



HAL
open science

Étude fonctionnelle et intérêt thérapeutique des MmpL chez *Mycobacterium abscessus*

Christian Dupont

► **To cite this version:**

Christian Dupont. Étude fonctionnelle et intérêt thérapeutique des MmpL chez *Mycobacterium abscessus*. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLV107 . tel-01505220v2

HAL Id: tel-01505220

<https://theses.hal.science/tel-01505220v2>

Submitted on 13 Apr 2017

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

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

NNT : 2016SACLV107

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
"L'UNIVERSITE VERSAILLES SAINT-QUENTIN EN
YVELINES"

ECOLE DOCTORALE N° 577
Structure et dynamique des systèmes vivants
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

M Christian Dupont

Étude fonctionnelle et intérêt thérapeutique des MmpL chez
Mycobacterium abscessus

Thèse présentée et soutenue à Montpellier, le 09 décembre 2016 :

Composition du Jury :

| | | |
|--------------------------|---|--------------------|
| M, Gaillard, Jean-Louis | Professeur, université de Versailles St Quentin en Yvelines | Président |
| Mme, Colucci-Guyon, Emma | Chargée de recherche, Institut Pasteur Paris | Rapporteur |
| M, Baulard, Alain | Directeur de recherche, INSERM Lille | Rapporteur |
| M, Biet, Franck | Directeur de recherche, INRA Tours | Examineur |
| M, Kremer, Laurent | Directeur de recherche, INSERM Montpellier | Directeur de thèse |
| M, Herrmann, Jean-Louis | Professeur, université de Versailles St Quentin en Yvelines | Directeur de thèse |

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : le Dr. Emma Colucci-Guyon et le Dr. Alain Baulard, rapporteurs de ce manuscrit, le Dr. Franck Biet et le Dr. Jean-Louis Gaillard, examinateurs de ce travail.

Je tiens à remercier Laurent Kremer et Jean-Louis Herrmann, mes directeurs de thèse. D'abord pour m'avoir fait confiance, pour avoir su être patient et me prodiguer nombre de conseils et d'encouragements pendant ces 3 années. Ensuite, merci de m'avoir laissé une grande liberté durant ces travaux, et de m'avoir permis de m'épanouir et m'adapter au milieu scientifique souvent âpre et difficile. Merci aussi d'avoir accepté ce caractère souvent bougon qui peut en refroidir certains.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Audrey Bernut pour son initiation au monde fantastique du Zebrafish. Bien que n'étant pas impliquée officiellement dans mon encadrement, elle a consacré un temps infini à me guider et à me conseiller, à la fois comme amie et scientifique. Elle a su être la lumière nécessaire pour me sortir de la noirceur dans laquelle je plongeais souvent à corps perdu. Je ne te remercierai jamais assez.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des acteurs de ces travaux. Les différents collaborateurs de ces projets qui ont su m'aider et m'encourager. Je remercie particulièrement Faustine Dubar pour nos nombreux échanges, sa gentillesse et sa foi dans le projet PIPD1.

Merci à Julien Brillard qui durant mon stage en master 1 m'a fait aimer la recherche, pour son soutien et son amitié depuis lors. Merci à Laila Gannoun et Anne Blanc-Potard qui depuis mon stage de master 2 m'ont encouragé dans cette voie et m'ont beaucoup apporté scientifiquement et amicalement.

Je remercie l'ensemble du personnel de DIMNP (UMR 5235), avec qui j'ai pu travailler durant ma première année de thèse, l'ensemble du personnel du CPBS que j'ai côtoyé durant mes deux dernières années de thèse. Je remercie particulièrement les membres des services administratifs pour m'avoir aidé (souvent) concernant les problèmes administratifs liés à mon contrat doctoral notamment Véronique Ansquer, Christine Bousquet et Gael Bellec à DIMNP, et Christine Gagnere, Sandrine Peired et Martine Michaud au CPBS qui ont toutes été disponibles et d'une grande aide. Un grand merci également à Pascale Bouhours pour son aide et pour m'avoir chouchouté.

Je remercie mes collègues de laboratoires, Mickaël Blaise pour son soutien, Albertus Viljoen pour nos nombreux échanges scientifiques et métaphysiques, Iman Halloum pour son soutien (quand on navigue dans les mêmes eaux troubles qu'est le doctorat on s'aide comme on peut et on se comprend mieux), Niel Van Wyk pour nos nombreuses discussions scientifiques et nos franches rigolades, Françoise Roquet-Banères pour nos nombreuses heures de travail sur le zebrafish, de bactériologie devant la psm, son aide, nos discussions et sa gentillesse.

Je remercie également les nombreuses personnes que j'ai rencontrées avant ou pendant la thèse. Ces personnes m'ont apporté énormément, scientifiquement et surtout humainement ! Laure Papin pour son soutien et nos nombreuses discussions sur le monde de la science, mais pas seulement. Claudine Belon pour nos nombreuses sorties (pas assez), pour avoir supporté mon caractère d'ours en crise d'hypoglycémie constante et mes blagues (douteuses...) quand nous partagions le même bureau, mais aussi en dehors du laboratoire. Maude Leveque pour avoir su également me soutenir à coup de rigolade et de bon vin. Enfin je remercie également Tiffany Lesne ma « ps », d'abord parce qu'elle a refusé ce projet..., mais aussi parce qu'elle est devenue une amie qui me supporte suffisamment pour que l'on continue à se fréquenter. Je remercie toutes ces personnes, certainement un peu masochistes, pour m'accepter tel que je suis dans les sciences et dans la vie.

Je remercie ma famille et famille étendue pour leur soutien et leur compréhension durant ces 3 années de thèse ; désolé d'avoir été si souvent absent. Merci à mes amis qui ont su me rester fidèles malgré mes trop nombreuses absences.

Je remercie surtout Aurélien qui a su m'encourager, me reconforter et me supporter au quotidien depuis 6 ans. Il sait mieux que personne que ces années de thèse n'ont pas été de tout repos. Il est celui qui a le plus cru en moi, sans lui je ne serai certainement pas arrivé jusqu'ici. Il sait ce que je ne peux dire ici.

Merci à la famille Ronald qui m'a aussi permis d'arriver jusqu'à la thèse.

Merci à toutes et à tous, dans le bon et le mauvais, à avoir contribué à me rendre meilleur.

Enfin, merci à ceux que j'oublie malgré moi.

Contributions Scientifiques

- **Résultats :**

“A New Piperidinol Derivative Targeting Mycolic Acid Transport in Mycobacterium Abscessus”

Dupont Christian, Albertus Viljoen, Faustine Dubar, Mickaël Blaise, Audrey Bernut, Alexandre Pawlik, Christiane Bouchier, Roland Brosch, Yann Guérardel, Joël Lelièvre, Lluís Ballell, Jean-Louis Herrmann, Christophe Biot et Laurent Kremer. Molecular Microbiology 2016.

doi:10.1111/mmi.13406.

“Insights into the Smooth-to-Rough Transitioning in Mycobacterium Bolletii Unravels a Functional Tyr Residue Conserved in All Mycobacterial MmpL Family Members”

Bernut Audrey, Albertus Viljoen, **Christian Dupont**, Guillaume Sapriel, Mickaël Blaise, Christiane Bouchier, Roland Brosch, Chantal De Chastellier, Jean-Louis Herrmann, and Laurent Kremer. Molecular Microbiology 2016.

doi:10.1111/mmi.13283.

- **Matériels et méthodes :**

“Deciphering and Imaging Pathogenesis and Cording of Mycobacterium Abscessus in Zebrafish Embryos,”

Bernut Audrey, **Christian Dupont**, Alain Sahuquet, Jean-Louis Herrmann, Georges Lutfalla, and Laurent Kremer. Jove 2015

doi:10.3791/53130.

“ Extraction and Purification of Mycobacterial Mycolic Acids”

Dupont Christian, Laurent Kremer. Bio-Protocol 2014.

doi:10.3791/53130.

Abréviations

ACCase 6 : Acyl-CoA carboxylase 6

ACP : Acyl Carrier Protein

AG : Arabinogalactane

AM : Acide mycolique

Apo-Acp : Acp inactive

Ara-LAM : Arabinofuranosyl-terminated LAM

Asp : Acide aspartique

BAAR : Bacille acido-alcoolique résistant

cAMP : AMP cyclique

CD : Cellule dendritique

CEMOVIS : Cryo-microscopie électronique de section vitreuse

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CmpL : Corynebacterial membrane protein Large

CRISPR : Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

D-Galf : D-galactofuranosyle

D-Araf : D-arabinofuranosyle

DAT : Di-acyltréhaloses

ENaC : Epithelial sodium channel

ESX : Système de sécrétion de type VII

ERDR : Etambutol Resistance-Determining Region

FAS : Fatty Acid Synthase

Fbp : Fibronectin-binding protein

GPL : Glycopeptidolipide

GM-CSF KO : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor knockout

GlcNac : N-acétyl-glucosamine

GL : Glycolipide

IL : Interleukine

ITL : infection tuberculeuse latente

IFN : Interféron

Holo-Acp : Acp activée

LM : Lipomannane

LAM : Lipoarabinomannane

LOS : Lipooligosaccharide

MAB_4115c mmpl4b chez *M. abscessus*

MAB_4116c : mmpl4a chez *M. abscessus*

MAB_4508 : mmpl3 chez *M. abscessus*

MASS_4115 : mmpL4 chez *M. massiliense*

MAC : Complexe *Mycobacterium avium-intracellulare*

mAGP : Mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane

ManLAM : Lipoarabinomannane mannosylé

MCE : Mammalian Cell Entry

MCL : Mycobactéries à croissance lente

MCR : Mycobactéries à croissance rapide

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses ou dites atypiques

MFP : Membrane Fusion Proteins

MgtC : Mg²⁺ Transport protein C

MMDAG : Monomeromycolyl diacylglycerol

MmpL : Mycobacterial Membrane Protein Large

MmpS : Mycobacterial Membrane Protein Small

MSMEG_0250 : *mmp13* chez *M. smegmatis*

Msr : Méthionine sulfoxide reductase

MTBC : Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

MurA : homologue de l'UDP-N-acetylglucosamine1-carboxyvinyltransferase

OMF : Outer Membrane Factor

PAT : Polyacyltréhalose

NK : Natural Killer

NFκB : Nuclear factor-kappa B

pb : Paire de base

PDIM : Dimycosérosate de phtiocérol

PE-PPE : Proline-glutamate ; Proline-Proline-glutamate

PG : Peptidoglycane

PGL : Phénolglycolipide

PI : Phosphatidylinositol

PILAM : Phosphoinositol-Capped LAM

PIM : Phosphatidyl inositol mannoside

PKS : Polykétide synthase

PL : Phospholipides

PLC : Phospholipase C

PMIM : Prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes

PptT : Phosphopantéthéine transférase

R : Rough ou rugueux

RND : Resistance-Nodulation-Cell Division

TAT : Tri-acyltréhaloses

S : Smooth ou lisse

SNC : Système nerveux central

SL : Sulfatides

SL-1 : Sulfolipide-1

THPP : Tétrahydropyrazolo[1,5-α]pyrimidine-3-carboxamide

TLR : Toll Like Receptor

TM : Transmembranaires

TMM et TDM : Mono ou dimycolate de tréhalose

TMMk : α-alkyl β-cétoacyl tréhalose

TNFα : Facteur de nécrose tumorale alpha

Tyr : Tyrosine

ZF : Zebrafish

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre 1 : Les mycobactéries..... | 1 |
| I Phylogénie : | 1 |
| II Complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : | 3 |
| II A Épidémiologie | 3 |
| II B Les autres agents étiologiques de la tuberculose humaine et animale | 3 |
| II C Physiopathologie des infections dues à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 4 |
| III Les mycobactéries non tuberculeuses ou dites atypiques (MNT) : | 5 |
| III A Les infections pulmonaires | 5 |
| III B Les infections extrapulmonaires | 6 |
| III C Les infections nosocomiales..... | 6 |
| Chapitre 2 : Le complexe <i>Mycobacterium abscessus</i> | 7 |
| I Généralités-Taxonomie | 8 |
| II Les infections causées par le complexe <i>Mycobacterium abscessus</i> | 8 |
| II A Les infections respiratoires..... | 8 |
| II B Les infections respiratoires dans un contexte de mucoviscidose | 9 |
| II C Les infections extrapulmonaires | 11 |
| II D Les évolutions possibles des infections à <i>M. abscessus</i> | 12 |
| III Le génome de <i>M. abscessus</i> et facteurs de virulence mycobactériens et non-mycobactériens...12 | |
| III A Gènes de virulence d'origine mycobactérienne | 12 |
| III B Gènes de virulence d'origine non-mycobactérienne | 13 |
| IV Hétérogénéité phénotypique et virulence de <i>M. abscessus</i> | 14 |
| V Traitements et mécanismes de résistance..... | 15 |
| V A Traitements contre <i>Mycobacterium abscessus</i> | 15 |
| V B Les mécanismes de résistance aux traitements chez <i>Mycobacterium abscessus</i> | 16 |

| | |
|--|----|
| VI Les modèles expérimentaux d'étude pharmacologique et physiopathologique | 17 |
| VI A Le modèle cellulaire | 18 |
| VI B Le modèle murin | 18 |
| VI C Le modèle drosophile | 19 |
| VI D Le modèle Zebrafish..... | 19 |
| VI D 1 Système immunitaire | 20 |
| VI D 2 Le modèle d'infection du zebrafish | 20 |
| VI D 2 a Utilisation du zebrafish pour l'étude des interactions hôte-pathogène..... | 21 |
| VI D 2 b <i>M. marinum</i> et zebrafish pour l'étude de la tuberculose | 21 |
| VI D 2 c Modèle d'étude pharmacologique | 22 |
| VI D 3 Le zebrafish et <i>M. abscessus</i> | 22 |
| Chapitre 3 : L'enveloppe mycobactérienne | 23 |
| I Structure et composition..... | 24 |
| I A La membrane plasmique | 24 |
| I B Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP) | 25 |
| I B 1 Le peptidoglycane..... | 25 |
| I B 2 L'arabinogalactane | 25 |
| I B 3 Les acides mycoliques..... | 25 |
| I B 4 Les composés extractibles..... | 26 |
| I B 5 La couche externe..... | 28 |
| I C L'enveloppe : barrière naturelle et pathogénicité | 28 |
| II Régulation de la biosynthèse des acides mycoliques | 29 |
| II A Le système FAS-I et la synthèse de la chaîne α et des précurseurs de FAS-II..... | 29 |
| II B Le Système FAS-II : Synthèse de la chaîne méromycolique | 30 |
| II B 1 L'activation de FAS-II..... | 30 |
| II B 2 L'Elongation de la chaîne Acyl-ACP par le système FAS-II..... | 30 |
| II B 2 a La condensation : Kas A et KasB..... | 30 |

| | |
|---|----|
| II B 2 b Les réductions par MabA et InhA..... | 31 |
| II B 2 c HadAB, HadBC et la déshydratation | 31 |
| II C La condensation mycolique | 32 |
| II D Bilan de la biosynthèse et devenir des acides mycoliques..... | 32 |
| Chapitre 4 : Les transporteurs de la famille MmpL | 23 |
| I La distribution des MmpL chez les mycobactéries | 34 |
| II Les principales fonctions des MmpL | 35 |
| III Topologie et force proto-motrice des transporteurs MmpL | 36 |
| IV Les inhibiteurs de MmpL3 : des entités chimiques différentes pour une même cible | 37 |
| Objectifs de thèse | 40 |
| Résultats | 42 |
| OBJECTIF 1 : Etablir les caractéristiques génétiques, phénotypiques, et physiopathologiques d'un variant rugueux de <i>Mycobacterium bolletii</i> | 42 |
| Article 1: “ Insights into the smooth-to-rough transitioning in <i>Mycobacterium bolletii</i> unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members ” | 44 |
| OBJECTIF 2 : Identifier des molécules actives contre le complexe <i>M. abscessus</i> , découvrir leur(s) cible(s) et expliquer leur mode d'action. | 45 |
| Article 2: “ A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in <i>Mycobacterium abscessus</i> ” | 47 |
| OBJECTIF 3 : Améliorer les propriétés thérapeutiques et physico-chimiques d'analogues structuraux de PIPD1 | 48 |
| Résultats : | 48 |
| I Activité <i>in vitro</i> | 48 |
| II Toxicité sur macrophages J774 | 48 |
| III Relations structure/activité | 49 |
| Discussion générale et perspectives | 50 |
| I Rôle des MmpL | 52 |
| II PIPD1 et analogues | 53 |

| | |
|---|----|
| III Expertises et outils à dispositions | 54 |
| IV Conclusions générales..... | 55 |
| Matériel et méthodes | 56 |
| I Souches bactériennes et conditions de cultures | 56 |
| I A Milieu de culture des mycobactéries | 56 |
| I B Evaluation de motilité par glissement..... | 56 |
| I C Evaluation de la formation de biofilm | 56 |
| II Méthodes de biochimie et biologie moléculaire | 57 |
| II A Préparation des plasmides | 57 |
| II B Préparation de mycobactéries électro-compétentes..... | 57 |
| II C Electro- transformations..... | 57 |
| II D Extraction et analyse d'acides mycoliques | 57 |
| Article 3 : “ Extraction and Purification of Mycobacterial Mycolic Acids ” | 58 |
| III Détermination de concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) et cinétiques | 59 |
| III A Préparation des plaques de cultures..... | 59 |
| III B CMI | 59 |
| III C CMB | 60 |
| III D Courbes de croissances | 60 |
| IV Infection de macrophages..... | 61 |
| IV A Culture..... | 61 |
| IV B Infection de macrophages par <i>M. abscessus</i> | 61 |
| V Méthodes d'infections du zebrafish | 62 |
| Article 4 : “ Deciphering and Imaging Pathogenesis and Cording of Mycobacterium Abscessus in Zebrafish Embryos ” | 63 |
| Références bibliographiques | 64 |

Introduction

Chapitre 1 : Les mycobactéries

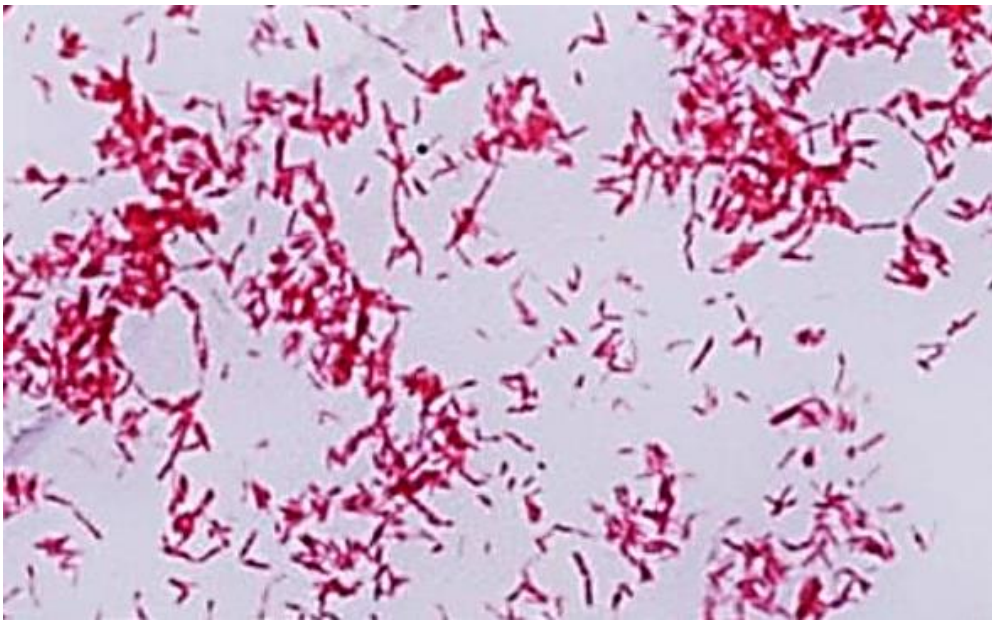


Figure 1 : Coloration Ziehl-Neelsen de mycobactéries

Après coloration des bacilles à la fuchsine, on procède à une décoloration à l'alcool suivie par une contre-coloration au bleu de méthylène. Les bactéries apparaissent en rouge.

Les mycobactéries sont des bacilles non sporulés, non flagellés, considérés comme aérobies stricts et mesurant de 0,2 à 0,6 µm de large par 1 à 10 µm de long. Leurs génomes, allant jusqu'à 7 méga paires de bases (Mbp) selon les espèces, sont caractérisés par un fort pourcentage en GC (GC%) (Stinear et al., 2008; Mohan et al., 2015). *Mycobacterium leprae*, l'agent de la lèpre, possède le plus petit génome mycobactérien avec 3,3 Mbp (Cole et al., 2001). Les mycobactéries se distinguent par une paroi exceptionnellement riche en lipides ; cela leur confère notamment la propriété de résister aux désinfectants, à l'acide et aux bases fortes. De fait, cette propriété est utilisée pour leur coloration : la coloration Ziehl-Neelsen, coloration à la fuchsine phéniquée avec une étape de décoloration à l'acide et l'alcool, et seules les mycobactéries résistent à cette décoloration. Ce sont donc des bacilles dits Acido-Alcool Résistants ou BAAR (Shinnick and Good, 1994) (Figure 1).

I Phylogénie :

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales, sous-ordre des *Corynebacterineae* et à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium*. L'ordre des Actinomycétales est caractérisé par une croissance sous forme de filaments ramifiés. Ces ramifications rappellent celles des champignons. Le préfixe myco-, d'origine grecque, signifie à la fois « champignons » et « cire ».

En 1896 Lehmann et Neumann ont, pour la première fois, caractérisé les mycobactéries, qui comptent aujourd'hui environ 200 espèces répertoriées. Leur classification est nécessaire afin de mieux identifier chaque espèce notamment celles potentiellement pathogènes. Ces espèces présentent entre elles des différences phénotypiques (culture, pigmentation, vitesse de croissance), ayant permis une première classification dès 1959 (Runyon, 1959). Les différentes espèces sont ainsi réparties en quatre groupes selon leur pathogénicité, leur vitesse de croissance et le caractère chromogène spontané ou non des colonies obtenues en culture sur milieu solide.

Si l'on considère strictement le pouvoir pathogène des différentes espèces, trois groupes principaux se détachent :

- Les mycobactéries pathogènes strictes pour l'homme et l'animal appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* et *Mycobacterium caprae*) ; l'agent de la lèpre *Mycobacterium leprae* ; et deux mycobactéries dites non tuberculeuses : *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium ulcerans*.

- Les mycobactéries, non tuberculeuses, et considérées comme pathogènes opportunistes comme *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, le complexe *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), *Mycobacterium simae*... On retrouve également notre mycobactérie d'intérêt : *Mycobacterium abscessus*, ainsi que *Mycobacterium chelonae* et *Mycobacterium fortuitum* ; mais le rôle pathogène pour ces deux dernières espèces est plus difficile à mettre en évidence.
- Les mycobactéries non pathogènes, saprophytes, et dans la majorité des cas présentant une croissance rapide (Kaevska et al., 2014; McIntosh et al., 2014). L'espèce la plus représentative est *Mycobacterium smegmatis*. On retrouve également *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium terrae*...

La vitesse de croissance sur milieu solide permet également de séparer le genre *Mycobacterium* en deux groupes :

- Les mycobactéries à croissance lente (MCL) qui présentent un temps de génération supérieur à 20h et qui ne produisent pas des colonies visibles sur milieu solide dans un délai inférieur à sept jours. Parmi ces MCL, on retrouve presque exclusivement les espèces pathogènes strictes ou opportunistes citées précédemment.
- Les mycobactéries à croissance rapide (MCR), qui présentent un temps de génération court, souvent inférieur à 6h et qui sont capables de former des colonies visibles sur milieu solide en moins de sept jours. On retrouve dans cette catégorie les mycobactéries saprophytes telle que *M. smegmatis* (Gutierrez et al., 2009) mais également celles responsables d'infections opportunistes comme *M. abscessus*, *M. chelonae* et *M. fortuitum*.

Enfin, *M. leprae* reste non cultivable à ce jour avec les méthodes de culture traditionnelles *in vitro*. L'utilisation de modèles expérimentaux, tels que le tatou (Sharma et al., 2013) ou le coussinet plantaire de souris (Lahiri et al., 2005; Levy and Ji, 2006) rend possible sa croissance en laboratoire.

La caractérisation des mycobactéries et leur classification repose également sur l'analyse de séquence du gène codant l'ARN 16S (*rrs*) (Tortoli, 2003). Cependant, ce gène hautement conservé chez les mycobactéries, ne permet pas toujours de discriminer finement certaines espèces proches du fait de leur forte similarité de séquence, en particulier celles du complexe MTBC ou les espèces *M. abscessus* *M. chelone*. Une approche moléculaire combinant l'analyse de nouvelles cibles génomiques telles que *hsp65* ou *rpoB* a été développée, permettant de fournir une phylogénie plus robuste des mycobactéries ainsi que la caractérisation de nouvelles espèces mycobactériennes

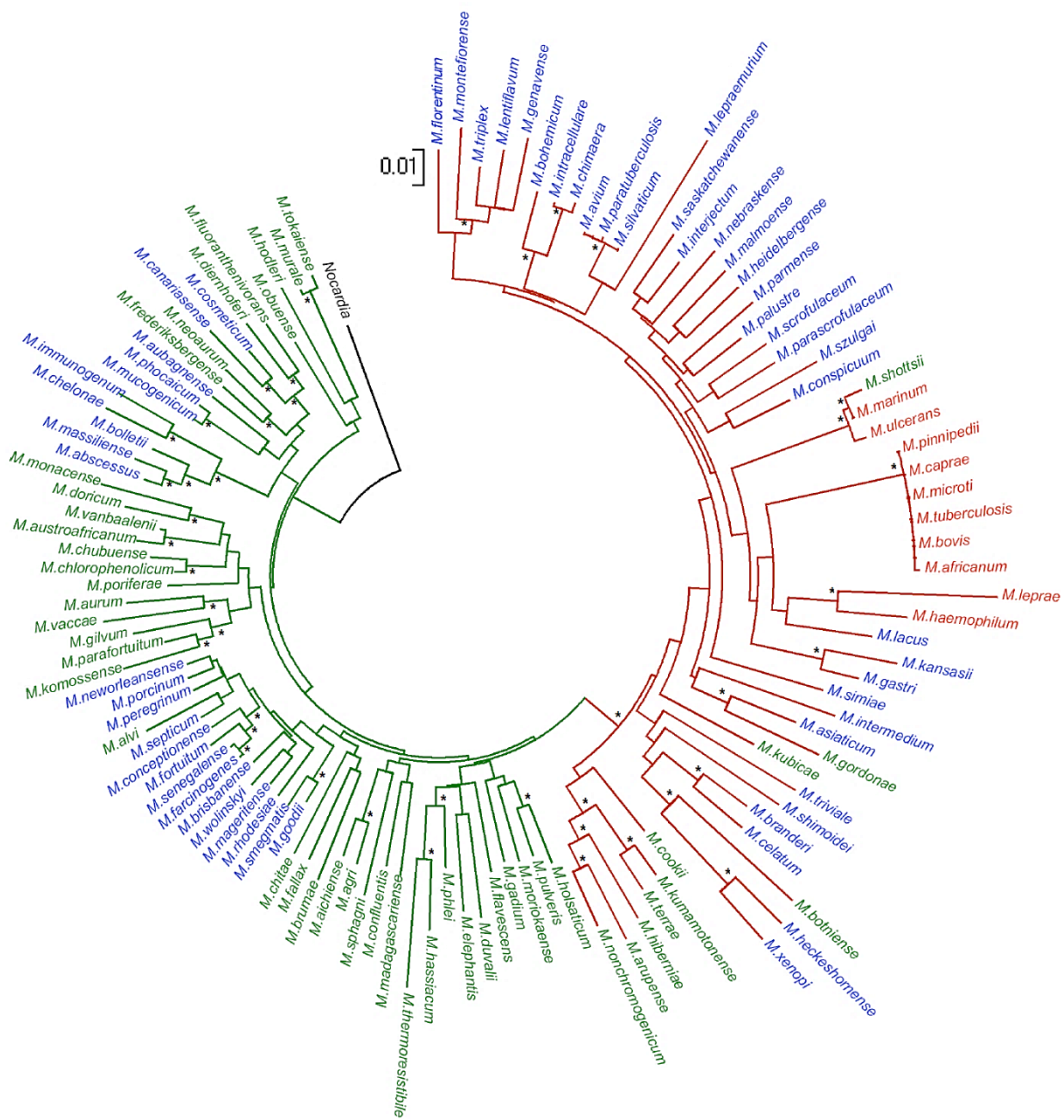


Figure 2 : Relation phylogénétique et pathogénicité entre 119 espèces de mycobactéries

Arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S, le gène *Hsp 65* et *rpoB*. Les espèces représentées en vert saprophytes, en bleu les pathogènes opportunistes, en rouge les pathogènes stricts. Les branches de l'arbre en vert représentent les mycobactéries à croissance rapide et les branches de couleur rouge représentent les mycobactéries à croissance lente (Gutierrez et al., 2009).

(Devulder et al., 2005; Tortoli, 2012) (**Figure 2**). D'autres approches telles que la technique de séquençage de loci repartis sur l'ensemble du génome ou Multilocus Sequence Typing (MLST), les techniques de MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units Variable Number of Tandem Repeats) et Rep-PCR (Repetitive Element Palindromic Polymerase chain Reaction) permettent d'apprécier une plus grande variabilité des espèces mycobactériennes, voir au sein même d'une espèce, et dont certaines deviennent des complexes (voir ci-après).

II Complexe *Mycobacterium tuberculosis* :

II A Épidémiologie

La tuberculose, due aux mycobactéries appartenant au complexe *tuberculosis*, sévit depuis l'antiquité. En 2014, l'OMS a estimé à 9,6 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose. Selon l'OMS, *M. tuberculosis* cause environ 1,5 millions de morts par an (**Figure 3**). 390 000 décès, soit près de 26%, étaient observés chez des patients co-infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). La tuberculose peut atteindre tous les organes et tissus. Cependant, la forme la plus fréquente est pulmonaire avec plus de 70 % des cas observés (Kulchavenya, 2014). Les mycobactéries se transmettent par inhalation de gouttelettes porteuses de bacilles diffusées par les expectorations d'un individu malade: patient dit bacillifère. Le risque de contamination passe de 80 à 90 % lors d'un contact avec des personnes tuberculeuses (Abel et al., 2014). Parmi les symptômes de tuberculose pulmonaire, la toux persistante, la perte de poids, les sueurs nocturnes, la fièvre, les difficultés respiratoires et des adénopathies satellites sont fréquemment retrouvées. Suite à une primo-infection, 95 % des individus infectés ne développeront pas la maladie dans les 2 années suivant le comptage (infection tuberculeuse latente ou ITL) (Young et al., 2009). Les 5% restant feront directement une tuberculose dans les mois suivant le comptage (tuberculose active ou tuberculose maladie). Parmi les 95% ayant une ITL, 5 à 10 % subiront une réactivation de l'infection qui évoluera en tuberculose maladie, souvent touchant d'autres organes que les poumons, au cours de leur existence, notamment suite à une immunodépression (Abel et al., 2014).

II B Les autres agents étiologiques de la tuberculose humaine et animale

Bien que principalement causée par *M. tuberculosis*, la tuberculose peut également être due à *M. bovis* et *M. africanum*. Les pathologies sont similaires à celles observées lors d'une infection à *M. tuberculosis* (De La Rua-Domenech, 2006; de Jong et al., 2010). Les cas de tuberculose provoquée par *M. africanum* sont le plus souvent retrouvés en Afrique de l'Ouest, avec une prévalence oscillant entre 2 % et plus de 50 % en fonction des pays considérés (de Jong et al., 2010) .

M. bovis présente un plus grand spectre d'hôtes, incluant les bovins, les canidés, les félins, les

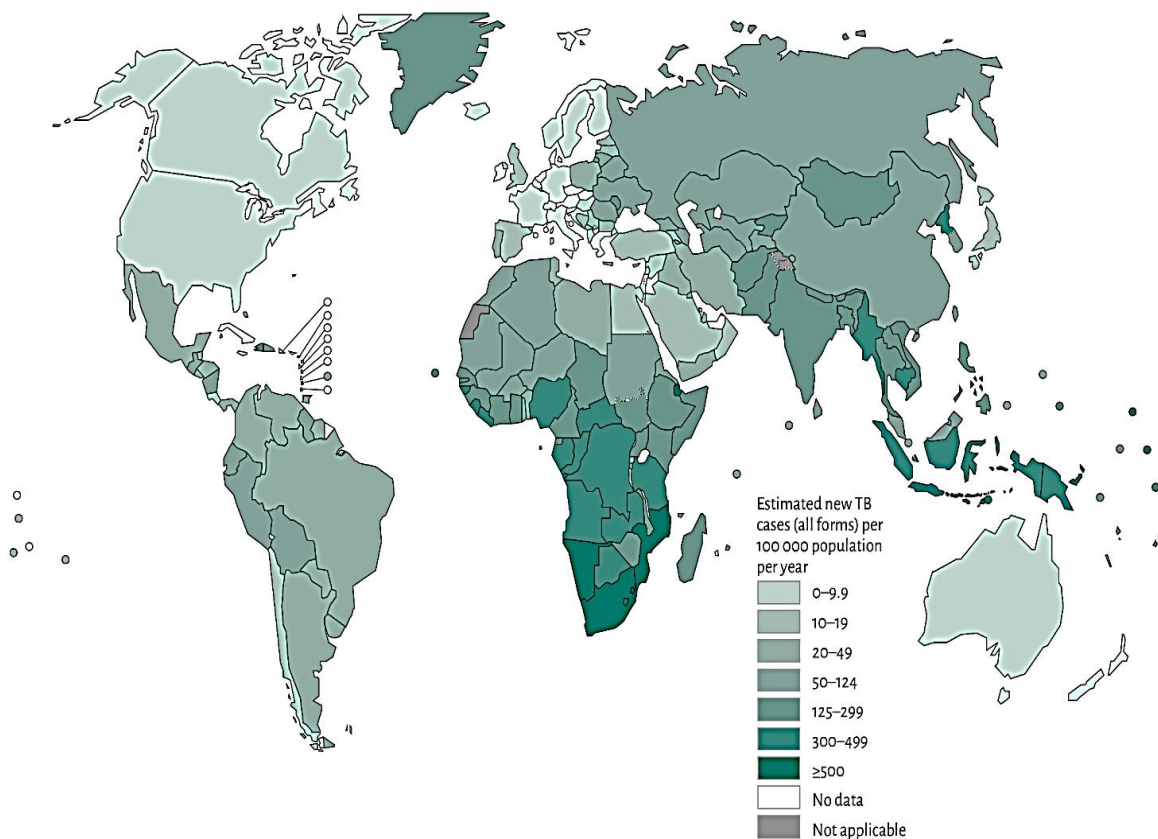


Figure 3 : Estimation en 2014 de l'incidence de la tuberculose à travers le monde.

Rapport sur l'incidence de la tuberculose de l'organisation mondiale de la santé de 2015 (WHO pour Global tuberculosis report) (WHO, 2015).

caprins, les suidés, les équidés et certains animaux sauvages (Cosivi et al., 1998; Ashford et al., 2001; Pérez-Lago et al., 2014). Les infections à *M. bovis* chez l'homme sont de type zoonotique. Historiquement, les infections par ce pathogène se faisaient par l'intermédiaire de lait contaminé, mais depuis l'apparition de la pasteurisation, elles ont fortement diminué (Pérez-Lago et al., 2014). Ces infections persistent cependant dans des pays où la pasteurisation n'est pas systématique, comme le Mexique (Pérez-Guerrero et al., 2008) ou l'Ouganda (Oloya et al., 2008).

II C Physiopathologie des infections dues à *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis fait partie des agents les plus infectieux au monde puisqu'une seule dizaine de bacilles suffit à infecter une personne (Ratcliffe and Palladino, 1952; Pfyffer, 2015). Lorsque les bacilles sont inhalés, ils se retrouvent rapidement dans les alvéoles pulmonaires où ils sont pris en charge par les macrophages alvéolaires. L'internalisation par les macrophages se fait par reconnaissance directement des antigènes bactériens par les récepteurs cellulaires. Les protéines de type lectine C, DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), les récepteurs à mannose, les récepteurs de protéine du surfactant, se fixent sur le lipoarabinomannane mannosylé (ManLAM) de l'enveloppe de *M. tuberculosis*. (Tailleux et al., 2002, 2005; Geijtenbeek et al., 2003; Koppel et al., 2004; Schäfer et al., 2009). Une fois internalisées, les mycobactéries vont être capables de survivre et de se répliquer à l'intérieur des macrophages (Park et al., 2006). Ces macrophages infectés initient, par l'intermédiaire de cytokines et de chimiokines, le recrutement d'autres cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques (CD), les neutrophiles, les cellules NK (Natural Killer). Les CD activées vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et déclencher la réponse adaptative en recrutant les lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$), ainsi que les lymphocytes B (Russell, 2007). Chez les personnes infectées de manière latente, le site infectieux présente une structure pluricellulaire, composée des diverses cellules recrutées et caractéristiques de l'infection tuberculeuse : le granulome (Figure 4). Lorsque ce granulome est mature, l'individu infecté n'est ni malade ni contagieux. Cet état peut perdurer des années, voire toute la vie, et ne cessera qu'à la suite d'une baisse des défenses immunitaires (traitements anti-inflammatoires, vieillissement, infection avec le VIH, diabète...) (Russell, 2007). Dans ce cas-là, la réactivation bactérienne aboutira à la rupture du granulome libérant ainsi les bactéries extracellulaires, rendant l'individu contagieux, assurant le processus de transmission.

Au cours de la tuberculose active, les bacilles disséminent dans l'organisme de l'individu et infectent d'autres organes que le poumon.

