGTGACAAAGACGACTGC	
GM-CSF (NM_000758)	F- CCTGAACCTGAGTAGAGACACT	In-house
	R- CCTTGAGCTTGGTGAGGCTG	
IL-1β (NM_000576)	F- AGCTACGAATCTCCGACCAC	In-house
	R- GGGAAAGAAGGTGCTCAGGTC	
IL-6 (NM_000600.5)	F: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	PrimerBank
	R: CCATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG	
IL-8 (NM_000584)	F- TACTCCAAACCTTTCCACCCC	In-house
	R- CTTCTCCACAACCCTCTGCA	
IP-10 (NM_001565)	F- GTGGCATTCAAGGAGTACCTC	In-house
	R- GATTCAGACATCTCTTCTCACCC	
Antimicrobial peptides		
β-Defensin 1 (NM_005218)	F- ATGGCCTCAGGTGGTAACTTTC	In-house
	R- GGTCACTCCCAGCTCACTTG	
β-Defensin 2 (NM_004942)	F-ATAGGCGATCCTGTTACCTGC	In-house
	R-CCTCCTCATGGCTTTTTGCAG	
β-Defensin 3 (NM_018661)	F- TGGGGTGAAGCCTAGCAG	In-house
	R- ACTTGCCGATCTGTTCCTCC	
β-Defensin 4		
(NM_080389.3)	F: TGCCGGAAGAAATGTCGCA	In-house
	R: CGACTCTAGGGACCAGCAC	
Cathelicidin LL37 (NM_004345)	F- ATGCTAACCTCTACCGCCTCC	In-house
	R- TCACCAGCCCGTCCTTCTTG	
Hepcidin (NM_021175)	F- GTTTTCCCACAACAGACGGG	In-house
	R- AGATGGGGAAGTGGGTGTC	
Lactoferrin (NM_002343)	F- CCCCTACAAACTGCGACCTG	In-house
	R- CAGACCTTGCAGTTCGTTCAG	
RNAse 7 (NM_032572)	F- GGAGTCACAGCACGAAGACCA	In-house
	R- GGCTTGGCACTGACTGGGATC	
Mucins		
MUC4 (NM_018406.7)	F: CTCAGTACCGCTCCAGCAG	In-house
	R: CCGCCGTCTTCATGGTCAG	
MUC5AC (NM_001304359.2)	F: CCAGTCCTGCCTTTGTACGG	In-house
	R: GACCCTCCTCTCAATGGTGC	
MUC5B (NM_002458.3)	F: GCCCACATCTCCACCTATGAT	PrimerBank
	R: GCAGTTCTCGTTGTCCGTCA	
Housekeeping		
GAPDH (NM_002046)	F-CTCCAAAATCAAGTGGGGCGATG	In-house
	R-GGCATTGCTGATGATCTTGAGGC	

TABLE 2 Summary of fluorescent markers used for flow cytometry and microscopy

Dye	Concentration/ Dilution	Marker of	Flow cytometry or microscopy
DAPI	1 μg/ml	Nuclei	Microscopy
CellMask deep red	1/30000	Cell membranes	Microscopy and Flow Cytometry
CellMask Green	1/1000	Cell membranes	Microscopy
TOPRO-3 iodide	1/1000	Dead cells	Microscopy
CellTracker CMAC blue	20 μM	Cell cytosol	Microscopy

3.6 | RT-qPCR

Uninfected control and Mtb- or Mabs-infected AOs (15 per condition) were collected at 48 hr post-infection, lysed in 1 ml of TRIzol Reagent (Invitrogen) and stored at −80°C for 2 days. As positive controls, AOs were stimulated with 0.02 μg/ml of human IL-1β (Invivogen) or 0.1 μg/ml of IFNγ (PeproTech) for 48 hr. Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) and retrotranscribed (150 ng) using the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). mRNA expression was assessed with an ABI 7,500 real-time PCR system (Applied Biosystems) and the SYBRTM Select Master Mix (ThermoScientific). Relative quantification was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and normalized to GAPDH. Primer sequences are provided in Table 1.

3.7 | Enzyme-linked immunosorbent assay

Between 20 and 30 organoids were embedded in fresh BME Cultrex and cultured with 800 μl complete media. After 48 hr, the supernatant was collected, sterilized through double 0.22 μm filters and stored at −80°C until analysis. IL-8 ELISA was performed according to manufacturer instructions (Qiagen).

3.8 | Flow cytometry and cell sorting

Organoids were washed out of Matrigel and dissociated into single cells using TrypLE for 5 min at 37°C. A minimum of 5×10^5 cells/ml were incubated with dsRED expressing Mtb at an MOI of 10 in complete organoid media. After 4 or 24 hr for single cells, or 7 days for whole intact organoids, samples were washed with PBS, stained with CellMask Deep Red (1:30.000) to highlight all cells composing the organoid and fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. Cells were pelleted and resuspended in PBS supplemented with 2% FCS. Samples were filtered just before analysis and sorted using a BD FACS ARIA Fusion. Cells were selected on their FSC-A/SSC-A profile, doublets were excluded on FSC-W/FSC-H and SSC-W/SSC-H parameters. Finally, double positive cells were gated based on Cell Mask Deep Red staining and DsRED-expressing Mtb. The population of cells from P5 (positive for GFP/bacteria and APC/ organoid cells) was pooled and imaged by confocal microscopy to determine if bacteria was intracellular. The fluorescent dyes used are summarized in Table 2.

3.9 | CmMTB preparation and macrophage co-cultures

Peripheral blood mononuclear cells were enriched from buffy coat using RosetteSep human monocyte enrichment cocktail according to the manufacturer's instructions (Stem Cell Technologies). Monocytes were purified by density gradient centrifugation using Lymphoprep (Stem Cell Technologies) according to the manufacturer's protocol. Monocytes were differentiated into macrophages by addition of 5 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (Sigma Aldrich) for 6 days. cmCTR and cmMTB were prepared and used as previously described (Lastrucci et al., 2015). Organoids were stained with CellMask Deep Red plasma membrane dye as previously described, and macrophages stained with 20 μM CellTracker Blue CMAC dye (ThermoFisher Scientific) for 1 hr in serum-free media. Microinjected organoids and macrophages were resuspended in freshly prepared Rat Tail Collagen type 1 (Thermofisher, 1 mg/ml) and polymerized in a 4-well, glass-bottom μ-slide (Ibidi) at 37°C for 30 min and imaged for 96 hr under a FEI CorrSight microscope.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge C. Kuo (Stanford University, USA) for the stable expressing Rspo1-Fc cell line, and the Hubrecht Institute for the stable expressing Noggin cell line; Genotoul TRI-IPBS core facility for flow cytometry and imaging, in particular E. Näser and E. Vega; IPBS BSL-3 facilities, in particular C. Verollet for technical support. Authors also acknowledge the Microscopy CORE lab and PLUC facility at Maastricht University. This work was supported by grants from Campus France PHC Van Gogh (40577ZE to GL-V), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE15-0012 (MMI-TB)) to GL-V, FRM "Amorçage Jeunes Equipes" (AJE20151034460 to EM), ERC StG 693 (INFLAME 804249 to EM), ATIP to EM, ZonMW 3R's (114021005) to PJP, the Nuffic Van Gogh Programme (VGP.17/10 to NI), and by the LINK program from the Province of Limburg, the Netherlands.

CONFLICT OF INTEREST

Hans Clevers and Norman Sachs are inventors on patents related to organoid technology. Other authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NI, CC, and PJP designed the experiments with the help of CLI, ON, EM, and GLV. NI, SALI, and CC performed the experiments with the contribution of KK, RBGR, SM, AP, CCh, KC, and CG. SR generated

the fluorescent Mtb strains. MME and JM provided the lung biopsies. HC and NS developed the lung organoid technology. NI, CC, SALI, and PJP wrote the manuscript.

ORCID

Nino Iakobachvili https://orcid.org/0000-0003-0797-2665
Stephen Adonai Leon-Icaza https://orcid.org/0000-0002-7546-8228
Kèvin Knoops https://orcid.org/0000-0002-7539-1160
Norman Sachs https://orcid.org/0000-0002-5467-7151
Serge Mazères https://orcid.org/0000-0002-0263-634X
Roxane Simeone https://orcid.org/0000-0002-7082-7842
Antonio Peixoto https://orcid.org/0000-0001-9493-1954
Julien Mazières https://orcid.org/0000-0002-5921-7613
Christian Chalut https://orcid.org/0000-0002-4849-1369
Raimond B. G. Ravelli https://orcid.org/0000-0001-6056-5888
Olivier Neyrolles https://orcid.org/0000-0003-0047-5885
Geanncarlo Lugo-Villarino https://orcid.org/0000-0003-4620-8491
Hans Clevers https://orcid.org/0000-0002-3077-5582
Céline Cougoule https://orcid.org/0000-0002-6795-5448
Peter J. Peters https://orcid.org/0000-0002-2964-5684

REFERENCES

Arranz-Trullén, J., Lu, L., Pulido, D., Bhakta, S. & Boix, E. (2017) Host antimicrobial peptides: the promise of new treatment strategies against tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1.

Bagayoko, S., Leon-Icaza, S.A., Pinilla, M., Hessel, A., Santoni, K., Péricat, D. et al. (2021, February 17) Host phospholipid peroxidation fuels ExoU-dependent cell necrosis and supports *Pseudomonas aeruginosa*-driven pathology. *bioRxiv*, *17*(9), e1009927. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009927

Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I. (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, *307*, 97–101.

Bartfeld, S. & Clevers, H. (2015) Organoids as model for infectious diseases: Culture of human and murine stomach organoids and microinjection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*, 53359.

Bermudez, L.E., Sangari, F.J., Kolonoski, P., Petrofsky, M. & Goodman, J. (2002) The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity*, *70*, 140.

Bernut, A., Dupont, C., Sahuquet, A., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G. & Kremer, L. (2015) Deciphering and imaging pathogenesis and cording of *Mycobacterium abscessus* in zebrafish embryos. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*, 53130.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*, E943–E952.

Bielecka, M.K., Tezera, L.B., Zmijan, R., Drobniewski, F., Zhang, X., Jayasinghe, S. et al. (2017) A Bioengineered three-dimensional cell culture platform integrated with microfluidics to address antimicrobial resistance in tuberculosis. *mBio*, *8*(1), e02073-16. https://doi.org/10.1128/mBio.02073-16

Boelaert, J.R., Vandecasteele, S.J., Appelberg, R. & Gordeuk, V.R. (2007) The effect of the host's iron status on tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, *195*, 1745–1753.

Cadena, A.M., Flynn, J.L. & Fortune, S.M. (2016) The importance of first impressions: Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection influence outcome. *mbio*, *7*(2), e00342-16. https://doi.org/10.1128/mBio.00342-16

Cambier, C.J., Takaki, K.K., Larson, R.P., Hernandez, R.E., Tobin, D.M., Urdahl, K.B. et al. (2014) Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*, *505*, 218–222.

Chen, G., Sun, L., Kato, T., Okuda, K., Martino, M.B., Abzhanova, A. et al. (2019) IL-1β dominates the promucin secretory cytokine profile in cystic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, *129*, 4433.

Cidem, A., Bradbury, P., Traini, D. & Ong, H.X. (2020) Modifying and integrating in vitro and ex vivo respiratory models for inhalation drug screening. *Front Bioeng Biotechnol*, *8*, 581995.

Cohen, S.B., Gern, B.H., Delahaye, J.L., Adams, K.N., Plumlee, C.R., Winkler, J. et al. (2018) Alveolar macrophages provide an early *Mycobacterium tuberculosis* niche and initiate dissemination. *Cell Host & Microbe*, *24*, 439.

Cooke, C.L., An, H.J., Kim, J., Canfield, D.R., Torres, J., Lebrilla, C.B. et al. (2009) Modification of gastric mucin oligosaccharide expression in rhesus macaques after infection with *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, *137*, 1061–1071.e8.

Corleis, B. & Dorhoi, A. (2020) Early dynamics of innate immunity during pulmonary tuberculosis. *Immunology Letters*, *221*, 56–60.

Domingo-Gonzalez, R., Prince, O., Cooper, A. & Khader, S.A. (2016) Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiology Spectrum*, *4*(5). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018-2016

Dong, H., Lv, Y., Zhao, D., Barrow, P. & Zhou, X. (2016) Defensins: the case for their use against mycobacterial infections. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 7515687. https://doi.org/10.1155/2016/7515687

Dutta, D. & Clevers, H. (2017) Organoid culture systems to study host–pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology*, *48*, 15.

Elkington, P., Lerm, M., Kapoor, N., Mahon, R., Pienaar, E., Huh, D. et al. (2019) In vitro granuloma models of tuberculosis: potential and challenges. *Journal of Infectious Diseases*, *219*, 1858.

Fonseca, K.L., Rodrigues, P.N.S., Olsson, I.A.S. & Saraiva, M. (2017) Experimental study of tuberculosis: from animal models to complex cell systems and organoids. *PLoS Pathogens*, *13*(8), e1006421. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006421

Gkatzis, K., Taghizadeh, S., Huh, D., Stainier, D.Y.R. & Bellusci, S. (2018) Use of three-dimensional organoids and lung-on-a-chip methods to study lung development, regeneration and disease. *European Respiratory Journal*, *52*, 1800876.

Heo, I., Dutta, D., Schaefer, D.A., Iakobachvili, N., Artegiani, B., Sachs, N. et al. (2018) Modeling cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. *Nature Microbiology*, *3*, 814.

Huh, D., Kim, H.J., Fraser, J.P., Shea, D.E., Khan, M., Bahinski, A. et al. (2013) Microfabrication of human organs-on-chips. *Nature Protocols*, *811*(8), 2135–2157.

Hui, K.P.Y., Ching, R.H.H., Chan, S.K.H., Nicholls, J.M., Sachs, N., Clevers, H. et al. (2018) Tropism, replication competence, and innate immune responses of influenza virus: an analysis of human airway organoids and ex-vivo bronchus cultures. *The Lancet Respiratory Medicine*, *6*, 846–854.

Iakobachvili, N. & Peters, P.J. (2017) Humans in a dish: the potential of organoids in modeling immunity and infectious diseases. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2402.

Johansen, M.D., Herrmann, J.-L. & Kremer, L. (2020) (2020) Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology*, *187*(18), 392–407.

Lamers, M.M., Beumer, J., van der Vaart, J., Knoops, K., Puschhof, J., Breugem, T.I. et al. (2020) SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science (80-)*, *369*, 50–54.

Lamers, M.M., van der Vaart, J., Knoops, K., Riesebosch, S., Breugem, T.I., Mykytyn, A.Z. et al. (2021) An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar type II-like cells. *EMBO Journal*, *40*(5), e105912. https://doi.org/10.15252/embj.2020105912

Lastrucci, C., Bénard, A., Balboa, L., Pingris, K., Souriant, S., Poincloux, R. et al. (2015) Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory $CD16^{+}$ monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell Research*, *25*, 1333.

Leiva-Juárez, M.M., Kolls, J.K. & Evans, S.E. (2018) Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunology*, *11*, 21.

Mahamed, D., Boulle, M., Ganga, Y., Arthur, C.M., Skroch, S., Oom, L. et al. (2017) Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife*, *6*, e22028. https://doi.org/10.7554/eLife.22028

Matsuyama, M., Martins, A.J., Shallom, S., Kamenyeva, O., Kashyap, A., Sampaio, E.P. et al. (2018) Transcriptional response of respiratory epithelium to nontuberculous mycobacteria. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *58*, 241.

Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y. et al. (2020) (2020) Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*, *585*(7826), 574–578.

Parasa, V.R., Rahman, M.J., Hoang, A.T.N., Svensson, M., Brighenti, S. & Lerm, M. (2014) Modeling *Mycobacterium tuberculosis* early granuloma formation in experimental human lung tissue. *Disease Models & Mechanisms*, *7*, 281.

Puissegur, M.-P., Lay, G., Gilleron, M., Botella, L., Nigou, J., Marrakchi, H. et al. (2007) Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and β1 integrin-mediated pathway. *The Journal of Immunology*, *178*, 3161–3169.

Rampacci, E., Stefanetti, V., Passamonti, F. & Henao-Tamayo, M. (2020) Preclinical models of nontuberculous mycobacteria infection for early drug discovery and vaccine research. *Pathogens*, *9*, 1–24.

Ratnatunga, C.N., Lutzky, V.P., Kupz, A., Doolan, D.L., Reid, D.W., Field, M. et al. (2020) The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease. *Frontiers in Immunology*, *11*, 303.

Reuschl, A.-K., Edwards, M.R., Parker, R., Connell, D.W., Hoang, L., Halliday, A. et al. (2017) Innate activation of human primary epithelial cells broadens the host response to *Mycobacterium tuberculosis* in the airways. *PLoS Pathogens*, *13*(9), e1006577. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006577

Rhoades, E.R., Archambault, A.S., Greendyke, R., Hsu, F.-F., Streeter, C. & Byrd, T.F. (2009) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-Inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF-α by preventing interaction with TLR2. *The Journal of Immunology*, *183*, 1997–2007.

Ridley, C. & Thornton, D.J. (2018) Mucins: the frontline defence of the lung. *Biochemical Society Transactions*, *46*, 1099.

Rivas-Santiago, B., Schwander, S.K., Sarabia, C., Diamond, G., Klein-Patel, M.E., Hernandez-Pando, R. et al. (2005) Human β-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity*, *73*, 4505.

Rossi, G., Manfrin, A. & Lutolf, M.P. (2018) Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, *1911*(19), 671–687.

Ryndak, M.B., Singh, K.K., Peng, Z. & Laal, S. (2015) Transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* replicating in type II alveolar epithelial cells. *PLoS One*, *5*, 112–114. https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.05.026

Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Ommen, D.D.Z., Heo, I., Böttinger, L., Klay, D. et al. (2019) Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO Journal*, *38*(4), e100300. https://doi.org/10.15252/embj.2018100300

Salahudeen, A.A., Choi, S.S., Rustagi, A., Zhu, J., van Unen, V. & Sean, M. et al. (2020) Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids. *Nature 588*(7839), 670–675.

Schaible, U.E., Collins, H.L., Priem, F. & Kaufmann, S.H.E. (2002) Correction of the iron overload defect in β-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, *196*, 1507.

Semple, F. & Dorin, J.R. (2012) β-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *Journal of Innate Immunity*, *4*, 337.

Si, L., Bai, H., Rodas, M., Cao, W., Oh, C.Y., Jiang, A. et al. (2021) A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics. *Nature Biomedical Engineering*, *2021*, 1–15.

Silva-Miranda, M., Ekaza, E., Breiman, A., Asehnoune, K., Barros-Aguirre, D., Pethe, K. et al. (2015) High-content screening technology combined with a human granuloma model as a new approach to evaluate the activities of drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*, 693.

Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Gröschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R. et al. (2015) Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence invivo. *PLoS Pathogens*, *11*(2), e1004650. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004650

Sow, F.B., Alvarez, G.R., Gross, R.P., Satoskar, A.R., Schlesinger, L.S., Zwilling, B.S. et al. (2009) Role of STAT1, NF-κB, and C/EBPβ in the macrophage transcriptional regulation of hepcidin by mycobacterial infection and IFN-γ. *Journal of Leukocyte Biology*, *86*, 1247–1258.

Sow, F.B., Florence, W.C., Satoskar, A.R., Schlesinger, L.S., Zwilling, B.S. & Lafuse, W.P. (2007) Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology*, *82*, 934–945.

Thacker, V.V., Dhar, N., Sharma, K., Barrile, R., Karalis, K. & McKinney, J.D. (2020) A lung-on-chip model of early *Mycobacterium tuberculosis* infection reveals an essential role for alveolar epithelial cells in controlling bacterial growth. *Elife*, *9*, 1–73.

Thacker, V.V., Sharma, K., Dhar, N., Mancini, G., Sordet-Dessimoz, J., & McKinney, J.D. (2021) Rapid endotheliitis and vascular damage characterize SARS-CoV-2 infection in a human lung-on-chip model. *EMBO Reports*, *22*(6), e52744. https://doi.org/10.15252/embr.202152744

To, K., Cao, R., Yegiazaryan, A., Owens, J. & Venketaraman, V. (2020) General overview of nontuberculous mycobacteria opportunistic pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Clinical Medicine*, *9*, 2541.

Torrelles, J.B. & Schlesinger, L.S. (2017) Integrating lung physiology, immunology and tuberculosis. *Trends in Microbiology*, *25*, 688.

Torres-Juarez, F., Touqui, L., Leon-Contreras, J., Rivas-Santiago, C., Enciso-Moreno, J.A., Hernández-Pando, R. et al. (2018) RNase 7 but not psoriasin nor sPLA2-IIA associates with *Mycobacterium tuberculosis* during airway epithelial cell infection. *Pathogens and Disease*, *76*(2). https://doi.org/10.1093/femspd/fty005

Vazquez-Armendariz, A.I., Heiner, M., Agha, E.E., Salwig, I., Hoek, A., Hessler, M.C. et al. (2020) Multilineage murine stem cells generate complex organoids to model distal lung development and disease. *EMBO Journal*, *39*(21), e103476. https://doi.org/10.15252/embj.2019103476

Whitsett, J.A. & Alenghat, T. (2015) Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunology*, *16*(1), 27–35. https://doi.org/10.1038/ni.3045

World Health Organization. (2020) *Tuberculosis*. Accessed August 5, 2021, https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data

Youk, J., Kim, T., Evans, K.V., Jeong, Y.-I., Hur, Y., Hong, S.P. et al. (2020) Three-dimensional human alveolar stem cell culture models reveal infection response to SARS-CoV-2. *Cell Stem Cell*, *27*, 905.

Zhou, J., Li, C., Sachs, N., Chiu, M.C., Wong, B.-H.-Y., Chu, H. et al. (2018) Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*, 6822.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Iakobachvili, N., Leon-Icaza, S.A., Knoops, K., Sachs, N., Mazères, S., Simeone, R., et al (2022) Mycobacteria–host interactions in human bronchiolar airway organoids. *Molecular Microbiology*, 117, 682–692. https://doi.org/10.1111/mmi.14824

Publication n°3: "Druggable redox pathways against *M. abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids"

Les données supplémentaires peuvent être récupérées en ligne au lien suivant : https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559.

PLOS PATHOGENS

RESEARCH ARTICLE

Druggable redox pathways against *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids

Stephen Adonai Leon-Icaza[1], Salimata Bagayoko[1], Romain Vergé[1], Nino Iakobachvili[2], Chloé Ferrand[1], Talip Aydogan[3], Célia Bernard[1], Angelique Sanchez Dafun[1], Marlène Murris-Espin[4,5], Julien Mazières[4], Pierre Jean Bordignon[1], Serge Mazères[1], Pascale Bernes-Lasserre[6], Victoria Ramé[6], Jean-Michel Lagarde[6], Julien Marcoux[1], Marie-Pierre Bousquet[1], Christian Chalut[1], Christophe Guilhot[1], Hans Clevers[7], Peter J. Peters[2], Virginie Molle[3], Geanncarlo Lugo-Villarino[1], Kaymeuang Cam[1], Laurence Berry[3], Etienne Meunier[1], Céline Cougoule[1]*

1 Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, Université Toulouse III–Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France, **2** M4i Nanoscopy Division, Maastricht University, Maastricht, Netherlands, **3** Laboratory of Pathogen Host Interactions (LPHI), Université Montpellier, CNRS, Montpellier, France, **4** Service de Pneumologie, Hôpital Larrey, CHU de Toulouse, Toulouse, France, **5** Centre de ressource et de compétence pour la mucoviscidose de l'adulte (CRCM adulte), CHU de Toulouse, Toulouse, France, **6** Imactiv-3D SAS, 1 Place Pierre POTIER, Toulouse, France, **7** Oncode Institute, Hubrecht Institute, Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences and University Medical Center, Utrecht, Netherlands

* Celine.Cougoule@ipbs.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Leon-Icaza SA, Bagayoko S, Vergé R, Iakobachvili N, Ferrand C, Aydogan T, et al. (2023) Druggable redox pathways against *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids. PLoS Pathog 19(8): e1011559. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559

Editor: Helena Ingrid Boshoff, National Institutes of Health, UNITED STATES

Received: November 30, 2022

Accepted: July 13, 2023

Published: August 24, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559

Copyright: © 2023 Leon-Icaza et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are

Abstract

Mycobacterium abscessus (Mabs) drives life-shortening mortality in cystic fibrosis (CF) patients, primarily because of its resistance to chemotherapeutic agents. To date, our knowledge on the host and bacterial determinants driving Mabs pathology in CF patient lung remains rudimentary. Here, we used human airway organoids (AOs) microinjected with smooth (S) or rough (R-)Mabs to evaluate bacteria fitness, host responses to infection, and new treatment efficacy. We show that S Mabs formed biofilm, and R Mabs formed cord serpentines and displayed a higher virulence. While Mabs infection triggers enhanced oxidative stress, pharmacological activation of antioxidant pathways resulted in better control of Mabs growth and reduced virulence. Genetic and pharmacological inhibition of the CFTR is associated with better growth and higher virulence of S and R Mabs. Finally, pharmacological activation of antioxidant pathways inhibited Mabs growth, at least in part through the quinone oxidoreductase NQO1, and improved efficacy in combination with cefoxitin, a first line antibiotic. In conclusion, we have established AOs as a suitable human system to decipher mechanisms of CF-driven respiratory infection by Mabs and propose boosting of the NRF2-NQO1 axis as a potential host-directed strategy to improve Mabs infection control.

within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This project has been funded by grants from: "Vaincre La Mucoviscidose" and "Grégory Lemarchal" foundations (N° RF20210502852/1/1/48) to CCo, including the PhD fellowship for SALI; the "Fondation pour la Recherche Médicale" ("Amorcage Jeunes Equipes", AJE20151034460), the Solvay Solidarity Fund and CNRS Foundation, the CNRS ATIP avenir program, and ERC StG (INFLAME 804249) to EM. SB was funded by "Fondation pour la Recherche Médicale" PhD fellowship (FDT202106012794). This work was also supported by grants from CNRS (IEA 300134) to CCo, Campus France PHC Van Gogh (40577ZE) to GL-V, ZonMW 3R's (114021005) and the LINK program from the Province of Limburg, the Netherlands to PJP, the Nuffic Van Gogh Programme (VGP.17/10) to NI, and by the ANR JCJC ProteasoRegMS to ASD. TA, VM and LB were funded by "La Région Languedoc-Roussillon" (N° DRTE/RSS - ESR_R&S_DF-000061-2018-003268). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: Julien Mazières reports grants or contracts from Astra Zeneca, Roche and Pierre Fabre; and payment or honoraria for board and expertise (personal and institution) from Merck, Astra Zeneca, BMS, MSD, Roche, Novartis, Daiichi, and Pfizer; outside the submitted work. Hans Clevers reports invention on patents related to organoid research. His full disclosure: www.uu.nl/staff/JCClevers/Additional function. The other authors have declared no competing interests.