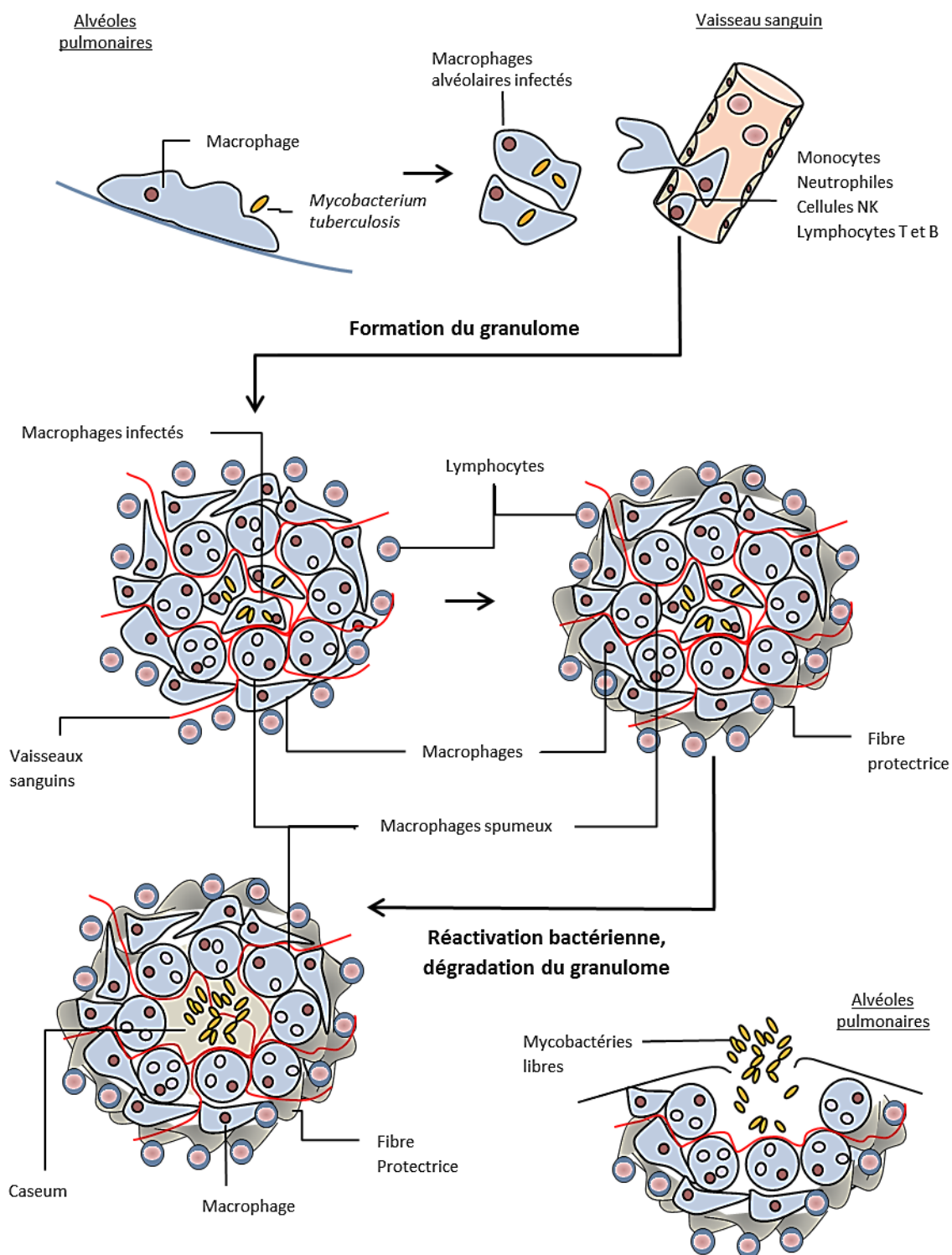


Figure 4 : Physiopathologie du cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*

Lorsque la mycobactérie est reconnue et phagocytée par les macrophages alvéolaires, la sécrétion de cytokines et chimiokines par ces derniers favorise le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Une structure cellulaire, le granulome va alors se développer. Certains macrophages, dits spumeux, vont pouvoir se gorger de lipides. Une couche de fibre de collagène va ensuite consolider la structure et contenir l'infection. La réplication est alors stoppée et l'infection est considérée comme latente. Suite à un événement physiologique telle qu'une altération du système immunitaire ou encore une fatigue intense, la réactivation peut se déclencher. Le granulome devient caséux et finit par se rompre, libérant ainsi dans les poumons les bactéries en phase de multiplication. L'individu entre alors en phase de tuberculose active et devient contagieux. D'après (Russell, 2007)

III Les mycobactéries non tuberculeuses ou dites atypiques (MNT) :

Des mycobactéries, autres que celles appartenant au complexe *tuberculosis*, intéressent la communauté scientifique et médicale depuis longtemps. Calmette fût d'ailleurs l'un des premiers médecins et scientifiques à les impliquer dans des pathologies chez l'homme. La principale difficulté diagnostique est liée à leur présence, pour la majorité d'entre elles, dans l'environnement hydro-tellurique de l'homme, rendant leur implication dans un processus pathologique délicate. La fréquence des pathologies causées par les MNT depuis les 40 dernières années est à mettre en relation avec l'augmentation des différents cas d'immunodépression chez l'homme, notamment l'infection par le VIH. Ces MNT colonisent de nombreuses niches écologiques qu'elles soient telluriques ou hydriques, mais aussi les particules en suspension comme la poussière ou encore les végétaux (Kaevska et al., 2014; McIntosh et al., 2014). Bien que la plupart soient non pathogènes, certaines MNT, sont capables de provoquer des pathologies humaines simulant ou non la tuberculose, appelées mycobactérioses (Griffith et al., 2007). Parmi ces MNT, le complexe MAC est responsable d'infections disséminées chez les personnes porteuses du VIH, mais également chez des personnes immunocompétents (Wolinsky, 1995; Kemper and Deresinski, 2008).

III A Les infections pulmonaires

Le plus souvent, les atteintes pulmonaires provoquées par les mycobactéries atypiques apparaissent chez des personnes présentant préalablement une pathologie respiratoire sous-jacente, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive, la bronchiectasie, la pneumoconiose ou la mucoviscidose (Griffith, 2010). Néanmoins, ces mycobactérioses peuvent également être observées en l'absence de facteurs prédisposants (Griffith et al., 1993). Dans la majorité des cas, ces infections pulmonaires sont dues à des espèces du complexe MAC, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi* ou encore des MCR comme *M. abscessus* (Bryant et al., 2013). Chez les patients mucoviscidosiques, les infections par des mycobactéries atypiques, impliquent majoritairement les espèces des complexes MAC et *M. abscessus*, et sont habituellement plus graves avec une prévalence de plus en plus importante (Griffith, 2003; Olivier et al., 2003; Roux et al., 2009; Seddon et al., 2013). La distribution géographique des espèces incriminées dans ces infections et leur incidence varie en fonction des pays. Alors que le complexe MAC est majoritairement retrouvé aux États-Unis (Olivier et al., 2003), *M. abscessus* est plus souvent observé au Royaume-Uni et en France (Roux et al., 2009; Seddon et al., 2013). Par ailleurs, les espèces incriminées dans les infections pulmonaires dans un contexte de mucoviscidose varient également en fonction de l'âge des patients (Pierre-audigier et al., 2005), illustré notamment par une plus forte prévalence de *M. abscessus* comparativement au complexe MAC. En effet, l'âge moyen du premier prélèvement de *M. abscessus*

Introduction : Les mycobactéries

| espèces mycobactériennes | Infection |
|-------------------------------------|---|
| Mycobactéries à croissance lente | |
| <i>Mycobacterium avium</i> | Pulmonaire Cervical Lymphadénite (infection aiguë ou chronique, des ganglions lymphatiques) chez les enfants Septicémie dans un contexte de VIH Ténosynovite (Inflammation des tendons) |
| <i>Mycobacterium genavense</i> | Bactériémie dans un contexte de VIH |
| <i>Mycobacterium haemophilum</i> | Cutanée (Rare) Bactériémie Pulmonaires ou ostéoarticulaires chez des malades Immunodéprimés |
| <i>Mycobacterium intracellulare</i> | Pulmonaire Ténosynovite |
| <i>Mycobacterium kansasii</i> | Adénite Pulmonaire Cutanées /infections généralisées dans un contexte de VIH, ou d'immunodépression |
| <i>Mycobacterium malmoense</i> | Pulmonaire Cervical Lymphadénite Bactériémie |
| <i>Mycobacterium marinum</i> | Cutanée (Granulome des piscines) Bactériémie |
| <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> | Cervical Lymphadénite chez les enfants Cutanée |
| <i>Mycobacterium simiae</i> | Bactériémie Pulmonaire |
| <i>Mycobacterium ulcerans</i> | Cutanée (Ulcère de Buruli) |
| <i>Mycobacterium xenopi</i> | Pulmonaire Osseuses, digestives... |
| Mycobactéries à croissance rapide | |
| <i>Mycobacterium abscessus</i> | Pulmonaire Infections cutané-muqueuses Abscess suite à des injections (Chirurgie plastique...)/Nosocomiale |
| <i>Mycobacterium chelonae</i> | Infections cutané-muqueuses Abscess suite à des injections/Nosocomiale |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> | Pulmonaire (rare) Abscess suite à des injections/Nosocomiale |

Tableau 1 : différents types d'infections causées par des MCL ou MCR

Exemples d'infections pulmonaires et extrapulmonaires causées par des mycobactéries à croissance lente ou rapide. D'après (Wallace et al., 1998; Falkinham, 2002; Carbonne et al., 2009; Cambau, 2013).

est compris entre 11 et 15 ans alors que celui de *M. avium* apparaît après l'âge de 25 ans (Roux et al., 2009; Catherinot et al., 2013).

III B Les infections extrapulmonaires

Les MNT sont également retrouvées dans le cadre d'infections cutanées, des tissus mous, ganglionnaires, ostéo-articulaires ou dans le cadre d'infections disséminées (Griffith et al., 2007).

On retrouve principalement dans les infections cutanées ou des tissus mous deux MNT pathogènes :

- *M. ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli, caractérisé par une infection nécrotique cutanée.
- *M. marinum*, un pathogène naturel du poisson, causant chez l'homme « le granulome des piscines ». Il engendre chez le poisson une infection systémique pseudo-tuberculeuse. Le contact avec des poissons malades peut contaminer et induire des lésions cutanées chez des personnes travaillant dans le domaine aquacole.

D'autres espèces telles que *M. abscessus*, *M. chelonae* ou *M. fortuitum* sont impliquées dans des cas d'infections cutanées (Grange, 1987). De nombreuses MNT peuvent également être incriminées dans des cas d'infections disséminées notamment dans un contexte de déficit immunitaire (Falkinham, 2002) (Tableau 1), tel que le complexe MAC durant une co-infection avec le VIH (Kemper and Deresinski, 2008).

III C Les infections nosocomiales

Capables de résister à la plupart des désinfectants couramment utilisés, les MNT, telles que *M. chelonae*, *M. abscessus* ou *M. fortuitum*, sont impliquées dans le cadre d'infections extrapulmonaires, très souvent d'origine iatrogène. Ces infections sont provoquées par l'utilisation de matériels réutilisables peu ou mal désinfectés ou suite à l'injection de solutions contaminées par les bactéries, le plus souvent lors de procédures chirurgicales de type endoscopie, dialyse, mésothérapie, de pose de prothèses ou de transplantations d'organes (Wallace et al., 1998; Carbonne et al., 2009). Une épidémie due à des infections à *M. xenopi* a été décrite en 1993 chez des patients ayant subi une microchirurgie par nucléotomie dans le but de traiter des hernies discales (Astagneau et al., 2001). Cette infection a été provoquée suite à l'utilisation de nucléotomes désinfectés puis rincés avec de l'eau du réseau de la clinique contaminée par la bactérie. Toutefois, une étude récente a démontré que le vinaigre du fait de sa composition en acide acétique, était particulièrement efficace non seulement contre des souches multirésistantes de *M. tuberculosis* mais aussi des MNT, dont les membres du complexe *M. abscessus*. Du fait de son très faible coût et de sa

disponibilité dans tous les pays, y compris à revenus faibles, le vinaigre pourrait être envisagé comme un désinfectant général très efficace (Cortesia et al., 2014).

Les mycobactéries, en particulier les mycobactéries tuberculeuses, sont depuis longtemps étudiées au regard de leur pathogénicité et sont responsables de problèmes sanitaires majeurs. Dans ce champ de bataille encore dominé par *M. tuberculosis*, les infections par des MNT apparaissent de plus en plus fréquemment à travers le monde. Elles sont capables d'induire un large spectre de pathologies ce qui est le cas notamment de *M. abscessus*.

Chapitre 2 : Le complexe *Mycobacterium abscessus*

Introduction : le complexe *Mycobacterium abscessus*

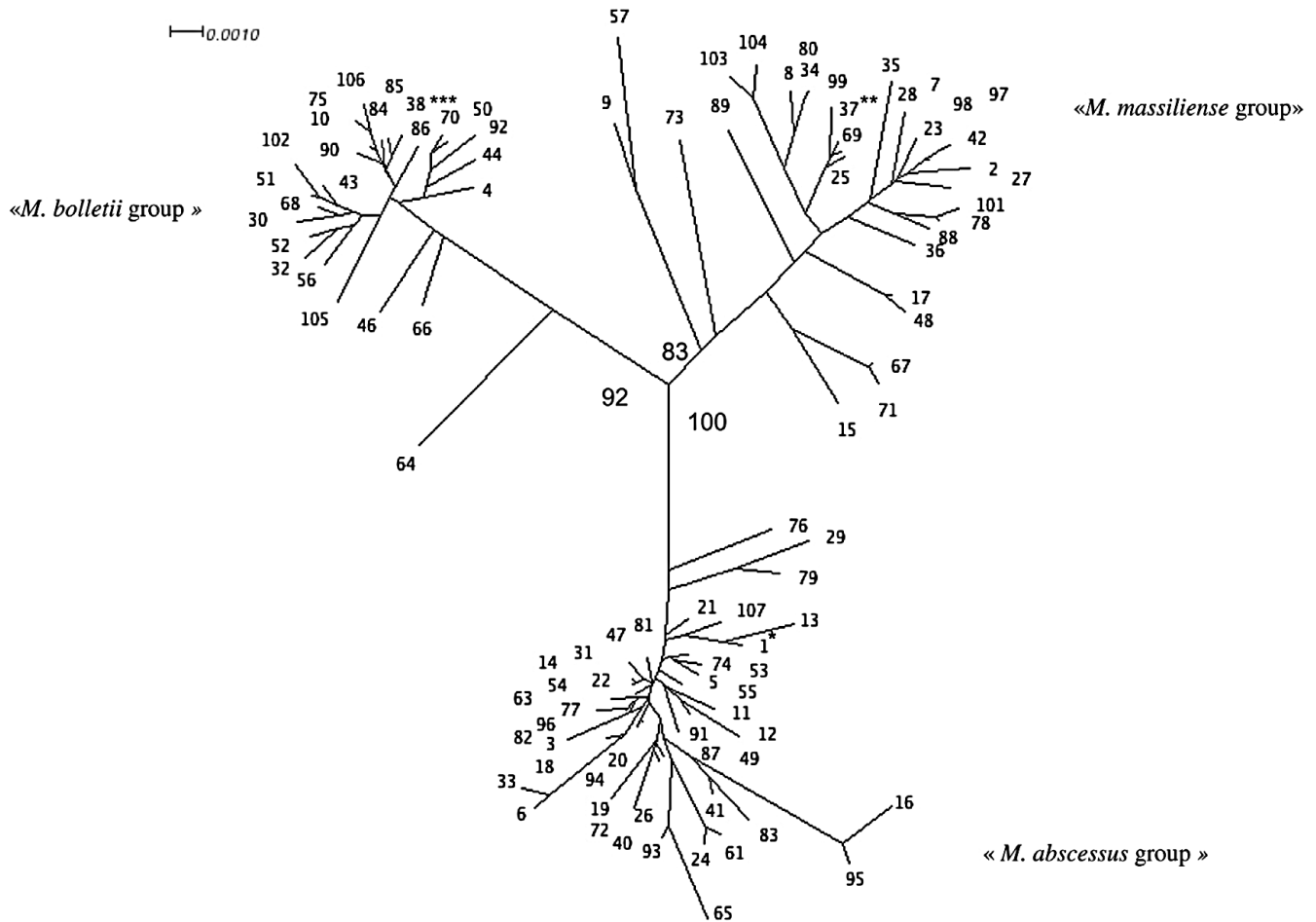


Figure 5 : Arbre phylogénétique présentant la variabilité inter et intraspécifique au sein du complexe *Mycobacterium abscessus sensu lato*

Arbre phylogénétique représentant les trois sous-espèces retrouvées au sein de *M. abscessus sensu lato* obtenu par MLST, basé sur l'ensemble des séquences géniques de *argH*, *cya*, *glpK*, *gnd*, *murC*, *pta* et *purH*.

M. abscessus* CIP 104536T, *M. massiliense* CIP 108297T, ****M. bolletii* CIP 108541T (Macheras et al., 2014).

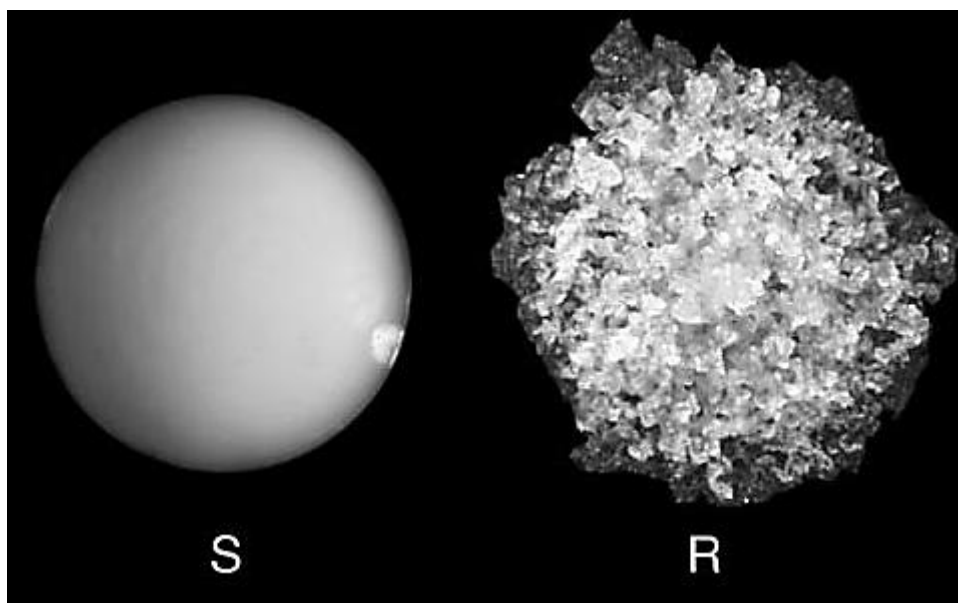


Figure 6 : Morphotypes dans le complexe *Mycobacterium abscessus*

Les deux morphotypes retrouvés au sein du complexe *M. abscessus*, lisse (S) à gauche et rugueux (R) à droite (Medjahed et al., 2010).

I Généralités-Taxonomie

M. abscessus fut isolée pour la première fois en 1953 à partir d'un abcès sous-cutané du genou (Moore and Frerichs, 1953). Durant de longues années, son pouvoir pathogène a été sous-estimé. En effet, pendant plusieurs décennies elle a été incluse avec *M. chelonae* dans le complexe *M. fortuitum* en tant que groupe « *chelonae-abscessus* » (Nakayama et al., 1970). En 1992, grâce aux techniques de biologie moléculaire et d'hybridation ADN-ADN, *M. abscessus* fut séparé du groupe « *chelonae-abscessus* » et élevé au rang d'espèce à part entière (Kusunoki and Ezaki, 1992). Sur la base du séquençage du gène *rpoB*, la taxonomie de cette nouvelle espèce évolua pour distinguer deux sous-espèces de *M. abscessus*: *Mycobacterium massiliense* en 2004 (Adékambi et al., 2004) et *Mycobacterium bolletii* en 2006 (Adékambi et al., 2006). Cependant la séparation de ces deux sous-espèces fait toujours débat. Une nouvelle classification a été proposée regroupant ces deux sous-espèces en une seule sous-espèce *Mycobacterium subsp. bolletii* (Leao et al., 2009, 2011). Des publications récentes proposent une répartition en faveur des trois sous-espèces au sein du complexe *M. abscessus* (pour *M. abscessus sensu lato*) comprenant *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* et *M. bolletii* (Cho et al., 2013; Macheras et al., 2014; Griffith et al., 2015; Tan et al., 2015). Dans la suite de ce manuscrit, nous retiendrons les termes de *M. abscessus* (pour *M. abscessus sensu stricto*), de *M. massiliense* et de *M. bolletii* (Figure 5).

Les espèces du complexe *M. abscessus* présentent également une particularité phénotypique. En effet, on retrouvera un morphotype lisse (dit « S » pour Smooth) caractérisé par la présence de glycopeptidolipides (GPL) à la surface des bacilles et un morphotype rugueux (dit « R » pour Rough) (Figure 6) qui est caractérisé par une absence de ces GPL (Howard et al., 2006). Cette présence/absence de GPL influe directement sur la virulence de la mycobactérie (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot et al., 2009).

II Les infections causées par le complexe *Mycobacterium abscessus*

II A Les infections respiratoires

M. abscessus est la MCR la plus fréquemment retrouvée dans le cadre d'infections pulmonaires chez l'homme et principalement chez les patients atteints de mucoviscidose (Olivier et al., 2003; Roux et al., 2009; Medjahed et al., 2010). La primo-colonisation des voies respiratoires semblerait être effectuée par le variant S capable de développer, de se mouvoir, de former des biofilms (Howard et al., 2006; Jönsson et al., 2007) et de persister en modulant l'activité des neutrophiles (Malcolm et al., 2013).

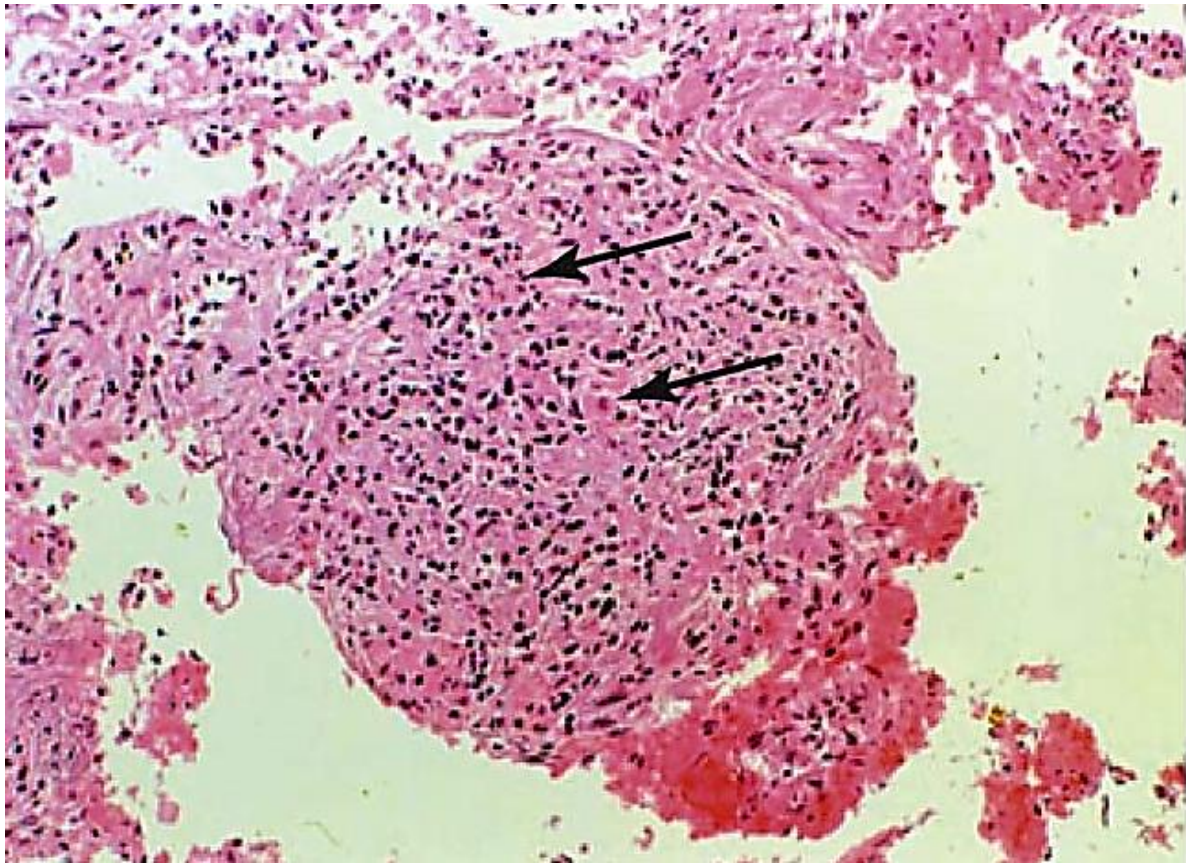


Figure 7 : Granulome induit par *M. abscessus*

Coupe histologique de poumon obtenu chez un patient atteint de mucoviscidose montrant la présence d'un granulome provoqué par *M. abscessus*. Les flèches indiquent des cellules épithélioïdes géantes (Medjahed et al., 2010).

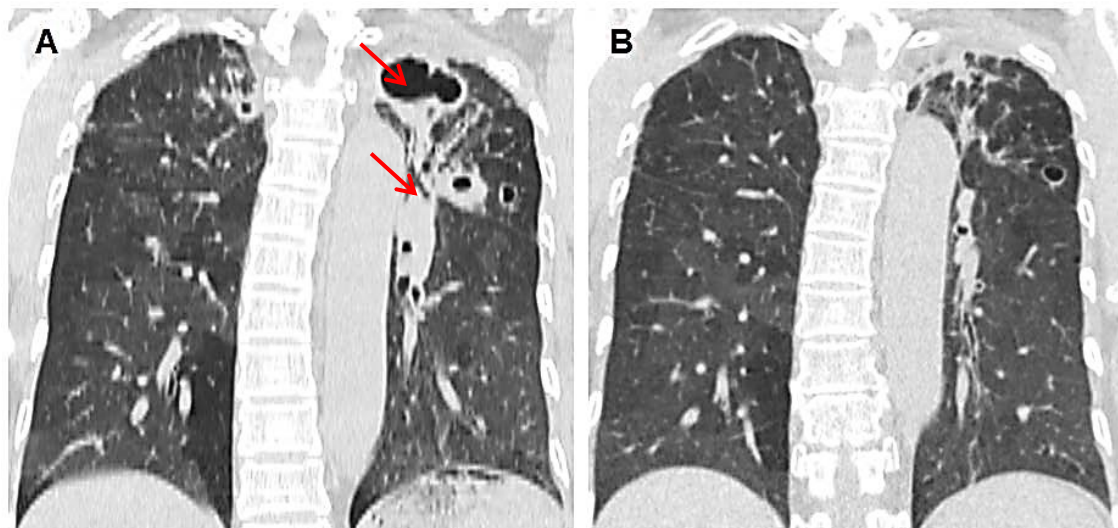


Figure 8 : radiographie d'une infection pulmonaire par *M. massiliense*

Deux radiographies effectuées avec 12 mois d'intervalle chez un même patient de 67 ans avant (A) et après (B) un traitement.

A /la radiographie montre des lésions caséuses dans le lobe supérieur gauche (flèches rouges).

B / un traitement de 12 mois (clarithromycine et de moxifloxacine par voie orale accompagnée d'amikacine et de céfoxitine par voie intraveineuse durant les 4 premières semaines de traitement) a permis la diminution de la taille des lésions caséuses du lobe supérieur gauche (Kang and Koh, 2016).

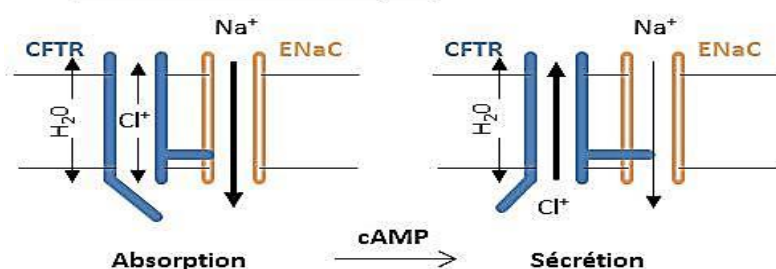
Au cours de l'infection, ces mycobactéries subiraient ensuite une transition morphologique vers le morphotype R (Caverly et al., 2015), associé aux formes sévères de la maladie (Jönsson et al., 2012).

M. abscessus est reconnue comme la principale cause d'infections pulmonaires (Griffith, 2010) provoquées par une MNT. Des épisodes d'épidémies ont été répertoriés, notamment à Taiwan, avec des infections pulmonaires chez des patients sous appareils respiratoires (Lee et al., 2016). Dans les poumons, *M. abscessus* peut persister plusieurs années (Cullen et al., 2000; Catherinot et al., 2009) et, comme *M. tuberculosis*, y former des granulomes (Figure 7) qui peuvent évoluer en nécrose caséuse (Tomashefski et al., 1996; Rottman et al., 2007)(Figure 8). Parmi ces infections, environ 30 % concernent des personnes immunocompétentes, ne présentant aucune étiologie pulmonaire préexistante (Griffith et al., 1993; Varghese et al., 2012).

II B Les infections respiratoires dans un contexte de mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive retrouvée le plus souvent chez les populations caucasiennes. Elle est due à des mutations du gène *cftr* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) provoquant une altération de la protéine CFTR, de la famille des transporteurs ABC (Figure 9). Cette protéine est présente dans de nombreuses cellules (Bradbury, 1999), notamment dans les cellules immunitaires telles que les macrophages, les neutrophiles chez qui elle participe respectivement à l'acidification du phagosome et phagolysosome (Di et al., 2006; Painter et al., 2006). Son rôle en tant que canal ionique est de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique des sécrétions muqueuses, par un contrôle de l'excrétion des bicarbonates et de l'ion chlorure. Il permettrait également le fonctionnement normal de certains compartiments intracellulaires en régulant le trafic vésiculaire (Bear et al., 1992; Hwang and Kirk, 2013; Zwick et al., 2016). La protéine mutée ne permet plus le transport correct de ces ions chlorure à travers la membrane des cellules. Au niveau de l'épithélium pulmonaire, la sécrétion de chlore n'étant plus permise, une hyper absorption d'eau et de sodium (*via* l'augmentation de l'activité de la protéine ENaC) va induire la formation d'un mucus déshydraté, plus épais et plus visqueux dans les voies respiratoires (Stutts et al., 1995). En conséquence, le rôle du mucus dans l'élimination des poussières et des agents infectieux est altérée, favorisant la colonisation des voies respiratoires par des pathogènes (Figure 10), comme *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*... (Smith et al., 1996; Verkman et al., 2003; Matsui et al., 2005, 2006). Ce mucus épais perd son activité bactéricide normalement présente à la surface de l'épithélium pulmonaire, et limite la mobilité des neutrophiles jusqu'au pathogène à phagocyter (Matsui et al., 2005) ou encore l'apprêtement de peptides antimicrobiens tels que la lactoferrine, un peptide hydrosoluble qui se retrouve dégradé dans ce mucus pauvre en eau

A Contexte classique



B Mucoviscidose

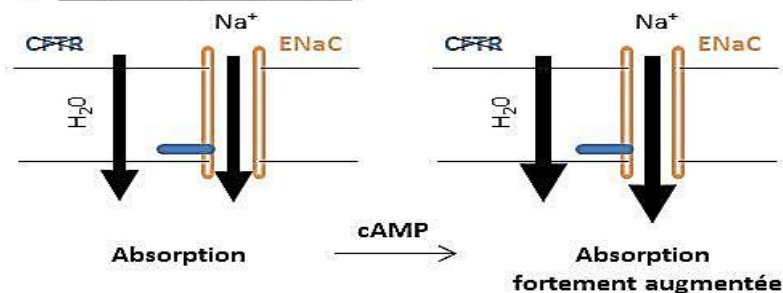


Figure 9 : Fonctionnement et dysfonctionnement de la protéine CFTR

L'équilibre entre sécrétion de l'ion chlorure et l'absorption de l'ion sodium est permise respectivement par la protéine CFTR et ENaC.

A/ Chez l'individu sain, l'activation de CFTR et d'ENaC par un AMP cyclique (cAMP), conduit à la sortie de l'ion chlorure de la cellule par CFTR. CFTR exerce alors une inhibition de la protéine ENaC et limite l'absorption de l'ion sodium dans la cellule.

B/ Dans un contexte de mucoviscidose, l'absence de CFTR conduit à une augmentation de l'activité d'absorption de sodium de la cellule par ENaC qui s'accompagne également par une forte entrée d'eau, favorisant l'accumulation de mucus visqueux, déshydraté et épais dans les voies respiratoires.

D'après (Stutts et al., 1995)

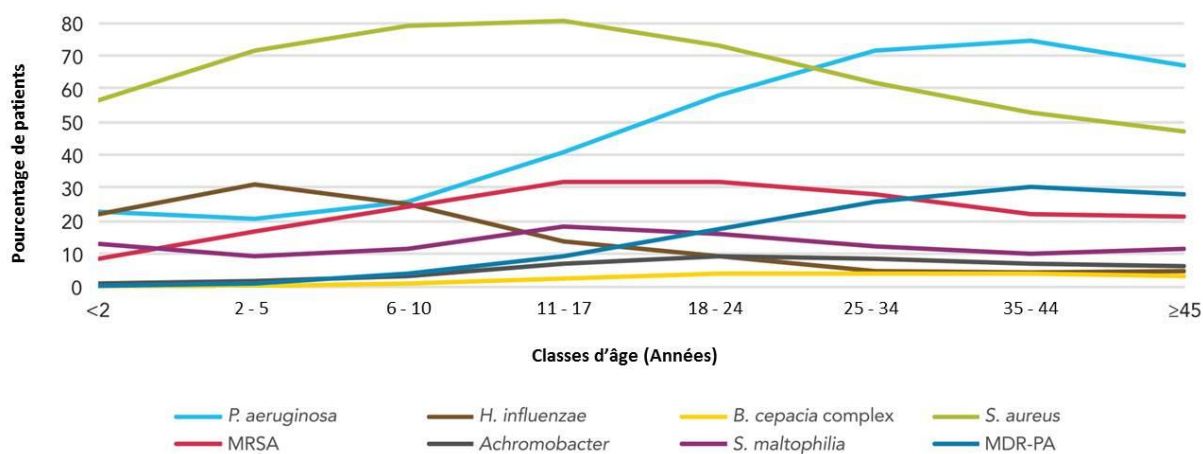


Figure 10 Prévalence des bactéries pathogènes isolées chez des patients atteints de mucoviscidose en 2014.

MRAS : *S. aureus* résistant à la méticilline ; MDR-PA : *P. aeruginosa* résistant à plusieurs antibiotiques (Registre français de la mucoviscidose, 2014)

(Matsui et al., 2006). Le dysfonctionnement de CFTR inhibe également la réponse immunitaire innée, en entravant l'expression de récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires tel que les TLR-4 (Toll Like Receptor 4) à la surface des cellules présentes dans les bronches conduisant à un retard de l'activation du système immunitaire (John et al., 2010). Dans la mucoviscidose, l'épithélium pulmonaire exprime plus de NFκB (nuclear factor-kappa B) ce qui mène à une sécrétion abondante de cytokines inflammatoires et d'interleukine-8 (IL-8), favorisant le recrutement de neutrophiles (Venkatakrishnan et al., 2000; Muhlebach et al., 2004; Vij et al., 2009). Cette inflammation basale dans la mucoviscidose est, de plus, exacerbée durant les infections (Balough et al., 1995; Dakin et al., 2002). Ainsi, la colonisation bactérienne favorisée, d'une part, et la réponse inflammatoire intense (basale ou en réponse aux infections), d'autre part, engendre la dégradation progressive de l'épithélium pulmonaire évoluant vers une insuffisance respiratoire mortelle (Stutts et al., 1995). Depuis environ 20 ans, la fréquence des infections à *M. abscessus* dans la mucoviscidose est en constante augmentation (Olivier et al., 2003; Roux et al., 2009; Medjahed et al., 2010). Aux Etats-Unis, de 2010 à 2014 parmi 20 880 individus étudiés, 3775 présentent une ou plusieurs espèces mycobactériennes (18,1 %) (Cystic Fibrosis Foundation, 2014). Parmi ces derniers, 628 (39,5%) étaient infectés par *M. abscessus* (Figure 11). Dans la mucoviscidose, ces infections sont d'autant plus graves qu'elles justifient souvent une contre-indication à la greffe pulmonaire (Lobo et al., 2013). Ces greffes représentent souvent l'ultime recours de survie chez ces patients atteints d'insuffisance respiratoire chronique (Lobo et al., 2013; Smibert et al., 2016). Une prévalence plus élevée à l'infection causée par *M. abscessus* est retrouvée chez les patients mucoviscidosiques de moins de 15 ans (Roux et al., 2009; Campos-Herrero et al., 2016). Qu'il s'agisse de *M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. massiliense*, les morphotypes R sont plus résistants à la céfoxitine et l'imipénème (Lavollay et al., 2014). Au-delà du contexte infectieux, la sous-espèce *M. massiliense* semble être impliquée dans des primo-infections de personnes plus jeunes, environ 13 ans et présentant une forme de mucoviscidose plus sévère, que celles infectées pour la première fois par *M. abscessus*, généralement âgées entre 15 et 17 ans (Roux et al., 2015; Campos-Herrero et al., 2016). Il semble également que des transmissions de *M. massiliense* entre patients CF infectés aient lieu (Bryant et al., 2013). Face à l'augmentation des souches développant des résistances aux différents traitements (Nessar et al., 2012; Cândido et al., 2014), des recommandations ont été établies concernant la prise en charge des infections à MNT notamment *M. abscessus* dans un contexte de mucoviscidose (Floto et al., 2016).

Le complexe *M. abscessus* peut également être responsable d'infections pulmonaires chez des patients présentant des pathologies génétiques autres que la mucoviscidose, comme le syndrome du triple A (autrement appelé syndrome d'Allgrove, une maladie génétique autosomique

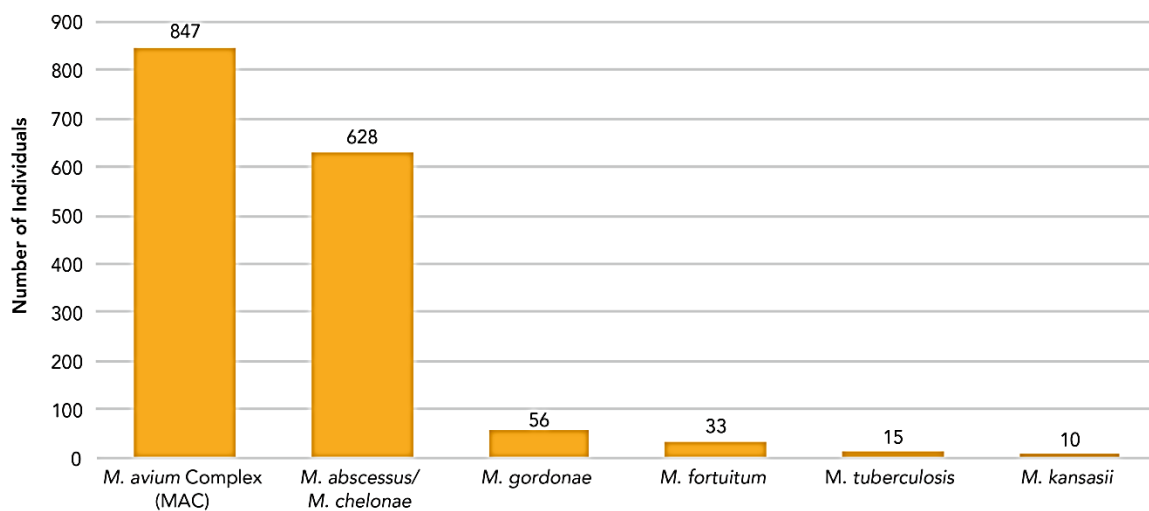


Figure 11 : Espèces mycobactériennes isolées aux Etats-Unis chez des patients en 2014.

Parmi l'ensemble des individus infectés et dont les cultures bactériennes étaient positives à des mycobactéries, 39,5 % de ces derniers l'étaient par *M. abscessus* ou *M. chelonae* (Cystic Fibrosis Foundation, 2014)

récessive tirant son nom en référence aux divers symptômes d'Alacrymie, d'Achalasie et de résistance à l'hormone Adrénocorticotrope) (Emiralioglu et al., 2016) ou présentant une PMIM (pour prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes, maladie autosomique récessive induisant un déficit en IFN γ (Interféron γ) et/ou d'IL12)(Lee et al., 2012b). Au-delà de ce tropisme pulmonaire, ces mycobactéries peuvent aussi être observées dans d'autres organes.

II C Les infections extrapulmonaires

Le complexe *M. abscessus* est également retrouvé lors d'infections nosocomiales provoquées par l'utilisation de matériel opératoire contaminé et pouvant survenir chez des patients sains ou présentant des pathologies préexistantes (Villanueva et al., 1997; Galil et al., 1999; Brown-elliott et al., 2002). En particulier, dans les pays tournés vers le tourisme esthétique, le nombre de ces infections augmente de façon alarmante évoluant vers de véritables épidémies (Murillo et al., 2000; Furuya et al., 2008; Galmés-Truyols et al., 2011; Wongkitisophon et al., 2011; Cai et al., 2016). Aux États-Unis, des patients ayant subi une chirurgie abdominale ont développé de graves infections postopératoires provoquées par *M. abscessus* (Wallace et al., 1998; Furuya et al., 2008). En Thaïlande, des survivants au tsunami de 2004, dont des membres ont été écrasés, ont développé des infections à *M. abscessus*, apparaissant deux mois après le traumatisme (Appelgren et al., 2008). Ces surinfections de plaies incriminant *M. abscessus* ont également été observées dans le cadre de blessures de guerre (Lauren et al., 2016). Des cas de contamination plus rares peuvent être observées, comme le cas d'une femme présentant une cirrhose ayant développé une infection du péritoine provoqué par *M. abscessus* (Kahn et al., 2016). La bactérie peut également traverser la barrière hémato-méningée et provoquer des encéphalites et méningites générant de très graves lésions du système nerveux central (Lee et al., 2012a; Baidya et al., 2016). Des septicémies suite à l'utilisation de cathéters peuvent survenir et sont pour 20 % d'entre elles provoquées par *M. abscessus* (Rodriguez-Coste et al., 2016). *M. abscessus* peut aussi être à l'origine d'ostéomyélites (Sarma et al., 2011), d'infections sous-cutanées (Prinz et al., 2004) ou d'empyèmes pleuraux (Fairhurst et al., 2002; Lai et al., 2013). Même si dans la plupart des cas *M. abscessus* est retrouvée chez des patients présentant une immunodépression acquise, héréditaire ou bien provoquée par différents traitements immunosuppresseurs (Besada, 2011), elle peut contaminer des personnes sans facteur prédisposant (Mueller and Edson, 2001). En particulier, les enfants immunocompétents semblent être des cibles privilégiées par ces mycobactérioses. Une épidémie survenue dans une piscine publique de 2006 à 2010 a impliqué de nombreux enfants présentant des lésions cutanées à *M. abscessus* sur les mains et les pieds (Sinagra et al., 2014). Suite à leur passage dans une clinique dentaire pédiatrique, d'autres enfants ont présenté des infections buccales causées par *M. abscessus* (Peralta et al., 2016).

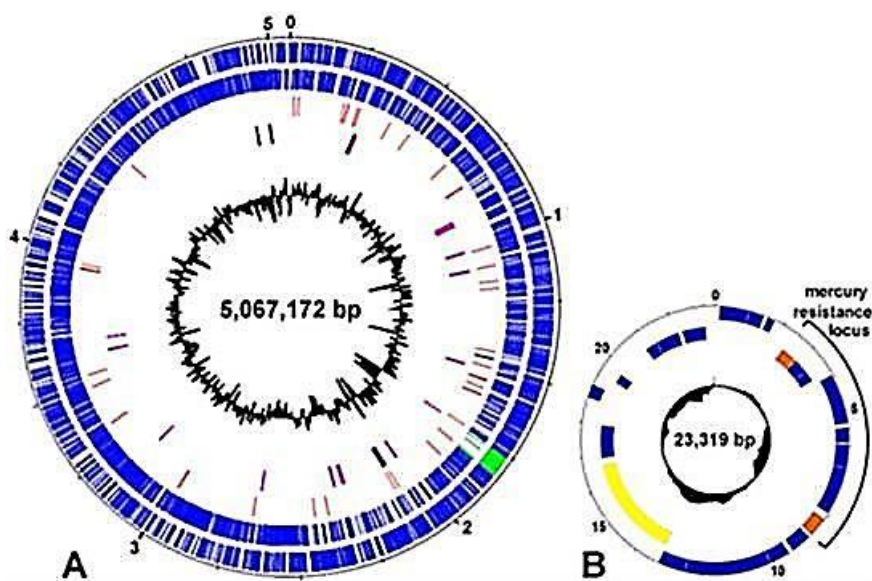


Figure 12 : génome de *M. abscessus* CIP 104536T

Génome de *M. abscessus* composé d'un chromosome circulaire de 5,1 GB présentant un prophage complet de 81 kb (vert) (A) et d'un plasmide de 23 kb hébergeant un locus de résistance au mercure (B) (Ripoll et al. 2009).

II D Les évolutions possibles des infections à *M. abscessus*

Les infections à *M. abscessus* se caractérisent par le développement des lésions granulomateuses pseudo-tuberculeuses (Figure 4 et 7) (Tomashefski et al., 1996; Rodríguez et al., 1997; Medjahed et al., 2010). Cependant, dans le cas de *M. abscessus*, et plus particulièrement dans un contexte mucoviscidosique, la phase de latence semble différente et consiste en une infection chronique avec une phase de persistance bactérienne indolente, asymptomatique cliniquement, empêchant une prise en charge thérapeutique précoce des patients (Cullen et al., 2000).

Le large spectre d'infections et de symptômes provoqués par *M. abscessus* fait d'elle une MNT pathogène originale qui s'explique d'une part, par l'originalité de son génome porteur de gènes de virulence d'origine mycobactérienne et d'origine non mycobactérienne et, d'autre part, par son hétérogénéité phénotypique, ses mécanismes de défense chez l'hôte et sa capacité intrinsèque à résister à la plupart des antibiotiques actuellement disponibles.

III Le génome de *M. abscessus* et facteurs de virulence mycobactériens et non-mycobactériens

Le génome de *M. abscessus*, séquencé en 2009 (Ripoll et al. 2009), est constitué d'un chromosome circulaire de 5 067 172 paires de bases (pb) avec un GC% de 67 %, d'un prophage complet de 81kb et d'un plasmide de 23 319 pb conférant une résistance au mercure et présentant une très forte homologie avec celui retrouvé chez *M. marinum* (Ripoll et al. 2009) (Figure 12). Le séquençage du génome de *M. massiliense* a été achevé en 2014 (Sekizuka et al., 2014) et celui de *M. bolletii* en 2016 (Caverly et al., 2016).

La comparaison du génome du complexe *M. abscessus* avec celui de *M. tuberculosis* a mis en évidence de fortes homologies de séquences. Environ 90 gènes de virulence, identifiés chez *M. tuberculosis*, sont également présents chez *M. abscessus* (Ripoll et al., 2009; Choo et al., 2014). De nombreuses voies métaboliques sont également partagées par ces deux espèces telles que les voies de synthèse des acides gras impliquées dans la formation et la structuration de l'enveloppe mycobactérienne. Son génome contient également de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques.

III A Gènes de virulence d'origine mycobactérienne

L'originalité du génome du complexe *M. abscessus*, comparativement aux autres MNT, s'illustre par la présence de nombreux facteurs de virulence présents généralement chez des MCL pathogènes. Certains de ces facteurs de virulence sont impliqués dans la survie intracellulaire. On y

retrouve notamment des protéines PE-PPE (Proline-glutamate ; Proline-Proline-glutamate) qui sont connues pour participer à la virulence, à la persistance et à la pathogénicité de *M. tuberculosis* (Cole and Barrell, 1998; Sayes et al., 2012). Les clusters de gènes ESX, parmi les 5 existant chez *M. tuberculosis* : ESX-1 à ESX-5 (Abdallah et al., 2007), codent pour un système de sécrétion de type VII (Cole and Barrell, 1998; Abdallah et al., 2007; Bitter et al., 2009a, 2009b; Siegrist et al., 2009). Chez *M. abscessus*, deux orthologues de ces gènes sont conservés, ESX-3 et ESX-4 (Ripoll et al., 2009; Sassi and Drancourt, 2014; Sapriel et al., 2016). Chez les actinomycètes, les gènes *mce* (Mammalian Cell Entry) sont généralement impliqués dans l'invasion cellulaire et sont des indicateurs de pathogénicité. Chez *M. abscessus*, ces gènes sont regroupés dans 7 opérons, alors que chez *M. smegmatis*, ils sont regroupés dans quatre opérons. Les gènes *mce* sont localisés dans MmGI-1, un îlot génomique présent chez les actinomycètes et chez les mycobactéries. Chez *M. massiliense*, MmGI-1 serait le résultat de transferts horizontaux ou de recombinaisons génétiques qui auraient eu lieu entre cette espèce et le complexe MAC (Sekizuka et al., 2014). *M. abscessus* est aussi capable de moduler la réponse immunitaire grâce à des protéines de type LpqH-like, agonistes des TLR-2. Chez *M. tuberculosis*, ces protéines sont notamment impliquées dans la reconnaissance bactérienne par le système immunitaire et l'activation des macrophages (Thoma-Uszynski et al., 2001; Roux et al., 2011; Sekizuka et al., 2014).

III B Gènes de virulence d'origine non-mycobactérienne

La singularité du génome de *M. abscessus* se caractérise aussi par l'acquisition de gènes d'origine non mycobactérienne. Le partage d'une même niche écologique ou d'un même environnement, avec d'autres espèces bactériennes impliquées dans les infections chez les patients atteints de mucoviscidose, favoriserait l'acquisition de gènes par transfert horizontal. Parmi ceux-ci, on trouve un gène codant une phospholipase C (PLC), une protéine impliquée dans la sortie des phagosomes et présente chez les pathogènes intracellulaires (Titball, 1993). Chez *M. abscessus* cette PLC est exprimé à partir du gène *MAB_0555* lorsque la bactérie se trouve dans des amibes. Des infections de souris par *M. abscessus* préalablement cultivée en présence d'amibes, augmentent la capacité d'invasion des poumons de ces mycobactéries comparativement à celles cultivées sans amibes (N'Goma et al., 2015). Le facteur MgtC (Mg²⁺ Transport protein C), une protéine identifiée chez *Salmonella typhimurium* et *M. tuberculosis*, confère à *M. abscessus* la capacité à survivre dans les macrophages ou en milieu carencé de Mg²⁺ (Blanc-Potard and Lafay, 2003; Le Moigne et al., 2016). L'utilisation d'un vaccin, construit autour du gène *MAB_3593* codant la protéine MgtC de *M. abscessus*, a dernièrement été associé à une production d'anticorps spécifique à cette protéine. Cette stratégie vaccinale innovante pourrait permettre d'aboutir à une meilleure protection contre des infections causées par *M. abscessus* (Le Moigne et al., 2016), à l'instar de ce qui a été observé

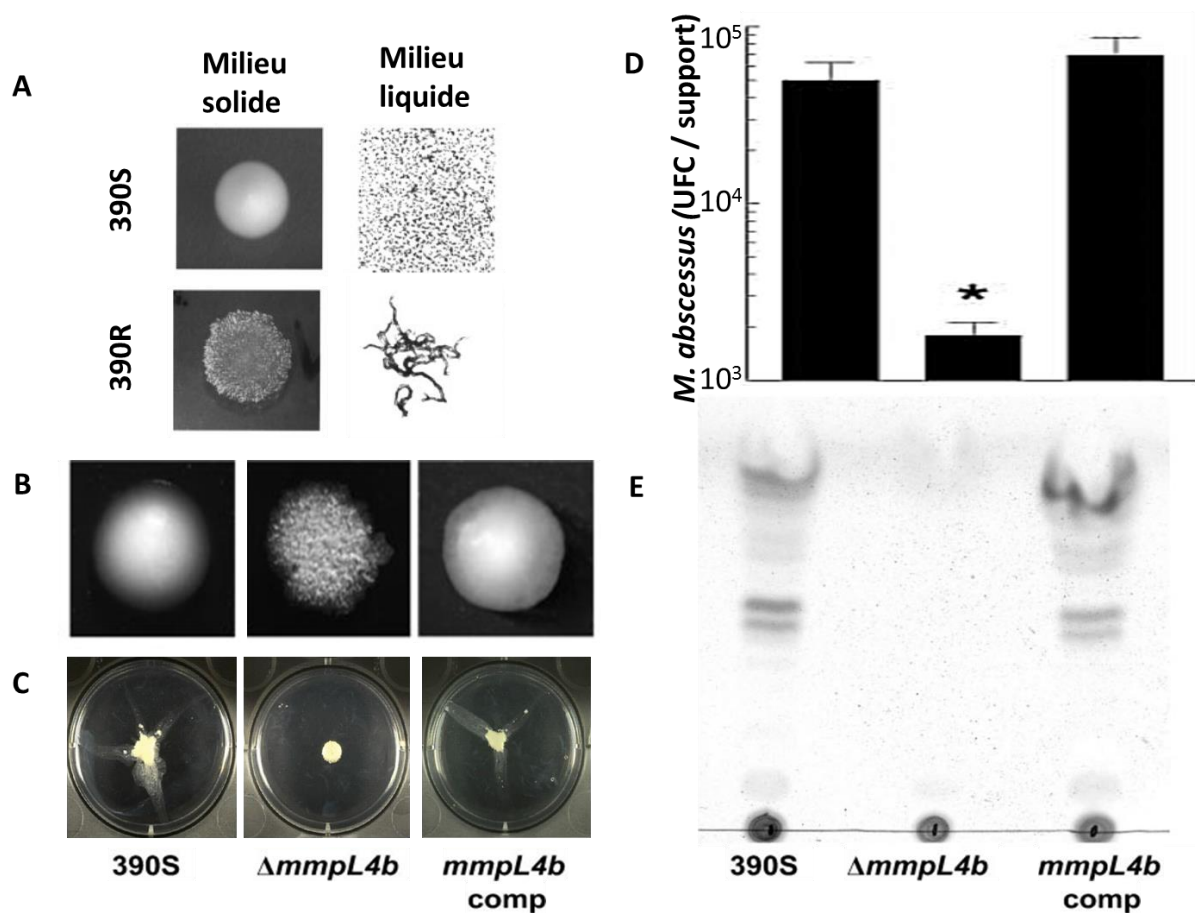


Figure 13 : Les variations phénotypiques de *M. abscessus*

A/ Différence phénotypique entre la souche parentale 390S et la souche parentale 390R dérivant de la souche 390S. Sur milieu solide la souche mutante 390R est caractérisée par des colonies sèches et rugueuses, la souche parentale (390S) présente des colonies muqueuses et lisses. En culture liquide la souche lisse reste homogène, alors que la souche rugueuse développe des cordes.

B/ Culture solide : la souche mutante ($\Delta mmpL4b$) est caractérisée par des colonies sèches et rugueuses alors que la souche parentale (390S) et la souche complétée ($\Delta mmpL4b comp$) sont caractérisées par des colonies muqueuses et lisses.

C/ Capacité de glissement (Sliding) présente uniquement chez la souche parentale et complétée

D/ Utilisation de la technique de MBEC (anciennement de Calgary Biofilm Device) : Nombre d'Unité Formant des Colonies (UFC) par support mis en contact dans un milieu de culture contenant l'une des trois souches. Capacité de former des biofilms à l'interface air-liquide observée uniquement chez les souches parentales et complétées

E/ Chromatographie sur couches minces de silice d'extrait de lipide montrant la présence de GPL chez la souche S et le mutant complété.

D'après (Howard et al., 2006; Medjahed and Reytrat, 2009; Nessar et al., 2011)

avec la PLC de *M. abscessus* (N'Goma et al., 2015). Le gène *msrA*, codant une méthionine sulfoxyde reductase, homologue de celui présent chez *Rhodococcus sp.*, est également présent chez *M. abscessus*. MsrA est connu chez *M. tuberculosis* pour son rôle de réparation des dommages engendrés par les espèces réactives de l'azote (John et al., 2001; Ripoll et al., 2009). Quatre gènes en opéron, similaire au locus codant pour le transporteur de type ABC (ATP Binding Cassette) du Fe^{3+} , sont présents chez *M. abscessus* (Ripoll et al., 2009; Wells et al., 2013), et sont habituellement observés chez les bactéries pathogènes tels que *S. typhimurium* ou *Burkholderia cenocepacia*. Ce mécanisme de captation du fer assurée par ces transporteurs, est important dans la virulence bactérienne (Ratledge, 2004; Rodriguez, 2006; Wells et al., 2013). D'autres gènes de virulence présents chez trois autres pathogènes de la mucoviscidose sont aussi retrouvés chez *M. abscessus*, telles que des cystéines désulfurases, ou le locus *dnd*, permettant la dégradation de l'ADN qui est présent en grande quantité dans les sécrétions pulmonaires des patients mucoviscidosiques (Zhang et al., 2004; Ripoll et al., 2009). On retrouve aussi le gène codant la phénazine, précurseur de la pyocyanine présent chez *Pseudomonas aeruginosa* et qui est impliqué dans la persistance de cette bactérie dans la mucoviscidose (Lau et al., 2004). L'acquisition de tous ces gènes, souligne l'originalité génomique de *M. abscessus* pouvant ainsi jouer un rôle dans sa pathogénicité et la présenter comme une MCR capable de persister dans un contexte intracellulaire et capable d'échapper au système immunitaire (que ce soit en se protégeant des radicaux oxygénés/azotés ou en inhibant la maturation du phagolysosome et de l'apoptose) (Choo et al., 2014).

IV Hétérogénéité phénotypique et virulence de *M. abscessus*

Les GPL sont les composés les plus abondants de la surface externe de la paroi mycobactérienne de certaines MNT, dont *M. abscessus*. A l'instar de nombreuses mycobactéries, *M. abscessus* possède 2 morphotypes qui sont associés à la présence ou non de GPL (Ripoll et al., 2007). En culture sur milieu solide, un défaut de synthèse de GPL se caractérise par des colonies « sèches » et rugueuses (morphotype R), alors que la synthèse de GPL rend les colonies muqueuses et lisses (morphotype S). Une étude génomique et transcriptomique a mis en évidence la présence de mutations par insertion/délétion (indels) au sein des génomes de chaque morphotype S et R de *M. abscessus* (Pawlik et al., 2013). Cette étude indique que des gènes, impliqués dans la biosynthèse des GPL (*mps1*, *mps2*) et dans le transport (notamment *mmpL4b*), présentent des indels bloquant leur transcription dans le morphotype R. Un phénotype R similaire était obtenu à partir du morphotype S de *M. abscessus* par insertion d'une cassette de résistance au sein du même gène *mmpL4b* et entraînant la perte des GPL (Medjahed and Reytrat, 2009; Nessar et al., 2011) (Figure 13).

L'expression des GPL est également nécessaire pour permettre aux bactéries de se déplacer par glissement ou de former des biofilms (Howard et al., 2006; Nessar et al., 2011). En revanche le défaut de synthèse de GPL chez le morphotype R lui confère la capacité de s'agréger et de former des « cordes » sur milieu solide ou en milieu liquide (Howard et al., 2006; Sánchez-Chardi et al., 2011). Ces cordes, consistant en l'agglomération de manière coordonnée des bacilles, est une caractéristique retrouvée chez les mycobactéries pathogènes comme *M. tuberculosis* et associée à leur virulence (Glickman et al., 2000). En empêchant la phagocytose de *M. abscessus* par les macrophages, les structures en cordes (Jönsson et al., 2012) ont récemment été décrites comme un nouveau mécanisme de virulence original chez *M. abscessus* (Bernut et al., 2014c). En effet, du fait de leur taille, les cordes protègent le bacille contre la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles. La formation de ces cordes peut donc être considérée comme un phénomène de plasticité morphologique et un moyen d'échappement au système immunitaire de l'hôte. Au-delà de ces différences morphologiques et de biosynthèse de ces GPL, le morphotype R est plus virulent dans des cas d'infections de souris ou de monocytes humains (Byrd and Lyons, 1999). Chez les souris, des infections persistantes accompagnées de lésions caséuses apparaissent et provoquent une mort rapide suite à l'infection du morphotype R par voie intraveineuse (Catherinot et al., 2007). Le variant R induit également une réponse inflammatoire intense impliquant la voie TLR-2 caractérisée par une surproduction du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α) (Roux et al., 2011). Chez les patients mucoviscidotiques, les variants R colonisent majoritairement les voies respiratoires dans les cas d'infections persistantes (Jönsson et al., 2007) et sont généralement retrouvés dans les cas d'infections pulmonaires les plus graves (Catherinot et al., 2009).

V Traitements et mécanismes de résistance

M. abscessus est considérée comme multi-résistante aux traitements antibiotiques (Griffith et al., 1993; Nessar et al., 2012). Actuellement seules quelques molécules sont actives contre cette mycobactérie.

V A Traitements contre *Mycobacterium abscessus*

Parmi les molécules disponibles et utilisées par le clinicien dans le traitement contre *M. abscessus* (Novosad et al., 2016), nous retrouvons essentiellement 4 antibiotiques : 1) l'imipénème (carbapénème de la famille des β -lactamines altérant la synthèse de la paroi bactérienne), 2) la céfoxitine (céphamycine, de la famille des β -lactamines), 3) l'amikacine (aminoglycoside qui cible la synthèse protéique) et 4) la clarithromycine (et/ou azythromycine, macrolide qui cible la synthèse protéique).

Introduction : le complexe *Mycobacterium abscessus*

| A Traitements | Voies | Temps de traitement (mois) |
|--|----------------------------------|--|
| Amikacine (AK) | Intraveineuse (IV); Nébulisation | 2,5-6 ; 12-16 |
| Céfoxitine (CEF) | IV | 12-16 |
| Clarithromycine (CLA) | Orale ; IV | 12-16 |
| Imipénème (IP) | IV | 1-3 |
| Azithromycine (AZT) | Orale | 16,5 |
| Céfoxitine (CEF) | IV | 12-16 |
| Ethambutol (ETH) | Orale | 12-24 |
| Linezolid (LZ) | Oral | 12-16 |
| Moxifloxacine (MX) | Orale | 12-16 |
| Minocycline (MI) | Orale | 12-16 |
| Rifampicine (RIF) | Orale | 12-16 |
| Rifabutine (RIFa) | Orale | 12-16 |
| Streptomycine (STR) | Intramusculaire ; IV | 3-6 |
| Tigecycline (TGL) | IV | 1-3 |
| B Effet secondaire | Taux d'incidence (%) | Potentiellement induit par |
| Nausées / vomissements, douleurs abdominales, diarrhée. | 23 | CLA ; CLO ; AK ; TGL ; AZT ; IP ; RIF ; MX |
| Prurit, décoloration de la peau | 11 | CLO |
| Insuffisance rénale / anémie | 9 | CLA ; AK ; IP ; AZT ; RIF ; RIFa ; CEF |
| Perte de poids | 7 | CLA ; CLO ; AK ; TGL ; AZT ; IP ; RIF ; MX |
| Tintements (acouphènes) | 6 | CLA ; AZT |
| Perte d'équilibre | 4 | ETH |
| Transaminases élevé dans le foie/ hépatites | 4 | CLA ; AK ; IP ; AZT ; RIF ; RIFa |
| Irritation des voies respiratoires | 3 | |
| Neutropénie ou thrombocytopénie | 2 | RIFa |
| Anxiété, retard de croissance, la fatigue, candidose (infection fongique) génito-urinaire et orale, inflammation de l'œil, épilepsie | 5 | ETH ; RIFa ; MX ; IP |

Tableau 2 : Traitement classique des infections à *M. abscessus*.

A Les différents traitements utilisés pour soigner des infections pulmonaires ou extrapulmonaires provoquées par *M. abscessus*. Les traitements classiques sont indiqués en rouge.

B Les différents effets secondaires induits par ces traitements et leur taux d'incidence.

D'après (Griffith and Aksamit, 2012; Leung and Olivier, 2013; Mirsaeidi et al., 2014; Floto et al., 2016; Koh et al., 2016; Novosad et al., 2016).

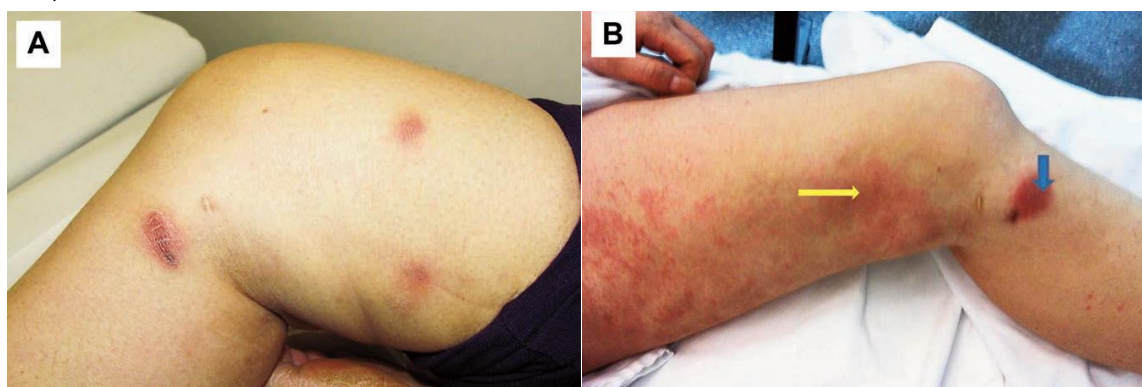


Figure 14 : Type de réaction et effets indésirables de traitements antibiotiques suite à une infection causée par *M. abscessus* dans un contexte post-liposuction

A) Lésions papuleuses présentes sur la cuisse droite et à la jambe lors de l'admission d'une patiente présentant des infections à *M. abscessus* suite à une liposuction.

B) Réaction induisant une éruption maculo-papuleuse provoqué par la céfoxitine administrée pendant le traitement combinant amikacine et céfoxitine par voie intraveineuse et prise par voie orale de clarithromycine pendant (flèche jaune-Céfoxitine). Apparition d'un nouveau nodule d'infection positif à *M. abscessus* (flèche bleue) (Hui et al., 2015).

D'autres antibiotiques sont également proposés (moxifloxacine, linezolide, tigécycline, clofazimine...) mais leur efficacité n'a pas été complètement évalué en clinique (Van Ingen, 2015; Floto et al., 2016). Les dernières recommandations proposent une combinaison de molécules comprenant un macrolide, un aminoside et une β -lactamine par voie intraveineuse durant les 2 à 3 premiers mois du traitement suivi, si l'on peut, par une antibiothérapie par voie orale comprenant impérativement un macrolide pour une durée maximale qui est conditionnée par la date de négativité des cultures bactériennes (Floto et al., 2016). Ces traitements qui consistent dans l'utilisation de molécules déjà existantes (Maurer et al., 2014), longs et sans garantie d'efficacité (Mirsaeidi et al., 2014)(Tableau 2 A), peuvent varier en efficacité en fonction de la sous-espèce du complexe *M. abscessus* (Koh et al., 2011; Harada et al., 2012). Récemment, des études ont été menées afin d'explorer l'activité de certaines combinaisons de molécules contre *M. abscessus* (Singh et al., 2014; Emiralioglu et al., 2016; Lefebvre et al., 2016). Cependant, peu de progrès récents ont été réalisés dans la prise en charge des patients atteints d'infections à *M. abscessus*, et l'absence de traitements antibiotiques efficaces s'accompagne d'un taux de mortalité élevé chez ces patients (Griffith et al., 2007), mais variable selon la sous-espèce impliquée. Lorsque les sous espèces sont clairement identifiées, l'éradication de l'infection est possible (Figure 9)(Kang and Koh, 2016), en particulier lorsqu'elle est causée par *M. massiliense* (Koh et al., 2011). Parfois, le traitement antibactérien s'accompagne d'effets indésirables qui exacerbe la gravité de la maladie (Griffith and Aksamit, 2012; Hui et al., 2015). Ce phénomène aussi appelé paradoxe du traitement a déjà été observé lors de la prise d'antituberculeux (Breen et al., 2004; Shah et al., 2012), et complique la prise en charge de l'infection suite à l'inefficacité des traitements et/ou des effets secondaires de certains antibiotiques (Hui et al., 2015) (Tableau 2 B et Figure 14).

V B Les mécanismes de résistance aux traitements chez *Mycobacterium abscessus*.

M. abscessus possède un large arsenal de gènes de résistance aux antibiotiques et aux agents désinfectants connus. Ces mécanismes définissent le phénotype de résistance naturelle de *M. abscessus*. La présence dans son génome d'un plasmide de résistance au mercure, rend cette bactérie particulièrement résistante aux différents agents désinfectants dérivés de mercure organique et inorganique (Mcdonnell and Russell, 1999; Ripoll et al., 2009; Nessar et al., 2012; Cortesia et al., 2014). Des enzymes modifiant ou désactivant les antibiotiques sont également présentes, tels que : 1) la rifampicine ADP-ribosyltransferase capable de dégrader la rifampicine rendant la bactérie naturellement résistante à cet antibiotique, 2) un homologue de l'UDP-N-acetylglucosamine1-carboxyvinyltransferase (MurA) responsable de la résistance naturelle à la fosfomycine et 3) une β -lactamase, notamment Bla_{mab}, qui dégrade les β -lactamines (Ripoll et al., 2009; Lavollay et al., 2014; Soroka et al., 2014; Dubée et al., 2015).

Introduction : le complexe *Mycobacterium abscessus*

| Mécanismes de résistance naturels | | | |
|-----------------------------------|---|--|--|
| Antibiotiques | Mécanismes | Locus et gènes associés dans la résistance | Protéines impliquées |
| Aminosides | <ul style="list-style-type: none"> - Perméabilité sélective de l'enveloppe cellulaire empêchant l'absorption de la drogue, - enzymes modifiant les antibiotiques | <i>MAB_4395</i> , <i>MAB_0327</i> , <i>MAB_0951</i> , <i>MAB_3637c</i> , <i>MAB_4910c</i> , <i>MAB_4395</i> | Aminoglycoside 2-N-acetyltransferase Aminoglycoside phosphotransferases |
| Rifampicine | Enzymes dégradant l'antibiotique | <i>MAB_0951</i> | rifampicine ADP-ribosyltransferase |
| β-lactamines | Enzymes dégradant l'antibiotique | <i>MAB_2875</i> | β-lactamase (Ambler class A beta-lactamase) Bla _{mab} |
| Macrolides | Enzymes modifiant la structure de la cible | <i>Erm(41)</i> <i>MAB_2297</i> | 23S RNA méthyltransférases |
| Fosfomycine | Empêche la fixation de la drogue qui normalement bloque la formation d'acide N-acétylmuraminique (constituant essentiel du peptidoglycane) | <i>murA</i> | UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase MurA |
| Étambutol | Mutations dans le gène | ERDR d' <i>embB</i> | Arabinosyl transférase |
| Différentes molécules | Pompes à efflux exportant les drogues à l'extérieur des bactéries | Répartie dans le génome | Transporteurs ABC Famille des MmpL |
| Composés métalliques | <ul style="list-style-type: none"> - Dégrade les composés et détoxifie le milieu interne - exporte à l'extérieur les composés mercuriels <i>via</i> les pompes à efflux | Plasmid <i>pMM23</i> , <i>MAB-p05c</i> , <i>MAB_p06c</i> | MerR, mercure réductase Opéron <i>ars</i> |
| Mécanismes de résistance acquis | | | |
| Aminosides | Mutations (A1408G, T1406A, C1409T, G1491T) dans le gène empêchent la fixation des aminosides sur l'ARN ribosomique, qui n'induit plus d'erreur dans le décodage des codons. | <i>rrs</i> | ARN 16S |
| Macrolides | Les mutations (A2058G, A2058C, A2058T, A2059T, A2059C, A2059G) dans le gène empêchent la fixation des macrolides sur l'ARN ribosomique, qui ne bloque plus la synthèse protéique. | <i>rrl</i> | ARN 23S |
| Fluoro-quinolones | Mutation, Ala90Val, dans le gène qui va empêcher la fixation des fluoroquinolones sur l'ADN gyrase, restituant la réplication de l'ADN bactérien. | <i>gyrA</i> | Sous-unité A de la gyrase |

Tableau 3 : Mécanismes de résistance naturels et acquis chez *M. abscessus*

Description des mécanismes de résistance naturels et acquis identifiés chez *M. abscessus* d'après (Ripoll et al., 2009; Nessar et al., 2012; Rubio et al., 2015)

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces β -lactamases, tels que l'avibactam en combinaison avec l'amoxicilline, restaurent l'efficacité des B-lactamines *in vitro* et *in vivo* (Dubée et al., 2015; Lefebvre et al., 2016). Par ailleurs, le gène *erm(41)* procure à la bactérie la capacité de modifier les macrolides, et est responsable d'une résistance inductible aux macrolides au sein du complexe *M. abscessus* (Nash et al., 2009). L'expression et la régulation de ce gène sont différentes selon la sous-espèce au sein du complexe. Chez *M. massiliense*, le gène *erm(41)*, contient deux délétions ne permettant plus son expression, rendant cette sous-espèce sensible à la clarithromycine (Kim et al., 2010; Bastian et al., 2011). Ces différences de sensibilité face aux antibiotiques au sein du complexe de *M. abscessus* ont été à la source du débat sur leur séparation en sous-espèces (Koh et al., 2011; Harada et al., 2012). *M. abscessus* est naturellement résistant à l'éthambutol, dû à la présence d'une région ERDR (Etambutol Resistance-Determining Region) dans le gène *embB* qui est conservée chez les espèces mycobactériennes résistantes à l'éthambutol (Nessar et al., 2012). La résistance acquise aux différents antibiotiques chez *M. abscessus* résulte également de mutations spontanées affectant les cibles des antibiotiques. L'existence d'un unique opéron ribosomal chez ces bactéries favoriserait en effet l'acquisition de ces mutations dominantes sur les gènes *rrs* et *rrl* induisant une résistance aux aminosides et aux macrolides (Wallace et al., 1996; Prammananan et al., 1998). D'autres gènes codant des transporteurs ABC et certaines protéines de la famille des MmpL participeraient à la résistance de *M. abscessus* par phénomène d'efflux (Ripoll et al., 2009)(Tableau 3). Enfin, la paroi mycobactérienne (Cf. Introduction chapitre III) agit comme une barrière hydrophobe réduisant la pénétration et l'accessibilité de certaines molécules dans la bactérie (Daffé and Draper, 1998; Daffé, 2015). Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être envisagées, comme la recherche de molécules réellement plus actives contre ce pathogène.

VI Les modèles expérimentaux d'étude pharmacologique et physiopathologique

L'étude des interactions hôte-pathogène nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux. Dans le contexte des infections à *M. abscessus*, le choix du ou des modèles sera fonction de la relation naturelle existant entre le modèle et la bactérie, la reproductibilité des expérimentations réalisées, dans le but de se rapprocher du cadre nosologique de la pathologie étudiée. Enfin, ces modèles doivent être compatibles avec les normes éthiques en vigueur, être faciles d'utilisation, et permettre de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer).

VI A Le modèle cellulaire

Le modèle cellulaire, qu'il soit *ex vivo* ou *in vitro*, est utilisé depuis longtemps dans l'étude des infections mycobactériennes. Les macrophages (humain ou murin), permettent d'effectuer des expérimentations rapides pour l'étude du comportement intracellulaire de *M. abscessus*

(Byrd and Lyons, 1999; Catherinot et al., 2007; Rottman et al., 2007), mais ne peuvent refléter la totalité des événements qui surviennent durant l'infection. Ils permettent néanmoins de comprendre les interactions intimes entre les premières cellules participant à l'immunité innée et l'agent pathogène. Ces cellules permettent également d'évaluer l'activité intracellulaire de certaines molécules antibactériennes (Lefebvre et al., 2016).