Author summary

Pulmonary infection by Non Tuberculosis Mycobacteria is a rising concern for patients with cystic fibrosis (CF), especially Mycobacterium abscessus (Mabs). Mabs exists as two morphotypes. CF patients are generally infected by the S morphotype present in the environment, which can switch to the R morphotype displaying higher virulence. Due to its resistance to antibiotics, treatments againt Mabs often fail, calling for complementary therapeutical strategies. Here we adapted the human airway organoid technology to model Mabs infection in the context of CF, decipher mechanisms of host-pathogen interaction that can be pharmacologically targeted to improve infection control. We found that Mabs R induces higher host oxidative stress and cell death, hallmarks of its virulence, which are enhanced in the CF context. Boosting the host oxidative pathway using antioxidants improves infection control by a frontline antibiotic. Our study provides CF patient-derived airway organoids as a relevant human-based, animal-free system for CF-driven Mabs infection and evaluation of innovative therapeutic strategies.

Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is a monogenic disease due to mutations in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene [1], which regulates ion transport, that impair lung mucociliary clearance and result in pathological triad hallmarks of CF, i.e., chronic airway mucus build-up, sustained inflammation, and microbe trapping leading to parenchyma epithelial cell destruction. The major reason CF patients succumbing to this disease is respiratory failure resulting from chronic lung infection [2].

CF Patients have a greater risk of infection by Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM), mainly by the drug-resistant NTM *Mycobacterium abscessus* (Mabs) [3–5]. Mabs display two distinct morphotypes based on the presence or absence of glycopeptidolipids (GPL) in their cell wall [6]. The smooth (S) GPL-expressing variant forms biofilm and is associated with environmental isolates. The Rough (R) variant does not express GPL, forms cording and induces more aggressive and invasive pulmonary disease, particularly in CF patients [6–8]. Mabs colonization of the CF patient airway is initiated by the infection with the S variant that, over time, switches to the R morphotype by losing or down-regulating surface GPL [9–11]. Although animal models like immunocompromised mice [12,13], zebrafish [14–16] and *Xenopus laevis* [17] contributed to a significant advance in the understanding of Mabs infection [18], their tissue architecture and cell composition are different from that of humans and do not recapitulate the hallmarks of CF [19–21]. Models with anatomical and functional relevance to the human airway and displaying natural CFTR gene mutations would complement those *in vivo* models.

Human airway organoids (AOs), derived from adult stem cells present in lung tissues [22], are self-organized 3D structures and share important characteristics with adult bronchiolar part of the human lung [22,23]. Of particular interest, organoids derived from CF patients constitute a unique system to model natural CFTR mutations and the resulting epithelium dysfunctions such as exacerbated mucus secretion, thus recapitulating critical aspects of CF in human that are not achievable with other cellular or animal models [22,24,25]. AOs have also been adapted for modelling infectious diseases with bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* [26], with viruses, such as RSV [22] and SARS-CoV-2 [27–29], and with parasites [30]. We previously showed that *M. abscessus* thrives in AOs [31], demonstrating that AOs constitute a suitable human system to model mycobacteria infection.

Here, we hypothesized that AOs could model Mabs variant virulence and how the CF lung context influence Mabs infection. In this study, we therefore assessed Mabs variant infectivity in AOs, and the influence of CFTR dysfunction using CF patient-derived AOs. We report that both Mabs S and R infect and replicate within AOs and display their specific extracellular features, especially biofilm and cording, respectively. Moreover, enhanced reactive oxygen species (ROS) production during Mabs infection and the CF context favours Mabs growth, which is reversed by antioxidants that improved antibiotic efficacy.

Results

Human airway organoids support S- and R-Mabs replication and phenotype

We microinjected bronchial airway organoids with S- and R- Mabs variants (380+94 CFU and 298+44 CFU respectively, mean + SEM, $P>0.99$, Fig 1A) as previously described [31]. We first quantified bacterial load in AOs overtime (S1A Fig), and showed that both Mabs S and R propagated over 12 days. Based on these data, we then performed experiments at 4 days post-infection, corresponding to bacteria exponential growth phase. We observed a low but significant difference between Mabs S and R, with Mabs S growing better compared to the R morphotype at 4 days post-infection (Fig 1A). We also showed that other Mabs subspecies also replicated in AOs, with *M. abscessus subspecie bolletii* displaying a slightly higher growth than Mabs S or *M. abscessus subspecie massiliense* (S1B Fig), while their growth *in vitro* was similar (S1C Fig). When analysed microscopically, we showed that Mabs S and R mainly resided in the lumen of AOs and we did not detect obvious alteration of the architecture of Mabs-infected AOs compared to mock injected AOs (Fig 1B). Interestingly, by light sheet imaging, we observed that S bacteria formed aggregates in the lumen of the organoids, whereas the R variant formed serpentine cords characterized by the parallel arrangement of the bacteria along their long axis (Figs 1C and S1D–S1I and S1 and S2 Movies), structures observed both *in vitro* and *in vivo* [32]. To further investigate Mabs behaviour, S- and R-Mabs-infected AOs were analysed by SEM and then TEM (Fig 1D). As previously described [22], the organoid epithelium is composed of basal, ciliated and goblet cells (Fig 1D, 1st row). Mabs S bacilli formed chaotically scattered aggregates in the organoid lumen (Fig 1D, 2nd row). We found Mabs S localizing in close contact with the apical side of the epithelial cells (Fig 1D, 4), particularly in the presence of cilia (Fig 1D, 5). The same samples observed by TEM revealed that S bacteria in the lumen were surrounded by what could be an extracellular polymeric substance [33] (Figs 1D, panel 6–6' and S2A), suggesting that Mabs S variant might form biofilm in the organoid lumen. We convincingly identified Mabs R forming serpentine cords, characterized by parallel and aligned bacteria, in the organoid lumen (Figs 1D, panels 7–9 and S2B). Importantly, electron microscopy confirmed no significant internalization of Mabs by epithelial cells [31]. As formation of cords constitutes a mycobacterial virulence trait [11,34,35], we next quantified Mabs cording over time of AO infection. We never observed formation of cords during Mabs S infection, but quantified an increase in the number of organoids containing cords upon Mabs R infection over 4 days of infection (Fig 1E). Finally, we evaluated the virulence of S- and R-Mabs by assessing epithelial cell damage. As shown in Fig 1F and 1G, AOs infected with the R variant exhibited enhanced cell death compared to those infected with the S variant likely reflecting the higher virulence of the cord-forming R morphotype.

Altogether, our results showed that S and R Mabs variants thrived in AOs and displayed respective features observed in *in vivo* models and in the lung of CF patients.

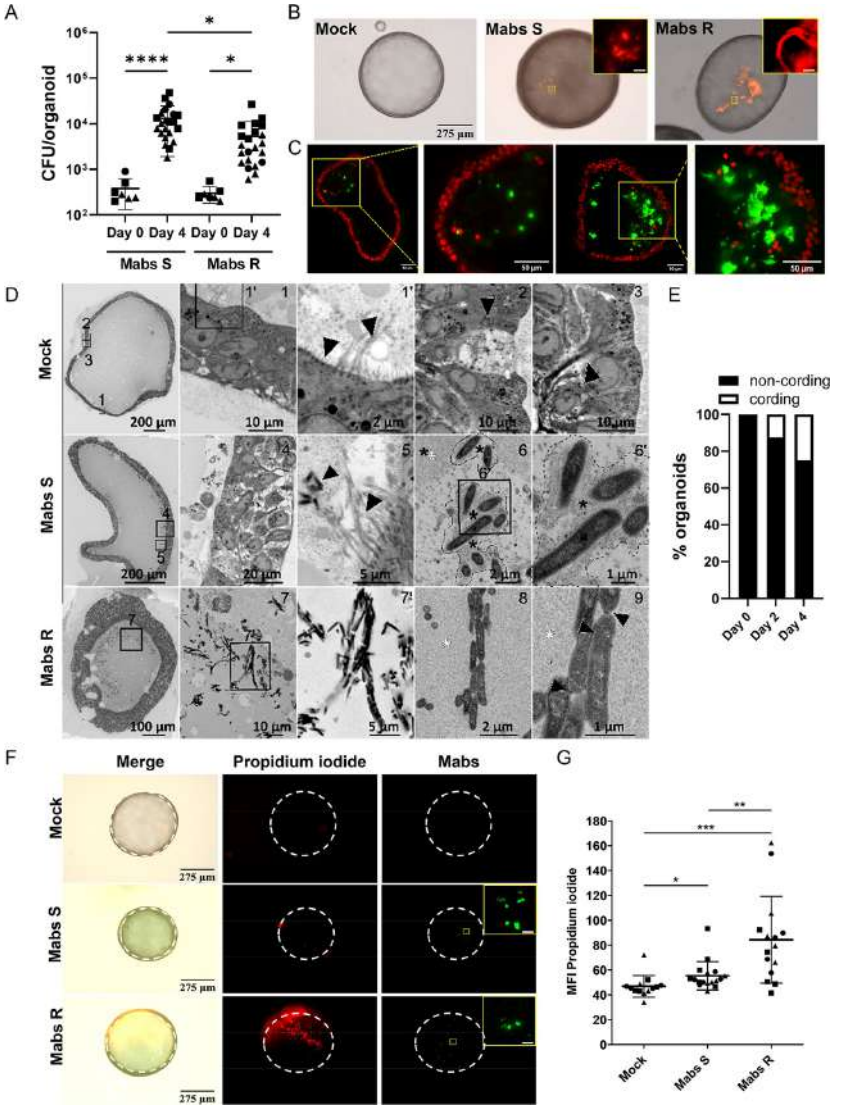


Fig 1. Mabs infection in airway organoids. (A) Mabs S (Day 0 n = 7; Day 4 n = 22) and R (Day 0 n = 7; Day 4 n = 22) growth in healthy AOs (H-AO). (B) Representative images of a mock (PBS) infected AO or AOs infected with tdTomato-expressing Mabs S or R. (C) Light-sheet fluorescence microscopy of a XY plane at the z = 120μm (left two images) or z = 80μm (right two images) positions of an AO infected with Mabs S or R, respectively; Zoom-in image of the yellow square zone. (D) Electron micrographs obtained with a FEI Quanta200 scanning electron microscope set up in back-scattered mode. Resin blocks were sectioned and imaged at different magnifications showing normal AO organization and the different cell types typical of lung epithelium (top row, panel 1': left arrow indicates microvilli, right arrow indicates cilia; panel 2: arrow indicates a goblet cell; panel 3: arrow indicates a club cell), the biofilm formed by Mabs S on the luminal face of the epithelial cells (middle row, panel 5: left arrow indicates bacteria; right arrow indicates cilia; panel 6 & 6': asterisks indicate the extracellular polymeric substance surrounding Mabs S), and the bacterial aggregates typical of the cording in the lumen of Mabs R infected AOs (bottom row, panel 9: arrows indicate electron dense deposit lining Mabs R making cords). Targeted ultrathin sections were made and observed by transmission electron microscopy (images 5 and 8). (E) Mean percentage of organoids containing Mabs R cords after 0 (n = 8), 2 (n = 8), or 4 (n = 8) days of infection. (F, G) Representative images (F) and Mean Fluorescence Intensity (MFI) quantification (G) of propidium iodide incorporation (50 μg ml^{-1}) in mock infected AOs (n = 13) or AOs

infected with Wasabi-expressing Mabs S (n = 17) or R (n = 15) for 4 days. The dotted lines delimit the organoids circumference. Except otherwise stated, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments, indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 by Mann-Whitney test.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559.g001

ROS production contributes to *Mycobacterium abscessus* growth

Next, we compared the host epithelial cell response to Mabs S and R infection by measuring the expression of genes related to inflammatory cytokines, antimicrobial peptides (AMPs), mucins and redox homeostasis in infected airway organoids. As previously described [31], we confirmed a tendency towards a decrease in pro-inflammatory cytokine expression, except for CXCL10 for which expression is significantly induced by both variants (S3A Fig). We also confirmed the modulation of AMPs expression, with a significant inhibition of lactoferrin expression (S3B Fig). Regarding mucin expression, we showed that infection by both S and R Mabs inhibited MUC5B and MUC4 expression (S3C Fig). As ROS production is an important antimicrobial process and is enhanced in the CF context [36,37], we finally evaluated the expression of genes related to the production and detoxification of ROS. While Mabs S did not significantly modulate the expression of NOX1 and DUOX1 oxidases, we measured a significant increase in DUOX1 expression upon Mabs R infection, suggesting enhanced ROS production by this variant (Fig 2A). Moreover, we observed a significant increase in the expression of the transcription factor nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF-2), but only Mabs R induced significantly the expression of the NRF2-regulated gene NQO1, denoting NRF2 activation with a significant difference between the S and the R variant (Fig 2A). Surprisingly, expression of the NRF2-regulated gene HMOX1 was not modulated upon Mabs infection (Fig 2A).

To confirm ROS production upon Mabs infection, Mabs-infected AOs were microscopically analysed after incubation with either MitoSOX or H2DCFDA to detect mitochondrial ROS and H_2O_2 production, respectively. As shown in Figs 2B–2D, both S- and R-Mabs infections enhanced the incorporation of MitoSOX and H2DCFDA, in agreement with the induction of ROS production. Interestingly, production of mitochondrial ROS and H_2O_2 was higher with the R variant, further confirming R-Mabs virulence compared to S-Mabs in AOs.

The contribution of cell protective antioxidant pathways during mycobacterial infection remains poorly understood [38,39]. We then determined the consequence of boosting antioxidant pathways for Mabs fitness. To assess the role of host-derived oxidative stress, Mabs-infected AOs were treated with the antioxidants resveratrol or the NRF2 agonist sulforaphane, which both significantly reduced by 70% S and R variant growth in AOs (Figs 2E and 2F, S3E and S3F), without affecting Mabs growth *in vitro* (S3D and S3G Fig). Interestingly, sulforaphane treatment also decreased the number of organoids containing Mabs R cords (Fig 2G).

Altogether, the results showed that the human airway organoids recapitulate features of the infection by Mabs variants. Moreover, independent of the immune system, airway epithelial cells mount an oxidative response upon Mabs infection, which contributes to Mabs growth and virulence.

AOs recapitulate hallmarks of cystic fibrosis, and display enhanced oxidative stress

In order to evaluate CF lung context on Mabs infection, we next derived AOs from CF patients displaying Class I and II CFTR mutations (S1 Table). The Class II CF AO lines display the delF508 CFTR mutation bore by 80% of the CF patients [40]. Characterization of CF versus healthy AOs showed that CF AOs have impaired swelling in the forskolin assay (Fig 3A)

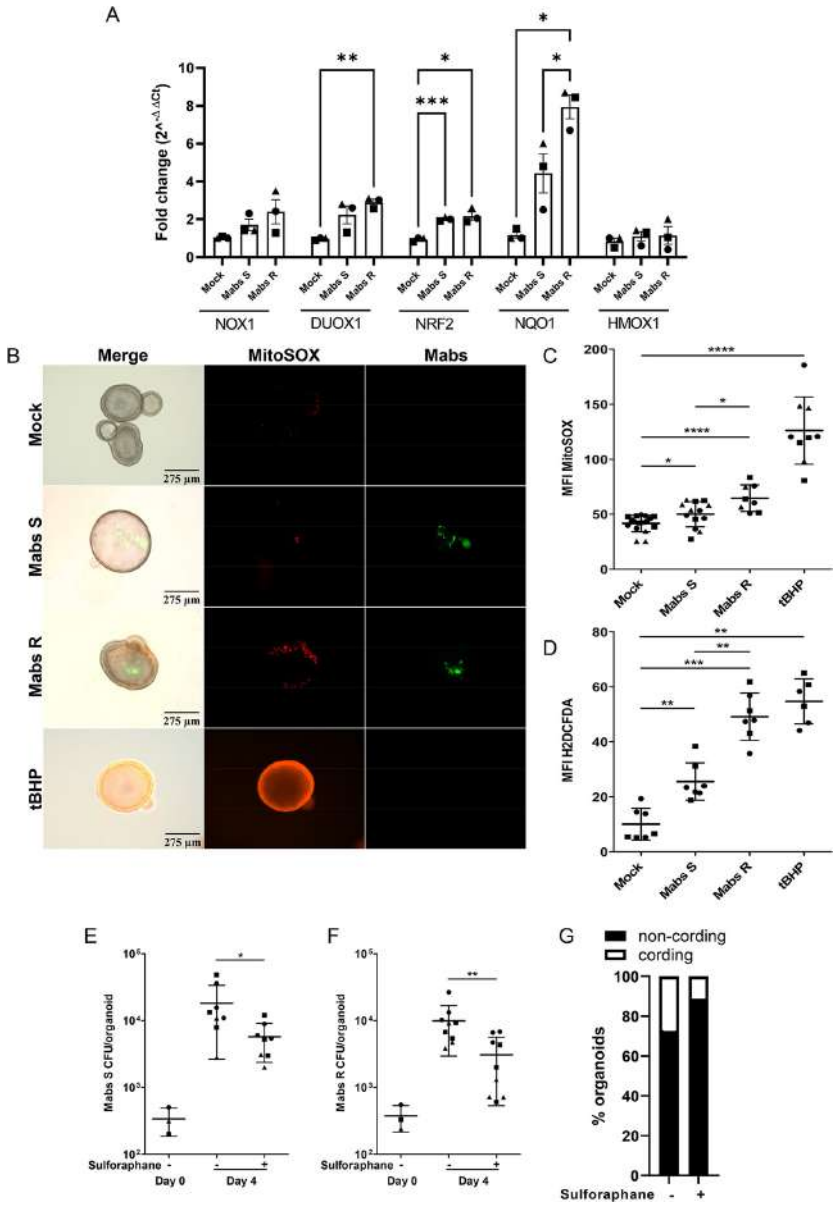


Fig 2. S and R Mabs promote an oxidative environment in airway organoids. (A) Expression patterns of ROS-related genes in mock-infected H-AOs or H-AOs infected with Mabs S or R for 4 days. Graph represents means ± SEM from three independent experiments, performed in triplicates. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 by unpaired T test. (B, C) Representative images (B) and MFI quantification (C) of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in mock-infected H-AOs (n = 17) or H-AO infected with Wasabi-labelled Mabs S (n = 13) or R (n = 8) for 3 days. (D) MFI quantification of H_2O_2 production (10μM H2DCFDA) in mock-infected AOs (n = 7) or AOs infected with tdTomato-labelled Mabs S (n = 7) or R (n = 7) for 3 days. (E, F) Bacterial load by CFU assay of H-AOs pre-treated with (+) or without (-) 10μM sulforaphane for 6hr before infection with Mabs S (E) (n+ = 8; n- = 8) or R (F) (n+ = 9; n- = 9) for 4 days. (G) Mean percentage of H-AOs exhibiting cords after 4 days of infection with Mabs R, in the presence (n+ = 9) or absence (n- = 8) of 10 μM sulforaphane treatment. Except otherwise stated, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments, indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, ****P<0.0001 by Mann-Whitney test.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559.g002

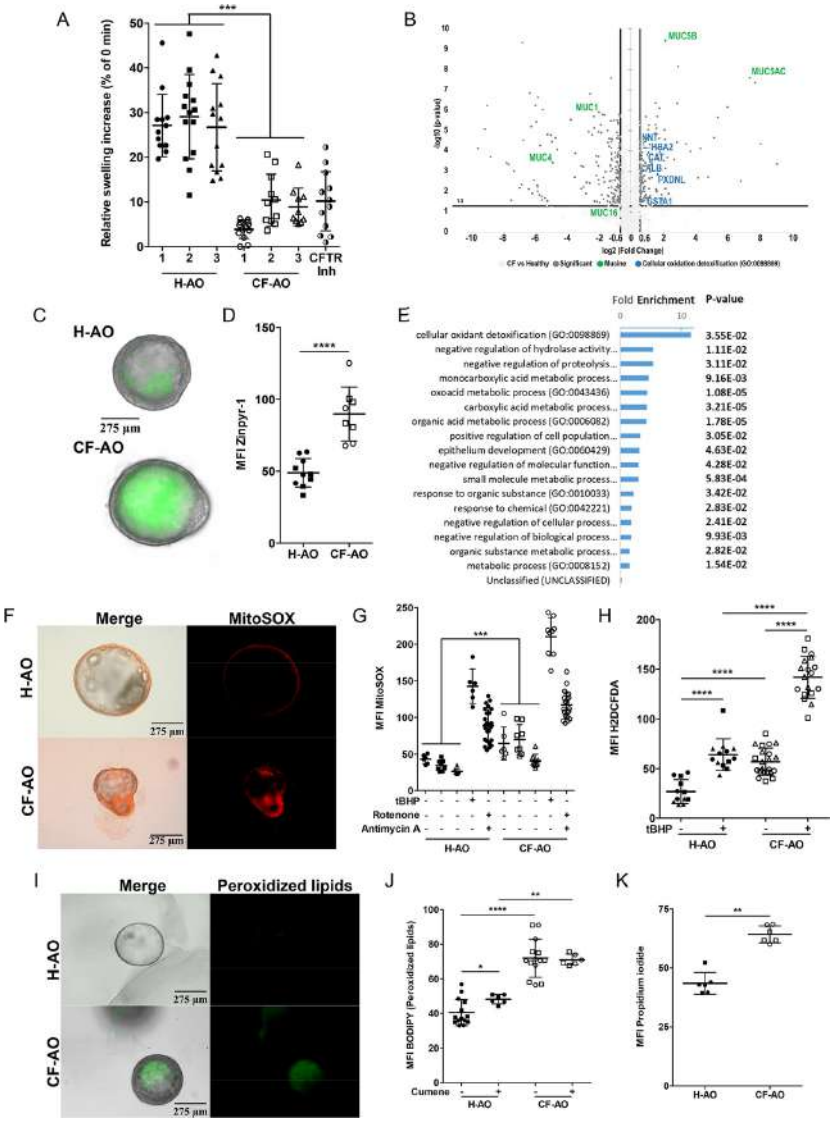


Fig 3. Patient-derived airway organoids recapitulate cystic fibrosis-driven oxidative stress. (A) Percentage of area increase of H-AOs (Donor 1 n = 13, Donor 2 n = 14, Donor 3 n = 13), CF-AOs (Donor 1 n = 13, Donor 2 n = 11, Donor 3 n = 10), and H-AOs pre-treated with CFTR inhibitors (25μM CFTRinh-172 and GlyH 101 for 4 days) (CFTR-Inh n = 13) after 2hr stimulation with 5μM forskolin. Data from two independent experiments. (B) The volcano plot showing the fold-change (x-axis) versus the significance (y-axis) of the proteins identified by LC–MS/MS in CF-AOs *vs* in H-AOs. The significance (non-adjusted p-value) and the fold-change are converted to −Log10(p-value) and Log2(fold-change), respectively. (C, D) Representative images (C) and MFI quantification (D) of mucus staining (10μM Zinpyr-1) in H-AOs (n = 10) and CF-AOs (n = 8). (E) Gene Ontology enrichment analysis showing the most enriched Biological Processes and their associated p-values (calculated using the Bonferroni correction for multiple testing) related to the list of up-regulated proteins in CF patients compared to healthy ones. (F, G) Representative images (F) and MFI quantification (G) of basal mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in H-AOs (Donor 1 n = 6, Donor 2 n = 8, Donor 3 n = 8) and CF-AOs (Donor 1 n = 6, Donor 2 n = 8, Donor 3 n = 8). Data from two independent experiments. As positive controls for ROS production, two wells of healthy or CF organoids were treated for 1hr at 37˚C with 20mM tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) (H-AOs n = 6; CF-AOs n = 9) or a mix of 5μM rotenone and 5μM antimycin A (H-AOs n = 26; CF-AOs n = 21). (H) MFI quantification of basal H_2O_2

production (10μM H2DCFDA) in H-AOs (-tBHP n = 12; +tBHP n = 13) and CF-AOs (-tBHP n = 22; +tBHP n = 18). (I, J) Representative images (I) and MFI quantification (J) of peroxidized lipids (2μM BODIPY) in H-AOs (n = 14) and CF-AOs (n = 14). As positive control for lipid peroxidation induction, healthy (n = 6) or CF (n = 6) AOs were treated with 800μM cumene hydroperoxide for 2hr at 37˚C. (K) MFI quantification of the basal plasma membrane permeabilization (50 μg ml^{-1} propidium iodide incorporation) in H-AOs (n = 6) and CF-AOs (n = 6). Except otherwise noted, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, ****P<0.0001 by Mann-Whitney test.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559.g003

denoting CFTR channel malfunction, similar than pharmacological inhibition of the CFTR. They also displayed a thicker epithelium (S4A and S4B Fig). Mass spectrometry analysis of CF vs healthy AOs revealed enhanced abundance of mucins MUC5AC and MUC5B (Fig 3B) that was confirmed at the mRNA level (S4C Fig) and by exacerbated accumulation of mucus in the CF AO lumen (Figs 3C, 3D and S4D). A gene ontology enrichment study revealed tendency towards an upregulation of the cellular oxidant detoxification pathway in CF AOs (fold-change 11.6; p-value 3.55e-2; Fig 3E). To further evaluate the oxidative status in the CF context, healthy and CF AOs were stained with MitoSOX or H2DCFDA. The ROS production was enhanced in CF AOs compared to healthy ones (Fig 3F–3H), which was further exacerbated after treatment with the oxidative stress inducer tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) [41], and rotenone and antimycin A, inhibitors of the mitochondrial electron transport, both treatment inducing higher oxidative stress in CF-AOs than in healthy ones (MFI MitoSOX 142.5+9.4 vs 210.2+8.7 ($P<0.001$) for tBHP, and 88.8+4.2 vs 117+3.9 ($P<0.0001$) for rotenone/antimycin A, in H-AOs compared to CF ones) (Figs 3G, 3H and S4E). Because high ROS levels induce lipid peroxidation leading to cell death [42–44], we examined and quantified these processes by microscopy using BODIPY (measuring lipid peroxidation) or propidium iodide (measuring cell death) respectively. We found that level of peroxidized lipids (Figs 3I, 3J and S4F) and cell death (Figs 3K and S4G) were higher in CF AOs than in healthy AOs. Interestingly, while the oxidizing agent cumene hydroperoxide enhanced lipid peroxidation in H-AOs, it had no additional effect in CF-AOs (Figs 3J and S4F).

Altogether, these results showed that organoids derived from CF lung tissue exhibited not only CFTR dysfunction and exacerbated mucus accumulation but also an increased oxidative stress, therefore representing a suitable *ex vivo* model to investigate how the lung CF context drives Mabs infection.

Mycobacterium abscessus takes advantage of CF-driven oxidative stress to thrive

As oxidative stress is enhanced in CF-AOs, we hypothesised that the CF context could favour Mabs growth. To test this hypothesis, we microinjected healthy and CF-AOs with S- or R-Mabs variants and quantified Mabs proliferation. At 4 days post-infection, we observed an enhanced replication for both variants in CF-AOs compared to in H-AOs (Fig 4A and 4B), indicating that the CF environment favours Mabs fitness. Interestingly, we quantified a higher percentage of organoids containing Mabs R cords in CF AOs (Fig 4C and 4D), suggesting a higher virulence of Mabs R in the CF context. To support these results, we next used CFTR inhibitors. First, we showed that treatment of H-AOs with CFTR inhibitors enhanced oxidative stress and cell death, hallmarks of CF-AOs (S5B and S5C). While CFTR inhibitors by themselves did not modify Mabs growth *in vitro* (S5D Fig), they enhanced Mabs proliferation in AOs compared with untreated ones (S5E and S5F Fig), associated with enhanced cording for Mabs R (S5G and S5H Fig), thus confirming that alteration of CFTR function promoted Mabs growth.

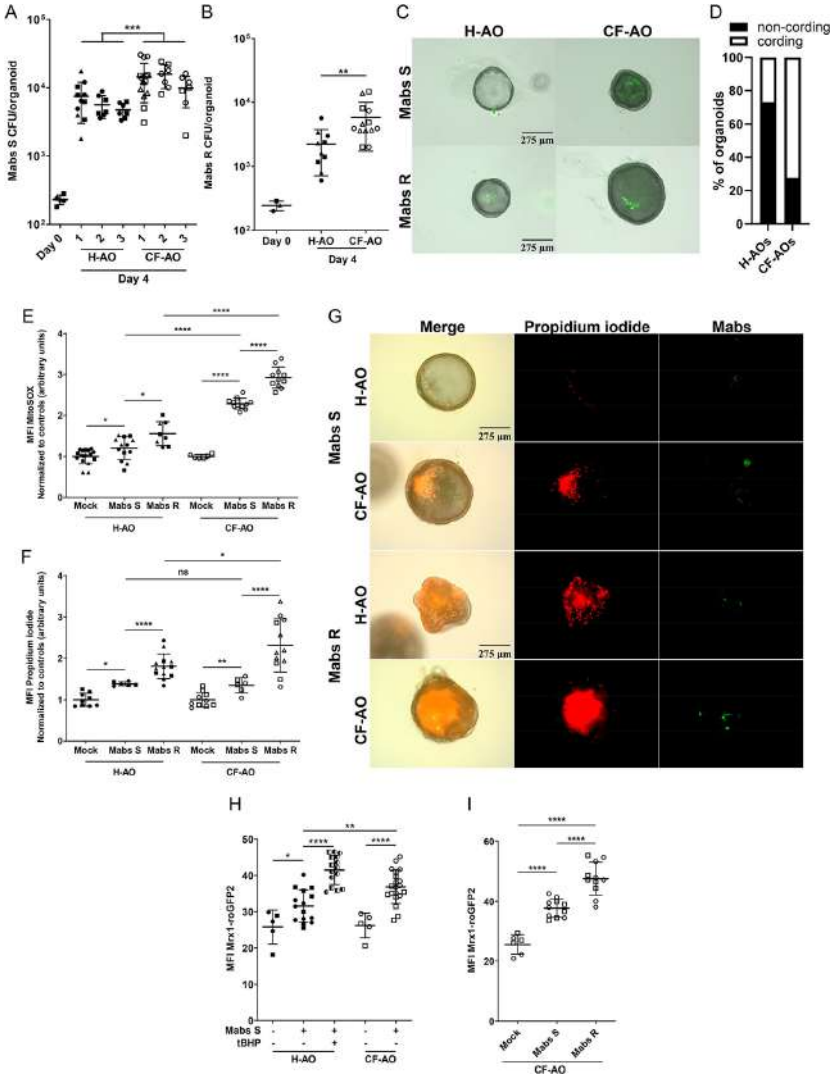


Fig 4. Oxidative stress in cystic fibrosis benefits Mabs growth. (A, B) Bacterial load by CFU assay of H-AOs and CF-AOs infected for 4 days with Mabs S (A) (healthy Donor 1 n = 11, Donor 2 n = 7, Donor 3 n = 7; cystic fibrosis Donor 1 n = 15, Donor 2 n = 7, Donor 3 n = 7) or R (B) (n healthy = 10; n cystic fibrosis = 13). (C) Representative images of Wasabi-labelled Mabs S or R 4 days-infected H-AOs and CF-AOs. (D) Mean percentage of H-AOs (n = 12) and CF-AOs (n = 7) exhibiting Mabs R cords after 4 days of infection. (E) MFI quantification of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in H-AOs and CF-AOs infected with Wasabi-expressing Mabs S (H-AOs n = 13; CF-AOs n = 11) or Mabs R (H-AOs n = 8; CF-AOs n = 11) for 3 days. Data are normalized to their respective Mock-infected H-AOs and CF-AOs (H-AOs n = 17; CF-AOs n = 6) control (F, G) MFI quantification (F) and representative images (G) of propidium iodide incorporation (50 μg ml^{-1}) in H-AOs and CF-AOs infected with Wasabi-expressing Mabs S (H-AOs n = 6; CF-AOs n = 6) or Mabs R (H-AOs n = 13; CF-AOs n = 12) for 4 days. Data are normalized to their respective Mock-infected H-AOs and CF-AOs (H-AOs n = 9; CF-AOs n = 10) control. (H) MFI quantification of GFP in Mock-infected H-AOs and CF-AOs (H-AOs n = 5; CF-AOs n = 5) or H-AOs and CF-AOs infected with Mrx1-roGFP2-expressing Mabs S (H-AO n = 15; CF-AO n = 20) for 4 days. As a positive control for ROS induction, H-AOs (n = 15) were exposed to 200μM tBHP for 1 hour prior infection, which was maintained all along the experiment. (I) MFI quantification of GFP in Mock-infected CF-AOs (n = 6) or CF-AOs infected with Mrx1-roGFP2-expressing Mabs S (n = 11) or Mabs R (n = 11) for 4 days. Except otherwise noted, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 by Mann-Whitney test.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559.g004

Next, we showed that Mabs-infected CF-AOs exhibited higher oxidative stress and epithelial cell death than Mabs-infected H-AOs, indicating that CF-AOs exhibited higher susceptibility to Mabs infection, especially the R variant that induced higher cell death than the S one (Figs 4E–4G, S5I and S5J).

As Mabs infection and CF context are associated with host oxidative stress in airway organoids, we next wondered whether infection is associated with ROS production by the bacteria themselves. To address this question, we adapted the fluorescent redox biosensor Mrx1-roGFP2 system, initially developed in *M. tuberculosis*, to measure mycothiol redox potential in response to oxidative stress [45]. First, we evaluated ROS production *in vitro* upon oxidative agent exposure. Interestingly, at basal level, our results showed that the roGFP2ox/roGFP2red ratio is higher in Mabs S compared to Mabs R, indicative of a higher oxidized status in the S compared to the R variant (S6A Fig). By normalizing basal redox level to 1 in untreated conditions, we measured a slight increase in the roGFP2ox/roGFP2red ratio for Mabs S, which was significantly higher for Mabs R, indicating that the R variant displayed higher redox stress upon exposure to Diamide, tBHP or cumene hydroperoxide (CHP) (S6B Fig). Moreover, higher induction of ROS production by Mabs R in response to 5mM Diamide was associated with better bacteria survival, while exposure to 2mM tBHP or 250μM CHP resulted in bacterial killing (S6C Fig). Finally, Mrx1-roGFP2-expressing strains were microinjected in H- and CF-AOs, and GFP fluorescence intensity was microscopically quantified. As shown in Figs 4H and S6D, fluorescence of Mrx1-roGFP2 of Mabs S is enhanced in CF-AOs compared to healthy ones. Finally, Mrx1-roGFP2 fluorescence is higher in Mabs R than in Mabs S in CF context (Fig 4I).

Altogether, these results show that the CF context is associated with higher pathogenicity of Mabs revealed by enhanced bacterial growth and cording, bacterial and host oxidative stress and cell death.

The NRF2-NQO1 axis supports a better control of Mabs growth

We next evaluated whether the antioxidant sulforaphane could inhibit Mabs growth. CF-AOs treated with sulforaphane exhibited mitigated oxidative environment (Figs 5A and S7A), and expressed higher level of NRF2-regulated NQO1 (Fig 5B). Activation of NRF2 resulted in reduced bacterial load (Fig 5C), % of organoids containing Mabs R cords (Fig 5D), and epithelial cell death (S7B and S7C), indicating that CF-driven oxidative stress stimulated Mabs growth and virulence, and host tissue damage. Interestingly, inhibition of NQO1 using dicoumarol abolished sulforaphane effect on Mabs growth and cording in CF context (Fig 5C and 5D), indicating that NQO1 might play a protective role during Mabs infection.

Finally, we evaluated the potential of sulforaphane combined with cefoxitin, a first line antibiotic to treat Mabs-infected patients [46]. First, we evaluated the influence of both treatment on ROS production upon Mabs S infection, and showed that sulforaphane, alone or in combination with cefoxitin, significantly inhibited host ROS production in CF-AOs upon Mabs S infection (Figs 5E and S7D). Moreover, while both cefoxitin and sulforaphane alone significantly inhibited Mabs growth in CF-AOs by 92% and 80% respectively, combination of both compounds was more efficient to reduce bacterial load (99% inhibition, Fig 5F). Of note, neither sulforaphane nor cefoxitin have any effect of the bacterial redox status (S7E Fig).

Altogether, these results show that pharmacological boost of antioxidant pathways, at least in part mediated by the NRF2-NQO1 axis, could be a complement strategy to current antibiotic therapies.

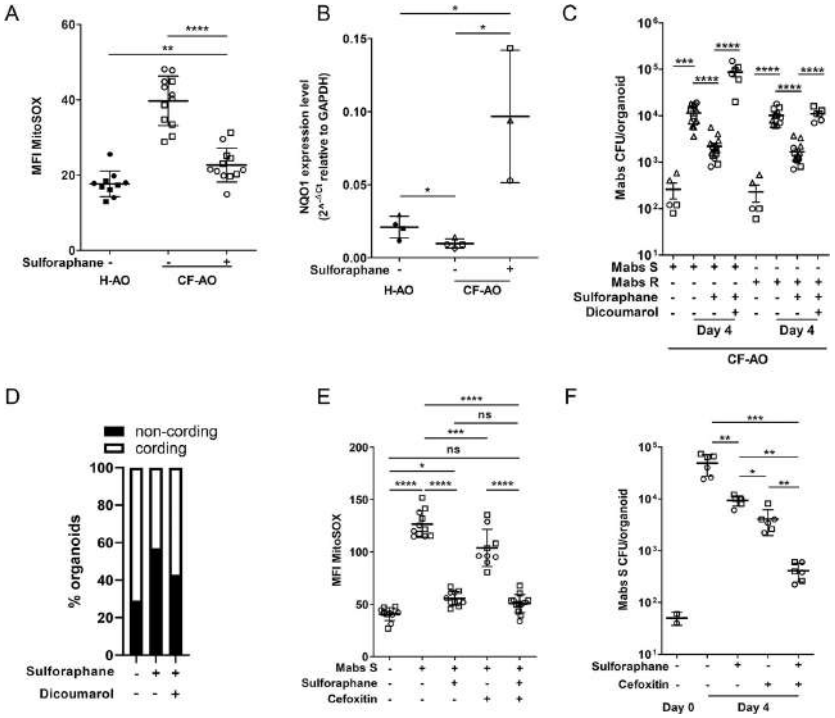


Fig 5. The NRF2-NQO1 axis mitigates oxidative stress and Mabs growth in CF-AOs. (A) MFI quantification of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in H-AOs (n = 10) and CF-AOs (n+ = 12; n- = 12) after 4 days of being treated with (+) or without (-) 10μM sulforaphane. (B) Expression of the NRF-2-regulated gene NQO1 in H-AOs and CF-AOs after 4 days of being treated with or without 10μM sulforaphane. Graph represents means from at least three pooled independent experiments, performed in triplicates. *P<0.05 by unpaired T test. (C) Bacterial load by CFU assay in CF-AOs pre-treated or not with 10μM sulforaphane for 6 hr before infection with Mabs S (treated n = 13; untreated n = 14) or Mabs R (treated n = 13; not-treated n = 12) for 4 days. When stated, the NQO1 inhibitor was added (10μM dicoumarol) (Mabs S n = 6; Mabs R n = 6) simultaneously with sulforaphane and maintained all along the experiment. (D) Mean percentage of CF-AOs untreated (n = 6) or treated with 10μM sulforaphane alone (n = 7) or in combination with 10μM dicoumarol (n = 7), exhibiting Mabs R cords after 4 days of infection. (E) MFI quantification of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in CF-AOs pre-treated or not with 10μM sulforaphane for 6 hr before infection with Wasabi-expressing Mabs S (treated n = 11; untreated n = 11) for 3 days. When stated, at day 2 post-infection, 20μg/ml of cefoxitin was added with (n = 13) or without (n = 9) 10μM sulforaphane. (F) Bacterial load by CFU assay of CF-AOs pre-treated with (n = 6) or without (n = 6) 10μM sulforaphane for 6 hr before infection with Mabs S for 4 days. When stated, at day 2 of the infection, 20μg/ml of cefoxitin was added with (n = 6) or without (n = 6) 10μM sulforaphane. Except otherwise stated, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 by Mann-Whitney test.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011559.g005

Discussion

In this study, we used healthy and CF-patient derived airway organoids (AOs), as realistic and animal testing-free method, to assess Mabs pathogenicity in the context of natural CFTR functional alterations. Indeed, CF AOs carry the patient's own mutations and recapitulate key features of CF disease. We showed that both S- and R-morphotypes of *M. abscessus* proliferate and exhibit infection hallmarks in AOs, with the R variant displaying higher virulence in the CF context characterized by enhanced cording, host oxidative stress and cell death. We also demonstrated that boosting of antioxidant pathways might be a potential complement therapeutic strategy to current antibiotic treatment to better control Mabs infection in CF patients.

The organoid technology has demonstrated its usefulness in developing CFTR corrector/modulator therapies for CF patients [47–49]. Indeed, CF patient-derived organoids, bearing natural CFTR mutations, recapitulate *ex vivo* the spectrum of CFTR dysfunctions and CF disease severities [24,50]. Extended to the airway, CF patient-derived AOs have been shown to display epithelium hyperplasia, luminal mucus accumulation and abrogated response to forskolin-induced swelling, thus recapitulating CFTR dysfunction and consequences on the airway homeostasis [22]. Here, we derived AO lines from three CF patients, carrying class I and II mutations that reproduce the expected defective response to forskolin-induced swelling, epithelium hyperplasia and mucus accumulation. Moreover, these CF AOs display enhanced oxidative stress and lipid peroxidation, as previously measured in CF patients [36,37] or *in vitro* in CFTR mutated cell lines [51], as well as enhanced cell death, recapitulating CF-driven tissue damage. Therefore, our results demonstrate that CFTR dysfunction in epithelial cells is sufficient to cause an oxidative status imbalance in the airway epithelium, independent of immune cells and infection.

We and others have already applied the organoid technology to model host-pathogen interactions [22,26,30,31,52,53]. Here, we have reproduced Mabs infection hallmarks in AOs in healthy and CF contexts. Specifically, we show that both S- and R-Mabs replicate as extracellular bacteria in AOs, which was further enhanced in CF context, thus recapitulating the susceptibility of CF patients to NTM infection [54,55] and consistent with Mabs localization in the airway of CF patients [56]. We showed that Mabs S is surrounded by an extracellular substance resembling a biofilm. Visualizing bacterial biofilm still remains a challenge, especially in *in vivo* settings. The formation of biofilm during both acute and chronic infection plays a crucial role at protecting extracellular bacilli from immune response and antimicrobial agents, leading to treatment failure [57–59]. Moreover, it is now recognized that biofilms are highly diverse bacterial communities, which depend on the environmental conditions, hardly reflected by *in vitro* cultures in laboratories [60]. Therefore, the detection of biofilm in Mabs S-infected healthy and CF AOs opens new venues to further dissect how the human airway, in healthy but also pathological contexts, influences Mabs biofilm formation and consequences on infection, and for testing antibiofilm activity of novel pharmacological compounds [57,61,62].

We also showed that the R variant forms serpentine cords, structures described to be associated with mycobacteria virulence [6–8,11,35,63–67]. Interestingly, formation of serpentine cords by Mabs R in AOs was modulated by the host responses. Indeed, Mabs R cords were increased over time of infection, enhanced in the CF context, and decreased after antioxidant treatment, also correlating with reduced levels of host oxidative stress and cell death. How host pathways can influence mycobacterial cording and virulence has been extensively described in the zebrafish model infected with *M. marinum* or *M. abscessus*, showing that a fine-tuned regulation of the host inflammatory response is crucial to ensure a proper control of mycobacterial infection [15,63,68–70]. It is interesting to note that mycobacteria cords display their virulence trait both intracellularly by triggering phagosomal rupture and death of infected cells [66,71–73], but also extracellularly by escaping phagocytosis and thus contributing to bacterial persistence and tissue damage [32]. Therefore, AOs constitute a relevant model to decipher the extracellular lifestyle of Mabs in the bronchial tree where biofilm and cording constitute key structures of Mabs variant pathobiology [74,75].

ROS production is a part of host antimicrobial defence but requires a fine-tuned balance to prevent tissue damage. Indeed, the production of ROS is essential to control infection, as knock-down of NOX2 expressed in immune cells, or inhibition of DUOX2-mediated epithelial ROS production resulted in uncontrolled bacteria proliferation in zebrafish and mouse models [15,76,77]. Here, we showed in airway organoids, that Mabs R infection triggers ROS production, which was further enhanced in CF context as previously described in zebrafish [15]. This

enhanced ROS production is associated with enhanced expression of the epithelial cell ROS production gene DUOX1, concomitantly to the expression of the antioxidant NRF2-NQO1 pathway. Interestingly, boosting the NRF2-NQO1 axis was associated with a better control of Mabs growth in AOs indicating that oxidative stress favours Mabs fitness. Indeed, activation of NRF2 with sulforaphane in CF organoids resulted in better control of Mabs, abolished by NQO1 inhibition using dicoumarol. Only few studies investigated the role of NRF2 in mycobacteria infection [78]. In Mtb-infected macrophages, it has been shown that activation of NRF2 is associated with enhanced bacterial load and cell survival [79], while inhibition of NRF2 or NQO1 ensured a better control of Mtb or BCG infection and host cell survival [80,81], suggesting that NRF2-NQO1 axis, by detoxifying ROS, might play a detrimental role during mycobacteria infection. By contrast, Zhou et al. showed that the activation of NRF2-NQO1 axis induced better control of Mtb [82]. Regarding Mabs infection, as we observed in airway organoids, studies showed that antioxidants resulted in better control of the infection in macrophages and zebrafish [83–85], while a contradictory one showed that knock-down of NRF2, by enhancing ROS level, is associated with a better control of Mabs [86]. Here we showed that cumulative oxidative stress due to both the CF context and Mabs infection might result in a permissive environment for extracellular bacteria growth and the establishment of chronic infection in the lung of CF patients. Because antioxidants did not inhibit Mabs growth and bacterial redox status *in vitro*, our results indicate that ROS production by epithelial cells is sufficient to generate a permissive environment for extracellular Mabs proliferation, which could play a major role in the establishment of Mabs colonization of CF patient airway. Therefore, even with low bacteria internalization by epithelial cells [31] and in the absence of immune cells, AOs recapitulate the contribution of the host NRF2-NQO1 axis on bacteria fitness in the airway, which can be boosted pharmacologically to improve tissue redox homeostasis and to foster infection control in combination with frontline antibiotic treatments, as we exemplified here with cefoxitin. Further investigations are now warranted to integrate ROS production by immune cells, essential to control the intracellular pool of bacteria [15]. Interestingly, treating R Mabs-infected zebrafishes with resveratrol improves fish survival and reduces bacterial load [84], suggesting that enhancing the global defence against ROS by antioxidants would improves Mabs infection control *in vivo*. Nevertheless, it would be interesting to extend the application of airway organoid by integrating innate immune cells to advance our understanding of mucosal immune responses, as previously described for NSCLC lung cancer and the evaluation of anti-tumoral immunotherapies [87,88]. Using a mouse model of CF, CCR2-mediated lung accumulation of monocyte-derived macrophages has been shown to drive neutrophil pulmonary inflammation upon LPS challenge [89]. As macrophages constitute an intracellular replicative niche for Mabs and display microbicidal deficiency in CF [90,91], the organoid technology constitutes a powerful human system to reconstruct the cellular framework of the human airway epithelial-immune niche. This will require in the future to access patient-matched lung biopsy and blood sample in order to co-culture epithelial and immune cells with matched CFTR mutations. Finally, combination of the CFTR modulators and correctors Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor, recently approved by FDA (Trikafta) and EMA (Kaftrio) is a game-changer for the treatment of CF. It is a highly effective therapy designed to correct CFTR folding and function for the treatment of CF patients carrying at least one CFTR delF508 mutation (70% of the patients) [92]. It is associated with clinically meaningful improvements in lung function and respiratory-related quality of life. Since its introduction, clinical observations highlighted that CF patients show a rapid reduction of infection-related hospital visits and antimicrobial use after starting the therapy [93,94], suggesting that by restoring CFTR function, Kaftrio may improve lung ion homeostasis and/or restructure microbial niche. Interestingly, Kaftrio therapy eradicated NTM infection in CF

patients [95]. Interestingly, CF is associated with a defective NRF2 expression, contributing to the excessive oxidative stress and lung tissue damage, whereas CFTR modulators rescue NRF2 function and therefore improve tissue oxidative status [96]. Therefore, CFTR-targeted therapies, by restoring CFTR function and reducing lung tissue redox status, might confer a better control of bacterial infection. But how Kaftrio influences CF-driven new or already established Mabs infection warrants further investigation. By responding to Kaftrio [97], CF AOs constitute the unique model available to further decipher, in a personalized way, the consequences of Kaftrio therapy on CF-driven respiratory infection.