VI B Le modèle murin

L'utilisation de modèles animaux se justifie par le besoin d'expérimentations effectuées dans un organisme complexe, plus proches des observations faites chez l'Homme, par exemple dans l'étude du processus infectieux, depuis la colonisation jusqu'à l'effet pathogène des bactéries, ou d'évaluer l'efficacité de molécules à visée thérapeutique. La première expérimentation animale avec *M. abscessus* a été réalisée dans un modèle murin (Runyon, 1959). Par la suite, Byrd et Lyons ont développé l'utilisation de ce modèle murin, mais immunodéprimé, en induisant des infections à *M. abscessus* par voie intra-trachéale, démontrant que seul le morphotype R persistait dans les poumons et la rate 28 jours après l'infection (Byrd and Lyons, 1999). Le modèle d'infection par voie intraveineuse a été développé ultérieurement sur des souris C57BL/6 considérées comme résistantes aux infections par les mycobactéries (Rottman et al., 2007), permettant de démontrer d'une part toute la différence de virulence entre *M. abscessus* et *M. chelonae*, et d'autre part de l'importance de la réponse cellulaire T et B pour contrôler les infections à *M. abscessus*. Ce même modèle a confirmé la différence de virulence entre les morphotypes S et R de *M. abscessus* (Catherinot et al., 2007). Mais, *M. abscessus* étant considéré comme un pathogène pulmonaire, ces modèles d'infection ne reproduisent pas le mode de transmission naturelle de cette bactérie, comme le montre la faible, voire l'absence, d'infection au niveau des poumons. Des modèles d'infection par aérosolisation ou administration intratrachéale de *M. abscessus* ont été développés (Ordway et al., 2008; Le Moigne et al., 2015, 2016; N'Goma et al., 2015). Ces infections ont été réalisées pour la première fois *via* l'utilisation de cobayes, de souris C57BL/6, de souris déficientes en leptine ob/ob et de souris déficiente en IFN γ (Ordway et al., 2008). Dans cette dernière étude, tous les animaux ont développé une infection pulmonaire, mais suivie de l'élimination des mycobactéries entre 30 et 60 jours après infection (Ordway et al., 2008), excepté dans les souris KO en IFN γ , qui développent une infection persistante dans les poumons jusqu'à après 60 jours après infection. Quelle que soit la méthode d'infection utilisée, il semble que les souris immunocompétentes éliminent totalement la charge bactérienne (Bernut et al., 2014a), avec cependant une réponse humorale plus forte suite aux infections par voie intraveineuse (Jeon et al., 2009). Malgré la difficulté à générer des infections vraies à *M. abscessus* dans les souris immunocompétentes, l'utilisation de modèles immunodéprimés s'avère être intéressant. Par exemple, la souris GM-CSF KO (Granulocyte-macrophage colony-

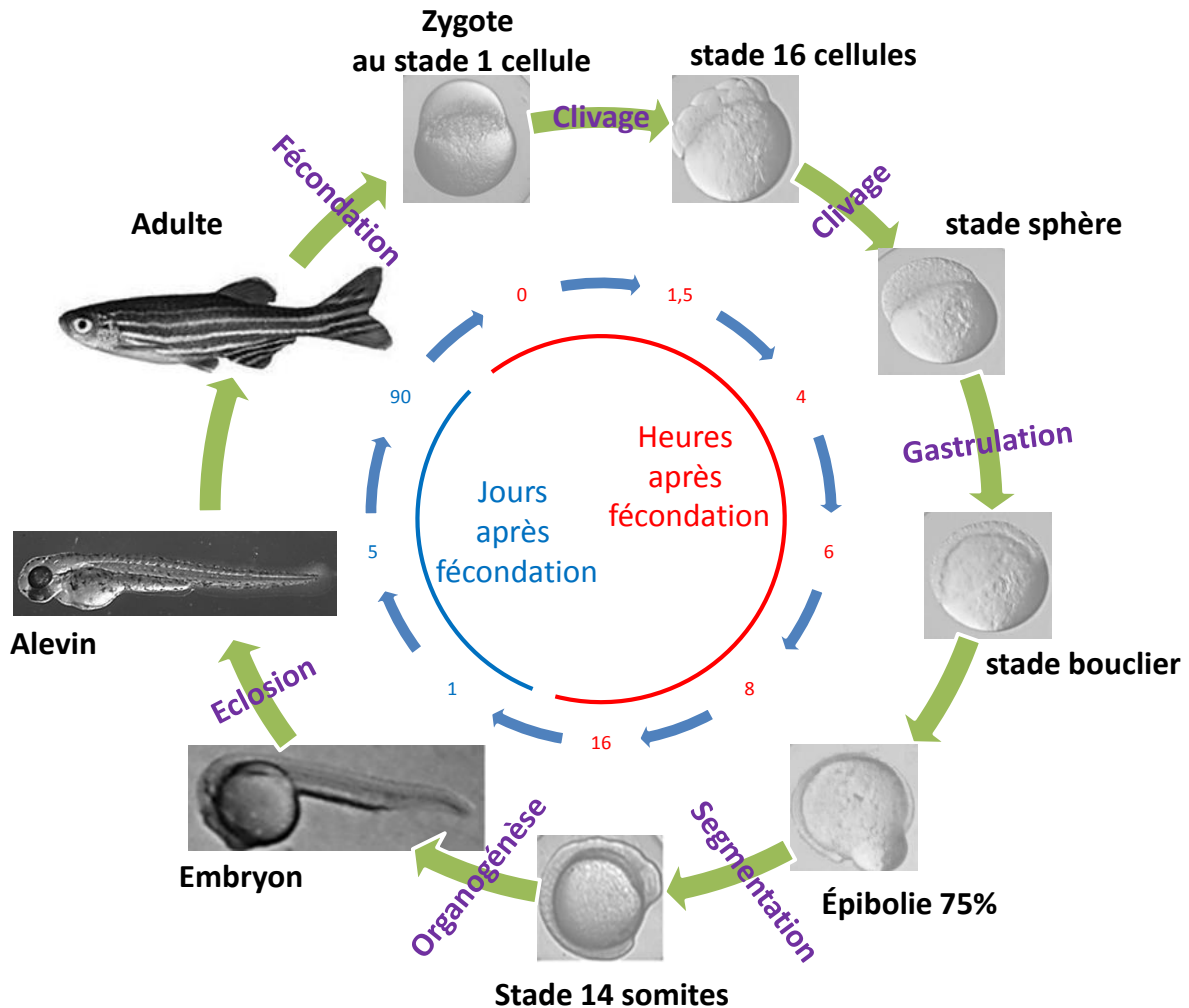


Figure 15 : Cycle de développement du zebrafish

Le développement embryonnaire du ZF est très rapide. Après fécondation, la succession de différentes étapes de clivage cellulaire augmente le nombre de cellules pour former la blastula au stade dit de « sphère ». Durant la gastrulation, l'ectoderme va commencer à entourer l'endoderme qui à 50% de l'épibolie prend un aspect dit de « bouclier ». À 75% de l'épibolie, on peut visualiser le côté dorsal de l'embryon. Au stade de segmentation présentant 14 somites, les différentes parties du corps de l'embryon sont visibles, et la mise en place des premiers organes s'accompagne de l'activation de la circulation sanguine dès le 1er jour après fécondation. L'éclosion de l'embryon survient entre le 2ème et les 3ème jours après fécondation. Dès le 5^{ème} jour après fécondation, l'embryon arbore la majorité des organes, et peut nager et se nourrir de façon autonome. Au bout de 90 jours après fécondation, l'adulte ZF atteint sa maturité sexuelle permettant sa reproduction.

stimulating factor knockout)(De Groote et al., 2014) ou la souris « nude », permettant des infections chroniques persistantes à *M. abscessus*. Utilisées récemment pour évaluer l'efficacité thérapeutique de composés dans un contexte *in vivo*, la céfoxitine et la tigecycline se sont illustrées comme les composés les plus efficaces dans ces modèles d'infections chroniques à *M. abscessus* (Lerat et al., 2014).

VI C Le modèle drosophile

La recherche et le développement de nouveaux modèles alternatifs utilisant des animaux plus permissifs aux infections à *M. abscessus* ont été mis en place par plusieurs équipes. Dans le modèle *Drosophila melanogaster*, les infections se caractérisent par une atteinte musculaire et nerveuse qui induit la mise en place d'une réponse immunitaire *via* la production de peptides antimicrobiens, mais qui ne suffisent pas à éradiquer l'infection, conduisant à la mort de l'animal (Oh et al., 2013). Ce modèle est intéressant, notamment dans le criblage de molécules thérapeutiques du fait de sa facilité de manipulation. Le criblage peut être réalisé en incorporant les différentes molécules dans la nourriture des mouches sur des périodes relativement courtes (Oh et al., 2014). La quantification de la charge bactérienne dans la drosophile et le suivi par microscopie de la taille des foyers infectieux causés par des bactéries fluorescentes, permettent d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ces composés sur un grand nombre d'individus.

VI D Le modèle Zebrafish

Le *Danio rerio*, ou zebrafish (ZF) appartenant aux vertébrés est un poisson de petite taille (4 cm), qui atteint sa maturité sexuelle à l'âge de 3 mois, et est capable de pondre 200 œufs par femelle chaque semaine (Figure 15). Le développement est également très rapide, puisque 24h après fécondation, le zygote monocellulaire forme un embryon, dont la plupart des organes vitaux seront formés des 5 jours après fécondation. L'embryon du ZF est transparent durant les 6 premiers jours après fécondation ce qui offre l'avantage d'observer *in vivo*, dans un organisme vivant, des mécanismes cellulaires et moléculaires du processus infectieux.

De nombreuses lignées transgéniques expriment des protéines fluorescentes de couleur distincte sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un tissu, une cellule ou à une organelle (Figure 16), permettant de suivre leur devenir dans l'embryon vivant. D'autres outils de manipulations génétiques existent sur ce modèle, tels que la technique CRISPR (pour clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats)(Hwang et al., 2013) utilisé pour effectuer de la mutagenèse dirigée, ou des morpholinos. Ces derniers sont de petits oligonucléotides (25 nucléotides) antisens, permettant de bloquer spécifiquement l'expression d'un gène (technique de knock-down).

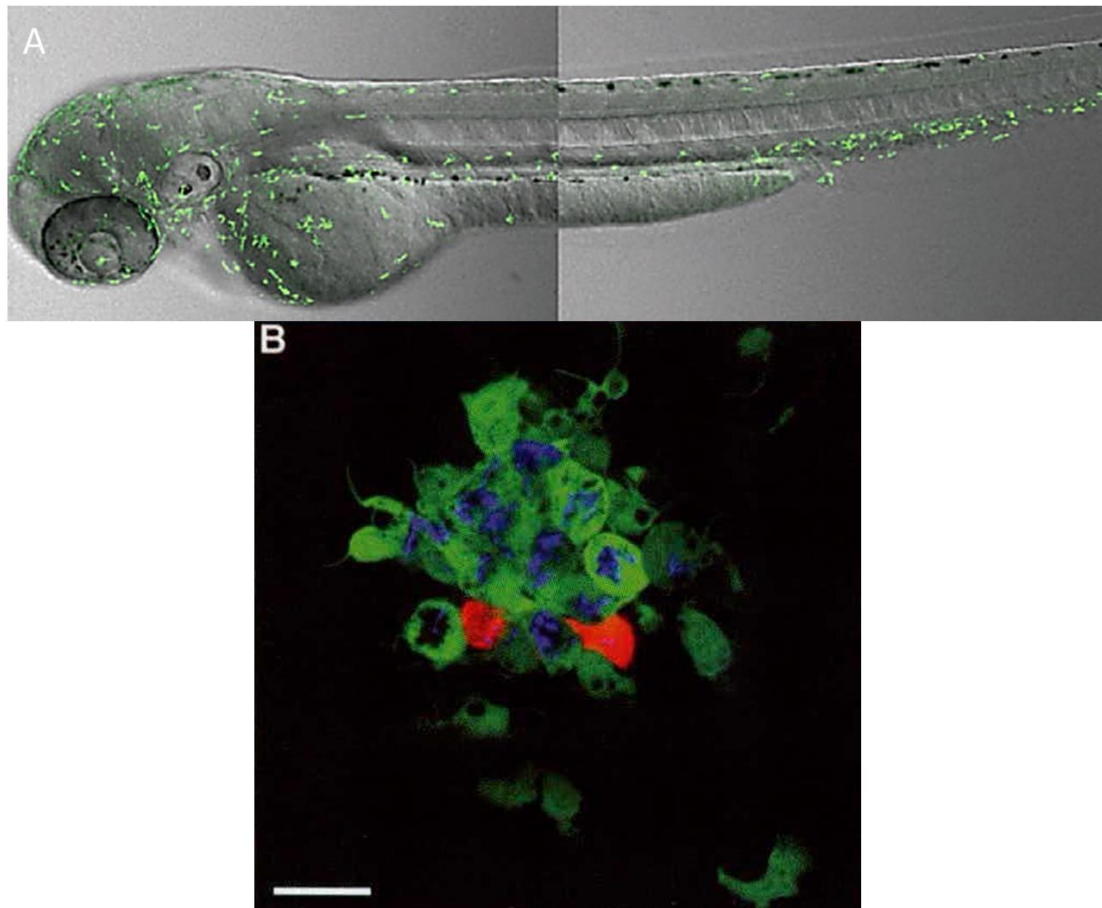


Figure 16 : Image de microscopie fluorescente de lignées transgéniques de ZF infecté avec *M. marinum*.

A/ Embryon issue d'une lignée rapportrice exprimant des macrophages fluorescent en vert. (Barre d'échelle 300µm)

D'après (Torraca et al., 2014)

B/ Développement d'un granulome suite à l'infection par *M. marinum*. Macrophage (vert), neutrophiles (rouges) et bactéries (bleu) (Barre d'échelle 20µm)

D'après (Ramakrishnan, 2013b)

Injectés au stade 1 cellule, ces morpholinos bloquent la fonction d'un gène durant quelques jours (Nasevicius and Ekker, 2000). Ces différents outils, couplés à la transparence optique des embryons, ont permis l'utilisation de ce modèle dans des domaines d'études variées tels que la toxicologie et l'écotoxicologie (Hinton et al., 2005; Bailey et al., 2013), la biologie cellulaire et la cancérologie (Kissa and Herbomel, 2010; White et al., 2013), la régénération tissulaire (Gemberling et al., 2013), les neurosciences (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014), la cardiologie (Wilkinson et al., 2014), l'immunologie (Traver et al., 2003; Trede et al., 2004), l'infectiologie (van der Sar et al., 2004; Colucci-Guyon et al., 2011; Ramakrishnan, 2013a, 2013b; Bernut et al., 2014c) et la pharmacologie (Tamplin et al., 2012; Takaki et al., 2013; Tat et al., 2013).

VI D 1 Système immunitaire

Le ZF possède un système immunitaire homologue à celui retrouvé chez l'Homme (70% d'homologie) (Howe et al., 2013). Cette homologie se traduit par le fait que l'on retrouve chez le ZF la majorité des types cellulaires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes...) et médiateurs cellulaires (cytokines, chimiokines, récepteurs...) présents chez l'Homme (Meeker and Trede, 2008). La mise en place du système immunitaire inné s'effectue très rapidement. Cependant, chez le ZF, la réponse immunitaire adaptative n'apparaît qu'au bout de quatre à six semaines, temps nécessaire pour être morphologiquement et fonctionnellement mature (Lam et al., 2004).

La réponse du système immunitaire présent chez le ZF, notamment face à des infections, montre les mêmes fonctions, activités et niveaux d'expression que ceux observés durant des infections chez les mammifères (Trede et al., 2004; Grayfer et al., 2013). La dissociation originale des deux systèmes immunitaires chez le ZF permet l'étude de la réponse immunitaire innée précocement fonctionnelle indépendamment de la contribution de la réponse immunitaire adaptative durant un processus infectieux en utilisant des bactéries fluorescentes. L'observation dynamique *in vivo* en temps réel de l'évolution du processus infectieux et des réponses cellulaire et moléculaire représente un outil formidable dans l'étude des interactions hôte-pathogène.

VI D 2 Le modèle d'infection du zebrafish

Les infections sont généralement effectuées en injectant directement l'inoculum dans le poisson anesthésié. Les adultes seront généralement infectés par voie intrapéritonéale ou par voie intramusculaire. Chez les embryons, les micro-injections ont lieu directement dans la circulation sanguine au niveau de la veine caudale entre 1 et 3 jours après fécondation des œufs (Davis et al., 2002; van der Sar et al., 2003; Prajsnar et al., 2008, 2013; Clatworthy et al., 2009; Levraud et al., 2009; Vergunts et al., 2010; Alibaud et al., 2011; Mostowy et al., 2013).

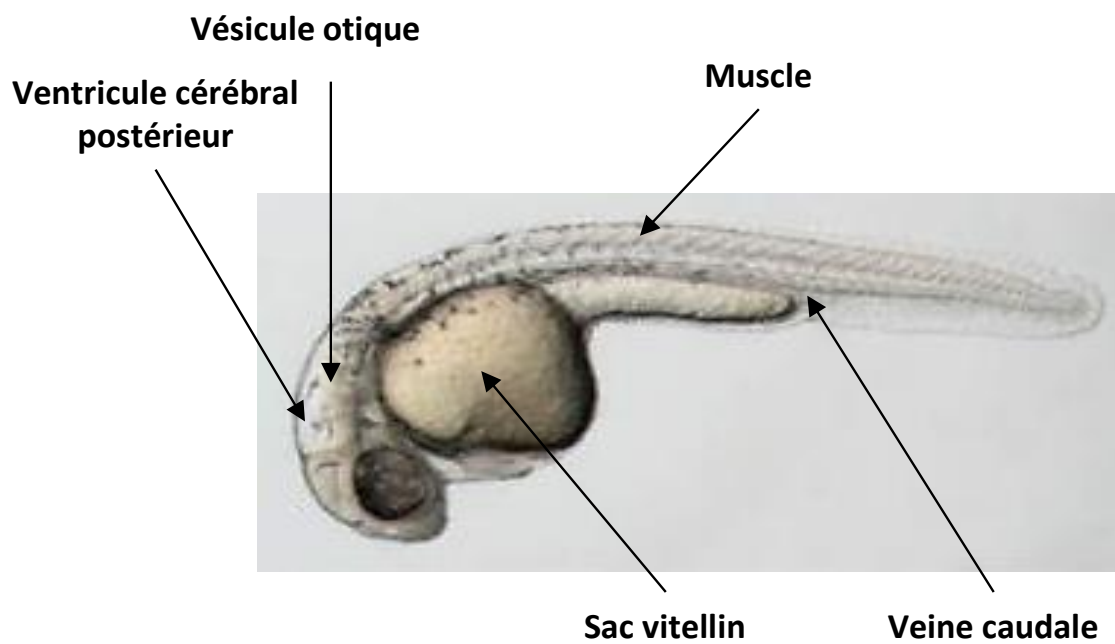


Figure 17 : Les principaux sites d'injection chez l'embryon du ZF

Chez l'embryon du ZF, le choix du site d'infections est fait en fonction du type d'étude que l'on souhaite mener. On privilégie l'injection dans la veine caudale ou dans le sac vitellin pour l'analyse de la virulence d'un pathogène. L'injection dans la vésicule otique, le ventricule cérébral postérieur ou le muscle permet l'analyse du recrutement et de l'activité leucocytaire en réponse à l'infection.

Dans certains cas, l'injection a lieu dans des compartiments clos comme la vésicule otique, le ventricule cérébral postérieur, ou dans le muscle, afin d'observer les phénomènes induits lors de la réponse immunitaire en réponse à l'infection (Colucci-Guyon et al., 2011). En fonction de la bactérie étudiée, le sac vitellin peut être utilisé pour faciliter la rapide croissance bactérienne massive destiné à des applications de criblages de molécules à haut débit (Prajsnar et al., 2008) (Figure 17).

VI D 2 a Utilisation du zebrafish pour l'étude des interactions hôte-pathogène

De nombreux agents bactériens et viraux pathogènes de poissons, notamment en élevage piscicole, ont été étudiés dans le ZF (Rowe et al., 2014). Mais, l'utilisation du ZF a en particulier permis à de nombreuses équipes de modéliser des infections causées par différents agents infectieux responsables de pathologies humaines, notamment dans la tuberculose (Davis et al., 2002; Lesley and Ramakrishnan, 2008; Ramakrishnan, 2013b; Bernut et al., 2014b). Parmi eux, on retrouve le virus *Chikungunya* (Palha et al., 2013), des champignons comme *Aspergillus fumigatus* (Knox et al., 2014) et de nombreuses bactéries, telles que *Shigella flexneri* (Mostowy et al., 2013), *S. typhimurium* (van der Sar et al., 2003), *Listeria monocytogenes* (Levraud et al., 2009) ou *Streptococcus sp* (Neely et al., 2002; Rounioja et al., 2012). Il a également permis l'étude de plusieurs pathogènes impliqués dans la mucoviscidose, comme *Staphylococcus aureus* (Prajsnar et al., 2008), *B. cenocepacia* (Vergunts et al., 2010), *P. aeruginosa* (Clatworthy et al., 2009) ainsi que *M. abscessus* (Bernut et al., 2014c; Halloum et al., 2016).

Ces différentes études ont permis de décrire des mécanismes spécifiques impliqués dans les interactions hôte-pathogène par différentes bactéries. Le rôle des macrophages de ZF dans la prise en charge d'infections a été mis en évidence lors d'infection par *M. marinum* (Clay et al., 2007) et plus récemment lors d'infection à *M. abscessus* (Bernut et al., 2014b, 2014c).

VI D 2 b *M. marinum* et zebrafish pour l'étude de la tuberculose

Pathogène naturel du poisson et d'amphibiens, *M. marinum* est la bactérie la mieux caractérisée dans le modèle ZF. En effet, le couple ZF/*M. marinum* s'est révélé particulièrement avantageux pour l'étude du granulome tuberculeux (Clay et al., 2007; Ramakrishnan, 2013a; Cronan and Tobin, 2014). Chez le ZF, cette mycobactérie, tout comme *M. tuberculosis* chez l'Homme, est capable de survivre dans les macrophages et induit la formation de granulomes (Russell, 2007; Tobin and Ramakrishnan, 2008). Les étapes de la formation du granulome ont été proposées pour la première fois par l'équipe du Pr. Ramakrishnan (Davis et al., 2002; Lesley and Ramakrishnan, 2008). Grâce aux dimycosérosates de phtiocérol (PDIM) et les phénolglycolipides (PGL et PGL-tb pour certaines espèces telles que *M. tuberculosis* ou *M. leprae*), des glycolipides présents à la surface de la mycobactérie, *M. marinum* module l'activité du système immunitaire en mobilisant les macrophages

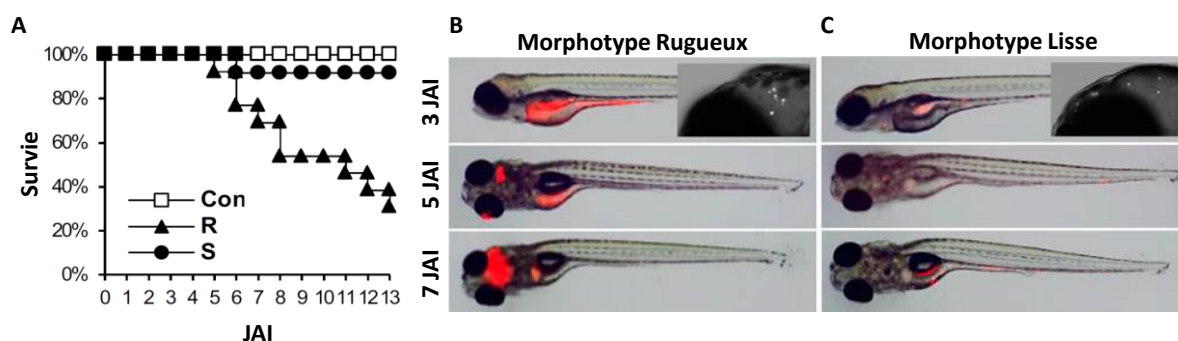


Figure 18 : Modèle d'infection ZF/*M. abscessus*

Modèle d'infection utilisant des souches de *M. abscessus* exprimant la protéine fluorescente tdTomato chez l'embryon de zebrafish. On observe une virulence accrue pour le morphotype rugueux (R) comparativement au morphotype lisse (S).

A/ Les injections de 300 bacilles du variant R induisent une mortalité supérieure aux injections de 300 bacilles du variant S. Les injections contrôles n'induisent pas de mortalités (Con) jusqu'à 13 jours après infections (JAI)

B/ Dès 5 JAI, le morphotype R induit la formation d'abcès préférentiellement localisés au niveau du système nerveux central.

C/ Les symptômes provoqués par le morphotype R, ne sont pas induits lors d'infection avec le morphotype S. D'après (Bernut et al., 2014c)

permettant sa survie intracellulaire tout en échappant aux mécanismes bactéricides de l'hôte (Alibaud et al., 2011; Cambier C.J. et al., 2014). Des travaux au sein de notre équipe ont révélé que le défaut de PDIM chez *M. marinum*, essentiels à la virulence des mycobactéries, *via* l'inactivation du gène *tesA* rend le bacille incapable de se propager ou de former des granulomes dans l'hôte (Alibaud et al., 2011).

VI D 2 c Modèle d'étude pharmacologique

L'embryon du ZF est un modèle particulièrement intéressant pour évaluer l'activité de molécules thérapeutiques en temps réel (Zon and Peterson, 2005). Sa petite taille permet un maintien des embryons en plaque de 96 puits dans lesquels les molécules peuvent être ajoutées directement dans le milieu dans lequel se développent les embryons. De plus les embryons sont perméables à de nombreux solutés, ce qui favorise l'absorption de nouveaux composés hydrophiles. Le criblage de molécules sur des embryons non infectés permet de détecter des molécules toxiques (Hinton et al., 2005) ou tératogènes (Bailey et al., 2013). La recherche de composés antimicrobiens s'est développée récemment avec ce modèle, notamment dans la recherche de nouveaux agents antituberculeux (Takaki et al., 2012, 2013; Makarov et al., 2014).

Dans un contexte infectieux, l'embryon du ZF permet de tester l'efficacité *in vivo* en temps réel de molécules bactéricides ou bactériostatiques. Par exemple, après infection avec *P. aeruginosa*, l'application d'un traitement à base de ciprofloxacine et d'imipénème a permis de réduire la mortalité des embryons (Clatworthy et al., 2009). L'utilisation du couple ZF/*M. marinum* (Takaki et al., 2013) a permis de montrer l'activité de molécules inhibitrices de pompes à efflux (Adams et al., 2011). Ainsi le vérapamil, la réserpine et la thioridazine, en association avec les antituberculeux, augmentent la survie des embryons infectés et réduisent la charge bactérienne et le nombre de granulomes. De la même façon, une molécule antituberculeuse, le PBTZ169, une benzothiazinone, a été validée grâce l'utilisation de ce modèle. Chez le ZF infecté avec *M. marinum*, tout comme dans le modèle murin infecté par *M. tuberculosis*, PBTZ169 diminue la charge bactérienne à des doses plus faibles que BTZ043 (Makarov et al., 2014). PBTZ169, moins cytotoxique que BTZ043 et impactant plus faiblement le développement de l'embryon de ZF, est actuellement en essai préclinique en tant qu'antituberculeux (WHO, 2015).

VI D 3 Le zebrafish et *M. abscessus*

Le ZF est un formidable modèle, mais il présente quelques inconvénients comme des différences anatomiques comparativement aux mammifères (Branchies vs poumons ; absence de ganglions lymphatiques; système reproducteur différent...). La mise en place de l'immunité adaptative, nécessitant plusieurs semaines pour être fonctionnelle, empêche l'observation de la

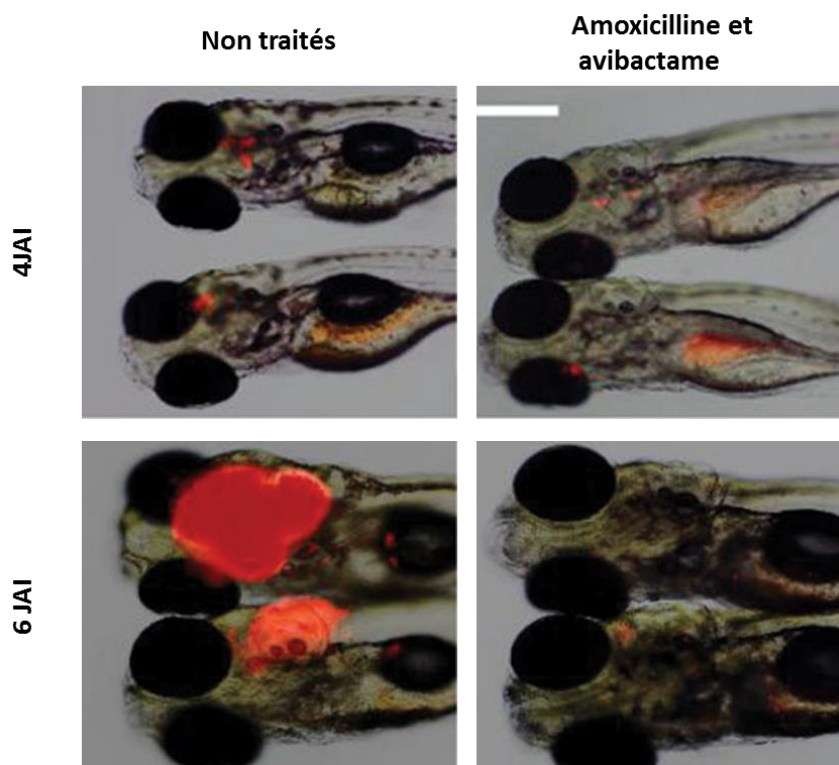


Figure 19 : Efficacité du traitement combiné amoxicilline/avibactam sur des embryons de ZF infectés avec *M. abscessus*

Les embryons sont infectés 24 heures après fécondation avec *M. abscessus* exprimant la protéine fluorescente rouge tdTomato, et sont soumis, ou non, à un traitement débutant 24 heures après infection pour une durée de 5 jours. Le traitement consiste en la combinaison d'amoxicilline (5000mg/L) et d'avibactam (50mg/L).

Les embryons non traités présentent des foyers dès 4 jours après infections (JAI) qui évoluent en de large abcès localisés au niveau du système nerveux central à 6 JAI. Les poissons traités semblent protégés de l'infection et ne développent pas d'abcès.

D'après (Dubée et al., 2015)

contribution complète du système immunitaire durant l'infection d'embryons. La pigmentation, apparaissant 6 jours après fertilisations, peut aussi limiter les observations *in vivo* des interactions entre l'hôte et le pathogène. La température de maintien du ZF est comprise entre 26 et 29°C, avec des températures supérieures délétères à leur survie, limite également l'étude de pathogènes humains, adaptés à la température de leur hôte soit 37°C. *M. abscessus* est capable de se développer entre 28°C et 37°C, ce qui ne pose pas de problème dans son étude chez le ZF.

Notre équipe pionnière dans le développement de ce modèle chez *M. abscessus* (Bernut et al., 2014c) (Figure 18), a permis de démontrer le caractère virulent de la forme R comparativement à la S dans le modèle ZF, et qui se traduit dans l'embryon par le développement de granulomes et de cordes. Les cordes vont alors induire la formation d'abcès, qui se forment préférentiellement au niveau du système nerveux central (SNC), conduisant à la mort rapide des embryons (Bernut et al., 2014c). Ce tropisme préférentiel pour le SNC s'explique par le transport de macrophages infectés de la circulation vers des tissus/organes éloignés du site d'injection. Suite à l'apoptose de ces macrophages provoquée par le variant R, la multiplication extracellulaire va initier la formation de cordes, qui du fait de leur taille importante protégeront *M. abscessus* de la phagocytose par les macrophages et neutrophiles (Bernut et al., 2014c). De plus, l'utilisation de ce modèle ZF/*M. abscessus* a permis d'évaluer l'activité thérapeutique d'antibiotiques tels que la clarithromycine à 42,5mg/L et l'imipénème à 224 mg/L (chez l'Homme ces traitements peuvent aller jusqu'à 2g/jours pour l'imipénème et 1 g/jours pour la clarithromycine)(Miyasaka et al., 2007; Bernut et al., 2014a). Ces travaux ont démontré la pertinence du couple ZF/*M. abscessus* dans la recherche de nouvelles molécules dirigées contre ce pathogène. De même, ce modèle a permis d'illustrer l'efficacité d'une combinaison de l'avibactam, inhibiteur spécifique des β -Lactamases dont Bla_{Mab}, et de l'amoxicilline (Dubée et al., 2015)(Figure 19). L'association amoxicilline-avibactam restaure la sensibilité des bactéries à l'amoxicilline, ce qui se traduit *in vivo* par la diminution de la charge bactérienne et une augmentation de la survie des embryons.

L'ensemble des études réalisées grâce à ces différents modèles a permis d'illustrer le caractère original de *M. abscessus* concernant sa pathogénicité. L'utilisation du modèle murin a permis de montrer que le contrôle de l'infection par *M. abscessus*, comparativement à *M. chelonae*, nécessitait une réponse adaptative des lymphocytes T et B (Rottman et al., 2007). Le modèle ZF a mis en avant l'importance de la forme R dans la virulence de *M. abscessus* et les interactions de cette mycobactérie avec le système immunitaire inné. Par ailleurs ce même modèle ZF/*M. abscessus* fait preuve de qualités dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules actives contre cette mycobactérie (Bernut et al., 2014a; Dubée et al., 2015).

Chapitre 3 : L'enveloppe mycobactérienne

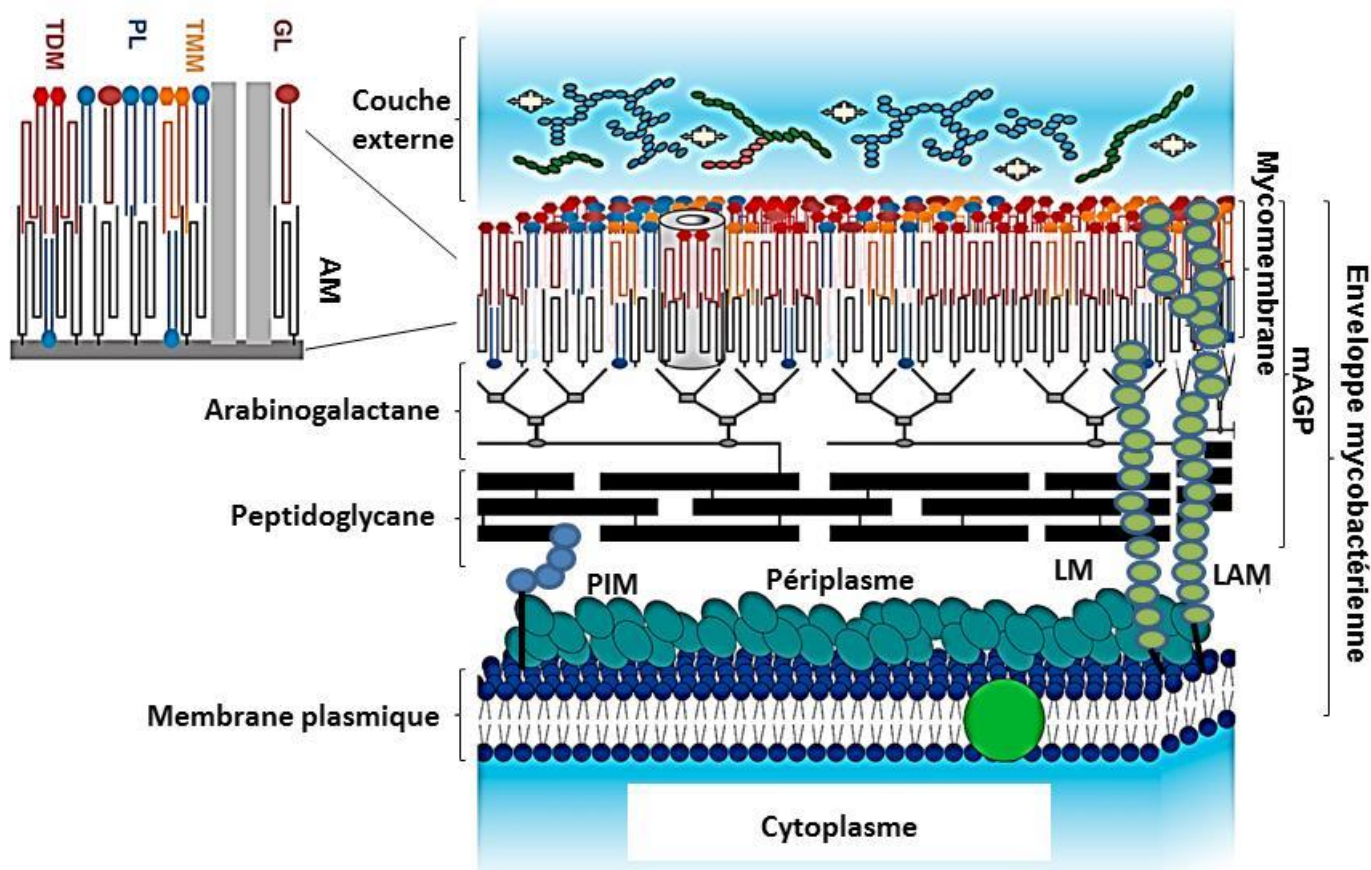


Figure 20 : Modélisation de l'enveloppe mycobactérienne.

La membrane plasmique du squelette de mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP). Celui-ci est constitué de peptidoglycane, joint de façon covalente à l'arabinogalactane dont la partie arabinane est estérifiée par des acides mycoliques (AM). Ces AM composent le feuillet interne de la mycomembrane. Le feuillet externe est lui composé de mono ou dimycolate de tréhalose (respectivement TMM en orange et TDM en rouge), de phospholipides (PL) en bleu, et de glycolipides (GL) en marron. La mycomembrane est surmontée d'une couche externe composée majoritairement de polysaccharides et de protéines. On retrouve entre les différentes couches de cette enveloppe du lipomannane (LM) du lipoarabinomannane (LAM) et du phosphatidyl inositol mannosides (PIM).

D'après (Medjahed et al., 2010; Marrakchi et al., 2014; Daffé, 2015; Jankute et al., 2015).

L'enveloppe mycobactérienne est unique et confère aux mycobactéries des propriétés exceptionnelles de par sa composition et son architecture. Elle constitue une barrière imperméable, expliquant en partie la résistance intrinsèque des mycobactéries à divers antibiotiques. Elle joue également un rôle fondamental dans leur pathogénicité. De ce fait, la caractérisation des structures des différents composants de cette enveloppe, ainsi que leurs voies de biosynthèse, ont fait l'objet de nombreuses recherches avec comme finalité de comprendre son rôle dans la physiologie mycobactérienne et l'identification de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique.

I Structure et composition

L'enveloppe des mycobactéries est définie par une forte teneur en lipides allant jusqu'à 40% du poids sec, alors que chez les autres bactéries ce taux est de 5% pour les bactéries à Gram positif et 10% chez les bactéries à Gram négatif (Daffé, 2015). Cette enveloppe peut être visualisée grâce à la technique de microscopie CEMOVIS (cryo-microscopie électronique de sections vitreuses) (Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008; Marrakchi et al., 2014). Comme illustré sur la **Figure 20**, elle est constituée d'une membrane plasmique, d'un peptidoglycane (PG) lié covalamment à l'arabinogalactane (AG), lequel est estérifié par des acides gras à longue chaîne, les acides mycoliques (AM). Le PG et la membrane plasmique sont séparés par un espace périplasmique. La membrane la plus externe est également appelée « mycomembrane ». Celle-ci est constituée d'une bicouche lipidique organisée de façon asymétrique composée d'AM pouvant être libre ou liés à l'AG, ainsi que d'autres lipides extractibles. Par ailleurs, l'enveloppe mycobactérienne est enrobée par une couche externe (Daffé, 2015). L'implication de l'enveloppe dans la virulence et dans la résistance aux antibiotiques des mycobactéries, justifie les recherches menées pour élucider son organisation. Ces études ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant la synthèse ou le transport de certains de ses composants (Grzegorzewicz et al., 2012; Marrakchi et al., 2014; Cox et al., 2016).

I A La membrane plasmique

Chez les mycobactéries, la membrane plasmique s'apparente à une membrane plasmique bactérienne classique (Minnikin, 1982). Elle est constituée de phospholipides formant une bicouche lipidique asymétrique délimitant le cytoplasme bactérien. On y retrouve majoritairement du phosphatidylglycérol, du phosphatidyléthanolamine, du phosphatidylinositol et du cardiolipide. Les acides gras précurseurs des phospholipides sont majoritairement l'acide palmitique ($C_{16:0}$) et l'acide oléique ($C_{18:1}$).

I B Le mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (mAGP)

Chez les mycobactéries, la paroi se compose de 3 macromolécules : Le PG qui est fixé de façon covalente à l'AG, un hétéro-polysaccharide complexe, lui-même estérifié par les AM. Ces derniers pourront interagir de façon non covalente avec les lipides dits extractibles.

I B 1 Le peptidoglycane

Chez *M. tuberculosis*, le squelette du PG est un polysaccharide constitué de glycoaminopeptides. Le glycane se compose d'unités alternées de N-acétyl-glucosamine (GlcNac) et d'acide muramique, qui peuvent être N-acétylés ou N-glycolylés (Mahapatra et al., 2005). Le tétrapeptide L-Alanine-D-isoglutaminy-méso-diaminopiméyl-D-alanine se fixe au glycane sur le groupement carbonyle des acides muramiques. Des liaisons peptidiques propres aux mycobactéries entre deux tétrapeptides peuvent avoir lieu entre les résidus *meso*-diaminopimélique et D-alanine, mais également entre deux résidus *meso*-diaminopimélique (Crick et al., 2001; Cordillot et al., 2013). La forme de la bactérie existe grâce à ce réseau complexe dont la rigidité en permet le maintien. Ce réseau permet également d'assurer la survie de la bactérie face à des changements environnementaux, tels que la présence d'antibiotiques ou d'enzymes lytiques (β -lactames, lysozyme, muramidases). Le PG relié à l'AG *via* un phosphodisaccharide composé d'une molécule de rhamnose et d'une molécule de GlcNac (Lederer et al., 1975; McNeil et al., 1990).