In conclusion, we have established AOs as a pertinent model of both CF airway dysfunction and susceptibility to Mabs infection. Moreover, we have identified the cell protective NRF2-NQO1 axis as a potential therapeutic target to restore CF tissue redox homeostasis and improve the control of bacteria growth. Therefore, our work opens new venues for deciphering the CF-associated extracellular lifestyle of Mabs, the role of critical host redox pathways and identifying innovative therapeutic intervention, as recently exemplified [98].

Materials and methods

Detailed protocols are provided in the supplementary information (S1 Text).

Ethics statements

The collection of patient data and tissue for AOs generation was performed according to the guidelines of the European Network of Research Ethics Committees following European and national law. The accredited ethical committee from CHU Toulouse reviewed and approved the study in accordance with the Medical Research Involving Human Subjects Act. Human lung tissue was provided by the CHU of Toulouse under protocol agreement (CHU 19 244 C and Ref CNRS 205782). As the biological materials consist in surgical waste repurposed for research, all patients participating in this study consented to scientific use of their material by verbal non-opposition statement; patients can withdraw their statement at any time, leading to the prompt disposal of their tissue and any derived material.

Airway organoid culture and maintenance

Healthy adjacent tissue from three donors with lung cancer (women, age 65–67), and biopsies of lung tissue from three cystic fibrosis patients (S1 Table) were used to derive organoids as previously described with minor changes [22,31]. To prevent risk of microbial contamination, airway organoid complete media was supplemented with 10 μg ml^{-1} Normocure (InvivoGen) and 2.5 μg ml^{-1} Fungin (InvivoGen) during the first 4 weeks of the cystic fibrosis airway organoid cultures.

Bacteria culture and organoid infection

Mycobacterium abscessus sensu stricto strain CIP104536T (ATCC19977T) morphotype S and R were grown as previously described [32]. Before infection, AOs were pretreated or no with 10μM Sulforaphane (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA) for 6hr. Bacteria were prepared for microinjection as described before [31,99]. Briefly, bacterial pellets were resuspended in PBS 1x and disaggregated using a 1ml syringe (Terumo) with a blunt needle (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Bacterial density was adjusted to OD_{600} = 0.1–0.4. Initial bacterial load is evaluated by microinjecting the same amount of bacteria in 100μl of PBS 1x and colony forming unit assay. As shown in S5A Fig, this approach gives a representative number of bacteria with reproducible microinjection between H- and CF-AOs. Infected organoids were individually

collected, washed in PBS 1x and embedded into fresh matrix (Matrigel (Corning)). Infected organoids were cultured for 3–4 days if not otherwise stated. Sulforaphane was maintained throughout the experiment and refreshed every two days. When stated, either prior Mabs infection or the second day post infection, 10μM dicoumarol (Sigma-Aldrich) or 20μg/ml cefoxitin (Sigma-Aldrich) were added, with or without sulforaphane.

Microscopy

Live imaging was performed to visualize, quantify and assess cell death with 50 μg ml^{-1} Propidium Iodide (Thermo Scientific), ROS levels by 10μM H2DCFDA (Invitrogen) or 5μM MitoSOX (Thermo Scientific), CFTR function by forskolin-induced organoid swelling assay (2hr with 5μM Forskolin (Sigma-Aldrich)) as described [100], mucus accumulation with 10μM Zinpyr-1 (Santa Cruz Biotechnology), and lipid peroxidation by 2μM BODIPY (Thermo Scientific) in non-infected and Mabs-infected organoids. Images were acquired under an EVOS M7000 Imaging System and analyzed post-acquisition with Fiji/ImageJ.

For Lightsheet imaging, fixed (overnight in 4% paraformaldehyde) airway organoids were stained with propidium iodide (6μg/ml in PBS) for 30 minutes at room temperature then rinsed in PBS. Organoids were then embedded in 1% low-melting agarose inside glass capillaries and imaged in PBS using a light-sheet fluorescence microscope (Zeiss Lightsheet Z.1). The 3D reconstructions were performed with Amira software (v2020.2).

For scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), organoids were fixed in 2% paraformaldehyde (EMS, Hatfield, PA, USA), 2.5% glutaraldehyde (EMS) and 0.1 M Sodium Cacodylate (EMS). Samples were embedding in Durcupan ACM resin (Sigma-Aldrich) then, semi-thin (300nm) serial sections were made using an UC7 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany) and collected on silicon wafers (Ted Pella, Redding, CA, USA). Sections were imaged on a Quanta FEG 250 SEM microscope in BSE mode. Ultrathin sections were also collected on copper grids formvar coated for TEM analysis on a JEOL 1200 EXE II microscope.

Colony forming unit (CFU) assay

At the indicated time point, organoids infected with Mabs were individually harvested and lysed in 100μl of 10% Triton X-100 (Euromedex) in cell culture grade water (Corning). Serial dilutions (factor of 10) were done to yield 10^{-1} to 10^{-5} dilutions of the original lysate and then plated on LB Agar (Invitrogen) in 55mm dishes (Sarstedt). Colonies were counted after an incubation of 4 days at 37˚C.

RT-qPCR

Organoids were collected at day 4 post-infection or stimulation and processed as reported [31]. Briefly, total RNA was extracted from organoids (15 AOs per condition) using the RNeasy mini kit (Qiagen) and retrotranscribed (150ng) with the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). mRNA expression was assessed with an ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) and the SYBR Select Master Mix (Thermo Scientific). Relative quantification was determined using the 2^-ΔΔCt or 2^-ΔCt method, normalized to GAPDH. Primer sequences are provided in S2 Table.

Statistics

Statistical analyses were performed using Prism 8 and 5 (GraphPad Software). Data were compared by Mann-Whitney or unpaired T test and results reported as mean with SD. Data statistically significant was represented by *$P<0.05$; **$P<0.01$; ***$P<0.001$ and **** $P<0.0001$.

Supporting information

S1 Text. Supplementary Information.
(DOCX)

S1 Fig. (A) Kinetics of Mabs S and R growth in H-AO. Graph shows three pooled independent experiments. (B) Growth of *Mycobacterium abscessus subspecie abscessus* (Day 0 n = 3; Day 4 n = 6), *subspecie massiliense* (Day 0 n = 3; Day 4 n = 6), and *subspecie bolletii* (Day 0 n = 3; Day 4 n = 6) in H-AO. Graph shows means ± SEM from two independent experiments. Each dot represents one organoid. **P<0.01 by Mann-Whitney test. (C) Kinetics of *in vitro* growth of *Mycobacterium abscessus subspecie abscessus*, *subspecie massiliense*, and *subspecie bolletii*. Graph represents means from one experiment performed in triplicates. (D-I) 3D light-sheet imaging of airway organoids infected with wasabi (green) Mabs S or R. H-AOs were fixed then stained with propidium iodide to visualize cell nuclei (red) before imaging using Zeiss Lightsheet 1 microscope. (D) XY planes at the indicated z positions of the 400 μm z-stack of an H-AO after infection with Mabs S shown in S1 Movie (10X objective). (E) 3D visualization using AMIRA software of the z-stack of AO after infection with Mabs S. (F) Corner cut from two different angles using AMIRA software through a volume rendering of the nuclei while keeping the Mabs S fluorescent signal. Scale bar: 50 μm. (G) XY planes at the indicated z positions of the 400 μm z-stack of a H-AO after infection with Mabs R shown in S2 Movie (10X objective). (H) 3D visualization using AMIRA software of the z-stack of AO after infection with Mabs R. (I) Corner cut from two different angles using AMIRA software through a volume rendering of the nuclei while keeping the Mabs R fluorescent signal. Scale bar: 50 μm.
(TIF)

S2 Fig. (A) Rows 1 and 2: Transmission electron micrographs of healthy AO infected with Mab-S. Bacteria were found dispersed in loose aggregates in the layer close to the luminal side of the lung epithelium (black asterisk) and excluded from the mucus (white asterisk). Bacteria were not in direct contact with each other and did not show any preferred orientation. An accumulation of fibril-granular material was observed around the aggregates. (B) Transmission electron micrographs of healthy AO infected with Mab-R. Bacteria were found exclusively in the mucus (white asterisk) organized in bundles showing individual cells oriented and in close apposition with each other inside the same bundle.
(TIF)

S3 Fig. (A-C) Expression pattern of inflammatory cytokines (A), antimicrobial peptides (B), and mucins (C) in mock-infected H-AO, or H-AO infected with Mabs S or R for 4 days. Graphs represent means ± SEM from at least three independent experiments, performed in triplicates. *P<0.05; ***P<0.001; ****P<0.0001 by unpaired T test. (D) Kinetics of *in vitro* Mabs S and R growth in absence or presence of 10μM resveratrol. Graph represents means from one experiment performed in triplicates. ns = not significative by Mann-Whitney test. (E-F) Bacterial load by CFU assay of H-AO pre-treated with (+) or without (-) 10μM resveratrol for 1hr before infection with Mabs S (E) (n+ = 7; n- = 6) or R (F) (n+ = 8; n- = 6) for 4 days. Graphs represent means ± SD from at two independent experiments, indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01 by Mann-Whitney test. (G) Kinetics of *in vitro* Mabs S and R growth in absence or presence of 10μM sulforaphane. Graph represents means from one experiment performed in triplicates. ns = not significative by Mann-Whitney test.
(TIF)

S4 Fig. (A, B) Representative bright-field images (A) and quantification (B) of epithelium thickness in healthy AOs (H-AO n = 32) and cystic fibrosis AOs (CF-AO n = 24). Data from three independent wells per donor. (C) Basal expression of mucin genes in H-AO and CF-AO. Graph represents means from three pooled independent experiments, performed in triplicates. **P<0.01; **** P<0.0001; ns = not significative by unpaired T test. (D) Electron micrographs of H-AO and CF-AO revealing mucus accumulation in the lumen and longer cilia in the CF ones. (E) Representative images of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in H-AO and CF-AO after 1hr treatment with 20Mm tBHP or a mix of 5μM rotenone and 5μM antimycin A. (F) Representative images of peroxidized lipids (2μM BODIPY) in H-AO and CF-AO after 2hr treatment with 800μM cumene hydroperoxide. (G) Representative images of the basal propidium iodide incorporation (50 μg ml^{-1}) in H-AO and CF-AO.
(TIF)

S5 Fig. (A) Initial bacterial load evaluation by CFU assay of H-AO and CF-AO infected with Mabs S (H-AO n = 6; CF-AO n = 6) or Mabs R (H-AO n = 6; CF-AO n = 6). (B) MFI quantification of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in H-AO after 4 days of being treated with (+ n = 16) or without (- n = 13) 25μM CFTR inhibitors (CFTRinh-172 and GlyH 101). (C) MFI quantification of propidium iodide incorporation (50 μg ml^{-1}) in H-AO after 4 days of being treated with (+ n = 10) or without (- n = 8) 25μM CFTR inhibitors. (D) Kinetics of Mabs S and R growth in absence or presence of 25μM CFTR inhibitors. Data from one experiment performed in triplicates. (E, F) Bacterial load by CFU assay of H-AO pre-treated with (+) or without (-) 25μM CFTR inhibitors for 2 days before infection with Mabs S (E) (n+ = 6; n- = 6) or R (F) (n+ = 8; n- = 6) for 4 days. (G) Representative images of H-AO pre-treated or not with 25μM CFTR inhibitors for 2 days before infection with Mabs S or R for 4 days. (H) Mean percentage of H-AO untreated (n = 18) or treated (n = 30) with 25μM CFTR inhibitors exhibiting cords after 4 days of infection with Mabs R. (I) MFI quantification of propidium iodide incorporation (50 μg ml^{-1}) in Mock-infected H-AO and CF-AO (H-AO n = 9; CF-AO n = 10) or H-AO and CF-AO infected with Wasabi-labelled Mabs S (H-AO n = 6; CF-AO n = 6) or Mabs R (H-AO n = 13; CF-AO n = 12) for 4 days. (J) MFI quantification of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in Mock-infected CF-AO (CF-AO n = 6) or CF-AO infected with Wasabi-labelled Mabs S (CF-AO n = 11) or Mabs R (CF-AO n = 11) for 3 days. Except otherwise stated, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments indicated by different symbols. Each dot represents one organoid. *P<0.05; **P<0.01; ****P<0.0001; ns = not significative by Mann-Whitney test.
(TIF)

S6 Fig. (A) Basal ratiometric sensor response of Mrx1-roGFP2-expressing Mabs S and R measured. * *P*< 0.05, paired t test of three independent experiments. (B) Mabs S (red) and R (green) expressing Mrx1-roGFP2 were either left untreated (Mock) or exposed to different concentrations of diamide, tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) or cumene hydroperoxide (CHP), and the ratiometric sensor response (405/480 ratio) was measured after 2 h post-exposure. Data represent the Mean± SD of three independent experiments. For S to R comparison, Mock condition was normalized to 1. S to R comparison: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P< 0.0001; Mabs variant to their respective Mock control: # P<0.05, ## P< 0.01, ### P< 0.001. (C) Mabs S (red) and R (green) expressing Mrx1-roGFP2 were either left untreated (Mock) or exposed to different concentrations of diamide, tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) or cumene hydroperoxide (CHP), and bacterial growth in untreated (Mock) or oxidative agent-treated conditions was measured by the McFarland technique measuring bacterial culture turbidity. (D) Representative images of H-AO and CF-AO treated or not with 200μM tBHP for 1

hour before infection with roGFP2-expressing Mabs S for 4 days.
(TIF)

S7 Fig. (A) Representative images of mitochondrial ROS production (5μM MitoSOX) in H-AO and CF-AO after 4 days of being treated or not with 10μM sulforaphane. (B, C) Representative images (B) and MFI quantification (C) of propidium iodide incorporation (50 μg ml^{-1}) in CF-AO pre-treated with (+) or without (-) 10μM sulforaphane for 6 hr before infection with Wasabi-labelled Mabs S (n+ = 6; n- = 6) for 4 days. (D) Representative images of MitoSOX staining in Mock- or Mabs-infected CF organoids treated or not with sulforaphane and cefoxitin, alone or in combination. (E) Mabs S expressing Mrx1-roGFP2 was either left untreated (Mock) or exposed to 5mM diamide, then left untreated or treated with 10μM sulforaphane and/or 20μg/ml cefoxitin, and the ratiometric sensor response (405/480 ratio) was measured after 2 h post-exposure. Data represent the Mean± SD of three independent experiments. * $P<0.05$, by Two-way ANOVA. Except otherwise stated, graphs represent means ± SD from at least two independent experiments, indicate them by different symbols. Each dot represents one organoid. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ by Mann-Whitney test.
(TIF)

S1 Movie. Representative 3D reconstruction of an S Mabs-infected human airway organoid showing green wasabi-expressing bacteria aggregates in the lumen. Nuclei are revealed by staining with propidium iodide (red). Images were acquired on a Zeiss lightsheet 1 microscope, and combined for 3D visualization using the AMIRA software.
(MP4)

S2 Movie. Representative 3D reconstruction of an R Mabs-infected human airway organoid showing green wasabi-expressing bacteria forming cords in the lumen. Nuclei are revealed by staining with propidium iodide (red). Images were acquired on a Zeiss lightsheet 1 microscope, and combined for 3D visualization using the AMIRA software.
(MP4)

S1 Table. Clinical data from CF patients who underwent lung transplantation and from who a lung biopsy was obtained to derive airway organoids.
(DOCX)

S2 Table. For each gene analyzed, list of forward and reverse primers and related bibliography.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Nicole Schieber (EMBL Heidelberg, Germany) for sharing with us the embedding protocol. We thank Veronique Richard and Franck Godiard from the "Microscopie Electronique et Analytique" service of the University of Montpellier for assistance in ultramicrotomy and TEM, respectively. We thank Bruno Payre from the "Centre de Microscopie Electronique pour la Biologie" of the University of Toulouse 3 for his assistance in SEM. The authors thank Sophie Manzi for technical assistance with the Mrx1-roGFP2 strains. This manuscript was edited at Life Science Editors.

Author Contributions

Conceptualization: Stephen Adonai Leon-Icaza, Salimata Bagayoko, Romain Vergé, Nino Iakobachvili, Chloé Ferrand, Talip Aydogan, Célia Bernard, Angelique Sanchez Dafun,

Marlène Murris-Espin, Julien Mazières, Pierre Jean Bordignon, Pascale Bernes-Lasserre, Victoria Ramé, Jean-Michel Lagarde, Julien Marcoux, Marie-Pierre Bousquet, Christian Chalut, Hans Clevers, Peter J. Peters, Virginie Molle, Geanncarlo Lugo-Villarino, Kaymeuang Cam, Laurence Berry, Etienne Meunier, Céline Cougoule.

Funding acquisition: Peter J. Peters, Virginie Molle, Geanncarlo Lugo-Villarino, Laurence Berry, Etienne Meunier, Céline Cougoule.

Investigation: Stephen Adonai Leon-Icaza, Salimata Bagayoko, Nino Iakobachvili, Chloé Ferrand, Talip Aydogan, Célia Bernard, Pierre Jean Bordignon, Christian Chalut, Kaymeuang Cam, Céline Cougoule.

Methodology: Stephen Adonai Leon-Icaza, Salimata Bagayoko, Romain Vergé, Nino Iakobachvili, Chloé Ferrand, Talip Aydogan, Célia Bernard, Angelique Sanchez Dafun, Marlène Murris-Espin, Julien Mazières, Pierre Jean Bordignon, Serge Mazères, Pascale Bernes-Lasserre, Victoria Ramé, Jean-Michel Lagarde, Julien Marcoux, Marie-Pierre Bousquet, Christian Chalut, Hans Clevers, Peter J. Peters, Virginie Molle, Geanncarlo Lugo-Villarino, Kaymeuang Cam, Laurence Berry, Etienne Meunier, Céline Cougoule.

Resources: Marlène Murris-Espin, Julien Mazières, Jean-Michel Lagarde, Christophe Guilhot, Hans Clevers, Peter J. Peters, Virginie Molle, Laurence Berry, Etienne Meunier, Céline Cougoule.

References

1. Dechecchi MC, Tamanini A, Cabrini G. Molecular basis of cystic fibrosis: from bench to bedside. Ann Transl Med. 2018; 6: 334–334. https://doi.org/10.21037/atm.2018.06.48 PMID: 30306073
2. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. Front Pharmacol. 2019; 10: 1662. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01662 PMID: 32153386
3. Lopeman RC, Harrison J, Desai M, Cox JAG. Mycobacterium abscessus: Environmental bacterium turned clinical nightmare. Microorganisms. 2019;7. https://doi.org/10.3390/microorganisms7030090 PMID: 30909391
4. Koh WJ, Stout JE, Yew WW. Advances in the management of pulmonary disease due to Mycobacterium abscessus complex. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. International Union against Tubercul. and Lung Dis.; 2014. pp. 1141–1148. https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0134 PMID: 25216826
5. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, 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 Suppl 1: i1–i22. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360 PMID: 26666259
6. Johansen MD, Herrmann J-L, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. Nature Reviews Microbiology 2020 18:7. 2020; 18: 392–407. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1 PMID: 32086501
7. Clary G, Sasindran SJ, Nesbitt N, Mason L, Cole S, Azad A, et al. Mycobacterium abscessus smooth and rough morphotypes form antimicrobial-tolerant biofilm phenotypes but are killed by acetic acid. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62. https://doi.org/10.1128/AAC.01782-17 PMID: 29311080
8. Gutiérrez AV, Viljoen A, Ghigo E, Herrmann J-L, Kremer L. Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the Mycobacterium abscessus Complex. Front Microbiol. 2018; 9: 1145. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01145 PMID: 29922253
9. To K, Cao R, Yegiazaryan A, Owens J, Venketaraman V. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus. J Clin Med. 2020; 9: 1–24. https://doi.org/10.3390/jcm9082541 PMID: 32781595
10. Jönsson BE, Gilljam M, Lindblad A, Ridell M, Wold AE, Welinder-Olsson C. Molecular Epidemiology of Mycobacterium abscessus, with Focus on Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol. 2007; 45: 1497. https://doi.org/10.1128/JCM.02592-06 PMID: 17376883

11. Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, 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 (Reading). 2006; 152: 1581–1590. https://doi.org/10.1099/mic.0.28625-0 PMID: 16735722
12. Le Moigne V, Raynaud C, Moreau F, Dupont C, Nigou J, Neyrolles O, et al. Efficacy of bedaquiline, alone or in combination with imipenem, against Mycobacterium abscessus in C3HeB/FeJ mice. Antimicrob Agents Chemother. 2020 [cited 14 Apr 2020]. https://doi.org/10.1128/AAC.00114-20 PMID: 32253217
13. Byrd TF, Lyons CR. Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection. Infect Immun. 1999; 67: 4700–4707. https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4700-4707.1999 PMID: 10456919
14. Bernut A, Le Moigne V, Lesne T, Lutfalla G, Herrmann JL, Kremer L. In Vivo assessment of drug efficacy against Mycobacterium abscessus using the embryonic zebrafish test system. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58: 4054–4063. https://doi.org/10.1128/AAC.00142-14 PMID: 24798271
15. Bernut A, Dupont C, Ogryzko N V., Neyret A, Herrmann JL, Floto RA, et al. CFTR Protects against Mycobacterium abscessus Infection by Fine-Tuning Host Oxidative Defenses. Cell Rep. 2019; 26: 1828–1840.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.071 PMID: 30759393
16. Lefebvre AL, Le Moigne V, Bernut A, Veckerlé C, Compain F, Herrmann JL, et al. Inhibition of the β-lactamase BlaMab by avibactam improves the in vitro and in vivo efficacy of imipenem against Mycobacterium abscessus. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61. https://doi.org/10.1128/AAC.02440-16 PMID: 28096155
17. Lopez A, Shoen C, Cynamon M, Dimitrakopoulou D, Paiola M, Pavelka MS, et al. Developing tadpole xenopus laevis as a comparative animal model to study Mycobacterium abscessus pathogenicity. Int J Mol Sci. 2021; 22: 1–12. https://doi.org/10.3390/ijms22020806 PMID: 33467397
18. Bernut A, Herrmann J-L, Ordway D, Kremer L. The Diverse Cellular and Animal Models to Decipher the Physiopathological Traits of Mycobacterium abscessus Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7: 100. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00100 PMID: 28421165
19. McCarron A, Parsons D, Donnelley M. Animal and Cell Culture Models for Cystic Fibrosis: Which Model Is Right for Your Application? Am J Pathol. 2021; 191: 228–242. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.10.017 PMID: 33232694
20. McCarron A, Donnelley M, Parsons D. Airway disease phenotypes in animal models of cystic fibrosis. Respir Res. 2018; 19: 1–12. https://doi.org/10.1186/S12931-018-0750-Y/METRICS
21. Semaniakou A, Croll RP, Chappe V. Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. Front Pharmacol. 2018;9. https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.01475 PMID: 30662403
22. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. EMBO J. 2019;38. https://doi.org/10.15252/embj.2018100300 PMID: 30643021
23. Iakobachvili N, Peters PJ. Humans in a dish: The potential of organoids in modeling immunity and infectious diseases. Front Microbiol. 2017;8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02402 PMID: 29259597
24. de Winter–de Groot KM, Berkers G, Marck–van der Wilt REP, van der Meer R, Vonk A, Dekkers JF, et al. Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations. Journal of Cystic Fibrosis. 2020; 19: 614–619. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.022 PMID: 31735562
25. Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, Vonk A, De Jonge HR, Janssens HM, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. Sci Transl Med. 2016; 8: 344ra84–344ra84. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8278 PMID: 27334259
26. Bagayoko S, Leon-Icaza SA, Pinilla M, Hessel A, Santoni K, Péricat D, et al. Host phospholipid peroxidation fuels ExoU-dependent cell necrosis and supports Pseudomonas aeruginosa-driven pathology. PLoS Pathog. 2021;17. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009927 PMID: 34516571
27. Kronemberger GS, Carneiro FA, Rezende DF, Baptista LS. Spheroids and organoids as humanized 3D scaffold-free engineered tissues for SARS-CoV-2 viral infection and drug screening. Artificial Organs. Blackwell Publishing Inc.; 2021. https://doi.org/10.1111/aor.13880 PMID: 33264436
28. Mykytyn AZ, Breugem TI, Riesebosch S, Schipper D, van den Doel PB, Rottier RJ, et al. Sars-cov-2 entry into human airway organoids is serine protease-mediated and facilitated by the multibasic cleavage site. Elife. 2021; 10: 1–23. https://doi.org/10.7554/eLife.64508 PMID: 33393462
29. Han Y, Duan X, Yang L, Nilsson-Payant BE, Wang P, Duan F, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. Nature. 2021; 589: 270–275. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2901-9 PMID: 33116299

30. Heo I, Dutta D, Schaefer DA, Iakobachvili N, Artegiani B, Sachs N, et al. Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. Nat Microbiol. 2018; 3: 814–823. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0177-8 PMID: 29946163

31. Iakobachvili N, Leon-Icaza SA, Knoops K, Sachs N, Mazères S, Simeone R, et al. Mycobacteria-host interactions in human bronchiolar airway organoids. Mol Microbiol. 2021; 00: 1–11. https://doi.org/10.1111/mmi.14824 PMID: 34605588

32. Bernut A, Herrmann JL, Kissa K, Dubremetz JF, Gaillard JL, Lutfalla G, et al. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111: E943–E952. https://doi.org/10.1073/pnas.1321390111 PMID: 24567393

33. McCutcheon J, Southam G. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation. Chem Geol. 2018; 498: 115–127. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016

34. Parmar S, Tocheva EI. The cell envelope of Mycobacterium abscessus and its role in pathogenesis. PLoS Pathog. 2023; 19: e1011318. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011318 PMID: 37200238

35. Julián E, Roldán M, Sánchez-Chardi A, Astola O, Agustí G, Luquin M. Microscopic Cords, a Virulence-Related Characteristic of Mycobacterium tuberculosis, Are Also Present in Nonpathogenic Mycobacteria. J Bacteriol. 2010; 192: 1751. https://doi.org/10.1128/JB.01485-09 PMID: 20097851

36. Winklhofer-Roob BM. Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis: the concept of an oxidant-antioxidant imbalance. Acta Paediatr Suppl. 1994; 83: 49–57. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1994.tb13229.x PMID: 8025360

37. Causer AJ, Shute JK, Cummings MH, Shepherd AI, Gruet M, Costello JT, et al. Circulating biomarkers of antioxidant status and oxidative stress in people with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. Redox Biol. 2020;32. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101436 PMID: 32044291

38. Rothchild AC, Olson GS, Nemeth J, Amon LM, Mai D, Gold ES, et al. Alveolar macrophages generate a noncanonical NRF2-driven transcriptional response to Mycobacterium tuberculosis in vivo. Sci Immunol. 2019;4. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw6693 PMID: 31350281

39. Nakajima M, Matsuyama M, Kawaguchi M, Kiwamoto T, Matsuno Y, Morishima Y, et al. NRF2 regulates granuloma formation and macrophage activation during mycobacterium avium infection via mediating nramp1 and ho-1 expressions. mBio. 2021; 12: 1–17. https://doi.org/10.1128/mBio.01947-20 PMID: 33563837

40. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen H V., Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. 2014; 13: 403–409. https://doi.org/10.1016/J.JCF.2013.12.003 PMID: 24440181

41. Koch RE, Hill GE. An assessment of techniques to manipulate oxidative stress in animals. Funct Ecol. 2017; 31: 9–21. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12664/SUPPINFO

42. Benabdeslam H, Abidi H, Garcia I, Bellon G, Gilly R, Revol A. Lipid peroxidation and antioxidant defenses in cystic fibrosis patients. Clin Chem Lab Med. 1999; 37: 511–516. https://doi.org/10.1515/CCLM.1999.082 PMID: 10418740

43. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019. https://doi.org/10.1155/2019/5080843 PMID: 31737171

44. Juan CA, de la Lastra JMP, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. Int J Mol Sci. 2021; 22: 4642. https://doi.org/10.3390/ijms22094642 PMID: 33924958

45. Bhaskar A, Chawla M, Mehta M, Parikh P, Chandra P, Bhave D, et al. Reengineering redox sensitive GFP to measure mycothiol redox potential of Mycobacterium tuberculosis during infection. PLoS Pathog. 2014;10. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003902 PMID: 24497832

46. Kurz SG, Zha BS, Herman DD, Holt MR, Daley CL, Ruminjo JK, et al. Summary for clinicians: 2020 clinical practice guideline summary for the treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. Ann Am Thorac Soc. 2020; 17: 1033–1039. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.202003-222CME PMID: 32870060

47. Graeber SY, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Hirtz S, van der Ent CK, et al. Comparison of Organoid Swelling and In Vivo Biomarkers of CFTR Function to Determine Effects of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for the F508del Mutation. Am J Respir Crit Care Med. 2020; 202: 1589–1592. https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1200LE PMID: 32687398

48. Anderson JD, Liu Z, Odom LV, Kersh L, Guimbellot JS. CFTR function and clinical response to modulators parallel nasal epithelial organoid swelling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2021; 321: L119–L129. https://doi.org/10.1152/ajplung.00639.2020 PMID: 34009038

49. Aalbers BL, Brunsveld JE, van der Ent CK, van den Eijnden JC, Beekman JM, Heijerman HGM. Forskolin induced swelling (FIS) assay in intestinal organoids to guide eligibility for compassionate use treatment in a CF patient with a rare genotype. J Cyst Fibros. 2022; 21: 254–257. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.01.008 PMID: 35110005

50. de Winter-De Groot KM, Janssens HM, van Uum RT, Dekkers JF, Berkers G, Vonk A, et al. Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as a biomarker of CFTR function. Eur Respir J. 2018;52. https://doi.org/10.1183/13993003.02529-2017 PMID: 30166324

51. de Bari L, Favia M, Bobba A, Lassandro R, Guerra L, Atlante A. Aberrant GSH reductase and NOX activities concur with defective CFTR to pro-oxidative imbalance in cystic fibrosis airways. J Bioenerg Biomembr. 2018; 50: 117–129. https://doi.org/10.1007/s10863-018-9748-x PMID: 29524019

52. Lamers MM, van der Vaart J, evin Knoops K, Riesebosch S, Breugem TI, Mykytyn AZ, et al. An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar type II-like cells. EMBO J. 2021; 40: e105912. https://doi.org/10.15252/embj.2020105912 PMID: 33283287

53. Zhou J, Li C, Sachs N, Chiu MC, Wong BHY, Chu H, et al. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018; 115: 6822–6827. https://doi.org/10.1073/pnas.1806308115 PMID: 29891677

54. Furukawa BS, Flume PA. Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. Semin Respir Crit Care Med. 2018; 39: 383–391. https://doi.org/10.1055/s-0038-1651495 PMID: 30071553

55. Qvist T, Taylor-Robinson D, Waldmann E, Olesen HV, Hansen CR, Mathiesen IH, et al. Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2016; 15: 380–385. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.007 PMID: 26482717

56. Qvist T, Eickhardt S, Kragh KN, Andersen CB, Iversen M, Høiby N, et al. Chronic pulmonary disease with Mycobacterium abscessus complex is a biofilm infection. Eur Respir J. 2015; 46: 1823–1826. https://doi.org/10.1183/13993003.01102-2015 PMID: 26493807

57. Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of Mycobacterium tuberculosis. Nat Commun. 2021;12. https://doi.org/10.1038/S41467-021-21748-6 PMID: 33707445

58. Esteban J, García-Coca M. Mycobacterium Biofilms. Front Microbiol. 2018;8. https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02651 PMID: 29403446

59. Kolpen M, Kragh KN, Enciso JB, Faurholt-Jepsen D, Lindegaard B, Egelund GB, et al. Bacterial biofilms predominate in both acute and chronic human lung infections. Thorax. 2022; 77: 1015–1022. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217576 PMID: 35017313

60. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. Nat Rev Microbiol. 2022;20. https://doi.org/10.1038/S41579-022-00767-0 PMID: 35922483

61. Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS Suppl. 2013; 1–51. https://doi.org/10.1111/apm.12099 PMID: 23635385

62. Wu B (Catherine), Haney EF, Akhoundsadegh N, Pletzer D, Trimble MJ, Adriaans AE, et al. Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents. npj Biofilms and Microbiomes 2021 7:1. 2021; 7: 1–13. https://doi.org/10.1038/s41522-020-00182-4 PMID: 33495449

63. Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, McFarland R, Vickery TW, Ray JP, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. Cell. 2012; 148: 434. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.023 PMID: 22304914

64. Roux AL, Viljoen A, Bah A, Simeone R, Bernut A, Laencina L, et al. The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages. Open Biol. 2016;6. https://doi.org/10.1098/rsob.160185 PMID: 27906132

65. Ufimtseva EG, Eremeeva NI, Petrunina EM, Umpeleva T V., Bayborodin SI, Vakhrusheva D V., et al. Mycobacterium tuberculosis cording in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis is likely associated with increased mycobacterial virulence. Tuberculosis. 2018; 112: 1–10. https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.07.001 PMID: 30205961

66. Lerner TR, Queval CJ, Lai RP, Russell MRG, Fearns A, Greenwood DJ, et al. Mycobacterium tuberculosis cords within lymphatic endothelial cells to evade host immunity. JCI Insight. 2020;5. https://doi.org/10.1172/jci.insight.136937 PMID: 32369443

67. Kam JY, Hortle E, Krogman E, Warner SE, Wright K, Luo K, 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. https://doi.org/10.1038/S41467-022-28638-5 PMID: 35177649

68. Roca FJ, Ramakrishnan L. TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Cell. 2013; 153: 521. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.03.022 PMID: 23582643

69. Roca FJ, Whitworth LJ, Prag HA, Murphy MP, Ramakrishnan L. TNF induces pathogenic mitochondrial ROS in tuberculosis through reverse electron transport. Science. 2022; 376: eabh2841. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABH2841 PMID: 35737799

70. Berg RD, Levitte S, O'Sullivan MP, O'Leary SM, Cambier CJ, Cameron J, et al. Lysosomal Disorders Drive Susceptibility to Tuberculosis by Compromising Macrophage Migration. Cell. 2016; 165: 139. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.034 PMID: 27015311

71. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium tuberculosis. Cell. 2014; 159: 1497–1509. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024 PMID: 25525872

72. Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, Chu F, Takaki KK, Cameron J, et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017; 114: 1371–1376. https://doi.org/10.1073/pnas.1620133114 PMID: 28119503

73. Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan L. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. Immunity. 2017; 47: 552. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.003 PMID: 28844797

74. Degiacomi G, Sammartino JC, Chiarelli LR, Riabova O, Makarov V, Pasca MR. Mycobacterium abscessus, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. Int J Mol Sci. 2019;20. https://doi.org/10.3390/IJMS20235868 PMID: 31766758

75. López-Roa P, Esteban J, Muñoz-Egea MC. Updated Review on the Mechanisms of Pathogenicity in Mycobacterium abscessus, a Rapidly Growing Emerging Pathogen. Microorganisms. 2023;11. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11010090 PMID: 36677382

76. Chao WC, Yen CL, Hsieh CY, Huang YF, Tseng YL, Nigrovic PA, et al. Mycobacterial infection induces higher interleukin-1β and dysregulated lung inflammation in mice with defective leukocyte NADPH oxidase. PLoS One. 2017;12. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0189453 PMID: 29228045

77. Le Moigne V, Rincon DR, Glatigny S, Dupont CM, Langevin C, Ali Said AA, et al. Roscovitine Worsens Mycobacterium abscessus Infection by Reducing DUOX2-mediated Neutrophil Response. Am J Respir Cell Mol Biol. 2022; 66: 439–451. https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0406OC PMID: 35081328

78. Matsuyama M, Hizawa N, Nonaka M, Nakajima M, Morishima Y, Ishii Y. The Role of NRF2 in Mycobacterial Infection. Antioxidants. 2021; 10: 1861. https://doi.org/10.3390/antiox10121861 PMID: 34942964

79. Sun Q, Shen X, Ma J, Lou H, Zhang Q. Activation of NRF2 signaling by oltipraz inhibits death of human macrophages with mycobacterium tuberculosis infection. Biochem Biophys Res Commun. 2020; 531: 312–319. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.026 PMID: 32800560

80. Li Q, Karim AF, Ding X, Das B, Dobrowolski C, Gibson RM, et al. Novel high throughput pooled shRNA screening identifies NQO1 as a potential drug target for host directed therapy for tuberculosis. Sci Rep. 2016;6. https://doi.org/10.1038/SREP27566 PMID: 27297123

81. Wan H, Cai Y, Xiao L, Ling Y, Ge L, Mo S, et al. JFD, a Novel Natural Inhibitor of Keap1 Alkylation, Suppresses Intracellular Mycobacterium Tuberculosis Growth through Keap1/NRF2/SOD2-Mediated ROS Accumulation. Oxid Med Cell Longev. 2023;2023. https://doi.org/10.1155/2023/6726654 PMID: 36819778

82. Zhou J, Fang F, Qi J, Li T, Zhang L, Liu H, et al. Activation of NRF2 modulates protective immunity against Mycobacterium tuberculosis infection in THP1-derived macrophages. Free Radic Biol Med. 2022; 193: 177–189. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.10.274 PMID: 36244589

83. Bonay M, Roux AL, Floquet J, Retory Y, Herrmann JL, Lofaso F, et al. Caspase-independent apoptosis in infected macrophages triggered by sulforaphane via NRF2/p38 signaling pathways. Cell Death Discov. 2015; 1: 1. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.22 PMID: 27551455

84. Kim YJ, Lee SH, Jeon SM, Silwal P, Seo JY, Hanh BTB, et al. Sirtuin 3 is essential for host defense against Mycobacterium abscessus infection through regulation of mitochondrial homeostasis. Virulence. 2020; 11: 1225–1239. https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809961 PMID: 32835604

85. Oberley-Deegan RE, Rebits BW, Weaver MR, Tollefson AK, Bai X, McGibney M, et al. An oxidative environment promotes growth of Mycobacterium abscessus. Free Radic Biol Med. 2010; 49: 1666–1673. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.026 PMID: 20807564

86. Abdalla MY, Ahmad IM, Switzer B, Britigan BE. Induction of heme oxygenase-1 contributes to survival of Mycobacterium abscessus in human macrophages-like THP-1 cells. Redox Biol. 2015; 4: 328–339. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.012 PMID: 25638774

87. Balážová K, Clevers H, Dost AFM. The role of macrophages in non-small cell lung cancer and advancements in 3D co-cultures. Elife. 2023;12. https://doi.org/10.7554/eLife.82998 PMID: 36809334

88. Dooling LJ, Andrechak JC, Hayes BH, Kadu S, Zhang W, Pan R, et al. Cooperative phagocytosis of solid tumours by macrophages triggers durable anti-tumour responses. Nature Biomedical Engineering 2023. 2023; 1–16. https://doi.org/10.1038/s41551-023-01031-3 PMID: 37095318

89. Öz HH, Cheng EC, Di Pietro C, Tebaldi T, Biancon G, Zeiss C, et al. Recruited monocytes/macrophages drive pulmonary neutrophilic inflammation and irreversible lung tissue remodeling in cystic fibrosis. Cell Rep. 2022; 41: 111797. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111797 PMID: 36516754

90. Di A, Brown ME, Deriy L V., Li C, Szeto FL, Chen Y, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. Nat Cell Biol. 2006; 8: 933–944. https://doi.org/10.1038/ncb1456 PMID: 16921366

91. Deriy L V., Gomez EA, Zhang G, Beacham DW, Hopson JA, Gallan AJ, et al. Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages. J Biol Chem. 2009; 284: 35926–35938. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057372 PMID: 19837664

92. Dave K, Dobra R, Scott S, Saunders C, Matthews J, Simmonds NJ, et al. Entering the era of highly effective modulator therapies. Pediatr Pulmonol. 2021; 56: S79–S89. https://doi.org/10.1002/ppul.24968 PMID: 33434412

93. Miller AC, Harris LM, Cavanaugh JE, Abou Alaiwa M, Stoltz DA, Hornick DB, et al. The Rapid Reduction of Infection-Related Visits and Antibiotic Use Among People With Cystic Fibrosis After Starting Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor. Clin Infect Dis. 2022; 75: 1115. https://doi.org/10.1093/cid/ciac117 PMID: 35142340

94. O'Shea KM, O'Carroll OM, Carroll C, Grogan B, Connolly A, O'Shaughnessy L, et al. Efficacy of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis and advanced lung disease. Eur Respir J. 2021;57. https://doi.org/10.1183/13993003.03079-2020 PMID: 33154033

95. Wiesel V, Aviram M, Mei-Zahav M, Dotan M, Prais D, Cohen-Cymberknoh M, et al. Eradication of Nontuberculous Mycobacteria in People with Cystic Fibrosis Treated with Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor: A Multicenter Cohort Study. J Cyst Fibros. 2023 [cited 4 Jul 2023]. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2023.05.003 PMID: 37173154

96. Borcherding DC, Siefert ME, Lin S, Brewington J, Sadek H, Clancy JP, et al. Clinically approved CFTR modulators rescue NRF2 dysfunction in cystic fibrosis airway epithelia. Journal of Clinical Investigation. 2019; 129: 3448–3463. https://doi.org/10.1172/JCI96273 PMID: 31145101

97. Amatngalim GD, Rodenburg LW, Aalbers BL, Raeven HHM, Aarts EM, Sarhane D, et al. Measuring cystic fibrosis drug responses in organoids derived from 2D differentiated nasal epithelia. Life Sci Alliance. 2022;5. https://doi.org/10.26508/lsa.202101320 PMID: 35922154

98. Alcaraz M, Roquet-Banères F, Leon-Icaza SA, Abendroth J, Boudehen Y-M, Cougoule C, et al. Efficacy and Mode of Action of a Direct Inhibitor of Mycobacterium abscessus InhA. ACS Infect Dis. 2022;8. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00314 PMID: 36107992

99. Lastrucci C, Bénard A, Balboa L, Pingris K, Souriant S, Poincloux R, et al. Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. Cell Res. 2015; 25: 1333–1351. https://doi.org/10.1038/cr.2015.123 PMID: 26482950

100. Boj SF, Vonk AM, Statia M, Su J, Vries RRG, Beekman JM, et al. Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. J Vis Exp. 2017;2017. https://doi.org/10.3791/55159 PMID: 28287550

III. Discussion et perspectives

En collaboration avec l'équipe du Dr E. Meunier, nous avons montré que les organoïdes pulmonaires constituaient un modèle pertinent à la fois pour l'étude des dysfonctionnements pulmonaires associés à la mucoviscidose et pour l'étude d'une infection par *M. abscessus*. Les données obtenues suggèrent que l'environnement oxydatif de l'organoïde CF favorise la prolifération de *M. abscessus*, expliquant en partie pourquoi les patients atteints de mucoviscidose sont aussi sensibles aux infections par ce pathogène.

En accord avec ce résultat, nous avons également montré qu'un traitement antibiotique à la céfoxitine combiné à une molécule antioxydante, diminuait la viabilité bactérienne au sein des organoïdes CF. Ces données démontrent l'intérêt des organoïdes pour la mise au point de stratégies de traitements plus efficaces contre *M. abscessus*. La création d'une banque de lignées d'organoïdes CF contenant les diverses mutations génétiques *CFTR* retrouvées chez les patients pourrait être un outil précieux pour aller vers une médecine personnalisée, la sensibilité des isolats cliniques pouvant être testée dans un environnement proche de celui de l'individu infecté.

Compte tenu des similitudes entre l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose et les organoïdes CF, nous pourrions également envisager d'utiliser ce modèle pour étudier les mutations conduisant à une meilleure tolérance de *M. abscessus* aux antibiotiques. Dans ce contexte, des organoïdes CF infectés par *M. abscessus* seraient exposés à des concentrations en antibiotique utilisées en clinique. La tolérance étant un processus adaptatif lié à l'environnement, cette approche permettrait une évolution des bactéries dans des conditions plus proches de celles rencontrées chez les patients.

Enfin, les données obtenues d'après les expériences d'infections des organoïdes par *M. abscessus* ne reposent que sur l'interaction de la bactérie avec les cellules épithéliales constituants ces structures. Or, dans les voies respiratoires des patients, *M. abscessus* est également exposé à la réponse immunitaire de l'hôte, impliquant des cellules phagocytaires, telles que les macrophages alvéolaires, et l'activation de la réponse immunitaire adaptative (voir Chapitre II, Partie II et IV de l'introduction). Dans ce contexte, il

serait pertinent de complexifier ce modèle d'étude, en injectant des macrophages alvéolaires au sein de la lumière de l'organoïde, en contact direct avec *M. abscessus*. Cette approche permettrait de mettre en évidence l'impact d'un traitement antibiotique combiné à la réponse cellulaire et immunitaire de l'hôte sur l'évolution de la tolérance ou de la résistance chez cette bactérie et ouvrirait la porte à de nouvelles stratégies de lutte contre ce pathogène émergent.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Identification des déterminants génétiques et mécanismes associés à la tolérance chez *Mycobacterium abscessus*.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence pour la première fois, l'implication du régulateur transcriptionnel WhiB7 ainsi que l'importance de l'homéostasie rédox et métabolique dans le phénotype de tolérance à la céfoxitine de *M. abscessus*. Nous avons démontré qu'une perturbation de la voie de biosynthèse de la L-sérine suite à l'acquisition d'une mutation génétique, induisait une perturbation de l'homéostasie rédox permettant la surexpression de *whiB7* et le phénotype de tolérance de la souche mutante MABserB2 à la céfoxitine. Ce mutant présente également une diminution de sensibilité à deux autres antibiotiques utilisés en clinique, l'imipénème et la moxifloxacine. Il reste à identifier, le ou les gènes du régulon de WhiB7 impliqué(s) dans le phénotype de tolérance du mutant. Un point remarquable à ces découvertes est que ce régulateur semble être un élément clé, à la fois pour la résistance et pour la tolérance aux antibiotiques.

Pour vérifier que nos résultats ont un sens d'un point de vue clinique, il pourrait être pertinent de déterminer si des mutations dans les voies de biosynthèses des acides-aminés ou dans des processus clés de régulation de l'homéostasie rédox sont retrouvées au sein d'isolats cliniques de *M. abscessus* et si elles sont associées à une modulation de la tolérance aux antibiotiques. Cibler les facteurs impactés par ces mutations pourrait conduire à la mise en place de nouvelles stratégies de lutte contre cette bactérie.

Impact de la tolérance sur la persistance de *Mycobacterium abscessus in vivo* et l'acquisition de mutations de résistance.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai tenté sans succès d'établir un lien entre le phénotype de tolérance du mutant MABserB2 et sa faculté à survivre de manière prolongée dans le modèle murin ou à acquérir des mutations de résistance aux antibiotiques. Ces études restent cependant très pertinentes et mériteraient d'être reproduites et poursuivies pour consolider l'importance de la tolérance aux antibiotiques dans l'échec des traitements contre *M. abscessus*.

Dans ce contexte, il serait intéressant de vérifier par des analyses génétiques comparatives longitudinales si des isolats cliniques issus de patients traités par des antibiotiques accumulent des mutations associées à une tolérance accrue au cours du temps pour établir une corrélation entre adaptation chez l'hôte et traitement aux antibiotiques. Il est à noter que les patients atteints de mucoviscidose sont très souvent traités pour des infections autres que *M. abscessus*. Les antibiotiques utilisés sont le plus souvent inefficaces contre *M. abscessus* mais leur utilisation répétée pourrait conduire à une augmentation de la tolérance chez ce pathogène par un mécanisme de tolérance croisé, et à une meilleure adaptation à l'hôte. Il est à noter que l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse travaille en collaboration avec des cliniciens qui disposent d'un large panel de souches cliniques de *M. abscessus*, rendant possible la mise en œuvre de ces analyses.

Mise au point d'un modèle d'organoïde pulmonaire pour l'étude de la sensibilité de *Mycobacterium abscessus* aux antibiotiques.

Le dernier axe de ma thèse a porté sur le développement du modèle d'organoïde pulmonaire pour l'étude de l'infection et de la sensibilité aux antibiotiques de *M. abscessus*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr E. Meunier à l'IPBS. Au cours de ces travaux, nous avons montré que les organoïdes pouvaient être utilisés afin de prédire l'efficacité des antibiotiques et proposons leur utilisation pour mettre en place de nouvelles stratégies de lutte contre *M. abscessus*.

Une perspective intéressante à ce travail de thèse serait d'utiliser les organoïdes pulmonaires comme alternative aux différents modèles animaux utilisés encore en laboratoire et en clinique. En plus de reproduire plus précisément l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose, ces structures permettraient une médecine personnalisée où la sensibilité des isolats cliniques de *M. abscessus* serait testée dans des organoïdes exprimant une mutation *CFTR identique* à celle du patient.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelaal, H.F.M., Chan, E.D., Young, L., Baldwin, S.L., and Coler, R.N. (2022) *Mycobacterium abscessus*: It's complex. *Microorganisms* **10**: 1454.