I B 2 L'arabinogalactane

L'AG est un hétéropolysaccharide ramifié complexe composé de résidus de D-galactofuranosyle (D-Galf). Une trentaine de D-Galf sont nécessaires pour former un domaine galactane, sur lesquels sont greffés des résidus de D-arabinofuranosyle (D-Araf) (Bhamidi et al., 2008). Les chaînes d'arabinane sont reliées aux résidus D-Galf en position 8, 10 et 12 du galactane (Alderwick et al., 2005). Chez certaines mycobactéries, une à deux chaînes d'arabinane sont estérifiées par des AM, au niveau du dernier et avant-dernier résidu composant le D-Araf. La chaîne d'arabinose non estérifiée à un AM sera substituée par un groupement succinyl sur l'un de ses résidus lysine (McNeil et al., 1991; Bhamidi et al., 2008).

I B 3 Les acides mycoliques

Les AM sont des acides gras α -ramifiés et β -hydroxylés, que l'on retrouve spécifiquement et majoritairement dans l'enveloppe des espèces appartenant au sous-ordre des *Corynebacterineae* avec quelques rares exceptions telles que *Corynebacterium kroppenstedtii* et *Corynebacterium amycolatum* (Collins Matthew D. et al., 1988; Collins et al., 1998). La taille de ces acides gras peut

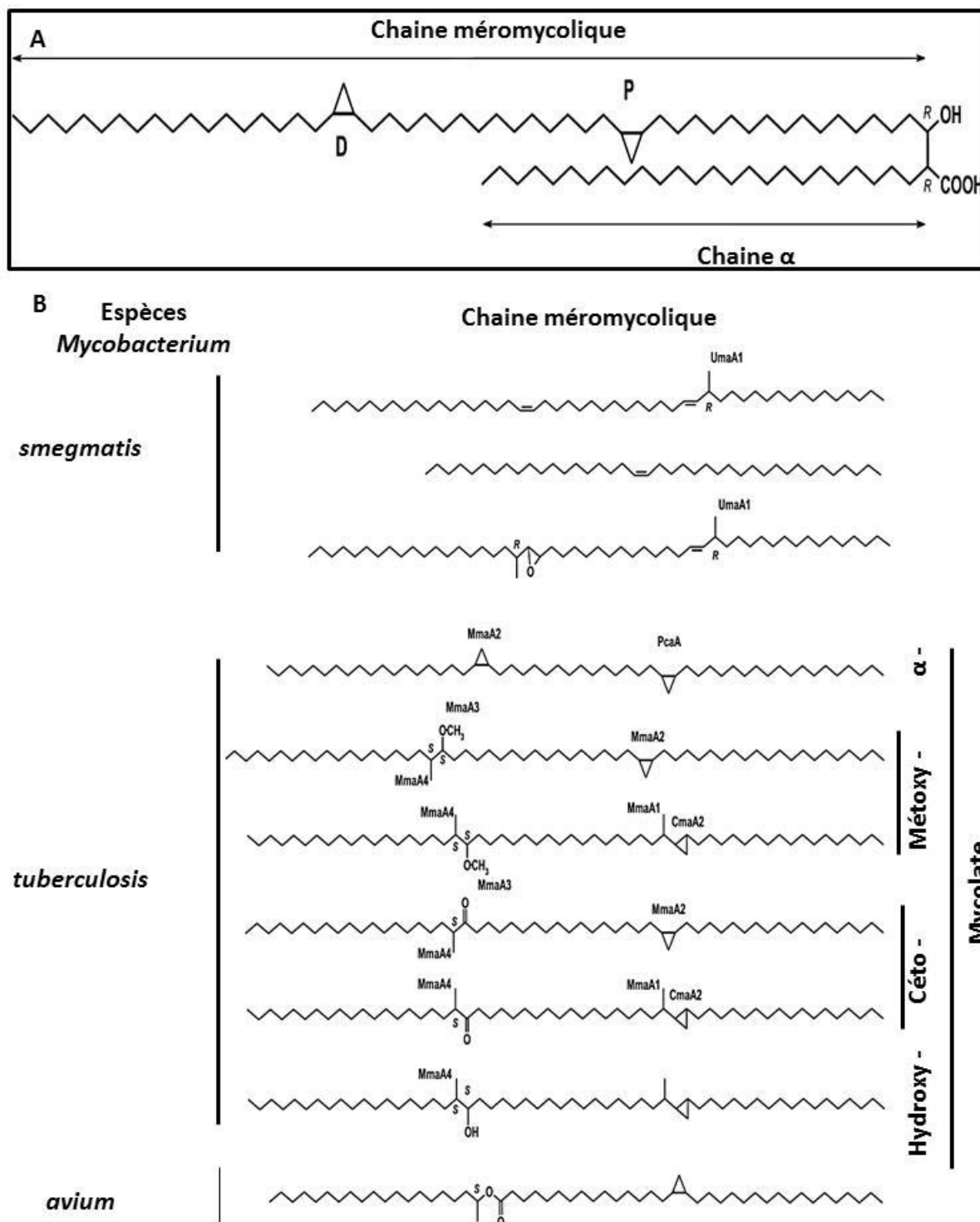


Figure 21 : Structure des acides mycoliques chez les mycobactéries.

A/ Représentation de la structure d'un acide mycolique (AM) de type α ou méromycolique. D et P indique respectivement les positions distales et proximales sur la chaîne méromycolique où sont introduits les groupements fonctionnels par différentes méthyltransférases.

B/ Structures des chaînes méromycoliques des différents types d'AM retrouvés chez quelques espèces mycobactériennes.

D'après (Marrakchi et al., 2014)

varier d'une espèce à une autre. Chez *Corynebacterium glutamicum*, les AM sont formés de 22 à 36 atomes de carbone. Chez *M. tuberculosis*, les AM sont constitués de 60 à 90 atomes de carbone (Marrakchi et al., 2014). Les AM sont les lipides les plus abondants de l'enveloppe mycobactérienne, et sont pour la majorité (90 à 95%) fixés covalamment au squelette d'AG. Ils forment alors le feuillet interne de la mycomembrane. Chez les mycobactéries, les AM proviennent de la condensation entre une chaîne courte appelée "chaîne α " (22 à 26 atomes), et une chaîne longue appelée "chaîne méromycolique" (48 à 64 atomes) (Figure 21 A) (Asselineau and Lederer, 1950). La chaîne méromycolique est ornée de groupements fonctionnels qui sont localisés en position distale et proximale. Cette position s'établit en fonction de l'espacement entre les groupements fonctionnels et la fonction carboxylique de l'AM. Ces groupes peuvent être distincts et permettent de différencier plusieurs classes d'AM. Cette diversité de classe est spécifique pour chacune des espèces de mycobactéries (Figure 21 B). Les AM dans l'enveloppe de *M. tuberculosis* sont composés de 50% d' α -mycolates (Watanabe et al., 2002) qui sont caractérisés par une fonction cyclopropane. Les chaînes d'acides méromycoliques chez *M. tuberculosis* sont différenciées en méthoxy-mycolates, céto-mycolates et hydroxy-mycolates. Ces AM se différencient des α -mycolates par la présence d'une fonction oxygénée sur leur chaîne méromycolique (Marrakchi et al., 2014). L'implication des AM dans la structure de l'enveloppe des mycobactéries est primordiale dans la survie des mycobactéries. La biosynthèse de ces AM fera l'objet de la partie II de ce chapitre.

I B 4 Les composés extractibles

L'enveloppe mycobactérienne contient également un ensemble de composés intercalés de manière non covalente, dits "extractibles". La majorité d'entre eux est localisée dans le feuillet externe de la mycomembrane. On retrouve dans cette catégorie de lipides extractibles, les phospholipides et les glyco-lipopeptides. Ces lipides ne sont associés à l'enveloppe qu'au travers d'interactions hydrophobes non covalentes. Grâce à cette caractéristique, ces lipides ont la faculté d'être extraits par des solvants organiques sans être détruits. La composition globale de l'enveloppe en lipides extractibles peut être très variable chez les mycobactéries. Chez *M. tuberculosis*, on retrouve plusieurs de ces lipides que l'on peut classer en plusieurs catégories :

- On identifie dans les lipides à tréhalose (Figure 22), le monomycolate de tréhalose (TMM) et le dimycolate de tréhalose (TDM), les sulfatides (SL), les di-acyltréhaloses (DAT), les polyacyltréhalose (PAT), et les tri-acyltréhaloses (TAT). Un à plusieurs mycolates peuvent être estérifié sur un tréhalose formant les TMM et les TDM (Minnikin et al., 2002; Neyrolles and Guilhot, 2011). Le TMM et le TDM sont retrouvés chez toutes les mycobactéries, et possèdent les mêmes AM que ceux fixés de façon covalente à l'AG. Le TDM appelé aussi « cord factor » est un

Introduction : L'enveloppe mycobactérienne

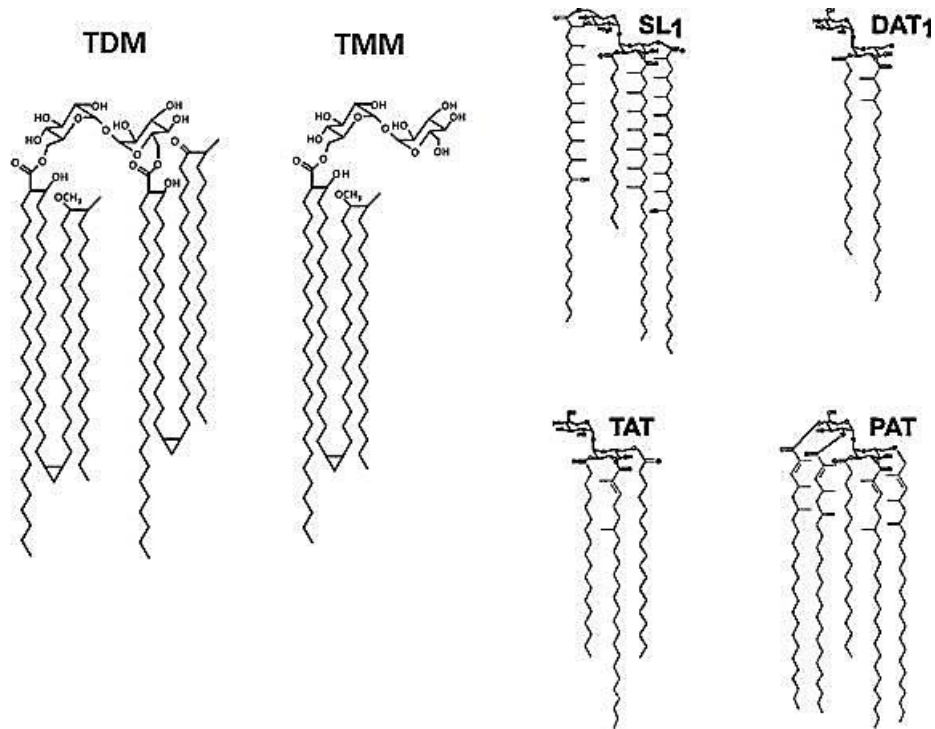


Figure 22 : Les principaux lipides à tréhalose présent chez *M. tuberculosis*.

TMM : Monomycolate de tréhalose ; TDM : dimycolate de tréhalose ; SL-1 : sulfolipide-1; DAT : diacyltrehaloses; TAT : triacyltrehaloses; PAT : poly- ou pentaacyltrehalose.
D'après (Minnikin et al., 2002; Quémar, 2016)

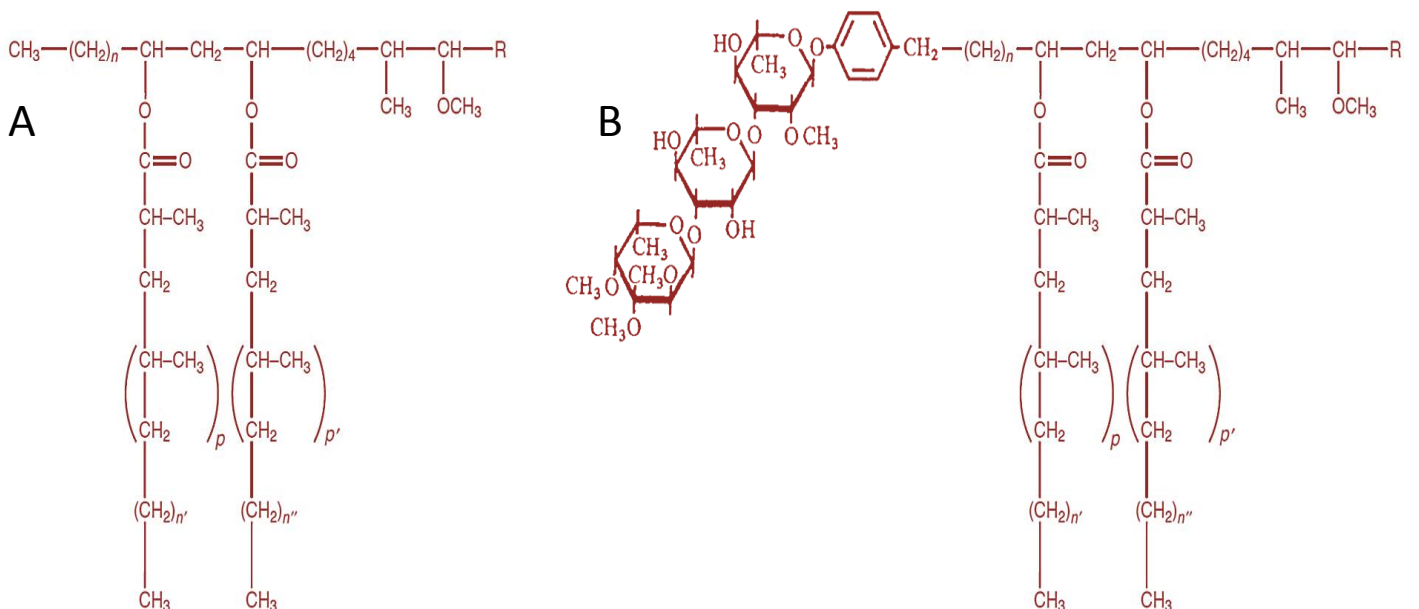


Figure 23 : Les lipides à mycosérosates.

(A) Structure de dimyco-cerolate de phthiocerol (PDIM) chez *M. tuberculosis* (B) et dimyco-cérosates de phénolphthiocérosates glycosylé (PGL-tb) chez *M. canetti*.

$n=20$ à 22 carbones n' et $n'' =$ de 16 à 18 carbones ; $p, p' =$ entre 2 à 5 carbones ; $R=CH_2-CH_3$ ou CH_3- .

D'après (Daffé et al., 1987; Sulzenbacher et al., 2006)

lipide impliqué dans la croissance en corde de certaines mycobactéries (Rajni et al., 2011). Le SL tétra-acylé appelé sulfolipide-1 (SL-1) est le plus représenté des SL dans l'enveloppe de *M. tuberculosis*. L'acylation d'un tréhalose par un acide gras à chaîne linéaire ainsi que d'un ou plusieurs acides gras di- ou tri-méthylés produit les glycolipides DAT, TAT et PAT. Les DAT sont les précurseurs des TAT et des PAT (Touchette et al., 2015).

- Les cires, composées de mycosérosates parmi lesquelles on retrouve les PDIM et les PGL (Figure 23). Ces derniers correspondent à un PDIM couplé à un noyau phénolique comportant 3 monosaccharides. Le PDIM est généralement retrouvé chez les mycobactéries pathogènes (Daffé and Laneelle, 1988). Avec les PGL, ces derniers sont identifiés depuis longtemps comme étant associés à la pathogénie de *M. tuberculosis* (Goren et al., 1974; Reed et al., 2004), et contribuent à la perméabilité de l'enveloppe et à la virulence (Cox et al., 1999; Camacho et al., 2001; Astarie-Dequeker et al., 2009). Les PGL sont notamment impliqués dans la virulence en modulant la réponse immunitaire durant l'infection. On les retrouve chez de nombreuses MCL, dont le complexe MTBC, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. haemophilum*... (Daffé and Laneelle, 1988; Tabouret et al., 2010; Alibaud et al., 2011; Cambier C.J. et al., 2014).
- Les dérivés glycosylés du phosphatidylinositol (PI) sont les phospholipides dénombrés en majorité chez les mycobactéries (Jackson et al., 2000). De ces PI sont issus de nombreux autres lipides de la paroi, en particulier les phosphatidyl inositol mannosides (PIM) constitués d'un PI glycosylé sur l'inositol par des domaines mannoses (jusqu'à 6). Du lipomannane (LM) s'obtient lorsqu'un domaine mannane s'ajoute au PIM. Ce dernier, par ajout d'un domaine arabinane, forme alors le lipoarabinomannane (LAM). Chez les espèces pathogènes, particulièrement les MCL, le LAM peut être à nouveau coiffé par un domaine mannose pour créer du ManLAM (Goude and Parish, 2008). Chez les MCR, le LAM peut 1) ne pas posséder de coiffe mannose, et se terminer par un arabinofuranose pour former de l'arabinofuranosyl-terminated LAM (Ara-LAM) ou 2) être coiffé avec un domaine phosphoinositol pour former du phosphoinositol-Capped LAM (PILAM) (Chatterjee et al., 1992; Khoo et al., 1995; Rajni et al., 2011). Les LAM sont des facteurs de virulences fondamentaux impliqués dans la reconnaissance cellulaire lors de la réponse immunitaire de l'hôte et sont considérés comme les lipopolysaccharides majeurs chez les mycobactéries (Kremer et al., 1999; Briken et al., 2004; Cambier C.J. et al., 2014).
- Les GPL sont retrouvés chez certaines MCL, telles les espèces du complexe MAC, *M. xenopi*, mais également chez les MCR comme *M. abscessus*, *M. chelonae* ou *M. smegmatis* (Figure 24). Ils jouent un rôle important chez les mycobactéries atypiques, pour leur implication dans l'organisation structurale de la bactérie et responsable d'autres propriétés telles que la formation de biofilms et la motilité ou dans la virulence (Recht and Kolter, 2001; Etienne et al., 2002; Villeneuve et al., 2005; Mukherjee and Chatterji, 2012).

Introduction : L'enveloppe mycobactérienne

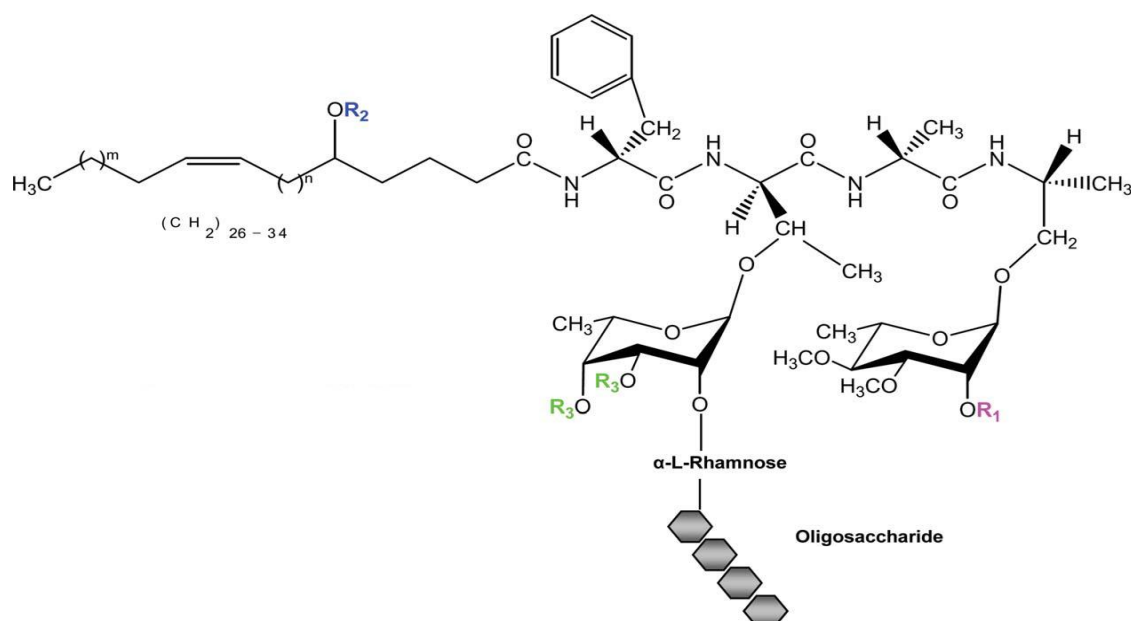


Figure 24 : Structure du glycopeptidolipide chez *M. smegmatis* et *M. abscessus*.

On peut observer en fonction du type de GPL : en R1, un atome d'H, un groupe méthyl ou du 3,4 di-O-Ac-L-dTal-Thréonine pour des GPL polaires ; en R2 un groupe méthyl, un groupement succinyl ou encore du 2-O-succinyl-rhamnosyl ; en R3 un groupe acétyle.

D'après (Mukherjee and Chatterji, 2012)

| Gène | chez <i>M. smegmatis</i> | chez <i>M. abscessus</i> | % d'homologie |
|-----------------|--------------------------|--|---------------|
| <i>mmpS4</i> | MSMEG0373 | <i>mab4117c</i> | 78 |
| <i>mmpL4a</i> | MSMEG0374 | <i>mab 4116c</i> | 78 |
| <i>mmpL4b</i> | MSMEG0375 | <i>mab4115c</i> | 76 |
| <i>Rv1174</i> | MSMEG0376 | <i>mab4114</i> | 48 |
| <i>rmlA</i> | MSMEG0377 | <i>mab4113</i> | 85 |
| <i>gtf3</i> | MSMEG0378 | <i>mab4112c</i> | 49 |
| <i>rmlB</i> | MSMEG0379 | <i>mab4111c</i> | 77 |
| <i>rmt2</i> | MSMEG0380 | <i>mab4109c</i> | 72 |
| <i>rmt4</i> | MSMEG0381 | <i>mab4108c</i> | 83 |
| <i>gtf1</i> | MSMEG0382 | <i>mab4107c</i> | 76 |
| <i>atf</i> | MSMEG0383 | <i>mab4106c(atf1)</i> <i>mab4110c(atf2)</i> | 72 59 |
| <i>rmt3</i> | MSMEG0384 | <i>mab4105c</i> | 81 |
| <i>gtf</i> | MSMEG0385 | <i>mab4104</i> | 67 |
| <i>fmt</i> | MSMEG0386 | <i>mab4103c</i> | 67 |
| <i>mbtH</i> | MSMEG0387 | <i>mab4100c</i> | 89 |
| <i>mpe1</i> | MSMEG0388 | <i>mab4099c</i> | 70 |
| <i>mpe2</i> | MSMEG0392 | <i>mab4098c</i> | 71 |
| <i>gap</i> | MSMEG0393 | <i>mab4097c</i> | 58 |
| <i>sap</i> | MSMEG0394 | <i>mab4454c</i> | 30 |
| <i>ecf</i> | MSMEG0395 | <i>mab4459c</i> | 46 |
| <i>fadE5</i> | MSMEG0396 | <i>mab4437</i> | 78 |
| <i>Rv0926</i> | MSMEG0397 | <i>mab4633</i> | 36 |
| <i>pks</i> | MSMEG0398 | <i>mab0939</i> | 79 |
| <i>papA3</i> | MSMEG0399 | <i>mab0938c</i> | 77 |
| <i>mmpL10</i> | MSMEG0400 | <i>mab0937c</i> | 75 |
| <i>fadD23</i> | MSMEG0401 | <i>mab0935c</i> | 73 |
| <i>pe</i> | MSMEG0402 | <i>mab0936c</i> | 64 |
| <i>Gap-like</i> | MSMEG0403 | <i>mab0934</i> | 55 |

Tableau 4 : Gènes appartenant au locus GPL chez *M. smegmatis* et leur orthologues chez *M. abscessus*

D'après (Ripoll et al., 2007)

Chez *M. smegmatis*, on retrouve de nombreux gènes composant le locus de biosynthèse et transport des GPL, lesquels sont retrouvés chez *M. abscessus* avec une forte homologie de séquence (Tableau 4) (Ripoll et al., 2007).

I B 5 La couche externe

La couche externe, encore appelé «capsule», est la dernière couche de l'enveloppe mycobactérienne. Parmi les MCL, et particulièrement *M. tuberculosis*, l'un des composants retrouvés en majorité dans cette couche externe est un α -glucane (30-55%)(Lemassu and Daffé, 1994; Daffé and Draper, 1998). Chez *M. tuberculosis* la couche externe renferme également du D-arabino-D-mannane, dont la composition est semblable à celle de la section saccharidique du ManLAM (Ortalo-Magné et al., 1996b) et résulterait de l'hydrolyse enzymatique du ManLAM. Des protéines sont également présentes dans la couche externe (40 à 55%) (Daffé and Draper, 1998), comme le complexe Ag85ABC (Daffé and Draper, 1998) ainsi que d'autres protéines secrétées par le système de sécrétion ESX-1 (Sani et al., 2010). La couche externe de *M. tuberculosis* contient également de petites quantités de lipides (2 à 3%) comme les GPL, PGL et les DIM (Ortalo-Magné et al., 1996a).

I C L'enveloppe : barrière naturelle et pathogénicité

L'enveloppe mycobactérienne, barrière physique imperméable de par son squelette et sa composition, joue une fonction essentielle dans la physiologie des mycobactéries (Daffé, 2015). Elle confère aux mycobactéries la propriété d'être résistantes à l'alcool et aux acides forts (cf. Introduction Chapitre I ; I), et représente une barrière physique qui limite la pénétration de nombreux composés et antibiotiques. Cette caractéristique est considérée comme l'une des conséquences principales de la résistance élevée des mycobactéries aux antibiotiques (Daffé and Draper, 1998; Daffé, 2015). La teneur importante en lipides de l'enveloppe, en particulier les AM qui est l'espèce lipidique la plus abondante, confère aux mycobactéries une hydrophobicité de surface. Elle engendre une barrière de perméabilité aux composés hydrophiles, jusqu'à 100 fois plus importante que chez les autres espèces bactériennes (Jarlier and Nikaido, 1990).

Chez *M. tuberculosis* il a été établi que des acides gras pouvaient être impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire (production de cytokines, phagocytose, circulation des vésicules au sein des macrophages)(Neyrolles and Guilhot, 2011). Parmi eux, le TDM et les AM, sont particulièrement impliqués dans le pouvoir pathogène. Le TDM, inhibe la fusion entre les phagosomes et les lysosomes, augmentant ainsi la survie intra-macrophagique des mycobactéries (Rajni et al., 2011). Le rôle crucial des AM pour la pathogénicité a été mis en évidence avec plusieurs mutants de gènes de biosynthèse des AM. Ainsi, l'inactivation de *kasB* (Bhatt et al., 2007) conduit à la synthèse d'AM plus courts et au développement d'une paroi moins bien structurée

limitant la survie intracellulaire des bacilles et conduisant à un phénotype hautement atténué et une absence des signes pathologiques chez les souris infectées (Gao et al., 2003; Bhatt et al., 2007; Vilchère et al., 2014). Ainsi, du fait de leur rôle essentiel dans la croissance et la virulence chez les mycobactéries, les AM représentent des cibles privilégiées dans la recherche de nouveaux composants d'intérêt thérapeutique (Marrakchi et al., 2014).

II Régulation de la biosynthèse des acides mycoliques

La biosynthèse des AM comprend 2 étapes principales : la synthèse puis l'élongation des acides gras précurseurs de la chaîne α et de la chaîne méromycolique, l'activation et la condensation de ces deux chaînes.

II A Le système FAS-I et la synthèse de la chaîne α et des précurseurs de FAS-II

La voie de synthèse des AM intègre 4 activités catalytiques retrouvées dans 2 systèmes « Fatty Acid Synthase » (FAS) (Figure 26). Ces activités catalytiques de condensation réduction, déshydratation et réduction, sont répétées de façon cyclique. FAS-I, enzyme codée par *fas*, est essentielle chez les mycobactéries (Zimhony et al., 2004). Elle contient 7 domaines dissemblables lui permettant de catalyser la synthèse de lipides à partir d'acétyl-CoA (Bloch and Vance, 1977; Fernandes and Kolattukudy, 1996). Pour chaque cycle catalytique, du malonyl-CoA est utilisé. Ce dernier est produit par carboxylation de l'acétyl-CoA par le complexe ACCase 6 (Acyl-CoA carboxylase 6), composé de la sous-unité carboxyltransferase AccD6 et de la sous-unité AccA3 (Daniel et al., 2007; Kurth et al., 2009). Le gène *accA3* est essentiel à la viabilité de *M. tuberculosis* (Sasseti et al., 2003; Griffin et al., 2011; Zhang et al., 2012). De même, la baisse du niveau d'expression d'*accD6* chez un mutant conditionnel a pour conséquence d'inhiber la biosynthèse des AM et des lipides extractibles de l'enveloppe, ce qui impacte négativement la survie des bactéries et illustre le caractère vital de ce gène chez *M. tuberculosis* (Pawelczyk et al., 2011). Deux acyl-CoA sont produit par FAS-I, de 16 à 22 carbones pour l'un, et de 24 à 26 carbones pour le second. Les premières chaînes carbonées seront ensuite utilisées par le système FAS-II pour synthétiser la chaîne méromycolique, tandis que les secondes formeront la chaîne α des AM. Ces acyl-CoA produits par FAS-I sont aussi utilisés pour la synthèse d'autres lipides de l'enveloppe, tels que les PDIM, les SL ou les phospholipides (Mukhopadhyay et al., 2012).

II B Le Système FAS-II : Synthèse de la chaîne méromycolique

Le système FAS-II est composé de plusieurs enzymes codés par des gènes distincts. Ce système est réparti selon quatre étapes qui se succèdent consécutivement (condensation, réduction, déshydratation, réduction).

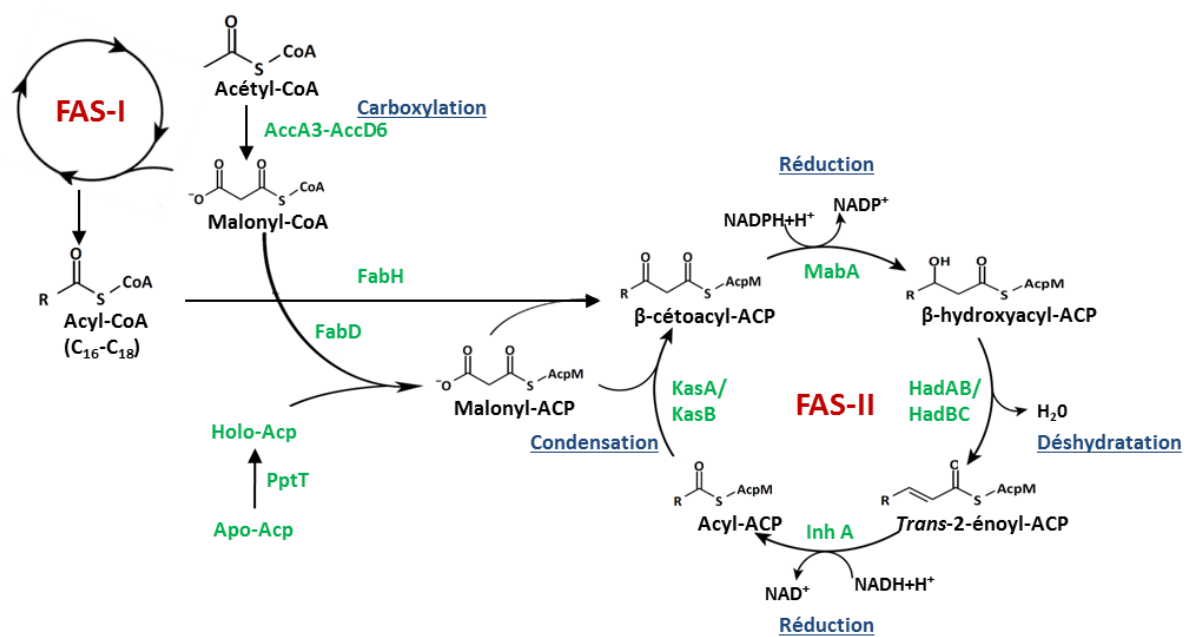


Figure 25: Le système FAS-II.

L'interaction entre le système FAS-I et FAS-II, est permis grâce à FabH qui initie la première condensation. Le système FAS-II est composé de quatre réactions enzymatiques consécutives : une **condensation**, une **réduction**, une **déshydratation** puis de nouveau une **réduction**. Les condensations plus tardives sont réalisées par KasA et KasB.

D'après (Schaeffer et al., 2001; Sacco et al., 2007a; Marrakchi et al., 2014)

Elles permettent aux mycobactéries d'allonger le substrat obtenu par le système FAS-I de deux atomes de carbones à chaque tour de cycle. Cependant, contrairement à FAS-I, FAS-II ne peut utiliser l'acyl-CoA sans l'aide d'une ACP (Acyl Carrier Protein, AcpM chez *M. tuberculosis*) mais uniquement sous la forme d'un Acyl-ACP.

II B 1 L'activation de FAS-II

L'ACP, qui permet le transport de l'acyl-CoA d'une enzyme à l'autre au sein de FAS-II durant le processus d'élongation, doit être activée en suivant différentes étapes (Figure 25):

- le passage de la forme inactive de l'Acp (apo-Acp) à la forme activée (holo-Acp), est effectué par l'enzyme Ppt (4'PhosphoPantéthéinyl Transferase) (Zimhony et al., 2015).
- la protéine FabD, une malonyl-CoA : Acp transacylase, va ensuite former du malonyl-Acp (substrat utilisé par le système FAS-II), produit de la réaction de transacylation entre le groupement du malonyl-CoA et l'holo-Acp (Kremer et al., 2001).
- FabH, β -cétolacyl-ACP synthase dont l'affinité est plus forte pour les Acyl-CoA que pour les acyl-ACP (Choi et al., 2000), va condenser l'acyl-CoA issue de FAS-I avec le malonyl-Acp pour former du β -cétolacyl-Acp. Ce substrat sera finalement pris en charge dans le système FAS-II.

II B 2 L'Elongation de la chaîne Acyl-ACP par le système FAS-II

L'élongation par FAS-II consiste en la succession de quatre réactions enzymatiques, une condensation, une réduction suivie d'une déshydratation et finalement d'une nouvelle réduction. MabA participe à la première réduction, les hétérodimères HadAB et HadB interviennent durant la déshydratation, InhA permet la réduction, et KasA et KasB catalyse la réaction de condensation. Une vingtaine de succession de ces cycles sera nécessaire pour générer une chaîne méromycolique contenant entre 48 et 64 carbones.

II B 2 a La condensation : Kas A et KasB

Les β -cétolacyl-ACP synthase KasA et KasB vont permettre à la chaîne méromycolique de s'allonger de 2 carbones en catalysant la condensation entre du malonyl-Acp et un acyl-Acp. Ces deux enzymes présentent un fort taux d'homologie de séquence (66% d'identité et 79% de similarité) (Slayden and Barry, 2002). Les gènes *kasA* (*rv2245*) et *kasB* (*rv2246*) font partie de l'opéron *fasII* (ou opéron *kas*), qui comporte également les gènes *fabD* (*rv2242*), *acp* (*rv2243*) et *accD6* (*rv2247*). Chez *M. smegmatis*, la surproduction des enzymes KasA, ou du couple KasA/KasB, et l'utilisation de [¹⁴C]-malonyl-CoA ont permis d'identifier une affinité pour des lipides autour de 40 atomes de carbone dans le premier cas, et de 54 atomes de carbone dans le second. KasA joue un rôle dans les premiers cycles de l'élongation, alors que KasB interviendrait plus tardivement lors des derniers cycles de

l'élongation des chaînes méromycoliques (Gao et al., 2003; Bhatt et al., 2007; Carel et al., 2014; Vilchèze et al., 2014). Une des différences majeures entre ces deux protéines est liée au fait que KasA est essentielle pour la biosynthèse des AM (Bhatt et al., 2005), alors que KasB ne l'est pas (Gao et al., 2003; Bhatt et al., 2007; Carel et al., 2014). Chez *M. tuberculosis*, la déplétion de *kasB* augmente la quantité d' α -mycolates et baisse la quantité de céto-mycolates produits (Bhatt et al., 2007), qui se traduit, dans le modèle murin, par une diminution des signes pathologiques, illustrant l'implication de ce gène dans la pathogénicité de la bactérie. Chez *M. marinum*, un mutant *kasB* présente une enveloppe dénaturée (Yamada et al., 2012) rendant le bacille plus sensible aux molécules lipophiles, ainsi qu'à certains antibiotiques (Gao et al., 2003).

II B 2 b Les réductions par MabA et InhA

Les enzymes intervenant durant les deux étapes de réduction sont MabA et InhA. Lors de la première réduction, MabA va catalyser des substrats comprenant de 8 à 22 atomes de carbone (Cohen-Gonsaud et al., 2002; Marrakchi et al., 2002). MabA, qui est une β -cétoacyl-ACP reductase NADPH-dépendante, va réduire du β -cétoacyl-ACP (produit durant la condensation) en β -hydroxyacyl-ACP. InhA, une 2-*trans*-enoyl-ACP réductase, catalyse la seconde réduction de molécules comprenant entre 12 et 24 atomes de carbone (Quémard et al., 1995). NADH-dépendante, elle réduit le 2-*trans*-énoyl-ACP (substrat résultant de l'étape de déshydratation) en acyl-ACP (Quémard et al., 1995). Les gènes *mabA* et *inhA* existent sous la forme d'un opéron chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG. Par contre, leur transcription se déroule de façon indépendante chez *M. smegmatis* (Banerjee et al., 1998). Les gènes *mabA* et *inhA* sont indispensables à la survie des mycobactéries (Parish et al., 2007). L'inactivation d'*inhA* chez *M. smegmatis* empêche le fonctionnement normal de FAS-II, bloquant la biosynthèse d'AM, et induit une lyse bactérienne (Vilchèze et al., 2000). Ces observations sont également obtenues chez *M. bovis* BCG soumis à un traitement à base d'isoniazide (INH) ou d'éthionamide (ETH), deux antituberculeux capables d'inhiber l'activité de l'InhA (Banerjee et al., 1994).