Abendroth, J., Gardberg, A.S., Robinson, J.I., Christensen, J.S., Staker, B.L., Myler, P.J., *et al.* (2011) SAD phasing using iodide ions in a high-throughput structural genomics environment. *J Struct Funct Genomics* **12**: 83–95.

Acker, H.V., Sass, A., Bazzini, S., Roy, K.D., Udine, C., Messiaen, T., *et al.* (2013) Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLOS ONE* **8**: e58943.

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

Adékambi, T., Colson, P., and Drancourt, M. (2003) rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **41**: 5699–5708.

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

Adolph, C., McNeil, M.B., and Cook, G.M. (2022) Impaired succinate oxidation prevents growth and influences drug susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **13**: e0167222.

Akif, M., Khare, G., Tyagi, A.K., Mande, S.C., and Sardesai, A.A. (2008) Functional studies of multiple thioredoxins from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **190**: 7087–7095.

Alcaide, F., Pfyffer, G.E., and Telenti, A. (1997) Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2270–2273.

Anand, K., Tripathi, A., Shukla, K., Malhotra, N., Jamithireddy, A.K., Jha, R.K., *et al.* (2021) *Mycobacterium tuberculosis* SufR responds to nitric oxide via its 4Fe–4S cluster and regulates Fe–S cluster biogenesis for persistence in mice. *Redox Biol* **46**: 102062.

Arora, G., Tiwari, P., Mandal, R.S., Gupta, A., Sharma, D., Saha, S., and Singh, R. (2014) High throughput screen identifies small molecule inhibitors specific for *Mycobacterium tuberculosis* phosphoserine phosphatase. *J Biol Chem* **289**: 25149–25165.

Bachhawat, A.K., and Yadav, S. (2018) The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ-glutamyl cycle. *IUBMB Life* **70**: 585–592.

Bakala N'Goma, J.C., Le Moigne, V., Soismier, N., Laencina, L., Le Chevalier, F., Roux, A.-L., *et al.* (2015) *Mycobacterium abscessus* Phospholipase C expression is induced during coculture within Amoebae and enhances *M. abscessus* virulence in mice. *Infect Immun* **83**: 780–791.

Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., *et al.* (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol* .

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622–1625.

Barik, S., Sureka, K., Mukherjee, P., Basu, J., and Kundu, M. (2010) RseA, the SigE specific anti-sigma factor of *Mycobacterium tuberculosis*, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis. *Mol Microbiol* **75**: 592–606.

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

Beaucher, J., Rodrigue, S., Jacques, P.-É., Smith, I., Brzezinski, R., and Gaudreau, L. (2002) Novel *Mycobacterium tuberculosis* anti-σ factor antagonists control σF activity by distinct mechanisms. *Mol Microbiol* **45**: 1527–1540.

Bechara, C., Macheras, E., Heym, B., Pages, A., and Auffret, N. (2010) *Mycobacterium abscessus* skin infection after tattooing: first case report and review of the literature. *Dermatology* **221**: 1–4.

Becker, K., Haldimann, K., Selchow, P., Reinau, L.M., Dal Molin, M., and Sander, P. (2017) Lipoprotein glycosylation by protein-O-mannosyltransferase (MAB_1122c) contributes to low cell envelope permeability and antibiotic resistance of *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol* **8**.

Behra, P.R.K., Pettersson, B.M.F., Ramesh, M., Das, S., Dasgupta, S., and Kirsebom, L.A. (2022) Comparative genome analysis of mycobacteria focusing on tRNA and non-coding RNA. *BMC Genomics* **23**: 704.

Belardinelli, J.M., Verma, D., Li, W., Avanzi, C., Wiersma, C.J., Williams, J.T., *et al.* (2022) Therapeutic efficacy of antimalarial drugs targeting DosRS signaling in *Mycobacterium abscessus*. *Sci Transl Med* **14**: eabj3860.

Belisle, J.T., and Brennan, P.J. (1989) Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol* **171**: 3465–3470.

Berghoff, B.A., Hoekzema, M., Aulbach, L., and Wagner, E.G.H. (2017) Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. *Mol Microbiol* **103**: 1020–1033.

Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., *et al.* (2013) Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet* **9**: e1003144.

Bernut, A., Dupont, C., Ogryzko, N.V., Neyret, A., Herrmann, J.-L., Floto, R.A., *et al.* (2019) CFTR protects against *Mycobacterium abscessus* Infection by fine-tuning host oxidative defenses. *Cell Rep* **26**: 1828-1840.e4.

Bernut, A., Dupont, C., Sahuquet, A., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2015) Deciphering and imaging pathogenesis and cording of *Mycobacterium abscessus* in zebrafish embryos. *J Vis Exp* 53130.

Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014a) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E943–E952.

Bernut, A., Herrmann, J.-L., Ordway, D., and Kremer, L. (2017) The diverse cellular and animal models to decipher the physiopathological traits of *Mycobacterium abscessus* infection. *Front Cell Infect Microbiol* **7**.

Bernut, A., Le Moigne, V., Lesne, T., Lutfalla, G., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2014b) *In vivo* assessment of drug efficacy against *Mycobacterium abscessus* using the embryonic zebrafish test system. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 4054–4063.

Bernut, A., Nguyen-Chi, M., Halloum, I., Herrmann, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2016) *Mycobacterium abscessus*-induced granuloma formation is strictly dependent on TNF signaling and neutrophil trafficking. *PLoS Pathog* **12**: e1005986.

Bigger, JosephW. (1944) Treatment of *Staphylococcal* infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The*

Lancet **244**: 497–500.

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J.A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., *et al.* (2016) Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* **4**: 14.

Blanc-Potard, A.-B., and Lafay, B. (2003) MgtC as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. *J Mol Evol* **57**: 479–486.

Bolla, J.R., Do, S.V., Long, F., Dai, L., Su, C.-C., Lei, H.-T., *et al.* (2012) Structural and functional analysis of the transcriptional regulator *Rv3066* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **40**: 9340–9355.

Boon, C., and Dick, T. (2002) *Mycobacterium bovis BCG* response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol* **184**: 6760–6767.

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* **14**: 320–330.

Bryant, J.M., Brown, K.P., Burbaud, S., Everall, I., Belardinelli, J.M., Rodriguez-Rincon, D., *et al.* (2021) Stepwise pathogenic evolution of *Mycobacterium abscessus*. *Science* **372**: eabb8699.

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

Bryant, J.M., Grogono, D.M., Rodriguez-Rincon, D., Everall, I., Brown, K.P., Moreno, P., *et al.* (2016) Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* **354**: 751–757.

Bryk, R., Lima, C.D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2002) Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* **295**: 1073–1077.

Buchmeier, N.A., Newton, G.L., and Fahey, R.C. (2006) A Mycothiol synthase mutant of *Mycobacterium tuberculosis* has an altered thiol-disulfide content and limited tolerance to stress. *J Bacteriol* **188**: 6245–6252.

Buchmeier, N.A., Newton, G.L., Koledin, T., and Fahey, R.C. (2003) Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Mol Microbiol* **47**: 1723–1732.

Burian, J., Ramón-García, S., Howes, C.G., and Thompson, C.J. (2012a) WhiB7, a transcriptional activator that coordinates physiology with intrinsic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **10**: 1037–1047.

Burian, J., Ramón-García, S., Sweet, G., Gómez-Velasco, A., Av-Gay, Y., and Thompson, C.J. (2012b) The mycobacterial transcriptional regulator *whiB7* gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. *J Biol Chem* **287**: 299–310.

Burian, J., and Thompson, C.J. (2018) Regulatory genes coordinating antibiotic-induced changes in promoter activity and early transcriptional termination of the mycobacterial intrinsic resistance gene *whiB7*. *Mol Microbiol* **107**: 402–415.

Burian, J., Yim, G., Hsing, M., Axerio-Cilies, P., Cherkasov, A., Spiegelman, G.B., and Thompson, C.J. (2013) The mycobacterial antibiotic resistance determinant WhiB7 acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor SigA (RpoV). *Nucleic Acids Research* **41**: 10062–10076.

Bush, M.J. (2018) The actinobacterial WhiB-like (Wbl) family of transcription factors. *Mol Microbiol* **110**: 663–676.

Calamita, H., Ko, C., Tyagi, S., Yoshimatsu, T., Morrison, N.E., and Bishai, W.R. (2005) The *Mycobacterium*

tuberculosis SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. *Cell Microbiol* **7**: 233–244.

Casonato, S., Cervantes Sánchez, A., Haruki, H., Rengifo González, M., Provvedi, R., Dainese, E., *et al.* (2012) WhiB5, a transcriptional regulator that contributes to *Mycobacterium tuberculosis* virulence and reactivation. *Infect Immun* **80**: 3132–3144.

Catherinot, 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.

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.

Chakraborty, P., Bajeli, S., Kaushal, D., Radotra, B.D., and Kumar, A. (2021) Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **12**: 1606.

Chawla, M., Mishra, S., Anand, K., Parikh, P., Mehta, M., Vij, M., *et al.* (2018) Redox-dependent condensation of the mycobacterial nucleoid by WhiB4. *Redox Biology* **19**: 116–133.

Chawla, M., Parikh, P., Saxena, A., Munshi, M., Mehta, M., Mai, D., *et al.* (2012) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB4 regulates oxidative stress response to modulate survival and dissemination in vivo. *Mol Microbiol* **85**: 1148–1165.

Chen, Z., Hu, Y., Cumming, B.M., Lu, P., Feng, L., Deng, J., *et al.* (2016) Mycobacterial WhiB6 differentially regulates ESX-1 and the Dos regulon to modulate granuloma formation and virulence in zebrafish. *Cell Reports* **16**: 2512–2524.

Cho, Y.-J., Yi, H., Chun, J., Cho, S.-N., Daley, C.L., Koh, W.-J., and Jae Shin, S. (2013) The genome sequence of *'Mycobacterium massiliense'* strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the *Mycobacterium abscessus* complex at the subspecies level. *PLoS One* **8**.

Choi, G.-E., Shin, S.J., Won, C.-J., Min, K.-N., Oh, T., Hahn, M.-Y., *et al.* (2012) Macrolide treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* infection and inducible resistance. *Am J Respir Crit Care Med* **186**: 917–925.

Choi, S., Britigan, B.E., Switzer, B., Hoke, T., Moran, D., and Narayanasamy, P. (2018) *In Vitro* efficacy of free and nanoparticle formulations of gallium(III) meso-tetraphenylporphyrine against *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* and gallium biodistribution in mice. *Mol Pharmaceutics* **15**: 1215–1225.

Chowdhury, N., Kwan, B.W., and Wood, T.K. (2016) Persistence increases in the absence of the alarmone guanosine tetraphosphate by reducing cell growth. *Sci Rep* **6**: 20519.

Clary, G., Sasindran, S.J., Nesbitt, N., Mason, L., Cole, S., Azad, A., *et al.* (2018) *Mycobacterium abscessus* smooth and rough morphotypes form antimicrobial-tolerant biofilm phenotypes but are killed by acetic acid. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.

Clevers, H. (2016) Modeling development and disease with organoids. *Cell* **165**: 1586–1597.

Cohen, N.R., Lobritz, M.A., and Collins, J.J. (2013) Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* **13**: 632–642.

Converse, P.J., Karakousis, P.C., Klinkenberg, L.G., Kesavan, A.K., Ly, L.H., Allen, S.S., *et al.* (2009) Role of the *dosR - dosS* two-component regulatory system in *Mycobacterium tuberculosis* virulence in three animal models. *Infect Immun* **77**: 1230–1237.

Cook, G.M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R.A., Danilchanka, O., and Niederweis, M. (2009)

Physiology of Mycobacteria. *Adv Microb Physiol* **55**: 81–319.

Couto, N., Wood, J., and Barber, J. (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine* **95**: 27–42.

Cumming, B.M., Lamprecht, D.A., Wells, R.M., Saini, V., Mazorodze, J.H., and Steyn, A.J.C. (2014) The physiology and genetics of oxidative stress in Mycobacteria. *Microbiol Spectr* **2**.

Cuthbertson, L., and Nodwell, J.R. (2013) The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 440–475.

Daffé, M., and Marrakchi, H. (2019) Unraveling the structure of the Mycobacterial envelope. *Microbiol Spectr* **7**.

Dahdouh, E., Shoucair, S.H., Salem, S.E., and Daoud, Z. (2014) Mutant prevention concentrations of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *The Scientific World Journal* **2014**: 1–7.

Dahl, J.L. (2005) Scanning electron microscopy analysis of aged *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Can J Microbiol* **51**: 277–281.

Dal Molin, M., Gut, M., Rominski, A., Haldimann, K., Becker, K., and Sander, P. (2017) Molecular mechanisms of intrinsic streptomycin resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.

Daley, C.L., Iaccarino, J.M., Lange, C., Cambau, E., Wallace, R.J., Andrejak, C., *et al.* (2020) Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: An official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline: Executive summary. *Clinical Infectious Diseases* **71**: e1–e36.

Davidson, L.B., Nessar, R., Kempaiah, P., Perkins, D.J., and Byrd, T.F. (2011) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by HβD2 gene expression and IL-8 release. *PLoS ONE* **6**: e29148.

Davidson, R.M., Nick, S.E., Kammlade, S.M., Vasireddy, S., Weakly, N., Hasan, N.A., *et al.* (2022) Genomic analysis of a hospital-associated outbreak of *Mycobacterium abscessus*: implications on transmission. *J Clin Microbiol* **60**: e01547-21.

Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., *et al.* (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* **25**: 730–733.

Deretic, V., Song, J., and Pagán-Ramos, E. (1997) Loss of oxyR in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology* **5**: 367–372.

Di, A., Brown, M.E., Deriy, L.V., Li, C., Szeto, F.L., Chen, Y., *et al.* (2006) CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* **8**: 933–944.

Dick, T., Shin, S.J., Koh, W.-J., Dartois, V., and Gengenbacher, M. (2020) Rifabutin is active against *Mycobacterium abscessus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **64**: 3.

Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* **8**: e1000317.

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

Dubee, V., Bernut, A., Cortes, M., Lesne, T., Dorchene, D., Lefebvre, A.-L., *et al.* (2014) Beta-Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* dku510.

Dubois, V., Pawlik, A., Bories, A., Le Moigne, V., Sismeiro, O., Legendre, R., *et al.* (2019) *Mycobacterium abscessus* virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages. *PLoS Pathog* **15**:

e1008069.

Dupont, C., Viljoen, A., Thomas, S., Roquet-Banères, F., Herrmann, J.-L., Pethe, K., and Kremer, L. (2017) Bedaquiline inhibits the ATP synthase in *Mycobacterium abscessus* and Is effective in infected zebrafish. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.

Dussurget, O., Rodriguez, M., and Smith, I. (1996) An ideR mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative-stress response. *Mol Microbiol* **22**: 535–544.

Dussurget, O., Stewart, G., Neyrolles, O., Pescher, P., Young, D., and Marchal, G. (2001) Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxide dismutase. *Infect Immun* **69**: 529–533.

Dutta, D., and Clevers, H. (2017) Organoid culture systems to study host–pathogen interactions. *Curr Opin Immuno* **48**: 15–22.

Dutta, N.K., Klinkenberg, L.G., Vazquez, M.-J., Segura-Carro, D., Colmenarejo, G., Ramon, F., *et al.* (2019) Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence. *Sci Adv* **5**: eaav2104.

Eckelt, E., Meißner, T., Meens, J., Laarmann, K., Nerlich, A., Jarek, M., *et al.* (2015) FurA contributes to the oxidative stress response regulation of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*. *Front Microbiol* **6**.

El Meouche, I., and Dunlop, M.J. (2018) Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science* **362**: 686–690.

Elchennawi, I., and Ollagnier de Choudens, S. (2022) Iron–sulfur clusters toward stresses: Implication for understanding and fighting tuberculosis. *Inorganics* **10**: 174.

Engelhardt, H., Heinz, C., and Niederweis, M. (2002) A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **277**: 37567–37572.

Engohang-Ndong, J., Baillat, D., Aumercier, M., Bellefontaine, F., Besra, G.S., Locht, C., and Baulard, A.R. (2004) EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol Microbiol* **51**: 175–188.

Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., and Collet, J.-F. (2017) Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **15**: 385–396.

Fauvart, M., De Groote, V.N., and Michiels, J. (2011) Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol* **60**: 699–709.

Fenn, K., Wong, C.T., and Darbari, V.C. (2020) *Mycobacterium tuberculosis* uses Mce proteins to interfere with host cell signaling. *Front Mol Biosciences* **6**.

Fletcher, L.A., Chen, Y., Whitaker, P., Denton, M., Peckham, D.G., and Clifton, I.J. (2016) Survival of *Mycobacterium abscessus* isolated from people with cystic fibrosis in artificially generated aerosols. *Eur Respir J* **48**: 1789–1791.

Floto, R.A., Olivier, K.N., Saiman, L., Daley, C.L., Herrmann, J.-L., Nick, J.A., *et al.* (2016) US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* **71**: i1–i22.

Flynn, J.L. (2006) Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes and Infection* **8**: 1179–1188.

Fontán, P.A., Voskuil, M.I., Gomez, M., Tan, D., Pardini, M., Manganelli, R., *et al.* (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor σB is required for full response to cell envelope stress and hypoxia *in vitro*, but it is

dispensable for *in vivo* growth. *J Bacteriol* **191**: 5628–5633.

Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shoresh, N., and Balaban, N.Q. (2014) Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature* **513**: 418–421.

Ganapathy, U.S., Lan, T., Krastel, P., Lindman, M., Zimmerman, M.D., Ho, H., *et al.* (2021) Blocking bacterial naphthohydroquinone oxidation and adp-ribosylation improves activity of rifamycins against *mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **65**: e00978-21.

Gaudion, A., Dawson, L., Davis, E., and Smollett, K. (2013) Characterisation of the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigG: Its operon and regulon. *Tuberculosis (Edinb)* **93**: 482–491.

Gerasimova, A., Kazakov, A.E., Arkin, A.P., Dubchak, I., and Gelfand, M.S. (2011) Comparative genomics of the dormancy regulons in mycobacteria. *J Bacteriol* **193**: 3446–3452.

Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013) Molecular mechanism of bacterial persistence by Hipa. *Mol Cell* **52**: 248–254.

Gokulan, K., Khare, S., Cerniglia, C.E., Foley, S.L., and Varughese, K.I. (2018) Structure and inhibitor specificity of L,D-Transpeptidase (LdtMt2) from *Mycobacterium tuberculosis* and antibiotic resistance: Calcium binding promotes dimer formation. *AAPS J* **20**: 44.

Gokulan, K., and Varughese, K.I. (2019) Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and targeting the l,d-transpeptidase enzyme. *Drug Dev Res* **80**: 11–18.

Grant, S.S., Kaufmann, B.B., Chand, N.S., Haseley, N., and Hung, D.T. (2012) Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *PNAS* **109**: 12147–12152.

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

Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G.P., and Radzioch, D. (2007) Cystic fibrosis mouse models. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**: 1–7.

Guillemin, I., Jarlier, V., and Cambau, E. (1998) Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2084–2088.

Guiza Beltran, D.C., Horova, M., Wong, H.-X., and Zhang, Z. (2022) A shared anchor on primary sigma factor SigA by the WhiB-Like proteins. *FASEB J* **36**.

Guo, Q., Chen, J., Zhang, S., Zou, Y., Zhang, Y., Huang, D., *et al.* (2020) Efflux pumps contribute to intrinsic clarithromycin resistance in clinical, *Mycobacterium abscessus* isolates. *Infect Drug Resist* **13**: 447–454.

Guo, Q., Zhang, Y., Fan, J., Zhang, H., Zhang, Z., Li, B., and Chu, H. (2021) MAB_2355c confers macrolide resistance in *Mycobacterium abscessus* by ribosome protection. *Antimicrob Agents Chemother* **65**: e00330-21.

Gupta, A.K., Katoch, V.M., Chauhan, D.S., Sharma, R., Singh, M., Venkatesan, K., and Sharma, V.D. (2010) Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb Drug Resist* **16**: 21–28.

Gupta, R.S., Lo, B., and Son, J. (2018) Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front Microbiol* **9**.

Gutiérrez, A.V., Richard, M., Roquet-Banères, F., Viljoen, A., and Kremer, L. (2019) 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* **63**: e01000-19, /aac/63/10/AAC.01000-19.atom.

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.

Hackam, D.J., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. (1999) Phagosomal acidification mechanisms and functional significance. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*. Gordon, S. (ed.). JAI, pp. 299–319.

Hall, C.W., and Mah, T.-F. (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **41**: 276–301.

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., *et al.* (2016) Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* **8**: 236.

Halloum, I., Viljoen, A., Khanna, V., Craig, D., Bouchier, C., Brosch, R., *et al.* (2017) Resistance to thiacetazone derivatives active against *Mycobacterium abscessus* involves mutations in the MmpL5 transcriptional repressor MAB_4384. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.

Hatakeyama, S., Ohama, Y., Okazaki, M., Nukui, Y., and Moriya, K. (2017) Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. *BMC Infect Dis* **17**.

Hicks, N.D., Yang, J., Zhang, X., Zhao, B., Grad, Y.H., Liu, L., *et al.* (2018) Clinically prevalent mutations in *Mycobacterium tuberculosis* alter propionate metabolism and mediate multidrug tolerance. *Nat Microbiol* **3**: 1032–1042.

Hillas, P.J., Alba, F.S. del, Oyarzabal, J., Wilks, A., and Montellano, P.R.O. de (2000) The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 18801–18809.

Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., and Miller, S.I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**: 1171–1175.

Hohl, M., Remm, S., Eskandarian, H.A., Dal Molin, M., Arnold, F.M., Hürlimann, L.M., *et al.* (2019) Increased drug permeability of a stiffened mycobacterial outer membrane in cells lacking MFS transporter Rv1410 and lipoprotein LprG. *Mol Microbiol* **111**: 1263–1282.

Holsclaw, C.M., Muse, W.B., Carroll, K.S., and Leary, J.A. (2011) Mass spectrometric analysis of mycothiol levels in Wild-Type and mycothiol disulfide reductase mutant *Mycobacterium smegmatis*. *Int J Mass Spectrom* **305**: 151–156.

Howard, S.T. (2006) Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**: 1581–1590.

Hu, Y., Kendall, S., Stoker, N.G., and Coates, A.R.M. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* sigJ gene controls sensitivity of the bacterium to hydrogen peroxide. *FEMS Microbiology Letters* **237**: 415–423.

Hu, Y., Wang, Z., Feng, L., Chen, Z., Mao, C., Zhu, Y., and Chen, S. (2016) σE-dependent activation of RbpA controls transcription of the furA-katG operon in response to oxidative stress in mycobacteria. *Mol Microbiol* **102**: 107–120.

Huang, J., Canadien, V., Lam, G.Y., Steinberg, B.E., Dinauer, M.C., Magalhaes, M.A.O., *et al.* (2009) Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6226–6231.

Hugo, M., Van Laer, K., Reyes, A.M., Vertommen, D., Messens, J., Radi, R., and Trujillo, M. (2014)

Mycothiol/mycoredoxin 1-dependent reduction of the peroxiredoxin AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **289**: 5228–5239.

Hunt, T.A., Kooi, C., Sokol, P.A., and Valvano, M.A. (2004) Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival *in vivo*. *Infect Immun* **72**: 4010–4022.

Hunter, R.L., Olsen, M.R., Jagannath, C., and Actor, J.K. (2006) Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci* **36**: 371–386.

Hunt-Serracin, A.C., Parks, B.J., Boll, J., and Boutte, C.C. (2019) *Mycobacterium abscessus* cells have altered antibiotic tolerance and surface glycolipids in artificial cystic fibrosis sputum medium. *Antimicrob Agents Chemother* **63**.

Hurst-Hess, K., McManaman, C., Yang, Y., Gupta, S., and Ghosh, P. (2023a) Hierarchy and networks in the transcriptional response of *Mycobacterium abscessus* to antibiotics. *bioRxiv* 2023.03.16.533064.

Hurst-Hess, K., Rudra, P., and Ghosh, P. (2017) *Mycobacterium abscessus* WhiB7 regulates a species-specific repertoire of genes to confer extreme antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: e01347-17, /aac/61/11/e01347-17.atom.

Hurst-Hess, K.R., Phelps, G.A., Wilt, L.A., Lee, R.E., and Ghosh, P. (2023b) Mab2780c, a TetV-like efflux pump, confers high-level spectinomycin resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Tuberculosis (Edinb)* **138**: 102295.

Hurst-Hess, K.R., Rudra, P., and Ghosh, P. (2021) Ribosome protection as a mechanism of lincosamide resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **65**: e01184-21.

Hurst-Hess, K.R., Saxena, A., Rudra, P., Yang, Y., and Ghosh, P. (2022) *Mycobacterium abscessus* HelR interacts with RNA polymerase to confer intrinsic rifamycin resistance. *Molecular Cell* **82**: 3166-3177.e5.

Iakobachvili, N., Leon-Icaza, S.A., Knoops, K., Sachs, N., Mazères, S., Simeone, R., *et al*. (2022) Mycobacteria–host interactions in human bronchiolar airway organoids. *Mol Microbiol* **117**: 682–692.