II B 2 c HadAB, HadBC et la déshydratation

L'étape de déshydratation de FAS-II est effectuée chez les mycobactéries par des hydratases de type eucaryote (Sacco et al., 2007b). Des hydratases similaires sont aussi reconnues dans la formation des lipides chez *M. tuberculosis* (Sacco et al., 2007b) ainsi que chez *M. smegmatis* (Brown et al., 2007). Ces déshydratases mycobactériennes sont codées par un ensemble de trois gènes *hadA*(Rv0635), *hadB*(Rv0636) et *hadC*(Rv037). Ces β -hydroxyacyl-ACP déshydratases vont catalyser la déshydratation du β -hydroxyacyl-ACP en 2-*trans*-enoyl-ACP. De façon générale, il semble que chez les mycobactéries, HadAB intervient dans des cycles d'élongation précoce, alors que HadBC

interviendrait dans des cycles tardifs dans l'élongation de chaînes longues (Sacco et al., 2007b), à l'instar de KasA et KasB. Chez *M. abscessus*, la délétion du gène *MAB_4780* code pour une déshydratase partageant une grande analogie structurale et fonctionnelle avec HadBC. Des travaux menés par notre équipe ont démontré que des mutants R dépourvus de *MAB_4780* n'étaient plus capable de former de cordes, de se multiplier dans les macrophages, de développer de granulomes dans le modèle d'infection ZF, et présentent une virulence extrêmement atténuée à la fois dans les embryons de ZF immunocompétents et immunodéprimés (Halloum et al., 2016).

II C La condensation mycolique

Les produits issus de FAS-I et de FAS-II, les chaînes α et les chaînes méromycoliques, vont être respectivement condensés en deux étapes (Figure 26 A). La première consiste en la carboxylation de la chaîne α . L'acyl-CoA est alors carboxylé par l'acyl-CoA carboxylase pour former du carboxyacyl-CoA. Cette carboxylase comprend deux sous-unités AccA3 et AccD4 (Portevin et al., 2005), dont le substrat spécifique est la chaîne α (Oh et al., 2006). FadD32 (ou FAAL32), est une fatty-acyl-AMP ligase qui va induire la production de l'acyl-AMP (chaîne méromycolique activée) à partir d'acides gras libres à longues chaînes carbonées (Trivedi et al., 2004). L'acyl-AMP va alors être transmise spécifiquement à Pks13 (Gavalda et al., 2009), une polykétide synthase qui, une fois activée, catalyse la condensation des chaînes α et méromycoliques (Portevin et al., 2005). L'enzyme phosphopantéthéine transférase (PptT) rend possible cette activation par l'addition d'un bras P-Pant sur les deux domaines ACP de Pks13 (Chalut et al., 2006). De l' α -alkyl β -cétoacyl tréhalose (TMMk) est produit par le domaine PKs13 qui catalyse le transfert d'une molécule tréhalose sur le produit de condensation de la chaîne méromycolique/chaîne- α . Ce TMMk va ensuite être réduit en TMM (Gavalda et al., 2014) par CmrA (Corynebacterineae mycolate reductase A)(Lea-Smith et al., 2007). Chez *M. tuberculosis* *fadD32*, *pks13* et *accD4* sont organisés en opéron, illustrant le rapport fonctionnel entre ces enzymes.

II D Bilan de la biosynthèse et devenir des acides mycoliques

La formation d'AM sollicite deux systèmes, FAS-I et FAS-II (Figure 26A). Le premier spécialisé dans la synthèse *de novo* de lipides à chaînes courtes (Chaînes α), alors que le deuxième participe à la synthèse d'acides gras à longues chaînes (chaînes méromycoliques) à partir d'acyl-CoA d'au moins seize carbones produit par FAS-I. Une fois cette chaîne méromycolique créée et activée, les AM finaux sont formés par la condensation des chaînes α et des chaînes méromycoliques. Ces AM sont transportés à travers la membrane mycobactérienne sous forme de TMM, et pourront soit servir de donneur pour la mycolylation de l'AG, soit être convertis en TDM (Marrakchi et al., 2014). MmpL3, une protéine de la famille MmpL (famille présentée dans le chapitre 4), est impliquée dans le

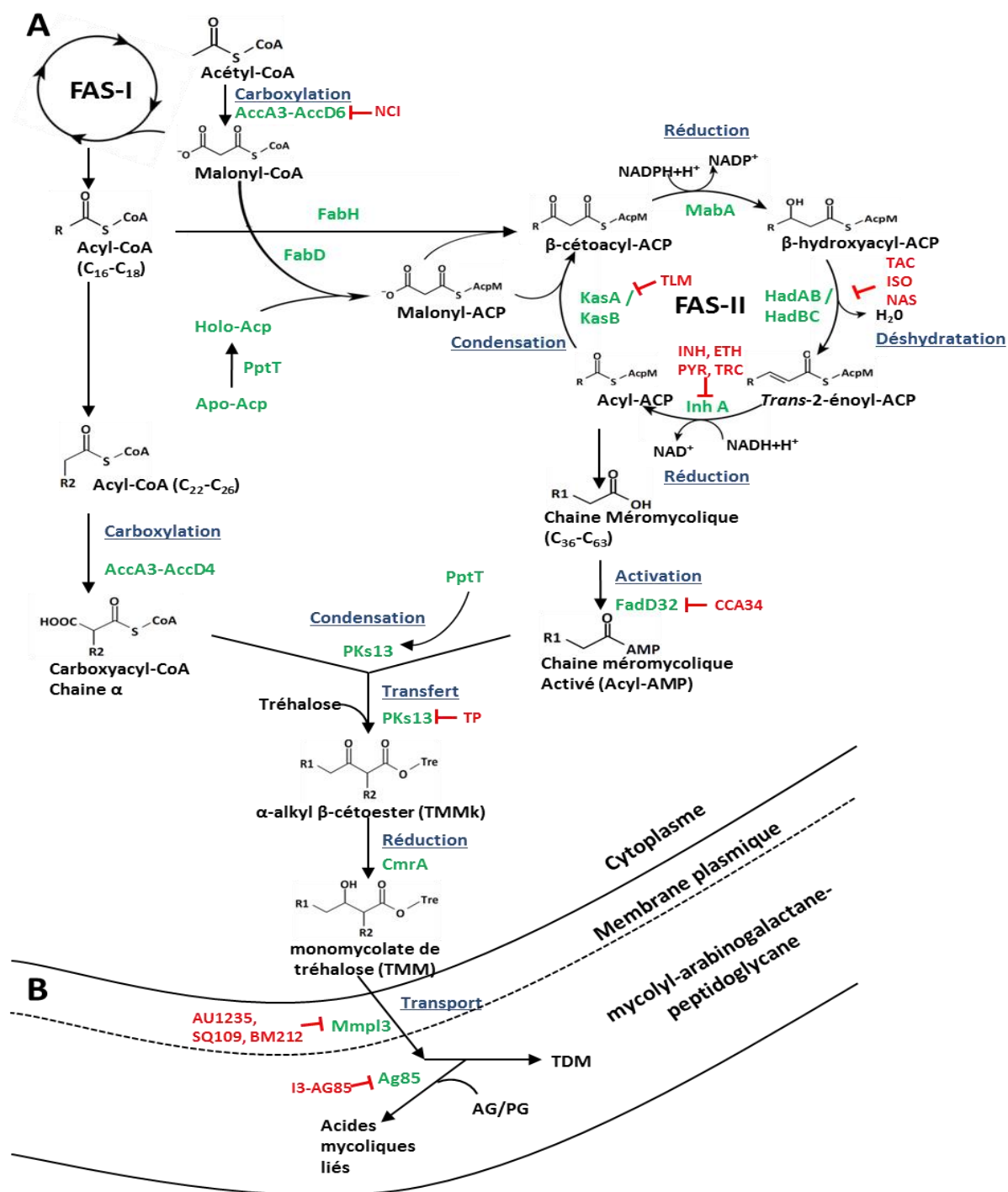


Figure 26 : Bilan de la biosynthèse, inhibition, et transport des acides mycoliques.

A/ Biosynthèse mycobactérienne des AM réalisée par l'action combinée des systèmes FAS-I et FAS-II. Le premier, FAS-I permet la synthèse *de novo* de deux types de lipides à courtes chaînes : la chaîne α de taille C₂₄- C₂₆, et un acyl-CoA de taille C₁₆-C₁₈. Le second, FAS-II, permet la formation de la chaîne méromycolique à partir d'acyl-CoA issu de FAS-I. La chaîne méromycolique est activée, puis condensée avec une chaîne α; ce qui suite à l'ajout d'un tréhalose, et une réduction produit les AM matures.

B/ Les AM sont transportés à travers la membrane plasmique *via* MmpL3, puis vers l'AG par Ag85 qui permet également la formation de TDM.

Les inhibiteurs connus et les étapes inhibées dans la voie de biosynthèse des AM sont indiqués en rouge, l'isoniazide (INH) et l'éthionamide (ETH) sont actuellement utilisés comme antituberculeux. Les différentes protéines intervenant dans les différentes étapes sont indiquées en vert.

Abréviation : NCI : NCI-172033; TLM : thiolactomycine; TAC : thiacétazone; ISO : isoxyl; NAS : NAS-21/NAS-94; TRC : triclosan; TP : thiophène ; PYR : pyridomycine ; CCA34 : 4,6-diaryl-5,7-diméthyl coumarine 34

D'après (Marrakchi et al., 2014; Quémar, 2016).

transport des AM à travers la membrane plasmique (Grzegorzewicz et al., 2012; Varela et al., 2012)(Figure 27B). Le complexe Ag85ABC, composé des mycolyltransférases secrétées Ag85A, Ag85B et Ag85C (retrouvées également sous le nom de FbpA, FbpB et FbpC respectivement pour fibronectin-binding proteins A, B et C) est impliqué dans la mycolylation des AM sur l'AG (Jackson et al., 1999; Puech et al., 2000, 2002) mais aussi dans la synthèse de TDM à partir de deux TMM (Belisle et al., 1997; Nguyen et al., 2005). L'inactivation de *fbpC* chez *M. tuberculosis*, se traduit par une réduction d'environ 40% de la quantité d'AM liés à l'AG, indiquant que la protéine Ag85C est impliquée dans la mycolylation de l'AG (Jackson et al., 1999; Puech et al., 2000).

La compréhension des mécanismes d'action de molécules ciblant des enzymes impliquées dans la voie métabolique des AM, tels que l'INH et l'ETH ciblant l'InhA (Banerjee et al., 1994; Morlock et al., 2003), a permis d'identifier près d'une dizaine de molécules inhibant l'activité d'enzymes intervenant dans cette voie de biosynthèse (Marrakchi et al., 2014). SQ-109, actuellement en essai clinique, cible le transporteur MmpL3 empêchant le transport de TMM à travers la membrane (Tahlan et al., 2012). Ces résultats montrent que les voies de synthèses et/ou de transport des AM peuvent être des cibles thérapeutiques prometteuses à exploiter.

Chapitre 4 : Les transporteurs de la famille MmpL

Introduction : les transporteurs de la famille MmpL

| Nom du gène | Locus | Nombre d'acides aminés par protéine | Fonction | Références |
|----------------|----------------|-------------------------------------|---|---|
| <i>mmpL1</i> | <i>Rv0402c</i> | 958 | Proche de <i>pkc6</i> , fonction inconnue | |
| <i>mmpS1</i> | <i>Rv0403c</i> | 142 | | |
| <i>mmpL2</i> | <i>Rv0507</i> | 968 | Fonction inconnue | |
| <i>mmpS2</i> | <i>Rv0506</i> | 147 | | |
| <i>mmpL3</i> | <i>Rv0206c</i> | 944 | Export des TMM/TDM | (Grzegorzewicz et al., 2012) (Tahlan et al., 2012) |
| <i>mmpS3</i> | <i>Rv2198c</i> | 299 | Fonction inconnue | |
| <i>mmpL4</i> | <i>Rv0450c</i> | 967 | Système d'export de sidérophore | (Jones et al., 2014) (Wells et al., 2013) |
| <i>mmpS4</i> | <i>Rv0451c</i> | 140 | | |
| <i>mmpL5</i> | <i>Rv0676c</i> | 964 | Système d'export de sidérophore et efflux d'antibiotiques | (Jones et al., 2014) (Wells et al., 2013) (Hartkoorn et al., 2014) |
| <i>mmpS5</i> | <i>Rv0677c</i> | 142 | | |
| <i>mmpL6</i> | <i>Rv1557</i> | 397 | Fonction inconnue | |
| <i>mmpL7</i> | <i>Rv2942</i> | 920 | Système d'export de PDIM et efflux d'antibiotiques | (Cox et al., 1999) (Camacho et al., 2001) |
| <i>mmpL8</i> | <i>Rv3823c</i> | 1089 | Export des sulfolipides | (Converse et al., 2003) (Domenech et al., 2004) |
| <i>mmpL9</i> | <i>Rv2339</i> | 962 | Fonction inconnue | |
| <i>mmpL10</i> | <i>Rv1183</i> | 1002 | Export de DAT/PAT et TMP | (Belardinelli et al., 2014) (Touchette et al., 2015) (Burbaud et al., 2016) |
| <i>mmpL11</i> | <i>Rv0202c</i> | 966 | Export de MMDAG et des esters de mycolate | (Pacheco et al., 2013) |
| <i>mmpL12</i> | <i>Rv1522c</i> | 1146 | Export de LOS | (Etienne et al., 2009) (Ren et al., 2007) (Boritsch et al., 2016) |
| <i>mmpL13a</i> | <i>Rv1145</i> | 303 | Fonction inconnue | |
| <i>mmpL13b</i> | <i>Rv1146</i> | 470 | Fonction inconnue | |

Tableau 5 : Gènes *mmpL* et *mmpS* de *M. tuberculosis* H37Rv.

Présentation et fonctions des différents gènes *mmpL* existants chez *M. tuberculosis* H37Rv. La fonction de *mmpL11* a été établie grâce à une complémentation du gène chez *M. smegmatis*. La fonction du gène *mmpL12* a été établie par homologie des gènes présents dans les loci LOS chez *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. canetti* et *M. kansasii*. Le gène *mmpL13* chez *M. tuberculosis* renferme une mutation dans le cadre de lecture, alors que chez *M. bovis* BCG, un seul cadre de lecture de *mmpL13a* et *mmpL13b* code pour une unique protéine de 781 résidus.

D'après (Chalut, 2016)

Les effecteurs moléculaires responsables de l'export des lipides à travers la paroi mycobactérienne restent peu connus. Les protéines membranaires de la famille des « Mycobacterial Membrane Protein Large » ou MmpL, représentent une sous-classe de la superfamille des transporteurs de type RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), impliquée dans l'efflux d'une vaste panoplie de composés organiques, de métaux lourds, de lipides et d'antibiotiques (Nikaido, 2011). Elles semblent toutefois jouer un rôle majeur en couplant à la fois la biosynthèse et le transport de certains lipides complexes de la paroi. Elles agissent en étroite interaction avec de multiples facteurs protéiques, notamment avec les protéines MmpS « Mycobacterial Membrane Protein Small » pour promouvoir efficacement le transport des lipides. Mais si leur fonction première semble être dédiée au transport de lipides à travers la paroi, certaines MmpL contribueraient également au processus de détoxification et d'efflux d'une vaste panoplie de substrats, incluant notamment certains antibiotiques. Par conséquent, les MmpL participent directement à des mécanismes de résistance aux antibiotiques (De Rossi et al., 2006). Leur activité est fondée sur l'utilisation de la force protonotrice comme source d'énergie.

I La distribution des MmpL chez les mycobactéries

Si toutes les espèces mycobactériennes possèdent des gènes codant les MmpL, leur nombre est très variable, de 5 gènes chez *M. leprae* à 31 gènes chez *M. abscessus* (Deshayes et al., 2010). D'autres organismes producteurs d'acides mycoliques tels que *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, et *Rhodococcus* possèdent également des orthologues des MmpL. *Corynebacterium glutamicum* possède, par exemple, quatre orthologues désignés CmpL1-4 (Corynebacterial membrane protein Large 1-4) (Yang et al., 2014). Le génome de *M. tuberculosis* renferme 14 *mmpL* (Cole and Barrell, 1998; Cole et al., 1998; Domenech et al., 2005). Cependant, *mmpL6* code pour une protéine tronquée et *mmpL13a* *mmpL13b* dérivent vraisemblablement d'un gène ancestral unique qui s'est scindé en deux cadres de lecture, suggérant que ces deux gènes ont perdu leur rôle fonctionnel (Tableau 5). L'arbre phylogénétique de la Figure 30 de la seconde partie de la section résultat montre que certaines MmpL chez *M. abscessus* présentent des homologies fortes avec des MmpL présents chez *M. smegmatis* et/ou *M. tuberculosis*. En particulier, MmpL3, responsable du transport des acides mycoliques chez *M. tuberculosis* (Grzegorzewicz et al., 2012) et *M. smegmatis* (Varela et al., 2012) semble très proches de MAB_4508 chez *M. abscessus*.

II Les principales fonctions des MmpL

La première démonstration expérimentale de la participation des MmpL dans le transport des lipides provient de deux études indépendantes démontrant que l'inactivation de *mmpL7* chez *M. tuberculosis* assurerait le transport des PDIM (Cox et al., 1999; Camacho et al., 2001). Il a ensuite

Introduction : les transporteurs de la famille MmpL

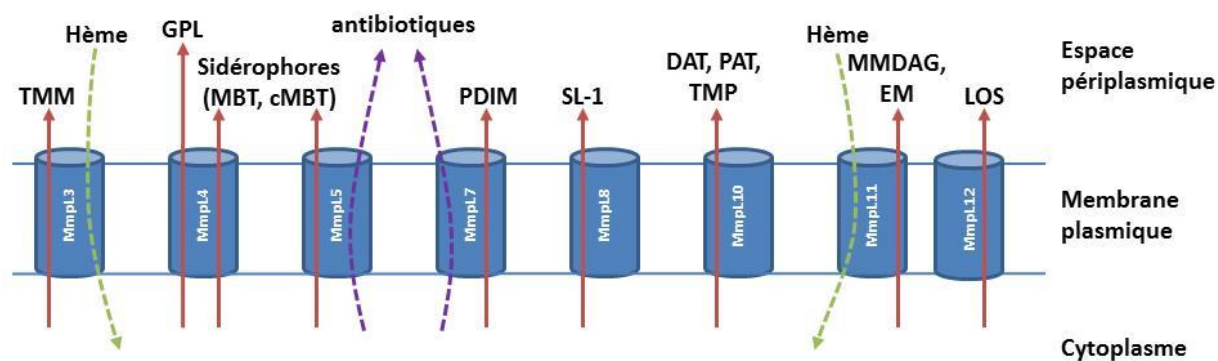


Figure 27 : Principales fonctions connues des protéines MmpL mycobactériennes.

TMM : Monomycolate de tréhalose ; GPL : Glycopeptidolipide ; MBT et cMBT : Mycobactines et carboxymycobactines ; PDIM : Dimycocerosate de phthiocerol ; SL-1 : Sulfolipides-1 ; DAT : diacyltréhalose ; PAT : pentaacyltréhalose ; TMP : Tréhalose monophléates ; MMDAG : monomeromycolyl-diacylglycerol ; EM : ester de mycolates ; LOS : Lipooligosaccharide.

D'après (Chalut, 2016; Székely and Cole, 2016)

été établi que *mmpL8* transporte des sulfolipides (SL) (Converse et al., 2003) tandis que *mmpL10* était impliqué dans le transport du pentaacyltréhalose (PAT) (Belardinelli et al., 2014) et des polyphléates de tréhalose (Burbaud et al., 2016) (Figure 27). Le seul gène *mmpL* essentiel chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* est *mmpL3*, requis pour transporter les mycolates sous la forme de TMM (Grzegorzewicz et al., 2012; Varela et al., 2012). D'autres études ont rapporté que MmpL11 permettait l'export de monomeromycolyl diacylglycerol (MMDAG) et d'ester de mycolate chez *M. smegmatis*. L'introduction du gène *mmpL11* de *M. tuberculosis* dans un mutant de *M. smegmatis* dépourvu de *mmpL11* restaure l'export de ces lipides, suggérant un rôle similaire de MmpL11 dans les deux espèces (Pacheco et al., 2013). MmpL4 et MmpL5 constituent le système d'export des sidérophores (Wells et al., 2013; Jones et al., 2014). En effet, des données récentes impliquent ces MmpL dans la sécrétion des mycobactines, qui sont de petites molécules capables de lier le fer avec une très grande affinité et de libérer celui-ci dans la bactérie dans des conditions de carence en fer (Rodriguez, 2006). De plus, MmpL5 est impliquée dans la résistance de *M. tuberculosis* à la clofazimine et à la bédaquiline (Andries et al., 2014; Hartkoorn et al., 2014). Des mutations qui inactivent le régulateur Rv0678 vont lever la répression du locus *mmpS5-mmpL5*, adjacent à Rv0678, et cet effet conduira à l'efflux de ces deux antibiotiques chez *M. tuberculosis*. D'ailleurs, l'absence de *mmpL5* chez *M. leprae* pourrait expliquer pourquoi cette mycobactérie est très sensible à la clofazimine sans jamais développer de résistance (Hartkoorn et al., 2014).

Le rôle de la plupart des autres MmpL chez *M. tuberculosis* demeure inconnu. Cependant, du fait de leur localisation, généralement proche de certaines *pks*, il est probable que certaines de ces MmpL aux fonctions indéterminées puissent intervenir dans le transport de lipides encore non caractérisés. L'ensemble de ces observations soulignent la stricte spécificité de substrat de ces transporteurs mais la présence de MmpL de fonction inconnue laissent penser qu'elles puissent transporter des substrats non-lipidiques et /ou intervenir dans des processus de détoxification opérant dans des conditions environnementales diverses. Alternativement, certains *mmpL* pourraient être associées à des voies métaboliques ancestrales pour lesquelles les fonctions ont été perdues au cours de l'évolution, comme le suggère le rôle de *mmpL12* dans l'export des lipooligosaccharides (LOS) (Boritsch et al., 2016).

Mais si *mmpL4* est impliqué dans le transport de sidérophores chez *M. tuberculosis*, les gènes *mmpL4a* et *mmpL4b* ont été essentiellement étudiés en tant que transporteurs de GPL chez *M. smegmatis* et *M. abscessus* (Sondén et al., 2005; Ripoll et al., 2007; Medjahed and Reyrat, 2009). Les GPL, composants majeurs de la membrane externe de certaines MNT, jouent un rôle primordial à la

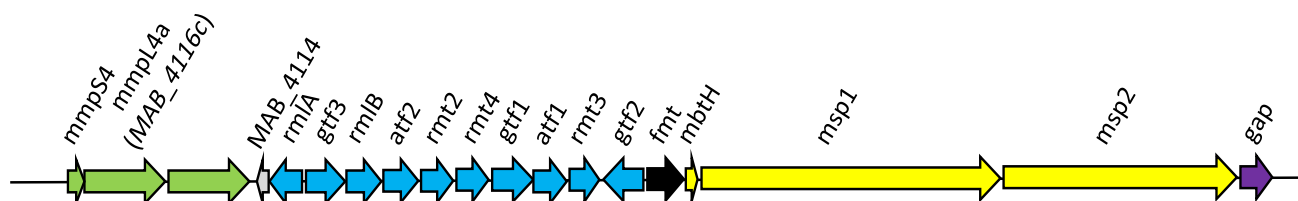


Figure 28 : Organisation génétique d'une partie du locus GPL de *M. abscessus*.

Les cadres de lecture ouverts sont sous forme de flèches. On retrouve en vert la famille MmpL/MmpS; en Gris une protéine codée de fonction inconnue; en bleu des protéines responsables de la biosynthèse, l'activation, le transfert et les modifications du sucre; en noir la protéine impliquée dans la biosynthèse des lipides; en jaune la protéine permettant la biosynthèse de peptides; en mauve la protéine responsable du transport du GPL à la surface de l'enveloppe mycobactérienne.

D'après (Ripoll et al., 2007)

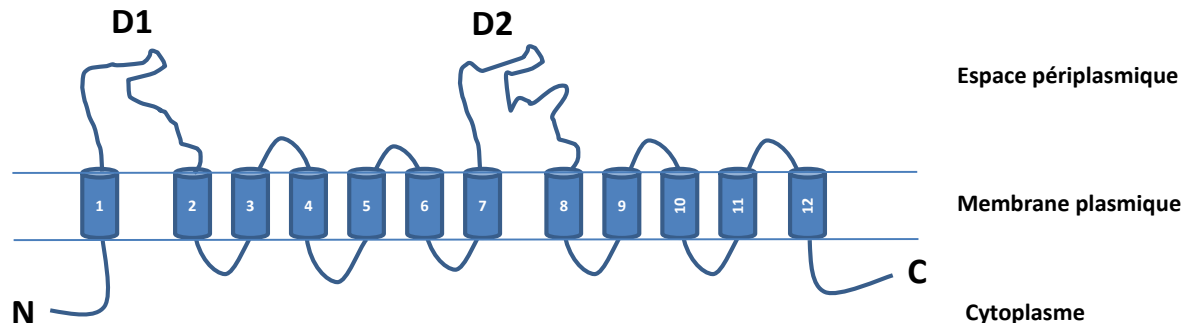


Figure 29 : Topologie générale des membres de la superfamille des protéines RND.

Elle est constituée classiquement de 12 domaines transmembranaires et deux boucles extra-cytoplasmiques (D1 et D2) localisées entre les TM1-TM2 et TM7-TM7.

D'après (Tekaija et al., 1999; Jain et al., 2008; Sandhu and Akhter, 2015; Székely and Cole, 2016)

fois dans la physiologie des bacilles et dans les interactions hôte-pathogène (Deshayes et al., 2008). Des mutations dans *MAB_4116c (mmpL4a)* chez un variant lisse de *M. abscessus* impactent directement sur la morphologie des bactéries qui deviennent rugueuses (Park et al., 2015). De la même façon, la délétion ou des mutations ponctuelles dans *MAB_4115c (mmpL4b)* abolissent la production des GPL à la surface de *M. abscessus* (Medjahed and Reyrat, 2009; Nessar et al., 2011; Kim et al., 2013; Pawlik et al., 2013)(Figure 28). La délétion de *mmpL4b* dans une souche parentale lisse s'accompagne également de l'acquisition de la capacité à produire des cordes, d'une augmentation de la virulence de *M. abscessus* ainsi que d'une mortalité accrue des zebrafish infectés avec le mutant *mmpL4b* comparativement à la souche parentale (Bernut et al., 2014). Ces observations impliquent donc clairement les MmpL4a et MmpL4b dans la virulence de *M. abscessus* et sont confortées par d'autres études démontrant la contribution de certaines MmpL dans la virulence de *M. tuberculosis*. En effet, les études pionnières de Domenech *et al.* (Domenech et al., 2005) basées sur l'inactivation génique de 11 *mmpL* et leur suivi phénotypique dans des souris infectées ont montré que les mutants *mmpL4*, *mmpL7*, *mmpL8* et *mmpL11* étaient fortement atténués. De la même façon et dans une étude indépendante, Lamichhane *et al.* montrent que l'inactivation de *mmpL4*, *mmpL5*, *mmpL7*, *mmpL8*, *mmpL10*, et *mmpL11* s'accompagne d'une baisse notable de la capacité de ces mutants à se multiplier dans les poumons des souris infectées (Lamichhane et al., 2005). L'ensemble de ces études souligne l'importance du transport des lipides de la paroi et la capacité innée des mycobactéries pathogènes à survivre et à se multiplier dans un environnement intracellulaire. Les MmpL participent donc directement dans le dialogue entre l'hôte et le pathogène et conditionnent l'issue de l'infection.

III Topologie et force proto-motrice des transporteurs MmpL

Les transporteurs de la famille RND possèdent généralement 700-1300 résidus et sont prédits pour contenir 10-12 régions transmembranaires (TM) ainsi que deux domaines périplasmiques situés entre TM1 et TM2 et entre TM7 et TM8 (figure 29). Ces protéines forment des homotrimères ou hétérotrimères composés de deux polypeptides. Les transporteurs RND chez les bactéries à Gram négatif sont généralement associés aux « Membrane Fusion Proteins (MFP) » qui sont insérées dans la membrane interne avec des « Outer Membrane Factors (OMF) » pour former une pompe traversant les membranes interne et externe (Yamaguchi et al., 2015). Cette architecture a été révélée grâce à la résolution des structures de plusieurs transporteurs RND, tels que AcrB, MexB, ZneA et MtrD (Murakami et al., 2002; Sennhauser et al., 2009; Pak et al., 2013; Bolla et al., 2014). Cependant, très peu d'informations sont connues concernant l'organisation et le mécanisme d'action des MmpL chez les mycobactéries et leur topologie réelle. Toutefois, Chim *et al.* (Chim et al., 2015) proposent une organisation topologique conservée chez toutes les MmpL, constituée de 12

TM en hélice et deux domaines extracytoplasmiques entre TM1 et TM 2 et entre TM7 et TM8, en accord avec les structures des transporteurs RND. Ces auteurs ont établi que le premier domaine extracytoplasmique de toutes les MmpL ainsi que le second domaine de MmpL3 et MmpL11 sont beaucoup plus petits que les domaines périplasmiques des transporteurs RND classiques (environ 150 résidus au lieu de 300). La résolution par cristallographie aux rayons X du second domaine périplasmique D2 de MmpL1 a révélé une structure homologue à celle des transporteurs RND. Une autre particularité de cette étude a consisté à montrer que MmpL3 et MmpL11 possèdent un domaine C-terminal cytoplasmique particulièrement étendu qui permettrait l'amarrage de protéines accessoires et/ou de biosynthèse également requises pour l'export des mycolates. Ces hypothèses sont renforcées par des observations en microscopie à fluorescence qui montrent que ce domaine C-terminal est requis pour la localisation polaire de MmpL3 chez *M. smegmatis* (Carel et al., 2014).

L'activité de transport des MmpL est médiée par la force proto-motrice qui dépend de la présence de plusieurs résidus essentiels. Des études biochimiques et cristallographiques sur AcrB d'*E. coli* ont identifié certains de ces résidus indispensables au maintien de la force proto-motrice, en particulier les résidus Lys940 du TM10, la Thr978 du TM11, l'Asp407 et l'Asp408 du TM 4 et la Ser481 du TM6 (Su et al., 2006; Eicher et al., 2014). Chez les mycobactéries, des études indirectes suggèrent que l'activité des MmpL est dépendante de l'établissement d'un gradient de proton. En l'occurrence, plusieurs composés pharmacologiquement actifs contre *M. tuberculosis*, tous appartenant à des familles chimiques très différentes, sont capables d'inhiber le transport des acides mycoliques en inhibant la force proto-motrice de MmpL3 de manière directe ou indirecte (Poce et al., 2014). Par contre, les résidus réellement impliqués dans la force proto-motrice et le transport des protons n'ont pas encore été identifiés. Des études combinant à la fois la mutagenèse dirigée ainsi que l'établissement d'une structure tridimensionnelle seront nécessaires pour i) démontrer de manière claire le rôle et l'impact des résidus de la force proto-motrice dans l'activité de transport des MmpL et ii) comprendre comment agissent les inhibiteurs de MmpL et si la liaison directe aux MmpL peut engendrer des changements structuraux et perturber le gradient de proton.

IV Les inhibiteurs de MmpL3 : des entités chimiques différentes pour une même cible

Chez *M. smegmatis* l'inactivation conditionnelle du gène *MSMEG_0250* (homologue de *mmpL3* de *M. tuberculosis*) conduit à un défaut de transport du TMM à la surface de la bactérie et

celui-ci s'accumule dans le cytoplasme (Varela et al., 2012). Le TMM étant un des substrats des mycolyltransférases du complexe 85, soit pour assurer la synthèse du TDM, soit pour catalyser lamycolylation de l'AG, l'inactivation conditionnelle de *MSMEG_0250* résulte donc dans la perte d'acides mycoliques en surface des bactéries et conduit à une lyse rapide des mycobactéries. Ces données génétiques ont été rapidement confirmées grâce à l'inhibition « chimique » de *MSMEG_0250*. En effet, AU1235, une molécule de la classe des adamantyl urée n'impacte pas la synthèse des acides mycoliques ou la production de TMM mais, tout comme l'inactivation conditionnelle de gène *MSMEG_0250*, s'accompagne d'une inhibition du transport de TMM à la périphérie de la paroi (Grzegorzewicz et al., 2012). Ces études non seulement identifiaient pour la première fois le transporteur des mycolates, mais démontraient également l'intérêt de MmpL3 en tant que cible thérapeutique suscitant l'attrait de nombreuses équipes dans la recherche de nouvelles molécules capables de cibler ce transporteur (Li et al., 2014; Bailo et al., 2015). De fait, MmpL3 est considérée actuellement comme l'une des cibles thérapeutiques les plus prometteuses à explorer dans le cadre du développement de nouvelles approches thérapeutiques. Quelques années ont suffi pour voir émerger une vaste gamme de composés très variés, tels que les indoléamides (Lun et al., 2013) ou leurs dérivés (Stec et al., 2016), le SQ109 un dérivé de l'éthambutol (Tahlan et al., 2012), le pyrole BM212 ou les indolcarboxamides en tant qu'inhibiteurs du transport des acides mycoliques. Cependant, dans un certain nombre d'études, seules des mutations dans *mmpL3* présentes dans les souches devenues spontanément résistantes à ces composés ont été identifiées sans pour autant démontrer un impact direct de ces mutations vis-à-vis du mécanisme de résistance. En effet, le tétrahydropyrazolo[1,5- α]pyrimidine-3-carboxamide (THPP) a été initialement sélectionné dans une campagne de criblage à haut débit contre *M. tuberculosis* (Remuiñán et al., 2013). Mais si la sélection de mutants spontanément résistants à THPP a permis de mettre en évidence des mutations dans *mmpL3* (Remuiñán et al., 2013), une seconde étude réalisée par les mêmes auteurs a démontré que MmpL3 n'était pas la cible de THPP. Le composé inhiberait l'enoyl-CoA hydratase EchA6, une enzyme cytoplasmique qui interagit avec d'autres composés de FAS-II (Cox et al., 2016), démontrant ainsi que la seule présence de mutations spontanées dans *mmpL3* peut en réalité obscurcir l'identification des cibles réelles de certains inhibiteurs.

En résumé, les MmpL sont impliquées dans un grand nombre de fonctions, couplant biosynthèse et transport de lipides complexes et variés. En tant qu'acteurs principaux du transport de ces lipides, ils participent donc directement à l'élaboration et l'assemblage complexe de la paroi. Du fait de l'importance de ces lipides à la surface des mycobactéries, certaines MmpL sont donc également impliquées dans la virulence et la physiopathologie infectieuse. Enfin, en agissant comme

Introduction : les transporteurs de la famille MmpL

des pompes à efflux, elles sont considérées comme des facteurs responsables de la résistance intrinsèque des mycobactéries à de nombreux agents anti-infectieux (Figure 27). Chez *M. abscessus*, le nombre extrêmement élevé de MmpL laisse présager de leur rôle dans des fonctions diverses, dans la physiologie, la virulence et la résistance innée de cette bactérie à la plupart des antibiotiques actuellement disponibles. Chez *M. abscessus*, très peu d'éléments sont connus quant aux rôles des MmpL dans la virulence bactérienne et en tant que cible. C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse.

Objectifs de thèse

Les mycobactérioses incriminant *M. abscessus* sont en augmentation croissante faisant de cette mycobactérie la principale MCR pathogène humaine (Medjahed et al., 2010). Capable d'induire un large spectre de symptômes cliniques, *M. abscessus* se révèle être particulièrement délétère chez des personnes présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente (Griffith, 2010), telle que la mucoviscidose (Griffith, 2003; Olivier et al., 2003).

Un des aspects les plus préoccupants de ces infections par les membres du complexe *M. abscessus*, regroupant *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* et *M. bolletii*, est leur résistance intrinsèque à la plupart des antibiotiques existants (Nessar et al., 2012), pouvant conduire à des impasses thérapeutiques. Si l'analyse du génome a mis en évidence un certain nombre de facteurs impliqués dans la résistance aux antibiotiques (Ripoll et al., 2009), la structure unique de l'enveloppe mycobactérienne, agissant comme une barrière hydrophobe et réduisant la pénétration et l'accessibilité de certaines molécules dans la bactérie, contribue également à cette résistance naturelle aux agents anti-infectieux (Medjahed et al., 2010; Marrakchi et al., 2014; Jankute et al., 2015). Ainsi, en raison de leur importance dans la chimiorésistance du pathogène, une bonne compréhension de la structure, de la biosynthèse et des mécanismes de régulation des composants majeurs de l'enveloppe constitue un enjeu capital dans la recherche de nouveaux traitements. Un certain nombre d'études axées sur les protéines transmembranaires de la famille des MmpL chez *M. tuberculosis* ont démontré leur rôle majeur dans l'élaboration de la paroi (Székely and Cole, 2016), dans la virulence mycobactérienne (Domenech et al., 2005) ainsi que dans l'expulsion de certaines molécules contribuant ainsi aux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Chalut, 2016). D'autres travaux récents ont mis en exergue l'efficacité thérapeutique de diverses classes d'agents antituberculeux capables de cibler le transporteur des acides mycoliques MmpL3. Chez *M. abscessus*, 31 gènes codent pour des MmpL potentielles mais très peu d'éléments relatifs à leur fonction et leur importance sont connus chez cette espèce (Deshayes et al., 2010). Quels sont les rôles de ces transporteurs dans l'assemblage des composants pariétaux, la physiologie, la virulence ou la chimiorésistance naturelle chez *M. abscessus*? Pourraient-ils représenter des cibles attractives à exploiter dans le cadre du développement de nouvelles molécules à portée thérapeutique ?

Développé au sein de notre équipe pour décrire le processus infectieux de *M. abscessus* en temps réel (Bernut et al., 2014b), l'embryon de zebrafish, plus permissif aux mycobactérioses à *M. abscessus* que le modèle murin (Bernut et al., 2014a), s'avère également adapté pour étudier l'efficacité de traitements thérapeutiques dans un contexte *in vivo* (Bernut et al., 2014a). Grâce au couple zebrafish/*M. abscessus*, l'efficacité d'une chimiothérapie combinant à la fois l'amoxicilline (une β -lactamine) et l'avibactam (un inhibiteur spécifique de BlaMab, la β -lactamase de *M. abscessus*) a été démontrée (Dubée et al., 2015),

l'avibactam permettant de restaurer l'activité de l'amoxicilline en inhibant BlaMab responsable de l'hydrolyse de l'antibiotique au sein de la mycobactérie. Cette combinaison offre par ailleurs l'avantage d'utiliser des antibiotiques déjà approuvés par les instances réglementaires et disponibles en clinique. Cependant, très peu de molécules agissent de manière spécifique et efficacement contre *M. abscessus*, soulignant le besoin urgent d'accroître notre arsenal thérapeutique pour lutter contre cette mycobactérie. Sur la base de similarités des séquences génomiques et de conservation de voies métaboliques entre *M. tuberculosis* et *M. abscessus*, nous avons initié un programme d'étude axé sur l'utilisation d'une chimiothèque de composés actifs contre *M. tuberculosis* comme point de départ pour la recherche de nouveaux composés efficaces contre *M. abscessus*. L'idée était ainsi de pouvoir bénéficier et d'utiliser directement les vastes données déjà existantes obtenues lors de précédentes campagnes de criblage contre *M. tuberculosis*, offrant l'avantage indéniable d'un gain de temps sans avoir à recourir à une étude de criblage *de novo* chez *M. abscessus*.

Dans ce contexte, ce projet de thèse a pour but d'accroître nos connaissances sur le rôle, les fonctions biologiques et mécanistiques de certaines MmpLs chez *M. abscessus* et de rechercher de nouvelles molécules actives contre cette mycobactérie en essayant de décrire leur mode d'action. L'ensemble de ces travaux a été réalisé en mettant à profit les différents outils (génétiques, biochimiques, structuraux, modèles animaux) développés au sein de notre équipe et en collaboration étroite avec d'autres partenaires (génomique, chimie). Les objectifs principaux de ces travaux ont été:

1. d'établir les caractéristiques phénotypiques, génétiques, et physiopathologiques d'un variant rugueux chez *M. bolletii*.
2. d'identifier des molécules actives contre le complexe *M. abscessus*, de découvrir leur(s) cible(s) et expliquer leur mode d'action.
3. d'améliorer les propriétés thérapeutiques et physico-chimiques d'analogues structuraux de PIPD1.

Résultats

OBJECTIF 1 : Etablir les caractéristiques génétiques, phénotypiques, et physiopathologiques d'un variant rugueux de *Mycobacterium bolletii*.



Ce travail a été initié, suite à l'obtention inattendue d'un clone rugueux (R) après la transformation d'une souche lisse (S) de *M. bolletii* (souche de référence CIP108541T).

Inscrit dans une démarche pluridisciplinaire et collaborative, le but de ce projet a été de comprendre les raisons de ce changement phénotypique et morphologique, d'en identifier les mécanismes et d'appréhender les effets de cette conversion en termes de virulence dans le modèle d'infection ZF.

Afin de mener à bien cette étude nous avons entrepris :

- d'identifier l'origine génétique de la conservation S/R, *via* une analyse comparative du génome des deux variants.
- de réaliser une étude comparative des caractéristiques phénotypiques *in vitro* des deux variants (formation de biofilms, formation de cordes, et capacité de se mouvoir par glissement sur milieu solide ont été étudié par mes soins, la production et transport de lipides à travers la membrane par Albertus Viljoen.)
- de dresser le profil physiopathologique des infections causées par les variants S et R de *M. bolletii* dans l'embryon de ZF.

Le séquençage du génome total des variants S et R de *M. bolletii*, réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr R. Brosch (Institut Pasteur, Paris) a permis de révéler une unique mutation T2524C dans le gène *MASS_4115 (mmpL4a)*, entraînant, au niveau de la protéine, la **substitution d'une tyrosine (Tyr) par une histidine en position 842 de la protéine MMPL4a**.

Les études comparatives de morphologie et de virulence ont relevé que la mutation induit plusieurs caractéristiques :

- **Une carence de production et de transport de GPL chez le variant R** qui s'illustre par :
 - **une zone translucide aux électrons (ETZ) plus fine**, au sein de la vacuole de phagocytose visualisée en microscopie électronique à transmission, comparativement à la vacuole observée avec le variant S dans les macrophages murins.
 - **l'acquisition de la capacité à produire des cordes *in vitro***.
 - **la perte de la capacité à former des biofilms ou à se déplacer par glissement sur milieu solide**.
- **Pour la première fois, des infections à *M. bolletii* ont été conduites chez l'embryon de ZF**, et une virulence accrue de ce variant R a été remarquée comparativement au variant S. Elle se traduit par :

Résultats : Caractéristiques phénotypiques, génétiques, physiopathologiques et mécanistiques d'un variant rugueux chez *M. bolletii*.

- **une production massive de structures sous forme de cordes mycobactériennes,**
- **la formation d'abcès conduisant à une infection aigüe,**
- **une mort rapide de larves infectées par ce variant R.**

En parallèle, l'alignement multiple des séquences de MmpL4a et des différentes MmpL de *M. tuberculosis* nous a permis de constater la conservation du résidu **Tyr842**. Des expériences de complémentations fonctionnelles réalisées chez *M. bolletii* ou *M. abscessus* on mises à jour le **rôle crucial de ce résidu dans le métabolisme des GPL et la croissance mycobactérienne.**

Par ailleurs, des études de modélisation moléculaire basée sur les coordonnées cristallographiques de la pompe à efflux AcrB d'*E. coli*, nous a permis d'établir un modèle de prédiction structural de MmpL4a et de MmpL3 montrant :

- **La localisation de Tyr 842 au niveau du TM10, domaine transmembranaire,**
- **La présence de deux résidus supplémentaires,** dont l'implication est supposée identique à la Tyrosine 842 de MmpL4a. Il s'agit du **couple Asp/Tyr du TM10** et de **l'acide aspartique du TM4.**

Des expériences de complémentations fonctionnelles réalisées dans un mutant conditionnel de *mmpL3* chez *M. smegmatis* ont permis de démontrer le rôle essentiel de ces différents résidus dans l'activité de transport des protéines de la famille MmpL, très vraisemblablement du fait de leur participation dans l'établissement de la force proto-motrice fournissant l'énergie nécessaire au transport des différents substrats des MmpL.

L'ensemble de cette étude nous fournit des informations importantes sur les aspects mécanistiques et structurales des protéines MmpL qui agissent à la fois en tant que i) transporteurs de lipides et ii) déterminants de la virulence chez les mycobactéries.

Résultats : Caractéristiques phénotypiques, génétiques, physiopathologiques et mécanistiques d'un variant rugueux chez *M. bolletii*.

**Article 1: “Insights into the smooth-to-rough
transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels
a functional Tyr residue conserved in all
mycobacterial MmpL family members “**

Auteurs

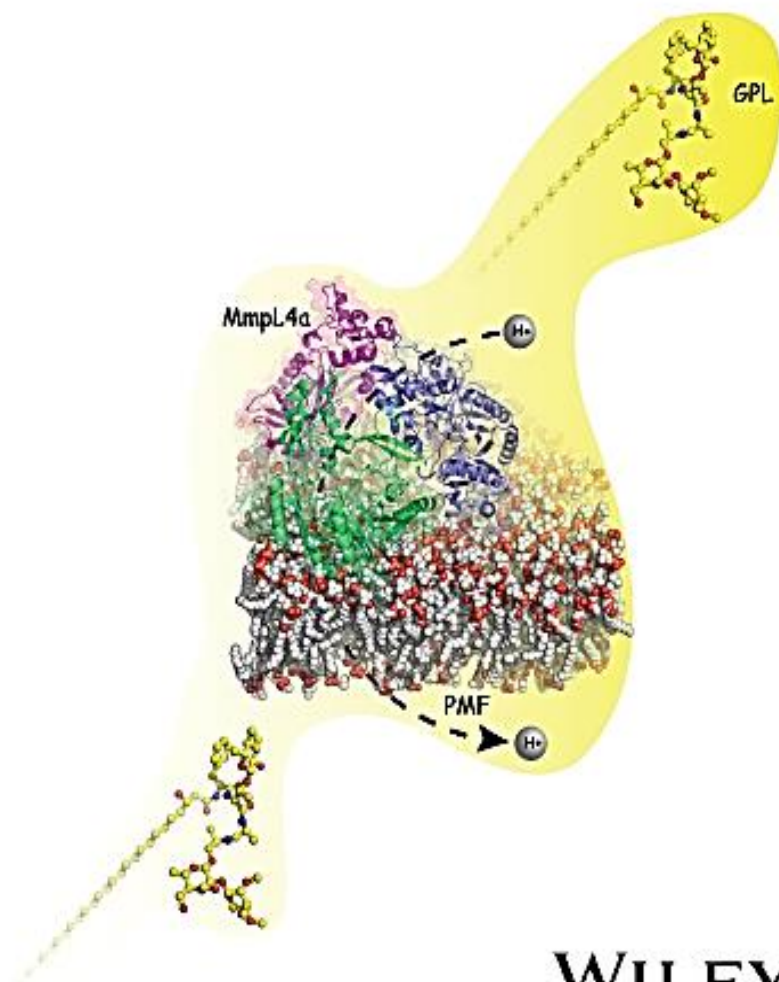
Audrey Bernut, Albertus Viljoen, Christian Dupont, Guillaume Sapriel, Mickaël Blaise, Christiane Bouchier, Roland Brosch, Chantal de Chastellier, Jean-Louis Herrmann et Laurent Kremer

Journal

Molecular Microbiology (2016) 99(5), 866-883

DOI: 10.1111/mmi.13283

molecular microbiology



On the cover:
Export of mycobacterial
glycopeptidolipids

**Life without Fe-S
clusters**

**Protein aggregation as
an antibiotic design
strategy**

**A novel relaxase from
*Clostridium perfringens***

WILEY Blackwell

Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium bolletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members

Audrey Bernut,^{1†} Albertus Viljoen,^{1,2†}
Christian Dupont,¹ Guillaume Sapriel,³
Mickaël Blaise,¹ Christiane Bouchier,⁴
Roland Brosch,⁵ Chantal de Chastellier,²
Jean-Louis Herrmann³ and Laurent Kremer^{1,6*}

¹Centre National de la Recherche Scientifique FRE3689, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France.

²Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille Université UM2, Inserm, U1104, CNRS UMR7280, 13288 Marseille, France.

³UMR1173, INSERM, Université de Versailles St Quentin, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France.

⁴Institut Pasteur, PF1 Génopole, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

⁵Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France.

⁶INSERM, CPBS, 34293 Montpellier, France.

Summary

In mycobacteria, MmpL proteins represent key components that participate in the biosynthesis of the complex cell envelope. Whole genome analysis of a spontaneous rough morphotype variant of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* identified a conserved tyrosine that is crucial for the function of MmpL family proteins. Isogenic smooth (S) and rough (R) variants differed by a single mutation linked to a Y842H substitution in MmpL4a. This mutation caused a deficiency in glycopeptidolipid production/transport in the R variant and a gain in the capacity to produce cords *in vitro*. In zebrafish, increased virulence of the *M. bolletii* R variant over the parental S strain was found, involving massive production of serpentine

cords, abscess formation and rapid larval death. Importantly, this finding allowed us to demonstrate an essential role of Tyr842 in several different MmpL proteins, including *Mycobacterium tuberculosis* MmpL3. Structural homology models of MmpL4a and MmpL3 identified two additional critical residues located in the transmembrane regions TM10 and TM4 that are facing each other. We propose that these central residues are part of the proton-motive force that supplies the energy for substrate transport. Hence, we provide important insights into mechanistic/structural aspects of MmpL proteins as lipid transporters and virulence determinants in mycobacteria.

Introduction

The mycobacterial cell envelope differs substantially from the canonical cell wall structures of other bacteria. Its unique architecture/composition and unusual hydrophobicity accounts for its unusual low permeability and makes it an efficient barrier for chemotherapeutic agents (Brennan and Nikaido, 1995). A key feature of the mycobacterial envelope is its high lipid content, representing up to 60% of the dry weight of the bacteria. This multilayered complex structure is composed of a typical phospholipid bilayer plasma membrane, an outer membrane, the mycomembrane, and an outermost layer referred to as the capsule (Hoffmann *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008). The mycomembrane is composed of mycolic acids anchored to arabinogalactan that is linked to peptidoglycan, generating the mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan backbone complex (Brennan and Nikaido, 1995). Interspersed within the mycomembrane is a wide assortment of covalently bound mycolic acids such as trehalose-dimycolates (TDM) as well as 'free' lipids, such as phthiocerol dimycoserates (PDIM), phenolic glycolipids or sulfolipids (Kremer and Besra, 2005). In addition to mycolic acids, these unique lipids contribute not only to the integrity of the cell envelope but play also important physiological roles, such as defining the shape of the bacilli. They provide also mechanical and osmotic protections and participate in

Accepted 18 November, 2015. *For correspondence. E-mail laurent.kremer@cpbs.cnrs.fr; Tel. (+33) 4 34 35 94 47; Fax (+33) 4 34 67 60 44 20. †Equal contribution.

mycobacterial pathogenesis (Jackson, 2014). Another central function of the cell envelope resides in the transport of various molecules, such as nutrients, ions, toxic compounds and lipids. Because proper localisation of these lipids in the membrane is crucial for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, their transport can be viewed as an important physiological process. Proteins transporting these lipids can, therefore, be considered as important virulence factors in addition to representing attractive drug targets (Bailo *et al.*, 2015).

Efflux pumps are membrane proteins that actively transport a wide array of compounds across the bacterial envelope and are classified into distinct superfamilies (Li *et al.*, 2015), including the ATP-binding cassette (ABC), major facilitator super family (MFS), small multidrug resistance (SMR), multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) and resistance nodulation division (RND) families. MFS, SMR, MATE and RND proteins are typically energised by the proton motive force (PMF). In mycobacteria, lipids are predominantly transported *via* a family of membrane proteins, designated MmpL (Mycobacterial Membrane Protein Large) belonging to the RND family. *M. tuberculosis* for instance possesses 13 MmpL proteins (Cole *et al.*, 1998). Whereas disruption of several *mmpL* genes led to significant attenuation for growth in mice (Converse *et al.*, 2003; Domenech *et al.*, 2005; Lamichhane *et al.*, 2005), *mmpL3*, involved in the transport of trehalose-monomycolate (TMM), is the only essential *mmpL* gene (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Varela *et al.*, 2012). However, despite their pivotal role in lipid transport and increasing interest as attractive drug targets (Bailo *et al.*, 2015), very little is known regarding the biochemical, structural and functional aspects characterising MmpL proteins. Considering the inherent difficulty to work with these very large membrane proteins, these tasks remain highly challenging.

Mycobacterium abscessus is a rapidly growing mycobacterium and an emerging human pathogen causing pulmonary infections, especially in patients with cystic fibrosis (CF) and other underlying lung disorders (Medjahed *et al.*, 2010). It also represents a major cause of sporadic and clustered outbreaks of community-acquired and health care-associated skin and soft tissue infections (Brown-Elliott and Wallace, 2002). *M. abscessus* displays smooth (S) or rough (R) colony morphotypes that can lead to different clinical outcomes. This morphotype difference relies on the presence (in S) or absence (in R) of surface-associated glycopeptidolipids (GPL) (Howard *et al.*, 2006; Ripoll *et al.*, 2007; Medjahed and Reytrat, 2009; Roux *et al.*, 2011). In contrast to the S strain, R bacteria can grow end to end, leading to a cord-like structure (Howard *et al.*, 2006; Sánchez-Chardi *et al.*, 2011). Several studies based on either cellular or animal models revealed the hypervirulence phenotype of the R morphotype (Byrd and Lyons,

1999; Catherinot *et al.*, 2007; Bernut *et al.*, 2014). From an epidemiological perspective, R variants are over-represented in airway colonisation (Jönsson *et al.*, 2007), and the most severe cases of *M. abscessus* pulmonary infections appear to be associated with R variants (Catherinot *et al.*, 2009). Two subspecies are recognised within the *M. abscessus* complex: *M. abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii* (Leao *et al.*, 2011). The latter subspecies includes strains of two previously described taxa, *M. massiliense* and *M. bolletii* (Adékambi *et al.*, 2004; 2006; Leao *et al.*, 2009). However, although the merging of *M. massiliense* and *M. bolletii* is under debate, recent publications support the previous three-subspecies classification (Cho *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2015). As for *M. abscessus*, R and S *M. bolletii* isolates have been reported (Roux *et al.*, 2009), to which CF patients are particularly vulnerable (Cândido *et al.*, 2014), and have been associated with recent outbreaks such as in southern Brazil (Nunes Lde *et al.*, 2014). However, defining and comparing the virulence of R and S *M. bolletii* has not yet been possible due to absence of isogenic pairs of *M. bolletii* and adapted animal models.

Herein, we present the characterisation of an R variant that spontaneously derived from the S *M. bolletii* reference strain. Whole genome sequencing identified an Y842H replacement in MmpL4a in the R strain, as the main genomic difference between the two isogenic variants. Moreover, it allowed us to unravel the functional importance of this Tyr residue found to be conserved in all MmpL family members, supporting its critical role in MmpL activity. Overall, this study represents an important step towards the understanding of the intrinsic mechanism governing the activity of these proteins in lipid transport and mycobacterial virulence.

Results

Selection of a rough M. bolletii strain

Investigating in more details the mechanisms underlying the smooth-to-rough switch requires working with S/R isogenic pairs as demonstrated recently for *M. abscessus* subsp. *abscessus* (Pawlik *et al.*, 2013). However, studies dedicated to address the genetic changes responsible for the S-to-R morphotype alterations are not yet available for the *M. bolletii* CIP108541^T reference strain and prevented by the lack of an isogenic rough variant, as the reference strain was obtained with a smooth morphotype. Previous attempts failed to generate rough colonies by plating smooth bacteria directly on agar plates (data not shown), consistent with findings in *M. abscessus* where the R morphotype could only be obtained *in vivo*, after an infectious challenge by the S variant in immunoglobulin knock-out mice (Rottman *et al.*, 2007). Unexpectedly, following

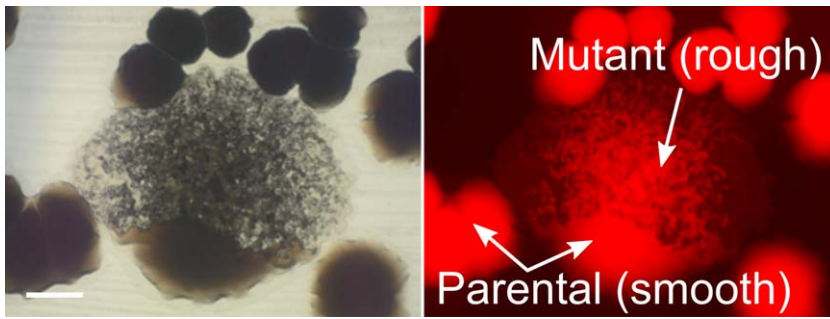


Fig. 1. Selection of a spontaneous rough variant of *M. boletii*. The smooth *M. boletii* strain CIP108541^T was electroporated with pTEC27, allowing expression of tdTomato. Following plating on 7H10^{OADC} containing 1 mg·ml⁻¹ hygromycin and incubation at 30°C, colonies were observed under the microscope (brightfield (BF), left panel; fluorescence, right panel). One single colony displayed a pronounced rough morphotype as indicated. Scale bar, 0.7 mm.

transformation of the *M. boletii* S variant with pTEC27, which allows expression of the tdTomato fluorescent marker, a single colony displaying a clear rough and dry texture was identified on agar plates (Fig. 1). To confirm that this R morphotype was not linked to the presence of the hygromycin, used as the selective antimicrobial, this clone was subcultured several times in the absence of the antibiotic. Stability of the R morphology, and absence of reversion to the S morphotype, was observed over the passages as judged by the visual inspection of the bacterial colonies on agar plates, thus indicating that a genetic mutation was responsible for the obtained R morphotype.

In vitro phenotypes of smooth and rough *M. boletii* variants

The S variant of *M. boletii* shows a dispersed growth phenotype when grown in liquid media. In contrast, the R variant failed to produce a dispersed and homogenous culture in liquid media but instead exhibited prominent clumping and aggregate formation (Fig. 2A). R morphotypes can be associated with cord formation in mycobacteria, characterised by numerous irregular serpentine filaments that form ridges and grooves throughout the colony. Comparison of the colony morphology of the *M. boletii* strains clearly indicates that the R variant displays cording on either agar plates (Fig. 2B, upper panels) or broth medium (Fig. 2B, lower panels), similarly to the *M. abscessus* R variants described previously (Howard *et al.*, 2006; Bernut *et al.*, 2014). The ability of the *M. boletii* S variant to slide from the centre (Fig. 2C) or to form thin biofilms (Fig. 2D) is in agreement with previous studies performed with *M. abscessus* S variants (Howard *et al.*, 2006). Similarly to *M. abscessus*, we observed that only the *M. boletii* R was unable to slide (Fig. 2C) and to produce biofilms (Fig. 2D). Collectively, these results indicate that *M. abscessus* S and *M. boletii* S behave similarly with respect to biofilm formation and sliding motility, whereas the R variants from each subspecies share a similar cording capacity.

Identification of a single point mutation in *MmpL4a* that abrogates GPL production

The genomic DNA from the *M. boletii* parental S and the R variants were subjected to sequencing. Comparison of the DNA sequences identified an SNP T2524C within *mmpL4a* (MASS_4115) that was further confirmed by PCR amplification and sequencing of a DNA segment comprising the putative mutation using the MASS_4115_for and MASS_4115_rev primers (Table S2). The T2524C single nucleotide substitution resulted in replacement of a Tyr by a His residue at position 842 (Fig. 3A). Examination of the genomic environment of *mmpL4a* indicates that it is part of the gene cluster involved in GPL biosynthesis (Fig. 3B), as reported earlier (Ripoll *et al.*, 2007).

S and R morphotypes are often associated with the presence or absence, respectively, of GPL in mycobacteria (Billman-Jacobe *et al.*, 1999; Eckstein *et al.*, 2000; Recht and Kolter, 2001), including *M. abscessus* (Howard *et al.*, 2006). We, therefore, analysed the GPL profile in both the smooth and the rough *M. boletii* strains by thin-layer chromatography (TLC). As anticipated, *M. boletii* S was characterised by an abundant production of GPL, whereas the R variant appeared as a low GPL producer (Fig. 3C), similar to previous observations in an *M. abscessus* *mmpL4b* deletion mutant (Medjahed and Reytrat, 2009).

Complementation with a functional *MmpL4a*

To investigate whether the above-mentioned *in vitro* phenotypes of the R strain are directed by the *MmpL4a*_Y842H substitution and not due to eventual additional mutations missed by whole genome sequencing, we constructed a complementation vector aimed to drive expression of a wild-type copy of the *mmpL4a* gene. The *mmpL4a* gene was amplified using *M. boletii* genomic DNA from the original S strain and cloned into the integrative pMV306, allowing expression of *mmpL4a* under the control of the *hsp60* promoter. Transformation of the R strain with pMV306_ *mmpL4a* generated dispersed and homogenous culture in broth medium, similar to the wild-type S variant (Fig. 2A). Moreover, complementation

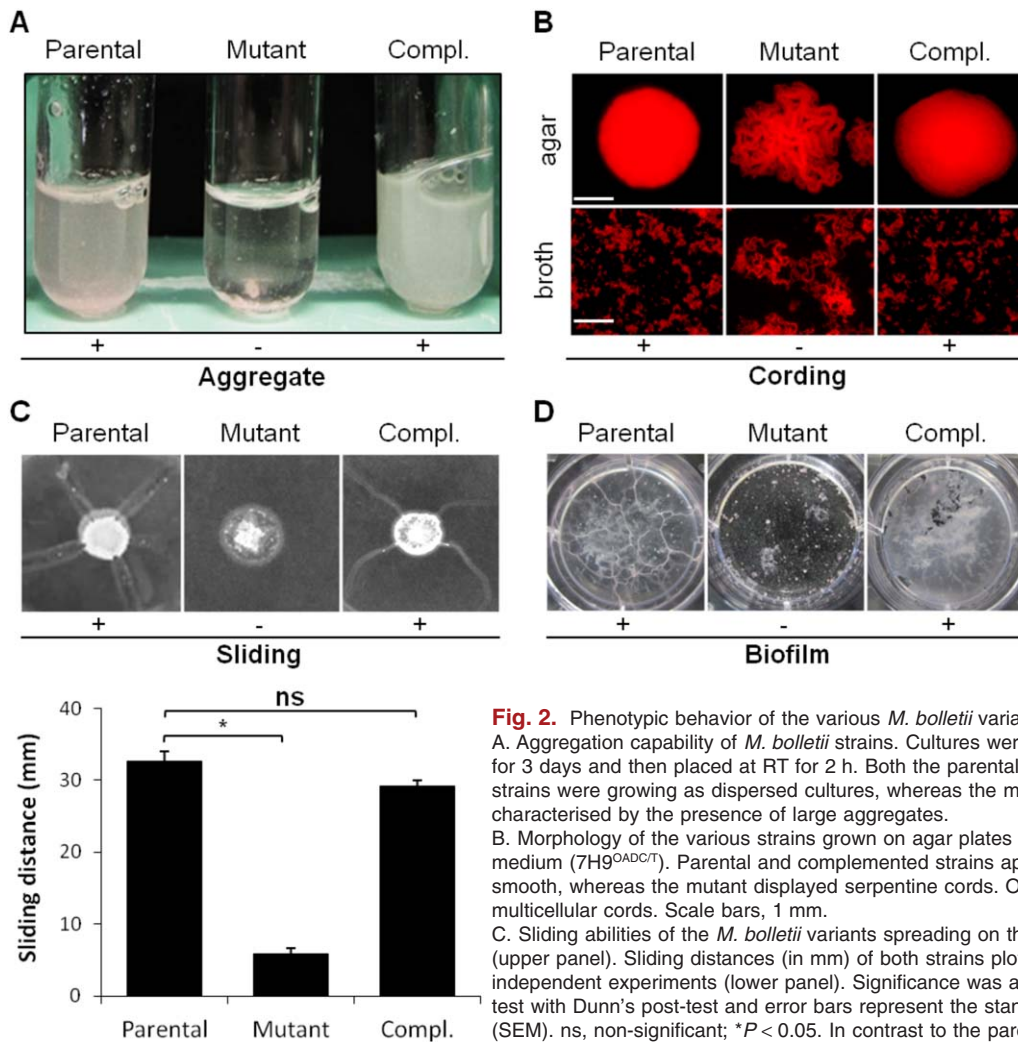


Fig. 2. Phenotypic behavior of the various *M. boletii* variants.

A. Aggregation capability of *M. boletii* strains. Cultures were grown in 7H9^{OADC/T} at 30°C for 3 days and then placed at RT for 2 h. Both the parental and the complemented strains were growing as dispersed cultures, whereas the mutant strain was characterised by the presence of large aggregates.

B. Morphology of the various strains grown on agar plates (7H10^{OADC}) or in broth medium (7H9^{OADC/T}). Parental and complemented strains appeared hemispherical and smooth, whereas the mutant displayed serpentine cords. Only rough bacteria produce multicellular cords. Scale bars, 1 mm.

C. Sliding abilities of the *M. boletii* variants spreading on the surfaces of motility plates (upper panel). Sliding distances (in mm) of both strains plotted are means of three independent experiments (lower panel). Significance was assessed by a Kruskal–Wallis test with Dunn's post-test and error bars represent the standard error of the mean (SEM). ns, non-significant; **P* < 0.05. In contrast to the parental and complemented strains, the rough mutant presents a decreased sliding capability.

D. Biofilm-forming capability of *M. boletii*. Parental and complemented strains, but not the rough mutant, formed a thin pellicule at the liquid/air interface.

restored all *in vitro* phenotypes characterising the parental S strain, such as sliding motility (Fig. 2C), biofilm formation (Fig. 2D) and GPL production (Fig. 3C). As anticipated, the complemented strain failed to produce cords (Fig. 2B). Overall, these results clearly indicate that the sole Y842H mutation in MmpL4a is responsible for the phenotypic characteristics associated with *M. boletii* R.

GPL production correlates with the presence of the cell wall ETZ in *M. boletii*-infected macrophages

After phagocytic uptake by macrophages, mycobacteria usually remain confined to phagosomes. Within this intracellular environment, the different layers of the mycobacterial cell wall can be easily visualised and characterised by transmission electron microscopy (TEM). With this approach, it has been shown that pathogenic species, but

not non-pathogenic ones, display an electron translucent zone (ETZ) that fills the entire space between the phagosome membrane and the thin dense layer of the wall located beyond the peptidoglycan layer (Frehel *et al.*, 1986). To determine whether ETZ formation coincides with GPL production in *M. boletii*, bone marrow-derived mouse macrophages (BMDMs) were infected either with the parental S strain, the MmpL4a_Y842H mutant or the complemented strain. The infected cells were fixed at 24 h post-infection (hpi) and processed for TEM analysis. Whereas all of the S bacteria were completely surrounded by a thick ETZ (Fig. 4A), this structure was very thin or non-existent in the cell wall of the R variant. As a result, the thin dense layer of the wall was found to be in close contact with the phagosomal membrane (Fig. 4B). The wide ETZ was restored in the case of the complemented *M. boletii* strain (Fig. 4C). Overall, these results indicate

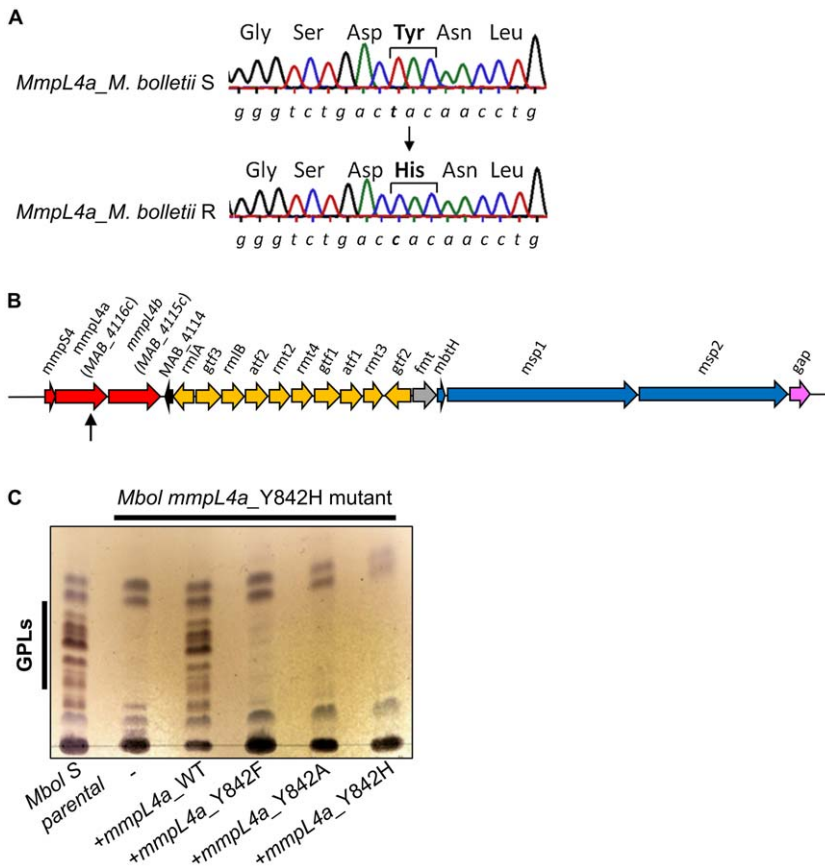


Fig. 3. A single point mutation in MmpL4a is responsible for the loss of GPL production in *M. bolletii*.

A. Parts of the sequence chromatograms of the PCR amplified *mmpL4a* genes from the parental (S) and mutant (R) *M. bolletii* strains are shown. A t→c SNP was detected, leading to the substitution of a Tyr in position 842 by a His residue.

B. Genetic organisation of part of the GPL locus in the *M. abscessus* that is identical in *M. bolletii*. The ORFs are depicted as arrows. Colour code: red: MmpL/MmpS family; black, unknown; yellow, sugar biosynthesis, activation, transfer and modifications; grey, lipid biosynthesis; blue, peptide biosynthesis; pink, GPL transport to the surface. Adapted from Ripoll *et al.* (2007).

C. TLC analysis of the crude lipid fractions of the parental, mutant and complemented strains. GPL were separated using CHCl₃/MeOH (9/1, v/v) as the solvent system and revealed after spraying with orcinol and charring. GPL are highly expressed in the parental and complemented smooth morphotypes but are minimal in the rough mutant.

This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com.

that inside the intraphagosomal milieu of a macrophage, *M. bolletii* displays a cell wall with a thick ETZ that relies on GPL production with a functional MmpL4a protein.

The Y842H mutation in MmpL4a increases pathogenicity of *M. bolletii* in zebrafish

We have recently exploited the optical transparency of zebrafish embryos to describe the increased virulence of the *M. abscessus* R variant compared with the S variant, which correlated with the loss of GPL production (Bernut *et al.*, 2014). Herein, we have used the zebrafish model to observe and compare the virulence and the physiopathological signs of the parental strain, the MmpL4a_Y842H mutant as well as the complemented strain. Around 200 cfu of tdTomato-expressing *M. bolletii*, exhibiting red fluorescence, were *i.v.* injected in the caudal vein of embryos at 30 h post-fertilisation (hpf). Daily monitoring of mortality as well as determination of the bacterial burden at various time points were used as phenotypic read-outs. Most embryos injected with the S morphotype were still alive at 13 days post-infection (dpi) (Fig. 5A). In sharp contrast, about 50% of embryos injected with the MmpL4a_Y842H

mutant were dead at 9 dpi, and around 70% of the larvae were dead at 13 dpi. Complementation with wild-type MmpL4a restored attenuation of the *M. bolletii* MmpL4a_Y842H to levels comparable with the S strain. The bacterial loads in embryos infected with the S parental strain increased only slightly between 3 and 5 dpi as compared with embryos infected with the rough MmpL4a_Y842H strain (Fig. 5B). This high replication rate of the mutant strain was corroborated with time-lapse imaging of *M. bolletii* R-infected embryos, which revealed the presence of growing foci of infection in the larval brain (Fig. 5C). Embryos harbouring an abscess similar to the one shown at 5 dpi in Fig. 5C usually died within the next 24 h. Over 13 dpi, abscesses were detected in 60% of the MmpL4a_Y842H-infected embryos (Fig. 5D). More than 50% of infected embryos developed abscesses in the brain and 15% had abscesses within the spinal cord (Fig. 5E). The less virulent *M. bolletii* S strains (parental and complemented) induced abscesses only marginally (Fig. 5C and D). Strikingly, virulence of the MmpL4a_Y842H variant also involved the massive production of serpentine cords, absent during infection with the S variants (parental and complemented strains), which initiated abscess formation leading to rapid larval death (Fig. 5F). Overall, these data

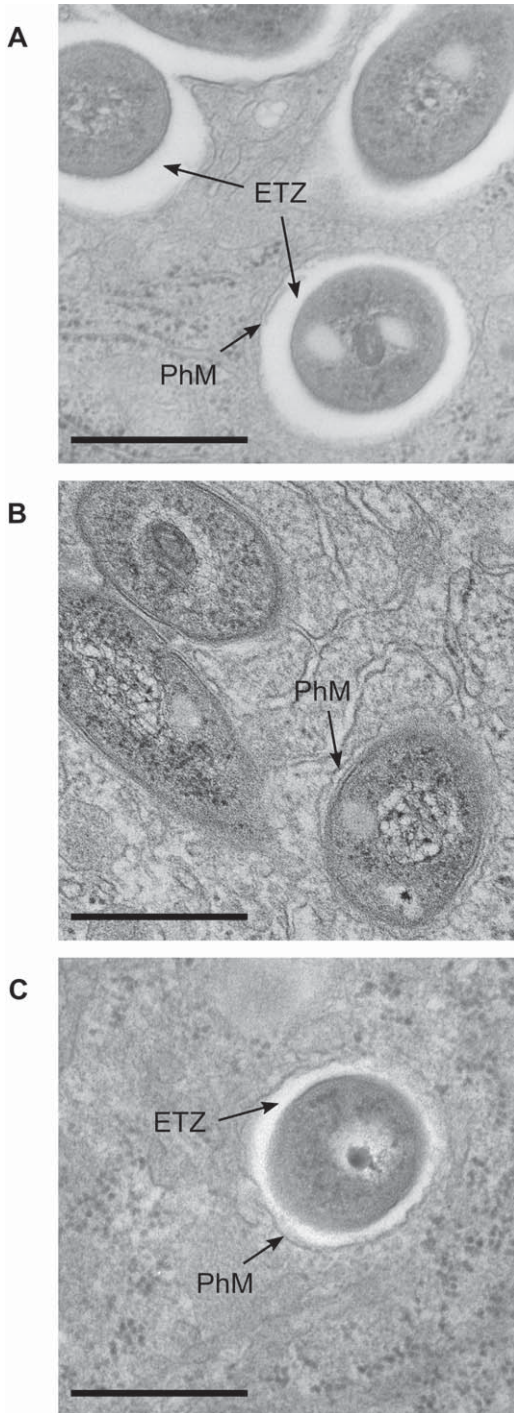


Fig. 4. Loss of GPL production in the *M. bolletii* *mmpL4a*_{Y842H} mutant results in disappearance of the ETZ of the bacterial cell wall as observed by TEM. Mouse bone-marrow derived macrophages infected with (A) the parental *M. bolletii* CIP108541^T, (B) *M. bolletii* *mmpL4a*_{Y842H} mutant or (C) the complement strain were fixed and processed for TEM at 24 hpi. PhM, phagosomal membrane. Scale bars in A–C, 0.5 μm.

indicate that the Tyr to His mutation in MmpL4a is responsible for the marked neurotropism of *M. bolletii* with massive infection abscesses within the central nervous system.

Conservation of the Tyr residue in MmpL4b is critical to GPL metabolism

Multiple sequence alignments showed that the amino acid portion encompassing Tyr842 was fully conserved in all MmpL4 orthologues from many different mycobacteria, including pathogenic, non-pathogenic, slow- and fast-growing species (Fig. 6A) as well as in all MmpL4-like proteins from various and unrelated organisms (Fig. 6B). Overall, these results suggest that Tyr842 could play a functional and/or structural role in the activity of the different MmpL transporters. That Tyr842 is a critical residue in MmpL4a activity with respect to the GPL metabolism was first investigated by complementation studies of the *mmpL4a*_{Y842H} mutant using constructs in which Tyr842 was substituted by different residues, followed by the TLC analysis of the GPL profile (Fig. 3C). As expected, introduction of the *mmpL4a*_{Y842H} failed to restore the GPL content. To exclude the possibility that the Y842H point mutation negatively affects overall expression and/or localisation of MmpL4a and accounts by these means for the loss of GPL restoration, MmpL4a-eGFP fusions were constructed and introduced in the *M. bolletii* *mmpL4a*_{Y842H} mutant. Green fluorescent-labelled mycobacteria indicated that both MmpL4a-eGFP and MmpL4a(Y842F)-eGFP fusions were expressed. In addition, whereas the complementation with pVV16-MmpL4a-eGFP restored an S morphotype without cords, MmpL4a(Y842F)-eGFP-expressing mycobacteria were rough and produced cords (Fig. S1A). This coincided with the GPL pattern of these strains (Fig. S1B). Moreover, the punctiform labelling of the MmpL4a-eGFP fusions suggests that both wild-type and mutant MmpL4a proteins assemble into a complex at the pole of the bacillus (Fig. S1C), similarly to MmpS4 in *M. smegmatis* (Deshayes *et al.*, 2010). This indicates that mutation at Tyr842 neither alters expression nor localisation of MmpL4a but rather abrogates its functions.

Introduction of either an *mmpL4a*_{Y842A} or an *mmpL4a*_{Y842F} allele also failed to restore the wild-type GPL profile (Fig. 3C). Consistent with these findings, we observed that the smooth morphotype was only restored when introducing the wild-type *mmpL4a* gene in the *M. bolletii* mutant strain (Fig. S2). Since Tyr and Phe only differ by the presence of a hydroxyl group, these results indicate that the additional hydroxyl group in Tyr842 plays an important role in MmpL4a activity.