Irving, S.E., Choudhury, N.R., and Corrigan, R.M. (2021) The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **19**: 256–271.

Izaki, K., Kiuchi, K., and Arima, K. (1966) Specificity and mechanism of tetracycline resistance in a multiple drug resistant strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **91**: 628–633.

Jaeger, T., Budde, H., Flohé, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **423**: 182–191.

Jarand, J., Levin, A., Zhang, L., Huitt, G., Mitchell, J.D., and Daley, C.L. (2011) Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. *Clinical Infectious Diseases* **52**: 565–571.

Jarlier, V., and Nikaido, H. (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonei*. *J Bacteriol* **172**: 1418–1423.

Jarlier, V., and Nikaido, H. (1994) Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **123**: 11–18.

Jeong, Y.J., Lee, K.S., Koh, W.-J., Han, J., Kim, T.S., and Kwon, O.J. (2004) Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients: comparison of thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology* **231**: 880–886.

Jhun, B.W., Moon, S.M., Jeon, K., Kwon, O.J., Yoo, H., Carriere, K.C., *et al.* (2020) Prognostic factors associated with long-term mortality in 1445 patients with nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: a 15-year follow-up study. *Eur Respir J* **55**.

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

Johnson, P.J.T., and Levin, B.R. (2013) Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Genetics* **9**: e1003123.

Johnsson, K., Froland, W.A., and Schultz, P.G. (1997) Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 2834–2840.

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.

Julián, E., Roldán, M., Sánchez-Chardi, A., Astola, O., Agustí, G., and Luquin, M. (2010) Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J Bacteriol* **192**: 1751–1760.

Kalsum, S., Braian, C., Koeken, V.A.C.M., Raffetseder, J., Lindroth, M., Crevel, R. van, and Lerm, M. (2017) The cording phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* induces the formation of extracellular traps in human macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 278.

Kam, J.Y., Hortle, E., Krogman, E., Warner, S.E., Wright, K., Luo, K., *et al.* (2022) Rough and smooth variants of *Mycobacterium abscessus* are differentially controlled by host immunity during chronic infection of adult zebrafish. *Nat Commun* **13**: 952.

Karthik Jothivasan, V., and J. Hamilton, C. (2008) Mycothiol : synthesis, biosynthesis and biological functions of the major low molecular weight thiol in actinomycetes. *Nat Prod Rep* **25**: 1091–1117.

Kaur, S., Rana, V., Singh, P., Trivedi, G., Anand, S., Kaur, A., *et al.* (2016) Novel mutations conferring resistance to kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northern India. *Tuberculosis* **96**: 96–101.

Keren, I., Minami, S., Rubin, E., and Lewis, K. (2011) Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *mBio* **2**.

Kessel, M., Brennan, M.J., Trus, B.L., Bisher, M.E., and Steven, A.C. (1988) Naturally crystalline porin in the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *Journal of Molecular Biology* **203**: 275–278.

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

Kim, J.-S., Cho, D.-H., Heo, P., Jung, S.-C., Park, M., Oh, E.-J., *et al.* (2016) Fumarate-mediated persistence of *Escherichia coli* against antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 2232–2240.

Kim, J.-S., Heo, P., Yang, T.-J., Lee, K.-S., Jin, Y.-S., Kim, S.-K., *et al.* (2011) Bacterial persisters tolerate antibiotics by not producing hydroxyl radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **413**: 105–110.

Kim, Y.S., Yang, C.-S., Nguyen, L.T., Kim, J.K., Jin, H.S., Choe, J.H., *et al.* (2017) *Mycobacterium abscessus* ESX-3 plays an important role in host inflammatory and pathological responses during infection. *Microbes Infect* **19**: 5–17.

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

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A., and Collins, J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**: 797–810.

Korch, S.B., Henderson, T.A., and Hill, T.M. (2003) Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* **50**: 1199–1213.

Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., and Connolly, L.E. (2016) Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**: a027029.

Kubica, G.P., Baess, I., Gordon, R.E., Jenkins, P.A., Kwapinski, J.B.G., Mcdurmont, C., *et al.* (1972) A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *Journal of General Microbiology* **73**: 55–70.

Kudhair, B.K., Hounslow, A.M., Rolfe, M.D., Crack, J.C., Hunt, D.M., Buxton, R.S., *et al.* (2017) Structure of a Wbl protein and implications for NO sensing by *M. tuberculosis*. *Nat Commun* **8**: 2280.

Kumar, A., Deshane, J.S., Crossman, D.K., Bolisetty, S., Yan, B.-S., Kramnik, I., *et al.* (2008) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 18032–18039.

Kumar, A., Farhana, A., Guidry, L., Saini, V., Hondalus, M., and Steyn, A.J.C. (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Reviews in Molecular Medicine* **13**: e39.

Kumar, A., Toledo, J.C., Patel, R.P., Lancaster, J.R., and Steyn, A.J.C. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11568–11573.

Kurthkoti, K., Amin, H., Marakalala, M.J., Ghanny, S., Subbian, S., Sakatos, A., *et al.* (2017) The capacity of *Mycobacterium tuberculosis* to survive iron starvation might enable it to persist in iron-deprived microenvironments of human granulomas. *mBio* **8**: e01092-17.

Kusunoki, S., and Ezaki, T. (1992) Proposal of *Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev.,* and elevation of *Mycobacterium chelonae subsp. abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus comb. nov*. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 240–245.

Kwak, N., Dalcolmo, M.P., Daley, C.L., Eather, G., Gayoso, R., Hasegawa, N., *et al.* (2019) *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease: individual patient data meta-analysis. *Eur Respir J* **54**.

Lavelle, G.M., White, M.M., Browne, N., McElvaney, N.G., and Reeves, E.P. (2016) Animal models of cystic fibrosis pathology: Phenotypic parallels and divergences. *Biomed Res Int* **2016**: 1–14.

Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., *et al.* (2008) The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-Transpeptidation. *J Bacteriol* **190**: 4360–4366.

Lavollay, M., Dubée, V., Heym, B., Herrmann, J.-L., Gaillard, J.-L., Gutmann, L., *et al.* (2014) In vitro activity of cefoxitin and imipenem against *Mycobacterium abscessus* complex. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: O297–O300.

Lavollay, M., Fourgeaud, M., Herrmann, J.-L., Dubost, L., Marie, A., Gutmann, L., *et al.* (2011) The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-Transpeptidases. *J Bacteriol* **193**: 778–782.

Le Moigne, V., Belon, C., Goulard, C., Accard, G., Bernut, A., Pitard, B., *et al.* (2016) MgtC as a host-induced factor and vaccine candidate against *Mycobacterium abscessus* infection. *Infect Immun* **84**: 2895–2903.

Leao, S.C., Tortoli, E., Euzéby, J.P., and Garcia, M.J. (2011) Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii comb. nov.,* designation of *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus subsp. nov.* and emended description of

Mycobacterium abscessus. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2311–2313.

Lee, H.-N., Lee, N.-O., Han, S.J., Ko, I.-J., and Oh, J.-I. (2014) Regulation of the *ahpC* gene encoding alkyl hydroperoxide reductase in *Mycobacterium smegmatis*. *PLOS ONE* **9**: e111680.

Lee, J., Lee, E., and Roe, J. (2022) uORF-mediated riboregulation controls transcription of *whiB7/wblC* antibiotic resistance gene. *Molecular Microbiology* **117**: 179–192.

Lee, J.-H., Ammerman, N.C., Nolan, S., Geiman, D.E., Lun, S., Guo, H., and Bishai, W.R. (2012) Isoniazid resistance without a loss of fitness in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **3**: 753.

Lee, M.-R., Sheng, W.-H., Hung, C.-C., Yu, C.-J., Lee, L.-N., and Hsueh, P.-R. (2015) *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerg Infect Dis* **21**: 1638–1646.

Lefebvre, C., Boulon, R., Ducoux, M., Gavalda, S., Laval, F., Jamet, S., *et al.* (2018) HadD, a novel fatty acid synthase type II protein, is essential for alpha- and epoxy-mycolic acid biosynthesis and mycobacterial fitness. *Sci Rep* **8**.

Leon-Icaza, S.A., Bagayoko, S., Vergé, R., Iakobachvili, N., Ferrand, C., Aydogan, T., *et al.* (2023) Druggable redox pathways against *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids. *PLoS Pathog* **19**: e1011559.

Lerat, I., Cambau, E., Roth dit Bettoni, R., Gaillard, J.-L., Jarlier, V., Truffot, C., and Veziris, N. (2014) *in vivo* evaluation of antibiotic activity against *Mycobacterium abscessus*. *J Infect Dis* **209**: 905–912.

Levin-Reisman, I., Brauner, A., Ronin, I., and Balaban, N.Q. (2019) Epistasis between antibiotic tolerance, persistence, and resistance mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 14734–14739.

Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., and Balaban, N.Q. (2017) Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* **355**: 826–830.

Levy-Frebault, V., Grimont, F., Grimont, P.A.D., and David, H.L. (1986) Deoxyribonucleic acid relatedness study of the *Mycobacterium fortuitum-Mycobacterium chelonae* complex. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**: 458–460.

Lewis, K. (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol* **64**: 357–372.

Li, B., Ye, M., Guo, Q., Zhang, Z., Yang, S., Ma, W., *et al.* (2018) Determination of MIC distribution and mechanisms of decreased susceptibility to bedaquiline among clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.

Li, B., Zhang, Y., Guo, Q., He, S., Fan, J., Xu, L., *et al.* (2022) Antibacterial peptide RP557 increases the antibiotic sensitivity of *Mycobacterium abscessus* by inhibiting biofilm formation. *Science of The Total Environment* **807**: 151855.

Liao, D., Fan, Q., and Bao, L. (2013) The role of superoxide dismutase in the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Jpn J Infect Dis* **66**: 480–488.

Lima, L.M., Silva, B.N.M. da, Barbosa, G., and Barreiro, E.J. (2020) β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* **208**: 112829.

Lin, K., O'Brien, K.M., Trujillo, C., Wang, R., Wallach, J.B., Schnappinger, D., and Ehrt, S. (2016) *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin reductase is essential for thiol redox homeostasis but plays a minor role in antioxidant defense. *PLoS Pathog* **12**: e1005675.

Liu, J., Gefen, O., Ronin, I., Bar-Meir, M., and Balaban, N.Q. (2020) Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science* **367**: 200–204.

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

Lopeman, R.C., Harrison, J., Desai, M., and Cox, J.A.G. (2019) *Mycobacterium abscessus*: environmental bacterium turned clinical nightmare. *Microorganisms* **7**: 90.

Lopes-Pacheco, M. (2019) CFTR modulators: The changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front Microbiol* **10**.

Luengo, J.M., GarcÍa, B., Sandoval, Á., Arias-Barrau, E., Arias, S., Bermejo, F., and Olivera, E.R. (2005) The phenylacetyl-CoA catabolon. In *Microbial Processes and Products*. Barredo, J.-L. (ed.). Humana Press, Totowa, NJ. pp. 91–129.

Lv, J., He, X., Wang, H., Wang, Z., Kelly, G.T., Wang, X., *et al.* (2017) TLR4-NOX2 axis regulates the phagocytosis and killing of *Mycobacterium tuberculosis* by macrophages. *BMC Pulm Med* **17**: 194.

MacMicking, J.D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. (1997) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5243–5248.

Maggioncalda, E.C., Story-Roller, E., Mylius, J., Illei, P., Basaraba, R.J., and Lamichhane, G. (2020) A mouse model of pulmonary *Mycobacteroides abscessus* infection. *Sci Rep* **10**: 3690.

Mailaender, C., Reiling, N., Engelhardt, H., Bossmann, S., Ehlers, S., and Niederweis, M. (2004) The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis BCG* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **150**: 853–864.

Malcolm, K.C., Caceres, S.M., Honda, J.R., Davidson, R.M., Epperson, L.E., Strong, M., *et al.* (2017) *Mycobacterium abscessus* displays fitness for fomite transmission. *Appl Environ Microbiol* **83**.

Malhotra, V., Sharma, D., Ramanathan, V.D., Shakila, H., Saini, D.K., Chakravorty, S., *et al.* (2004) Disruption of response regulator gene, *devR* , leads to attenuation in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* **231**: 237–245.

Malik, S.S., Luthra, A., and Ramachandran, R. (2009) Interactions of the *M. tuberculosis* UsfX with the cognate sigma factor SigF and the anti-anti sigma factor RsfA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**: 541–553.

Manandhar, S., Singh, A., Varma, A., Pandey, S., and Shrivastava, N. (2022) High level of persister frequency in clinical staphylococcal isolates. *BMC Microbiology* **22**: 109.

Manganelli, R. (2014) Sigma factors: Key molecules in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence. *Microbiol Spectr* **2**: MGM2-0007–2013.

Manganelli, R., Voskuil, M.I., Schoolnik, G.K., Dubnau, E., Gomez, M., and Smith, I. (2002) Role of the extracytoplasmic-function σ Factor σH in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol* **45**: 365–374.

Martini, M.C., Hicks, N.D., Xiao, J., Alonso, M.N., Barbier, T., Sixsmith, J., *et al.* (2022) Loss of RNase J leads to multi-drug tolerance and accumulation of highly structured mRNA fragments in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **18**: e1010705.

Maslowska, K.H., Makiela-Dzbenska, K., and Fijalkowska, I.J. (2019) The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ Mol Mutagen* **60**: 368–384.

Matieli, L.C.V., De Freitas, D., Sampaio, J., Moraes, N.S.B., Yu, M.C.Z., and Hofling-Lima, A.L. (2006)

Mycobacterium abscessus endophthalmitis: treatment dilemma and review of the literature. *Retina* **26**: 826.

McNabb, A., Eisler, D., Adie, K., Amos, M., Rodrigues, M., Stephens, G., *et al.* (2004) Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (hsp65) for Routine Identification of Mycobacterium Species Isolated from Clinical Sources. *J Clin Microbiol* **42**: 3000–3011.

Mehta, M., Rajmani, R.S., and Singh, A. (2016) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to vacuolar pH-induced changes in mycothiol redox potential to modulate phagosomal maturation and virulence. *J Biol Chem* **291**: 2888–2903.

Méndez-Samperio, P. (2008) Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections. *Peptides* **29**: 1836–1841.

Minnikin, D.E., and Brennan, P.J. (2020) Lipids of clinically significant mycobacteria. In *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*. Goldfine, H. (ed.). Springer International Publishing, Cham. pp. 1–76.

Miranda-CasoLuengo, A.A., Staunton, P.M., Dinan, A.M., Lohan, A.J., and Loftus, B.J. (2016) Functional characterization of the *Mycobacterium abscessus* genome coupled with condition specific transcriptomics reveals conserved molecular strategies for host adaptation and persistence. *BMC Genomics* **17**.

Mishra, M.N., and Daniels, L. (2013) Characterization of the *MSMEG_2631* gene (mmp) encoding a multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Family Protein in *Mycobacterium smegmatis* and exploration of its polyspecific nature using biolog phenotype microArray. *J Bacteriol* **195**: 1610–1621.

Mishra, S., Shukla, P., Bhaskar, A., Anand, K., Baloni, P., Jha, R.K., *et al.* (2017) Efficacy of β-lactam/β-lactamase inhibitor combination is linked to WhiB4-mediated changes in redox physiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *eLife* **6**: e25624.

Moine, P., Mueller, S.W., Schoen, J.A., Rothchild, K.B., and Fish, D.N. (2016) Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a weight-based dosing regimen of cefoxitin for perioperative surgical prophylaxis in obese and morbidly obese patients. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 5885–5893.

Molina-Quiroz, R.C., Silva-Valenzuela, C., Brewster, J., Castro-Nallar, E., Levy, S.B., and Camilli, A. (2018) Cyclic AMP regulates bacterial persistence through repression of the oxidative stress response and SOS-Dependent DNA repair in uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* **9**: e02144-17.

Moliteo, E., Sciacca, M., Palmeri, A., Papale, M., Manti, S., Parisi, G.F., and Leonardi, S. (2022) Cystic fibrosis and oxidative stress: The role of CFTR. *Molecules* **27**: 5324.

Moore, M., and Frerichs, J.B. (1953) An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus, n. sp*. *J Invest Dermatol* **20**: 133–169.

Morris, R.P., Nguyen, L., Gatfield, J., Visconti, K., Nguyen, K., Schnappinger, D., *et al.* (2005) Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* **102**: 12200–12205.

Moyed, H.S., and Bertrand, K.P. (1983) *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* **155**: 768–775.

Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S., and Lewis, K. (2010) Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* **192**: 6191–6199.

Müller, A.U., Imkamp, F., and Weber-Ban, E. (2018) The mycobacterial LexA/RecA-independent DNA damage response is controlled by PafBC and the Pup-proteasome system. *Cell Reports* **23**: 3551–3564.

Nair, R.R., Sharan, D., Sebastian, J., Swaminath, S., and Ajitkumar, P. (2019) Heterogeneity of ROS levels in antibiotic-exposed mycobacterial subpopulations confers differential susceptibility. *Microbiology* **165**: 668–682.

Nandakumar, M., Nathan, C., and Rhee, K.Y. (2014) Isocitrate lyase mediates broad antibiotic tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **5**: 4306.

Nash, K.A., Brown-Elliott, B.A., and Wallace, R.J. (2009) A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 1367–1376.

Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2012) *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* **67**: 810–818.

Nessar, R., Reyrat, J.-M., Davidson, L.B., and Byrd, T.F. (2011) Deletion of the *mmpL4b* gene in the *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid biosynthetic pathway results in loss of surface colonization capability, but enhanced ability to replicate in human macrophages and stimulate their innate immune response. *Microbiology (Reading, Engl)* **157**: 1187–1195.

Newton, G.L., Buchmeier, N., and Fahey, R.C. (2008) Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 471–494.

Newton, G.L., Koledin, T., Gorovitz, B., Rawat, M., Fahey, R.C., and Av-Gay, Y. (2003) The glycosyltransferase gene encoding the enzyme catalyzing the first step of mycothiol biosynthesis (mshA). *J Bacteriol* **185**: 3476–3479.

Ng, H.F., and Ngeow, Y.F. (2022) Genetic determinants of tigecycline resistance in *Mycobacteroides abscessus*. *Antibiotics* **11**: 572.

Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., and McKinney, J.D. (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* **52**: 1291–1302.

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., *et al.* (2011) Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* **334**: 982–986.

Nguyen, L., Chinnapapagari, S., and Thompson, C.J. (2005) FbpA-dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **187**: 6603–6611.

Nicholson, S., Bonecini-Almeida, M. da G., Lapa e Silva, J.R., Nathan, C., Xie, Q.W., Mumford, R., *et al.* (1996) Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* **183**: 2293–2302.

Nick, J.A., Dedrick, R.M., Gray, A.L., Vladar, E.K., Smith, B.E., Freeman, K.G., *et al.* (2022) Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Cell* **185**: 1860-1874.e12.

Nie, W., Duan, H., Huang, H., Lu, Y., Bi, D., and Chu, N. (2014) Species identification of *Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* and *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* using *rpoB* and *hsp65*, and susceptibility testing to eight antibiotics. *International Journal of Infectious Diseases* **25**: 170–174.

Nishimura, T., Shimoda, M., Tamizu, E., Uno, S., Uwamino, Y., Kashimura, S., *et al.* (2020) The rough colony morphotype of *Mycobacterium avium* exhibits high virulence in human macrophages and mice. *J Med Microbiol* **69**: 1020–1033.

Norman, R.A., McAlister, M.S.B., Murray-Rust, J., Movahedzadeh, F., Stoker, N.G., and McDonald, N.Q. (2002)

Crystal structure of inositol 1-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in phosphatidylinositol synthesis. *Structure* **10**: 393–402.

Oberley-Deegan, R.E., Rebits, B.W., Weaver, M.R., Tollefson, A.K., Bai, X., McGibney, M., *et al.* (2010) An oxidative environment promotes growth of *Mycobacterium abscessus*. *Free Radic Biol Med* **49**: 1666–1673.

Obregón-Henao, A., Arnett, K.A., Henao-Tamayo, M., Massoudi, L., Creissen, E., Andries, K., *et al.* (2015) Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* to antimycobacterial drugs in preclinical models. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 6904–6912.

Oh, Y., Lee, H.-I., Jeong, J.-A., Kim, S., and Oh, J.-I. (2022) Activation of the SigE-SigB signaling pathway by inhibition of the respiratory electron transport chain and its effect on rifampicin resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *J Microbiol* **60**: 935–947.

Ojha, A.K., Baughn, A.D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., *et al.* (2008) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* **69**: 164–174.

Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., *et al.* (2008) Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *J Leukoc Biol* **83**: 1502–1511.

Orman, M.A., and Brynildsen, M.P. (2013) Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3230–3239.

Orman, M.A., and Brynildsen, M.P. (2015) Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun* **6**: 7983.

Pagán-Ramos, E., Song, J., McFalone, M., Mudd, M.H., and Deretic, V. (1998) Oxidative stress response and characterization of theoxyR-ahpC and furA-katG loci in *Mycobacterium marinum*. *J Bacteriol* **180**: 4856–4864.

Pandya, A.N., Prathipati, P.K., Hegde, P., Li, W., Graham, K.F., Mandal, S., *et al.* (2019) Indole-2-carboxamides are active against *Mycobacterium abscessus* in a mouse model of acute infection. *Antimicrob Agents Chemother* **63**: e02245-18.

Pang, H., Li, G., Wan, L., Jiang, Y., Liu, H., Zhao, X., *et al.* (2015a) In vitro drug susceptibility of 40 international reference rapidly growing mycobacteria to 20 antimicrobial agents. *Int J Clin Exp Med* **8**: 15423–15431.

Pang, H., Li, G., Zhao, X., Liu, H., Wan, K., and Yu, P. (2015b) Drug susceptibility testing of 31 antimicrobial agents on rapidly growing mycobacteria isolates from China. *Biomed Res Int* **2015**.

Park, S., Kim, S., Park, E.M., Kim, H., Kwon, O.J., Chang, C.L., *et al.* (2008) *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea. *J Korean Med Sci* **23**: 49–52.

Pasipanodya, J.G., Ogbonna, D., Ferro, B.E., Magombedze, G., Srivastava, S., Deshpande, D., and Gumbo, T. (2017) Systematic review and meta-analyses of the effect of chemotherapy on pulmonary *Mycobacterium abscessus* outcomes and disease recurrence. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: 14.

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.

Piccaro, G., Pietraforte, D., Giannoni, F., Mustazzolu, A., and Fattorini, L. (2014) Rifampin induces hydroxyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 7527–7533.

Piddington, D.L., Fang, F.C., Laessig, T., Cooper, A.M., Orme, I.M., and Buchmeier, N.A. (2001) Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating

an oxidative Burst. *Infect Immun* **69**: 4980–4987.

Pisu, D., Provvedi, R., Espinosa, D.M., Payan, J.B., Boldrin, F., Palù, G., *et al.* (2017) The alternative sigma factors SigE and SigB are involved in tolerance and persistence to antitubercular drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.

Poetsch, A.R. (2020) The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **18**: 207–219.

Pomposiello, P.J., and Demple, B. (2001) Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology* **19**: 109–114.

Poulton, N.C., DeJesus, M.A., Munsamy-Govender, V., Roberts, C.G., Azadian, Z.A., Bosch, B., *et al.* (2023) Beyond antibiotic resistance: the *whiB7* transcription factor coordinates an adaptive response to alanine starvation in mycobacteria. *bioRxiv* .

Prammananan, T., Sander, P., Brown, B.A., Frischkorn, K., Onyi, G.O., Zhang, Y., *et al.* (1998) A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J INFECT DIS* **177**: 1573–1581.

Prevots, D.R., and Marras, T.K. (2015) Epidemiology of human pulmonary infection with non-tuberculous mycobacteria: A review. *Clin Chest Med* **36**: 13–34.

Prusa, J., Zhu, D.X., and Stallings, C.L. (2018) The stringent response and *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathog Dis* **76**: fty054.

Pryjma, M., Burian, J., Kuchinski, K., and Thompson, C.J. (2017) Antagonism between front-line antibiotics clarithromycin and amikacin in the treatment of *Mycobacterium abscessus* infections is mediated by the *whiB7* gene. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.

Pym, A.S., Domenech, P., Honoré, N., Song, J., Deretic, V., and Cole, S.T. (2001) Regulation of catalase–peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **40**: 879–889.

Qualls, J.E., and Murray, P.J. (2016) Immunometabolism within the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. *Semin Immunopathol* **38**: 139–152.

Qvist, T., Gilljam, M., Jönsson, B., Taylor-Robinson, D., Jensen-Fangel, S., Wang, M., *et al.* (2015) Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J Cyst Fibros* **14**: 46–52.

Qvist, T., Taylor-Robinson, D., Waldmann, E., Olesen, H.V., Hansen, C.R., Mathiesen, I.H., *et al.* (2016) Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **15**: 380–385.

Raghunand, T.R., and Bishai, W.R. (2006) Mapping essential domains of *Mycobacterium smegmatis* WhmD: insights into WhiB structure and function. *J Bacteriol* **188**: 6966–6976.

Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W.R., and Husson, R.N. (2001) The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **183**: 6119–6125.

Ramis, I.B., Vianna, J.S., Silva Junior, L., Groll, A. von, Ramos, D.F., Lobo, M.M., *et al.* (2019) *In silico* and *in vitro* evaluation of tetrahydropyridine compounds as efflux inhibitors in *Mycobacterium abscessus*. *Tuberculosis* **118**: 101853.

Ravnholt, C., Kolpen, M., Skov, M., Moser, C., Katzenstein, T.L., Pressler, T., *et al.* (2018) The importance of early

diagnosis of *Mycobacterium abscessus* complex in patients with cystic fibrosis. *APMIS* **126**: 885–891.

Rawat, M., Newton, G.L., Ko, M., Martinez, G.J., Fahey, R.C., and Av-Gay, Y. (2002) Mycothiol-deficient *Mycobacterium smegmatis* mutants are hypersensitive to alkylating agents, free radicals, and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3348–3355.

Rawat, M., Uppal, M., Newton, G., Steffek, M., Fahey, R.C., and Av-Gay, Y. (2004) Targeted mutagenesis of the *Mycobacterium smegmatis mca* gene, encoding a mycothiol-dependent detoxification protein. *J Bacteriol* **186**: 6050–6058.

Recchia, D., Stelitano, G., Stamilla, A., Gutierrez, D.L., Degiacomi, G., Chiarelli, L.R., and Pasca, M.R. (2023) *Mycobacterium abscessus* Infections in cystic fibrosis individuals: A Review on therapeutic options. *Int J Mol Sci* **24**: 4635.

Reeves, A.Z., Campbell, P.J., Sultana, R., Malik, S., Murray, M., Plikaytis, B.B., *et al.* (2013) Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in the 5′ untranslated region of *whiB7*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 1857–1865.

Reyes, A.M., Hugo, M., Trostchansky, A., Capece, L., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Oxidizing substrate specificity of *Mycobacterium tuberculosis* alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **51**: 464–473.

Reyes, A.M., Pedre, B., De Armas, M.I., Tossounian, M.-A., Radi, R., Messens, J., and Trujillo, M. (2018) Chemistry and redox biology of mycothiol. *Antioxid Redox Signal* **28**: 487–504.

Rhoades, E.R., Archambault, A.S., Greendyke, R., Hsu, F.-F., Streeter, C., and Byrd, T.F. (2009) *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF- by preventing interaction with TLR2. *J Immunol* **183**: 1997–2007.

Richard, M., Gutiérrez, A.V., and Kremer, L. (2020) Dissecting *erm(41)*-mediated macrolide-inducible resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **64**: e01879-19.

Richard, M., Gutiérrez, A.V., Viljoen, A., Rodriguez-Rincon, D., Roquet-Baneres, F., Blaise, M., *et al.* (2018a) Mutations in the *MAB_2299c* TetR regulator confer cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **63**.

Richard, M., Gutiérrez, A.V., Viljoen, A.J., Ghigo, E., Blaise, M., and Kremer, L. (2018b) Mechanistic and structural insights into the unique TetR-dependent regulation of a drug efflux pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front Microbiol* **9**.

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.

Rodrigue, S., Provvedi, R., Jacques, P.-É., Gaudreau, L., and Manganelli, R. (2006) The σ factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 926–941.

Rodriguez, G.M., Voskuil, M.I., Gold, B., Schoolnik, G.K., and Smith, I. (2002) *ideR*, an essential Gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun* **70**: 3371–3381.

Rogall, T., Flohr, T., and Böttger, E.C. (1990) Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. *Microbiology* **136**: 1915–1920.

Rohde, K.H., Abramovitch, R.B., and Russell, D.G. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host Microbe* **2**: 352–364.

Rominski, A., Roditscheff, A., Selchow, P., Böttger, E.C., and Sander, P. (2017a) Intrinsic rifamycin resistance of *Mycobacterium abscessus* is mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591. *J Antimicrob Chemother* **72**: 376–384.

Rominski, A., Schulthess, B., Müller, D.M., Keller, P.M., and Sander, P. (2017b) Effect of β-lactamase production and β-lactam instability on MIC testing results for *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* **72**: 3070–3078.

Rominski, A., Selchow, P., Becker, K., Brülle, J.K., Dal Molin, M., and Sander, P. (2017c) Elucidation of *Mycobacterium abscessus* aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **72**: 2191–2200.

Ronneau, S., and Helaine, S. (2019) Clarifying the link between toxin–antitoxin modules and bacterial persistence. *Journal of Molecular Biology* **431**: 3462–3471.

Rottman, M., Catherinot, E., Hochedez, P., Emile, J.-F., Casanova, J.-L., Gaillard, J.-L., and Soudais, C. (2007) Importance of T cells, Gamma Interferon, and Tumor Necrosis Factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 Mice. *Infect Immun* **75**: 5898–5907.

Roux, A.-L., Ray, A., Pawlik, A., Medjahed, H., Etienne, G., Rottman, M., *et al.* (2011) Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants: TLR-2 ligand induction at the mycobacterial surface. *Cell Microbiol* **13**: 692–704.

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

Rowe, S.E., Wagner, N.J., Li, L., Beam, J.E., Wilkinson, A.D., Radlinski, L.C., *et al.* (2020) Reactive oxygen species induce antibiotic tolerance during systemic *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol* **5**: 282–290.

Rudra, P., Hurst-Hess, K., Lappierre, P., and Ghosh, P. (2018) High levels of intrinsic tetracycline resistance in *Mycobacterium abscessus* are conferred by a tetracycline-modifying monooxygenase. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.

Rudra, P., Hurst-Hess, K.R., Cotten, K.L., Partida-Miranda, A., and Ghosh, P. (2020) Mycobacterial HflX is a ribosome splitting factor that mediates antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 629–634.

Ruger, K., Hampel, A., Billig, S., Rucker, N., Suerbaum, S., and Bange, F.-C. (2014) Characterization of rough and smooth morphotypes of *Mycobacterium abscessus* Isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **52**: 244–250.

Ruis, C., Bryant, J.M., Bell, S.C., Thomson, R., Davidson, R.M., Hasan, N.A., *et al.* (2021) Dissemination of *Mycobacterium abscessus* via global transmission networks. *Nat Microbiol* **6**: 1279–1288.

Rybniker, J., Nowag, A., Gumpel, E. van, Nissen, N., Robinson, N., Plum, G., and Hartmann, P. (2010) Insights into the function of the WhiB-like protein of mycobacteriophage TM4--a transcriptional inhibitor of WhiB2. *Mol Microbiol* **77**: 642–657.

Sachdeva, P., Misra, R., Tyagi, A.K., and Singh, Y. (2010) The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J* **277**: 605–626.

Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Zomer-van Ommen, D.D., Heo, I., Böttinger, L., Klay, D., *et al.* (2019) Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J* **38**: e100300.

Saini, V., Cumming, B.M., Guidry, L., Lamprecht, D.A., Adamson, J.H., Reddy, V.P., *et al.* (2016) Ergothioneine maintains redox and bioenergetic homeostasis essential for drug dusceptibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep* **14**: 572–585.

Salini, S., Bhat, S.G., Naz, S., Natesh, R., Kumar, R.A., Nandicoori, V.K., and Kurthkoti, K. (2022) The error-prone polymerase DnaE2 mediates the evolution of antibiotic resistance in persister mycobacterial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **66**: e01773-21.

Sánchez, A., Espinosa, P., García, T., and Mancilla, R. (2012) The 19 kDa *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein (LpqH) induces macrophage apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways: A role for the mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Immunol Res* **2012**: e950503.

Sánchez-Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T.F., Julián, E., Brambilla, C., and Luquin, M. (2011) Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: Implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* **49**: 2293–2295.

Sankey, N., Merrick, H., Singh, P., Rogers, J., Reddi, A., Hartson, S.D., and Mitra, A. (2023) Role of the *Mycobacterium tuberculosis* ESX-4 secretion system in heme Iron utilization and pore formation by PPE proteins. *mSphere* e0057322.

Santi, I., Manfredi, P., Maffei, E., Egli, A., and Jenal, U. (2021) Evolution of antibiotic tolerance shapes resistance development in chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *mBio* **12**: 10.1128/mbio.03482-20.

Sareen, D., Newton, G.L., Fahey, R.C., and Buchmeier, N.A. (2003) Mycothiol is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. *J Bacteriol* **185**: 6736–6740.

Schrader, S.M., Botella, H., Jansen, R., Ehrt, S., Rhee, K., Nathan, C., and Vaubourgeix, J. (2021) Multiform antimicrobial resistance from a metabolic mutation. *Sci Adv* **7**: eabh2037.

Schumacher, M.A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N.B., Hansen, S., Vulić, M., *et al.* (2015) HipBA–promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature* **524**: 59–64.

Sebastian, J., Swaminath, S., Nair, R.R., Jakkala, K., Pradhan, A., and Ajitkumar, P. (2016) *De novo* emergence of genetically resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* from the persistence phase cells formed against antituberculosis drugs *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.01343-16.

Selvaraj, S., Sambandam, V., Sardar, D., and Anishetty, S. (2012) *In silico* analysis of DosR regulon proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* **506**: 233–241.

Sevalkar, R.R., Glasgow, J.N., Pettinati, M., Marti, M.A., Reddy, V.P., Basu, S., *et al.* (2022) *Mycobacterium tuberculosis* DosS binds H2S through its Fe3+ heme iron to regulate the DosR dormancy regulon. *Redox Biol* **52**: 102316.

Shahi, F., Khosravi, A.D., Tabandeh, M.R., and Salmanzadeh, S. (2021) Investigation of the *Rv3065, Rv2942, Rv1258c, Rv1410c*, and *Rv2459* efflux pump genes expression among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Heliyon* **7**: e07566.

Shee, S., Singh, S., Tripathi, A., Thakur, C., Kumar T, A., Das, M., *et al.* (2022) Moxifloxacin-mediated killing of *Mycobacterium tuberculosis* involves respiratory downshift, reductive stress, and accumulation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* **66**: e0059222.

Shi, L., Jiang, Q., Bushkin, Y., Subbian, S., and Tyagi, S. (2019) Biphasic dynamics of macrophage immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *mBio* **10**: e02550-18.

Shi, Y., Queller, D.C., Tian, Y., Zhang, S., Yan, Q., He, Z., *et al.* (2021) The ecology and evolution of amoeba-bacterium interactions. *Appl Environ Microbiol* **87**: e01866-20.

Shin, H.S., Yang, B., Kim, S.R., Kim, H.-S., Shin, K.S., and Shin, Y.M. (2023) Disseminated nontuberculous mycobacteria infection in an immunocompetent host: A case report. *Medicine (Baltimore)* **102**: e32416.

Shukla, J., Gupta, R., Thakur, K.G., Gokhale, R., and Gopal, B. (2014) Structural basis for the redox sensitivity of the *Mycobacterium tuberculosis* SigK–RskA σ–anti-σ complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**: 1026–1036.

Silva, J.L. da, Gupta, S., Olivier, K.N., and Zelazny, A.M. (2020) Antimicrobial peptides against drug resistant *Mycobacterium abscessus*. *Res Microbiol* **171**: 211–214.

Silva, P.E.A. da, Machado, D., Ramos, D., Couto, I., Von Groll, A., and Viveiros, M. (2016) Efflux Pumps in Mycobacteria: Antimicrobial Resistance, Physiological Functions, and Role in Pathogenicity. In *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Li, X.-Z., Elkins, C.A., and Zgurskaya, H.I. (eds). Springer International Publishing, Cham. pp. 527–559 http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-39658-3_21. Accessed March 25, 2020.

Simcox, B.S., Tomlinson, B.R., Shaw, L.N., and Rohde, K.H. (2023) *Mycobacterium abscessus* DosRS two-component system controls a species-specific regulon required for adaptation to hypoxia. *Front Cell Infect Microbiol* **13**.

Singh, A., Crossman, D.K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M.I., Renfrow, M.B., and Steyn, A.J.C. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLOS Pathogens* **5**: e1000545.

Singh, A., Guidry, L., Narasimhulu, K.V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K.E., *et al.* (2007) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O2 and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 11562–11567.

Singha, B., Behera, D., Khan, M.Z., Singh, N.K., Sowpati, D.T., Gopal, B., and Nandicoori, V.K. (2023) The unique N-terminal region of *Mycobacterium tuberculosis* Sigma Factor A (σA) plays a dominant role in the essential function of this protein. *J Biol Chem* 102933.

Skolnik, K., Kirkpatrick, G., and Quon, B.S. (2016) Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Curr Treat Options Infect Dis* **8**: 259–274.

Smith, L.J., Stapleton, M.R., Fullstone, G.J.M., Crack, J.C., Thomson, A.J., Le Brun, N.E., *et al.* (2010) *Mycobacterium tuberculosis* WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide-sensitive iron-sulfur cluster. *Biochem J* **432**: 417–427.

Song, T., Dove, S.L., Lee, K.H., and Husson, R.N. (2003) RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Mol Microbiol* **50**: 949–959.

Sorayah, R., Manimekalai, M.S.S., Shin, S.J., Koh, W.-J., Grüber, G., and Pethe, K. (2019) Naturally-occurring polymorphisms in QcrB are responsible for resistance to telacebec in *Mycobacterium abscessus*. *ACS Infect Dis* **5**: 2055–2060.

Stallings, C.L., and Glickman, M.S. (2010) Is *Mycobacterium tuberculosis* stressed out? A critical assessment of the genetic evidence. *Microbes Infect* **12**: 1091–1101.

Stanley, N.R., and Lazazzera, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52**: 917–924.

Steffek, M., Newton, G.L., Av-Gay, Y., and Fahey, R.C. (2003) Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* mycothiol S-conjugate amidase. *Biochemistry* **42**: 12067–12076.

Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**: 199–210.

Sulaiman, J.E., and Lam, H. (2020) Proteomic investigation of tolerant *Escherichia coli* populations from cyclic antibiotic treatment. *J Proteome Res* **19**: 900–913.

Sulaiman, J.E., and Lam, H. (2021) Evolution of bacterial tolerance under antibiotic treatment and its implications on the development of resistance. *Front Microbiol* **12**.

Surette, M.D., Waglechner, N., Koteva, K., and Wright, G.D. (2022) HelR is a helicase-like protein that protects RNA polymerase from rifamycin antibiotics. *Molecular Cell* **82**: 3151-3165.e9.

Svetlíková, Z., Škovierová, H., Niederweis, M., Gaillard, J.-L., McDonnell, G., and Jackson, M. (2009) Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *AAC* **53**: 4015–4018.

Swaminath, S., Paul, A., Pradhan, A., Sebastian, J., Nair, R.R., and Ajitkumar, P. (2020) *Mycobacterium smegmatis* moxifloxacin persister cells produce high levels of hydroxyl radical, generating genetic resisters selectable not only with moxifloxacin, but also with ethambutol and isoniazid. *Microbiology* **166**: 180–198.

Thakur, K.G., Jaiswal, R.K., Shukla, J.K., Praveena, T., and Gopal, B. (2010a) Over-expression and purification strategies for recombinant multi-protein oligomers: A case study of *Mycobacterium tuberculosis* σ/anti-σ factor protein complexes. *Protein Expr Purif* **74**: 223–230.

Thakur, K.G., Praveena, T., and Gopal, B. (2010b) Structural and biochemical bases for the redox sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* RslA. *Journal of Molecular Biology* **397**: 1199–1208.

Thomson, R., Tolson, C., Carter, R., Coulter, C., Huygens, F., and Hargreaves, M. (2013a) Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. *J Clin Microbiol* **51**: 3006–3011.

Thomson, R., Tolson, C., Sidjabat, H., Huygens, F., and Hargreaves, M. (2013b) *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. *BMC Infectious Diseases* **13**: 241.

Torrelles, J.B., Ellis, D., Osborne, T., Hoefer, A., Orme, I.M., Chatterjee, D., *et al.* (2002) Characterization of virulence, colony morphotype and the glycopeptidolipid of *Mycobacterium avium* strain 104. *Tuberculosis* **82**: 293–300.

Torrey, H.L., Keren, I., Via, L.E., Lee, J.S., and Lewis, K. (2016) High persister mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* **11**: e0155127.

Tortoli, E., Kohl, T.A., Brown-Elliott, B.A., Trovato, A., Leão, S.C., Garcia, M.J., *et al.* (2016) Emended description of *Mycobacterium abscessus, Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* and *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 4471–4479.

Tsai, S.-H., Shen, G.-H., Lin, C.-H., Liau, J.-R., Lai, H.-C., and Hu, S.-T. (2013) Mab_3168c, a putative acetyltransferase, enhances adherence, intracellular survival and antimicrobial resistance of *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **8**.

Tufariello, J.M., Chapman, J.R., Kerantzas, C.A., Wong, K.-W., Vilchèze, C., Jones, C.M., *et al.* (2016) Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *PNAS* **113**: E348–E357.

Ulrichs, T., and Kaufmann, S.H. (2006) New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* **208**: 261–269.

Ung, K.L., Alsarraf, H.M.A.B., Olieric, V., Kremer, L., and Blaise, M. (2019) Crystal structure of the aminoglycosides *N* -acetyltransferase Eis2 from *Mycobacterium abscessus*. *FEBS J* **286**: 4342–4355.

Ung, K.S.E., and Av-Gay, Y. (2006) Mycothiol-dependent mycobacterial response to oxidative stress. *FEBS Letters* **580**: 2712–2716.

Van Acker, H., and Coenye, T. (2017) The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends in Microbiology* **25**: 456–466.

Van den Bergh, B., Fauvart, M., and Michiels, J. (2017) Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol Rev* **41**: 219–251.

Van den Bergh, B., Michiels, J.E., Wenseleers, T., Windels, E.M., Boer, P.V., Kestemont, D., *et al.* (2016) Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nat Microbiol* **1**.

Vázquez-Laslop, N., and Mankin, A.S. (2018) How macrolide antibiotics work. *Trends Biochem Sci* **43**: 668–684.

Verstraete, L., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., and Michiels, J. (2022) Ecology and evolution of antibiotic persistence. *Trends in Microbiology* **30**: 466–479.

Verstraeten, N., Knapen, W.J., Kint, C.I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., *et al.* (2015) Obg and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Molecular Cell* **59**: 9–21.

Vianna, J.S., Machado, D., Ramis, I.B., Silva, F.P., Bierhals, D.V., Abril, M.A., *et al.* (2019a) The contribution of efflux pumps in *Mycobacterium abscessus* complex resistance to clarithromycin. *Antibiotics* **8**: 153.

Vianna, J.S., Ramis, I.B., Bierhals, D., Groll, A. von, Ramos, D.F., Zanatta, N., *et al.* (2019b) Tetrahydropyridine derivative as efflux inhibitor in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **17**: 296–299.

Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M., and Rovira, C. (2012) Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H_2O_2 oxidation in models systems and implications for heme protein engineering. *J Inorg Biochem* **117**: 292–297.

Vilchèze, C., Av-Gay, Y., Attarian, R., Liu, Z., Hazbón, M.H., Colangeli, R., *et al.* (2008) Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **69**: 1316–1329.

Viljoen, A., Raynaud, C., Johansen, M.D., Roquet-Banères, F., Herrmann, J.-L., Daher, W., and Kremer, L. (2019) Verapamil improves the activity of bedaquiline against *Mycobacterium abscessus in vitro* and in macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* **63**.

Voskuil, M., Bartek, I., Visconti, K., and Schoolnik, G. (2011) The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Front Microbiol* **2**.

Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., and Schoolnik, G.K. (2003) Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* **198**: 705–713.

Wallace, R.J., Meier, A., Brown, B.A., Zhang, Y., Sander, P., Onyi, G.O., and Böttger, E.C. (1996) Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1676–1681.

Wan, T., Horová, M., Beltran, D.G., Li, S., Wong, H.-X., and Zhang, L.-M. (2021) Structural insights into the functional divergence of WhiB-like proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Cell* **81**: 2887-2900.e5.

Wang, X., Yao, J., Sun, Y.-C., and Wood, T.K. (2021) Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins. *Trends in Microbiology* **29**: 388–393.

Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., *et al.* (2004) Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6188–6196.

Wilmaerts, D., Windels, E.M., Verstraeten, N., and Michiels, J. (2019) General mechanisms leading to persister formation and awakening. *Trends in Genetics* **35**: 401–411.

Windels, E.M., Michiels, J.E., Fauvart, M., Wenseleers, T., Van den Bergh, B., and Michiels, J. (2019) Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *ISME J* **13**: 1239–1251.

Wu, M., Li, B., Guo, Q., Xu, L., Zou, Y., Zhang, Y., *et al.* (2019) Detection and molecular characterisation of amikacin-resistant *Mycobacterium abscessus* isolated from patients with pulmonary disease. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **19**: 188–191.

Xu, W., Zhang, L., Mai, J., Peng, R., Yang, E., Peng, C., and Wang, H. (2014) The Wag31 protein interacts with AccA3 and coordinates cell wall lipid permeability and lipophilic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **448**: 255–260.

Yaacoby-Bianu, K., Gur, M., Toukan, Y., Nir, V., Hakim, F., Geffen, Y., and Bentur, L. (2018) Compassionate nitric oxide adjuvant treatment of persistent *Mycobacterium* infection in cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis J* **37**: 336–338.

Yang, S.-C., Hsueh, P.-R., Lai, H.-C., Teng, L.-J., Huang, L.-M., Chen, J.-M., *et al.* (2003) High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1958–1962.

Yin, Y.-J., Wang, B.-J., Jiang, C.-Y., Luo, Y.-M., Jin, J.-H., and Liu, S.-J. (2010) Identification and quantification of mycothiol in Actinobacteria by a novel enzymatic method. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 1393–1401.

Zahrt, T.C., Song, J., Siple, J., and Deretic, V. (2001) Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene katG. *Mol Microbiol* **39**: 1174–1185.

Zaunbrecher, M.A., Sikes, R.D., Metchock, B., Shinnick, T.M., and Posey, J.E. (2009) Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 20004–20009.

Zhai, Q., Duan, B., Lin, C., Liu, J., Zhang, L., and Xia, B. (2022) DNA binding mechanism of WhiB4 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Magnetic Resonance Letters* **2**: 17–27.

Zhang, Z., Hillas, P.J., and Ortiz de Montellano, P.R. (1999) Reduction of peroxides and dinitrobenzenes by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **363**: 19–26.

RÉSUMÉ

Mycobacterium abscessus est une mycobactérie pathogène opportuniste responsable d'infections pulmonaires sévères, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement de ces infections est souvent inefficace du fait de la résistance intrinsèque de *M. abscessus* à de nombreux antibiotiques et de l'émergence de souches résistantes. Au-delà de la résistance, la tolérance aux antibiotiques qui désigne la capacité d'une sous-population bactérienne ou d'une population bactérienne dans sa globalité, à survivre de manière transitoire à l'exposition à des doses létales d'antibiotiques, contribue probablement à l'échec des traitements. La tolérance conduit à l'allongement de la durée de l'antibiothérapie et favorise la sélection de bactéries mutantes résistantes. Malgré son importance en clinique, la tolérance reste peu étudiée chez *M. abscessus*. Par ailleurs, l'absence de modèles infectieux adéquats pour étudier les infections à *M. abscessus* et évaluer l'efficacité des antibiotiques complique la mise en place de stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient.

Dans ce contexte, la première partie de ce travail a porté sur l'identification des fonctions impliquées dans la tolérance aux antibiotiques chez *M. abscessus*. Un mutant présentant une tolérance accrue à la céfoxitine lors de la sortie des bactéries de la phase stationnaire a été isolé par évolution expérimentale. Ce mutant présente une mutation dans le gène *serB2*, codant une phosphosérine phosphatase impliquée dans la biosynthèse de la L-sérine. Les changements métaboliques causés par cette mutation altèrent l'homéostasie rédox intracellulaire et induisent la surexpression du régulateur transcriptionnel *whiB7*, favorisant la tolérance aux antibiotiques par la mise en place d'une réponse au stress médiée par WhiB7 selon des mécanismes moléculaires qui restent à préciser.

Une deuxième partie de ce travail, réalisée dans le cadre d'une collaboration inter-équipes, a contribué au développement d'un modèle d'organoïde pulmonaire récapitulant certaines des caractéristiques pulmonaires associées à la mucoviscidose (organoïde CF) pour étudier l'infection à *M. abscessus* et sa réponse aux antibiotiques. Nos données montrent que l'environnement oxydant de l'organoïde CF favorise la croissance de *M. abscessus* et confirment le caractère hyper-virulent du morphotype rugueux de *M. abscessus* par rapport au morphotype lisse. Nous avons également démontré que l'ajout d'antioxydants potentialise l'effet bactéricide de la céfoxitine lors d'un traitement d'organoïdes CF infectés par *M. abscessus*, suggérant que des antioxydants pourraient être utilisés comme adjuvants pour améliorer l'efficacité des traitements antibiotiques en clinique.