That *mmpL4b*, which is adjacent to *mmpL4a* in *M. abscessus* (Ripoll *et al.*, 2007), participates in the GPL

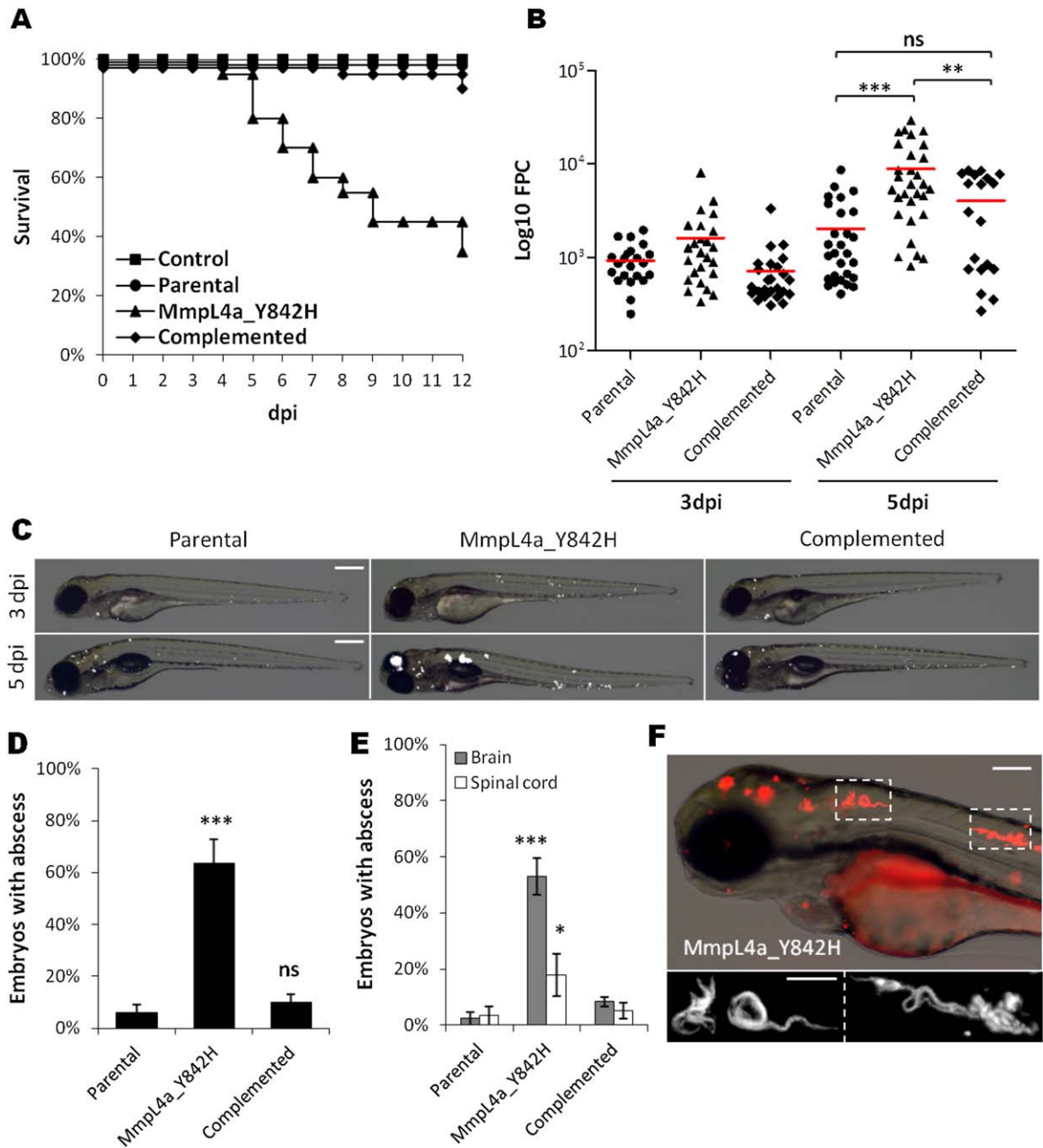


Fig. 5. The Y842H mutation in *M. bolletii* MmpL4a is associated with acquisition of a virulent phenotype in zebrafish embryos.

A–F. The 30 hpf zebrafish embryos were infected intravenously with either the parental *M. bolletii* CIP108541^T, the MmpL4a_Y842H mutant or the complemented strain (≈ 200 CFU).

A. Survival curves of the infected embryos with respect to the uninfected embryos ($n = 20$ – 30 per group, representative from three independent experiments). Embryos are significantly more susceptible to infection with the MmpL4a_Y842H mutant than with the parental or complemented smooth strains ($P < 0.0001$, log-rank test).

B. Bacterial loads of infected embryos. Zebrafish were monitored and imaged for FPC at 3 and 5 dpi to determine the bacterial burdens. Each symbol represents individual embryos and horizontal red lines indicate the mean. Results are expressed as mean log₁₀ FPC per embryo from two independent experiments. Higher bacterial loads were observed in the MmpL4a_Y842H-infected embryos.

C. Fluorescence and BF overlay of whole embryo showing the evolution of the infection with the MmpL4a_Y842H mutant expressing tdTomato. Scale bars, 200 μ m.

D. Frequency of abscesses in whole infected embryos at 13 dpi ($n = 20$ – 30 per group, average of three independent experiments).

E. Average localisation of mycobacterial abscesses in embryos from (D).

F. Fluorescence and BF overlay of the head of an MmpL4a_Y842H-infected embryo with typical serpentine cords (scale bar, 100 μ m) with the insets showing cords at higher resolution (scale bar, 50 μ m). For (B), significance was assessed by Kruskal–Wallis test with Dunn's post-test, whereas for (D) and (E) by Fisher's exact test. ns, no significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| MASS_4115 (<i>M. boletii</i>) | Q | I | N | W | V | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | G | A | G | L | K | T | G | I | 863 |
| MASS_4115_Y842H | Q | I | N | W | V | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | H | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | G | A | G | L | K | T | G | I | 863 |
| MAB_4116c (<i>M. abscessus</i> Mmpl4a) | Q | I | N | W | V | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | G | A | G | L | K | T | G | I | 863 |
| MAB_4115c (<i>M. abscessus</i> Mmpl4b) | N | L | H | W | M | V | L | A | M | S | V | I | I | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | G | A | G | L | N | T | G | I | 875 |
| MYCMA_2292 (<i>M. massiliense</i>) | Q | I | N | W | V | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | G | A | G | L | K | T | G | I | 863 |
| MSMEG_0381 (<i>M. smegmatis</i> mc2) | Q | I | N | W | V | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | I | G | A | G | L | N | T | G | I | 863 |
| Mspyr1_38180 (<i>M. gilvum</i>) | A | L | H | W | M | V | L | P | M | A | V | I | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | F | K | E | E | L | S | G | G | L | K | T | G | I | 855 | |
| MMAR_3174 (<i>M. marinum</i> Mmpl4_5) | P | L | Q | W | M | V | M | S | M | A | V | I | I | L | L | A | V | G | A | D | Y | N | L | M | M | V | A | F | K | E | E | M | P | A | G | L | K | T | G | I | 866 | |
| MMAR_3744 (<i>M. marinum</i> Mmpl4_1) | K | I | H | W | I | V | A | A | L | S | V | I | I | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | F | R | E | E | I | H | A | G | L | K | T | G | I | 885 |
| MKAN_18145 (<i>M. kansasii</i>) | E | L | H | Y | M | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | F | K | E | E | I | G | A | G | L | N | T | G | I | 866 |
| BCG_0489c (<i>M. bovis</i> BCG) | H | L | H | W | L | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | F | K | Q | E | I | G | A | G | L | K | T | G | I | 866 |
| MAV_3248 (<i>M. avium</i>) | Q | L | H | W | T | V | L | S | T | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | A | A | G | I | H | T | G | I | 864 |

B

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|
| MASS_4115 | - | I | N | W | V | V | L | A | M | S | V | I | V | L | L | A | V | G | S | D | Y | N | L | L | L | V | S | R | M | K | E | E | L | G | A | G | L | - | - | K | T | 861 | |
| <i>Nocardioides</i> sp. | D | I | H | F | T | V | P | V | I | V | F | V | L | L | V | A | V | G | A | D | Y | N | I | L | L | M | S | R | M | R | E | S | G | L | A | L | D | - | - | R | D | 922 | |
| <i>Saccharopolyspora erythraea</i> | E | L | D | W | S | V | Q | P | I | A | F | V | I | L | V | A | V | G | A | D | Y | N | M | L | L | M | S | R | I | R | E | E | S | D | D | G | S | - | - | R | A | 951 | |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | G | A | D | P | A | V | P | L | Y | G | F | V | F | L | V | A | L | G | I | D | Y | N | I | F | L | V | T | R | I | R | E | E | T | K | T | H | G | - | - | T | R | L | 627 |
| <i>Frankia</i> sp. | G | L | E | P | S | V | P | L | I | G | F | L | F | L | V | A | L | G | V | D | Y | N | I | F | L | M | T | R | V | R | E | E | A | A | R | H | G | - | - | T | V | D | 621 |
| <i>Kribbella flavida</i> | G | L | E | P | S | V | P | L | I | G | F | L | F | L | V | A | L | G | V | D | Y | N | I | F | L | M | T | R | V | R | E | E | A | A | R | H | G | - | - | T | V | E | 618 |
| <i>Streptomyces coelicolor</i> | G | A | D | S | A | F | P | L | W | V | F | V | F | L | V | A | L | G | V | D | Y | N | I | F | L | V | T | R | I | K | E | E | S | D | R | L | G | - | - | T | R | Q | 608 |
| <i>Actinoplanes friuliensis</i> | F | I | E | P | S | N | M | I | L | V | L | A | V | L | F | G | L | A | T | D | Y | E | V | F | L | L | S | R | V | R | E | E | W | D | R | T | G | D | N | T | A | 608 | |
| <i>Catenulipora acidiphila</i> | G | M | M | F | M | L | P | V | M | V | Y | L | F | V | V | A | I | G | T | D | Y | N | I | L | M | I | S | R | L | R | E | E | A | R | E | G | H | D | P | R | R | 638 | |
| <i>Cellulomonas fimi</i> | G | I | E | T | Y | V | V | A | L | V | A | F | A | F | G | L | A | M | D | Y | E | V | F | L | L | S | R | I | K | E | L | W | D | A | G | H | D | N | D | E | 659 | | |
| <i>Conexibacter woesei</i> | Y | L | D | A | I | A | L | S | G | I | F | A | I | V | F | G | L | S | I | D | Y | E | V | F | L | I | S | R | L | L | E | G | R | A | V | T | G | T | D | G | 966 | | |

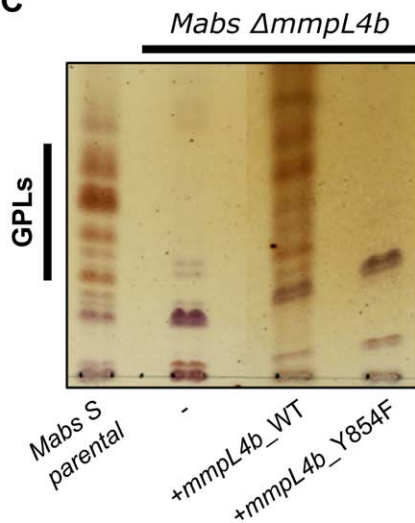
C

Fig. 6. Strict conservation of the Tyr842 residue in all Mmpl4 proteins. The *M. boletii* Mmpl4a_Y842 residue is highly conserved as shown by multiple alignments of the primary protein sequences of (A) homologous Mmpl4 proteins in various mycobacterial species as indicated, including *M. abscessus* Mmpl4a and Mmpl4b, and (B) Mmpl4 in different bacteria as indicated, including several actinomycetes. (C) TLC analysis of the crude lipid extracts of the parental *M. abscessus* S, the *mmpL4b* deletion mutant and the *mmpL4b* mutant transformed with either pMV306-Zeo_*mmpL4b*_WT or pMV306-Zeo_*mmpL4b*(Y854F). GPL were separated using chloroform/methanol (9/1, v/v), as the solvent system and revealed after spraying with orcinol and charring.

biosynthetic machinery was demonstrated earlier through the construction of an *mmpL4b* deletion strain (Medjahed and Reytrat, 2009) and the subsequent identification of genetic lesions within *mmpL4b* following sequencing of the R *M. abscessus* reference strain (Pawlik *et al.*, 2013). We next addressed whether the Tyr854 in Mmpl4b, corresponding to Tyr842 in Mmpl4a, also plays a role in GPL synthesis. The Δ *mmpL4b* mutant of *M. abscessus* S was complemented with either a wild-type or a mutated allele

harbouring the Y854F mutation in *mmpL4b*. Genes were cloned into the pMV306-Zeo construct. The TLC analysis of the GPL profile of all strains is shown in Fig. 6C. As reported earlier, the Δ *mmpL4b* mutant failed to produce GPL (Medjahed and Reytrat, 2009) and complementation with a functional gene restored the phenotype of the parental S strain. In contrast, introduction of pMV306-Zeo_*mmpL4b*(Y854F) failed to restore the parental GPL profile. These results clearly indicate that, like Tyr842 in

MmpL4a, Tyr854 plays a critical role in MmpL4b. These data also emphasise the fact that, although being closely related, sharing 74% identity, MmpL4a and MmpL4b are not exchangeable and both are required for GPL synthesis/export.

Tyr641 in MmpL3 from M. tuberculosis controls growth of an MmpL3-conditional M. smegmatis mutant

Multiple sequence alignments indicate a strict conservation of the Tyr residue in all 13 MmpL members of *M. tuberculosis* (Fig. 7A), despite the fact that all these proteins are distantly related as based on phylogenetic studies (Domenech *et al.*, 2005) and with respect to the nature of the lipids they transport (Cox *et al.*, 1999; Converse *et al.*, 2003; Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2013; Belardinelli *et al.*, 2014). To investigate whether the Tyr residue identified in MmpL4a is important in other MmpLs, we addressed its role in MmpL3 from *M. tuberculosis* because it is the only essential *mmpL* gene and is involved in the transport of TMM, a glycolipid that is biosynthetically and structurally unrelated to GPL. The *M. smegmatis* MmpL3 (*MSMEG0250*) conditional mutant that was designed to test *mmpL3* gene essentiality (Varela *et al.*, 2012) was used. This strain, Δ *MSMEG0250*, contains a recombinant integrated copy of *mmpL3* placed under the control of the inducible acetamide promoter, while the native copy of the gene was deleted and replaced with a hygromycin resistance cassette (Varela *et al.*, 2012). Conditional depletion resulted in the loss of cell wall mycolylation and TDM (Varela *et al.*, 2012). Δ *MSMEG0250* was complemented with pMV206-*Apra_mmpL3*, allowing expression of the *M. tuberculosis* MmpL3 protein under its endogenous promoter. Additionally, the strain was also transformed with either pMV206-*Apra_mmpL3*(Y641F) where Tyr641 was replaced by a Phe residue or with the empty pMV206-*Apra*. As expected, complementation with pMV206-*Apra_mmpL3* allowed growth both in the presence and absence of the inducer acetamide, indicating that MmpL3 from *M. tuberculosis* can functionally complement for the lack of *MSMEG0250* activity in *M. smegmatis* (Fig. 7B). Importantly, introduction of the Y641F mutation abrogated growth of Δ *MSMEG0250* in the absence of acetamide (Fig. 7B), indicating that the viability of the mutant was strictly dependent on the Tyr641 residue. Optical density measurements confirmed normal growth kinetics for the MmpL3-expressing cells in the presence and absence of acetamide. However, the MmpL3(Y641F)-expressing bacteria failed to grow when cultured in the absence of inducer (Fig. 7C, left panel). This correlated with a dramatic decrease in the number of CFU (Fig. 7C, right panel). Collectively, these results demonstrate that Tyr641 is critical for *M. tuberculosis* MmpL3 activity and to sustain mycobacterial growth.

The conserved Asp/Tyr pair in TM10 is a key element in the potential MmpL proton pathway

To date, very little structural information on mycobacterial MmpL efflux pumps is available, with the exception of the interacting periplasmic MmpL domains whose structures have recently been solved (Chim *et al.*, 2015). However, that homology modelling of MmpLs using known RND protein crystal structures as template, notably the *E. coli* AcrB and CusA, could be achieved (Chim *et al.*, 2015; Sandhu and Akhter, 2015), prompted us to build homology models of *M. boletii* MmpL4a and *M. tuberculosis* MmpL3 in order to interrogate the functional role of the strictly conserved Tyr residue. Structural homology modelling indicated that Y842 in MmpL4a and Y641 in MmpL3 are located in the transmembrane helix 10 (TM10) in both proteins (Fig. 8), in agreement with the protein topology predictions (Fig. 7a). Interestingly, Asn941 and Lys940 located in TM10 are crucial residues for the proton relay pathway in AcrB (Fig. 8). In addition, several residues found in the spatial vicinity of Lys940 and Asn941, notably Thr978 on TM11, Asp407 and Asp408 on TM4 and Ser481 on TM6 (Fig. 8) are also indispensable for driving the PMF of AcrB (Su *et al.*, 2006; Eicher *et al.*, 2014). The superposition of MmpL4a and MmpL3 homology models with AcrB unravelled the potential involvement of the D841/Y842 pair in MmpL4a and the D640/Y641 pair in MmpL3 activity (Fig. 8). Therefore, to confirm the essential role of D640 in MmpL3, the pMV206-*Apra_mmpL3*(D640A) construct was introduced in Δ *MSMEG0250*. Indeed, MmpL3(D640A) failed to rescue the growth of Δ *MSMEG0250* in the absence of inducer (Fig. 7B), strongly suggesting that, like Tyr641, Asp640 plays a central role in the proton pathway of MmpL3.

An additional Asp/Tyr pair in the TM4 (D268/Y269 in MmpL4a and D251/Y252 in MmpL3) was also unravelled in our homology models (Fig. 8) and found to be conserved in most MmpL members, suggesting that it may also be involved in the proton relay pathway in these two proteins. Introduction of D251A, but not Y252F, in MmpL3 abrogated growth of Δ *MSMEG0250* in the absence of inducer (Fig. 7B), thus confirming that the viability of the strain was strictly dependent on Asp251.

Altogether, and by analogy with AcrB, our structural and complementation analyses position the conserved Asp/Tyr pair in TM10 and the Asp in TM4 as essential elements for the proton relay pathway, and therefore in driving the PMF in MmpLs.

Discussion

Previous studies reported that rough variants from the *M. abscessus* complex could only be obtained *in vivo*

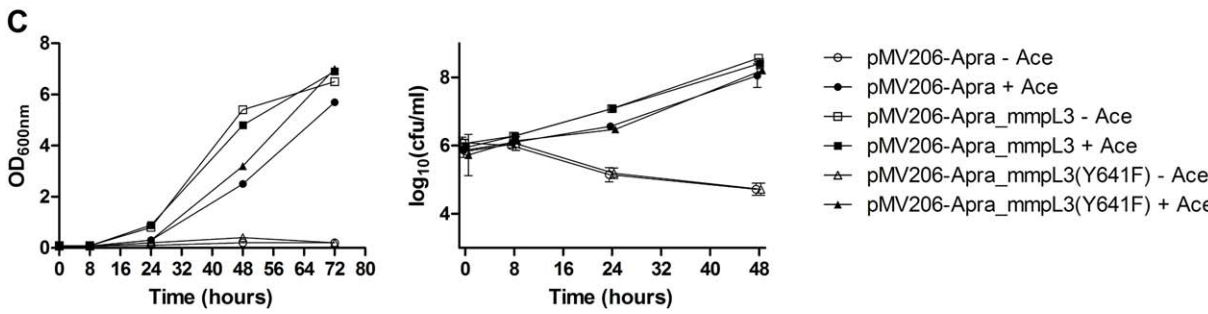
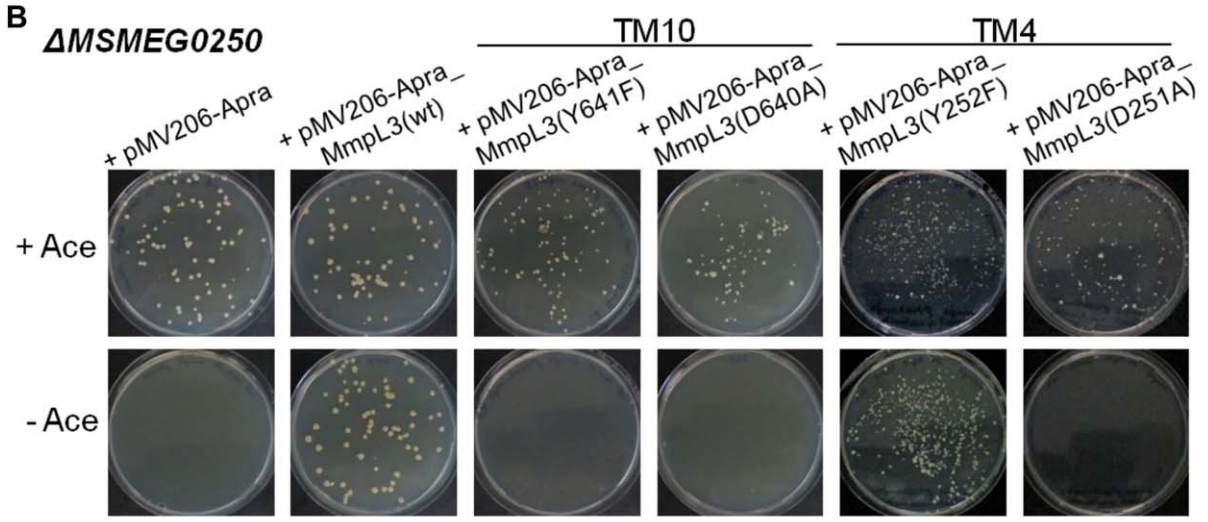
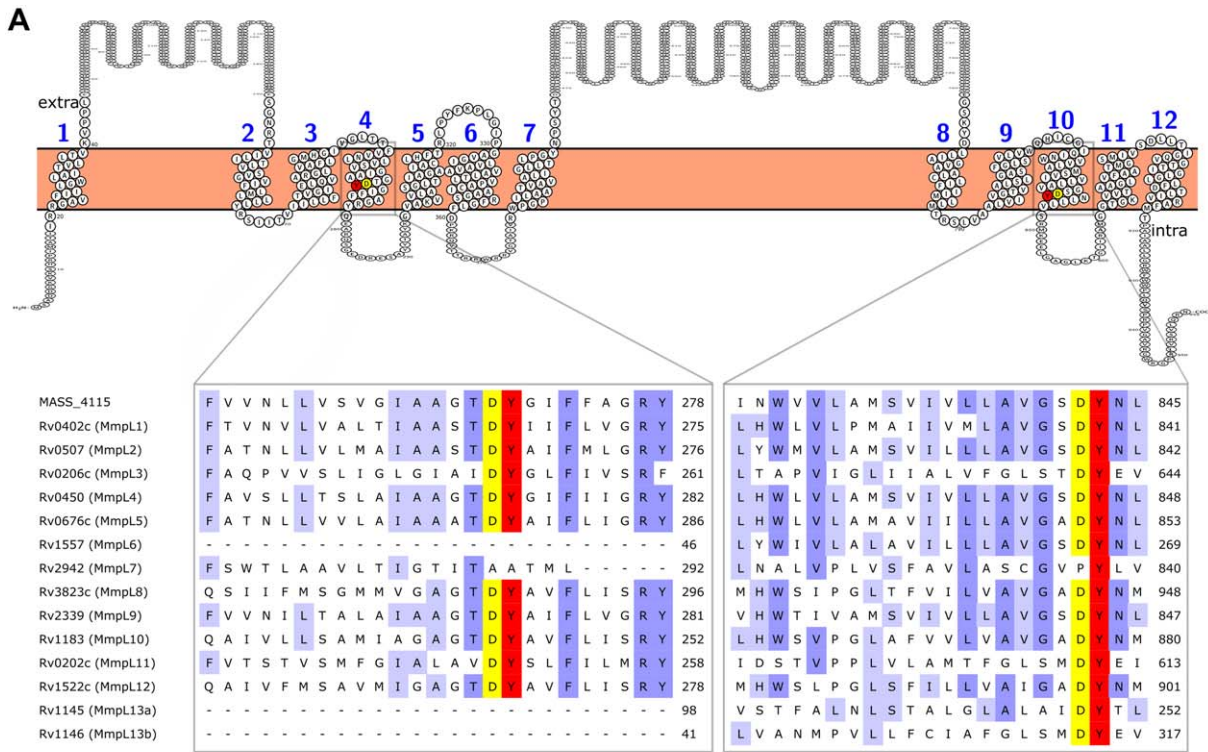


Fig. 7. Functional residues in MmpL3 required for controlling mycobacterial growth.

A. Topology prediction and multiple sequence alignments of the TM4 and TM10 regions of all 13 MmpL members from *M. tuberculosis* highlight the strict conservation of Asp640 and Tyr641 in TM10, with the notable exception of MmpL7 in which the Asp residue is substituted by a Pro. The highly conserved residues Asp251 and Tyr252 in TM4 are also indicated. The shorter MmpL6 (347 amino acids), MmpL13a (303 amino acids) and MmpL13b (470 amino acids) compared to the other *M. tuberculosis* MmpLs (> 900 amino acids) aligned within the more C-terminal region of the other MmpLs spanning TM10, but not within the more N-terminal region spanning TM4.

B. Essentiality of the various *mmpL3* derivatives using the conditional mutant $\Delta MSMEG0250$ transformed with either pMV206-Apra, pMV206-Apra_ *mmpL3*(WT), pMV206-Apra_ *mmpL3*(Y641F), pMV206-Apra_ *mmpL3*(D640A), pMV206-Apra_ *mmpL3*(Y252F) or pMV206-Apra_ *mmpL3*(D251A) on LB agar containing 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ apramycin with or without the inducer acetamide. After transformation, bacterial suspensions of the $\Delta MSMEG0250$ mutant were incubated overnight in 7H9^{OADC} broth without antibiotic or acetamide prior to plating in order to deplete the cells of acetamide and MmpL3 protein. Plates were incubated for 1 week at 37°C.

C. Growth curves in broth medium (left panel) and plot of CFU numbers (right panel) of $\Delta MSMEG0250$ transformed with either pMV206-Apra, pMV206-Apra_ *mmpL3*(WT) or pMV206-Apra_ *mmpL3*(Y641F) in the presence of absence of acetamide. Log₁₀ CFU values are calculated from different dilutions from a single experiment.

during the course of the infection (Jönsson *et al.*, 2007) or following infection of immune-compromised mice (Rottman *et al.*, 2007) but could not be obtained *in vitro* from agar plates, except for one isolate (the 390 strain) (Howard *et al.*, 2006). As described here, and in one occasion only, we were able to select a stable rough variant from a smooth *M. boletii* pre-culture, after an electroporation event. Whether the stress induced by the electric shock may have favoured the emergence of a SNP in *mmpL4a* remains a possibility. Importantly, mutations abrogating MmpL4a activity, such as the one described here, are of clinical relevance. Indeed, a recent study reporting the evolutionary phenotypic and genetic changes in serial isolates from patients infected with *M. abscessus* identified detrimental single point mutations in *mmpL4a*, leading either to a premature stop codon or to a frameshift mutation (Park *et al.*, 2015). Interestingly, these mutations in MmpL4a, also leading to the loss of GPL, occurred essentially during the chronic lung infection with *M. abscessus* (Park *et al.*, 2015).

The Y842H point mutation within MmpL4a was accompanied by multiple *in vitro* phenotypes, including (i) the presence of highly aggregative broth cultures, (ii) a high propensity to produce cords, (iii) a strong sliding defect, (iv) an impairment in biofilm formation, (v) the lack of GPL production, and (vi) the absence of a typical ETZ, as visualised in intraphagosomal mycobacteria. Our results clearly indicate that GPL production correlates with an ETZ in *M. boletii*-infected macrophages.

Mycobacterium abscessus, *M. massiliense* and *M. boletii* infections are known to exhibit different drug sensitivity test results, responses to antibiotics and clinical symptoms (Koh *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2012). Little information, however, is known regarding pathogenicity of smooth and rough *M. boletii* strains despite the fact that this species represents an emerging pathogen of pulmonary infections in cystic fibrosis (Roux *et al.*, 2009; Cândido *et al.*, 2014) and has been associated to recent outbreaks such as in southern Brazil (Nunes Lde *et al.*, 2014). Spe-

cific knowledge on the pathogenicity of this species has been largely hampered by the lack of adapted genetic tools and cellular/animal models. In this study, we describe an *M. boletii* CIP108541^T S/R isogenic pair that has opened the possibility for exploring and comparing, for the first time, the virulence of rough and smooth variants of this species in zebrafish embryos. Our results indicate that the *M. boletii*/zebrafish system is a tractable and faithful model that can be used to unravel the events characterising infection with *M. boletii*. We found that, similarly to *M. abscessus* (Bernut *et al.*, 2014), infection with rough, but not smooth, *M. boletii* was correlated with (i) increased bacterial loads after 3 dpi and 5 dpi, and (ii) a marked neurotropism (brain and spinal cord) with the presence of massive abscesses and cords. This led to a high mortality rate as evidenced by the time-to-death studies. In contrast, complementation with a wild-type *mmpL4a* allele abrogated virulence of *M. boletii* in zebrafish and reduced the pathological symptoms (abscesses) as well as cording. This further corroborates a functional link between MmpL4a, GPL biosynthesis/transport and cording within the *M. abscessus* complex. As reported earlier, cording prevents predation by neutrophils and macrophages, presumably because the extremely long serpentine cords exceed the capacity of the professional phagocytes to surround and internalise them (Bernut *et al.*, 2014). Extracellular cording allows the bacterium to withstand phagocytosis, leading to uncontrolled growth and establishment of an acute and lethal infection. Interestingly, the *in vitro* and *in vivo* phenotypes of the *M. boletii* MmpL4a_Y842H strain were very similar to those observed earlier with the *M. abscessus* $\Delta mmpL4b$ mutant (Bernut *et al.*, 2014). Overall, this indicates that MmpL4a and MmpL4b, despite being encoded by adjacent genes and sharing a 74% identity, are not exchangeable, and both their proteins are required for GPL transport and pathogenicity.

The diverse mycobacterial lipids, many of which are important for virulence and mediate interactions with host cells, are primarily found on the bacterial surface. How these complex lipids, synthesized in the cytoplasm, find

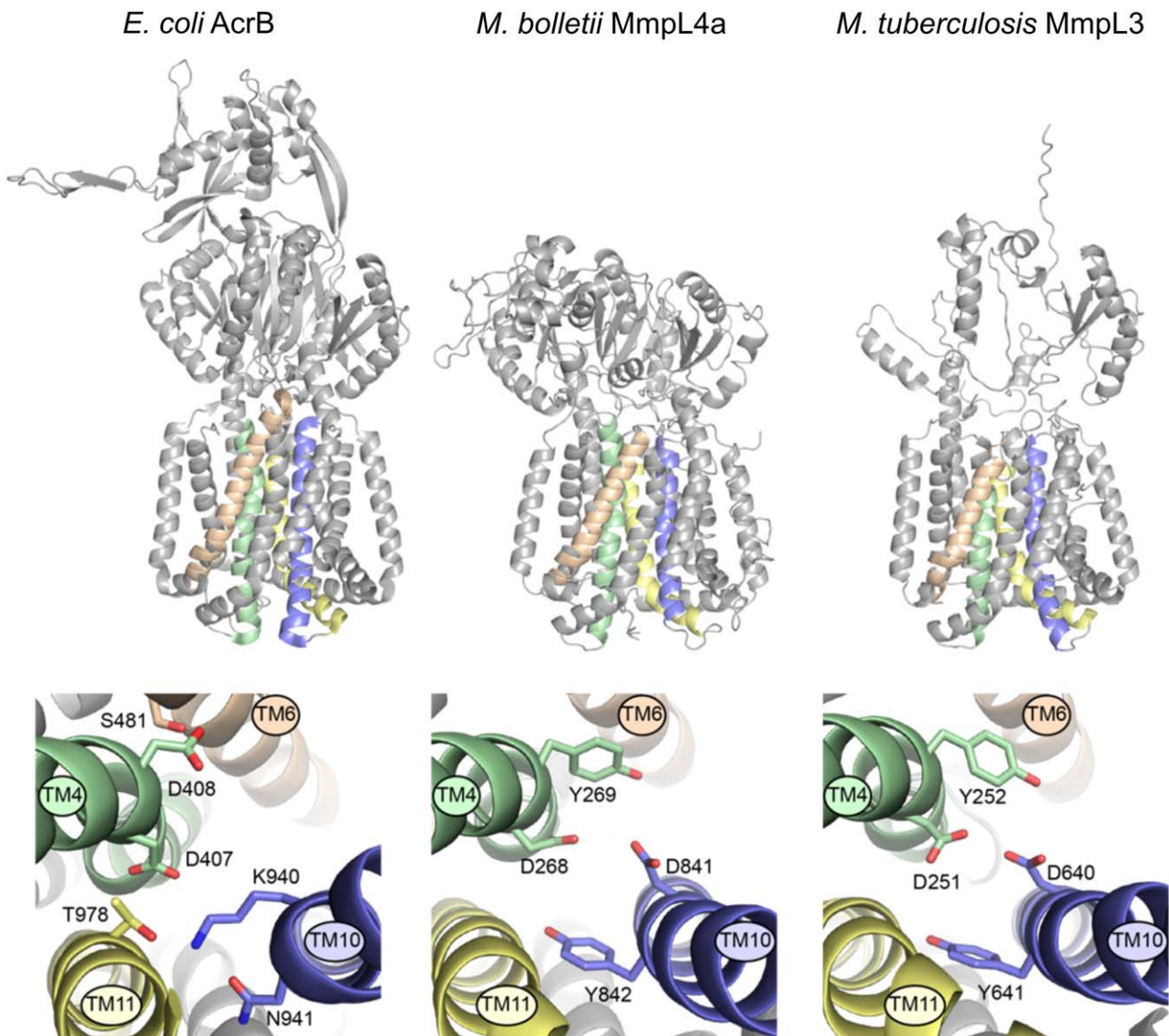


Fig. 8. MmpL4a and MmpL3 homology modelling with special emphasis on the PMF-associated residues. The upper panels represent the overall crystal structure of the *E. coli* efflux pump AcrB (PDB code : 4U8Y) and overall homology models of the *M. bolletii* MmpL4a and *M. tuberculosis* MmpL3. TM4, TM6, TM10 and TM11 are depicted in green, wheat, blue and yellow. The lower panels depict enlarged regions highlighting the typical residues involved in the proton relay pathway in AcrB, and the corresponding amino acids in the presumed PMF in MmpL4a and MmpL3. The D841/Y842 (MmpL4a) and D640/Y641 (MmpL3) pairs appear to play a role similar to the one of K940/N941 (AcrB) in the proton relay pathway. The figures were generated with Pymol, <http://www.pymol.org>. The colour code is the same as mentioned above.

their way through the cell membrane to reach their destination on the hydrophobic surface of the mycolic acid layer remains poorly understood. Recent years have highlighted the critical functions of MmpL as a class of transporters, in facilitating lipid egress. It is noteworthy that some MmpL proteins can transport small molecules other than lipids. This is the case, for instance, of MmpS4/MmpL4 and MmpS5/MmpL5 that have been recently identified as siderophore export systems in *M. tuberculosis* (Wells *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2014). Although several residues involved in the PMF, including

D640, have been proposed previously, based on homology models (Li *et al.*, 2014; Chim *et al.*, 2015), structural and mechanistic information on biologically important MmpL members are scarce despite their importance. In this study, we provide a glimpse into the biological mechanism of action of MmpL proteins as lipid transporters and key virulence determinants. By focusing mainly on non-tuberculous mycobacteria and using a combination of genomic, genetic and biochemical approaches, we demonstrate here the crucial and unexpected function of a Tyr residue, conserved in all MmpL proteins, in lipid

biosynthesis/transport. Thanks to molecular modelling, we subsequently identified two additional residues, which are also highly conserved in MmpL proteins and which form an Asp/Tyr pair within TM10 and one additional Asp residue in TM4, facing TM10 in MmpL4a and MmpL3. That these amino acids contribute to the proton relay is substantiated by the fact that they are in the same position as the essential residues involved in the PMF of AcrB (Su *et al.*, 2006; Eicher *et al.*, 2014), suggesting that they also participate actively in the PMF in MmpLs. This was further supported by our *in vivo* complementation studies showing that Tyr to Phe mutations in MmpL4a and MmpL3 abolish GPL synthesis/transport and growth of Δ MSMEG025, respectively. As Tyr and Phe can only be distinguished by the presence of an additional hydroxyl group in Tyr, the effect of the Tyr to Phe mutation is very unlikely to compromise the overall structural integrity of the MmpL but rather abolishes the Tyr–OH mediated proton transport. However, ultimate confirmation of the crucial role of these residues in the PMF of MmpLs relies on the elucidation of the structure of whole MmpL proteins and establishment of an *in vitro* assay. It is also noteworthy that, although the Asp/Tyr pair in TM10 is conserved in most MmpL members, the Asp residue is replaced by a Pro in MmpL7. It can be inferred that the Pro changes locally the three-dimensional structure of TM10, therefore affecting/preventing the proton relay to occur. The presence of an ABC transporter-like DrrABC, encoded by genes in the close vicinity of *mmpL7* in *M. tuberculosis*, has always been intriguing (Cox *et al.*, 1999). One possible explanation is that DrrABC acts as a helper for MmpL7 to transport PDIM across the cytoplasmic membrane.

Overall, investigating the smooth-to-rough shift in the *M. abscessus* complex has brought unanticipated and significant insights into structural and mechanistic information that appear to be also relevant to MmpLs in *M. tuberculosis*. MmpL3 represents the only essential MmpL member in *M. tuberculosis* (Domenech *et al.*, 2005) and has been shown to translocate TMM across the plasma membrane (Grzegorzewicz *et al.*, 2012). In addition, it represents currently one of the most promising anti-tubercular drug targets, and multiple pharmacophores have recently been shown to inhibit MmpL3 in *M. tuberculosis*, thus opening a new field in the inhibition of mycolic acid transport (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; La Rosa *et al.*, 2012; Tahlán *et al.*, 2012; Lun *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2013; Remuiñán *et al.*, 2013; Bailo *et al.*, 2015). Our functional complementation studies based on various *M. tuberculosis mmpL3* alleles emphasise the crucial role of two Asp/Tyr couples in the PMF driving MmpL3 activity. These findings, along with the anticipated elucidation of the full MmpL3 structure, should not only help to understand how TMM is transported through the

membrane, but also how the different inhibitors are acting on MmpL3 and how to design new scaffolds that are specifically targeting these TM4- and TM10-containing critical elements for future antimycobacterial drug developments.

Experimental procedures

Mycobacterial strains and growth conditions

All the bacteria used in this present study are listed in Table S1. Rough (R) and smooth (S) variants of *M. abscessus sensu stricto* strain CIP104536^T (ATCC19977T) or *M. bolletii* strain CIP108541^T were grown at 30°C in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% Oleic acid/Albumin/Dextrose/Catalase (OADC) enrichment and 0.05% Tween 80 (7H9^{OADC/T}) or on Middlebrook 7H10 agar containing 10% OADC (7H10^{OADC}). Electro-competent mycobacteria were transformed using a Bio-Rad Gene pulser (25 μ F, 2500 V, 1000 ohms). Recombinant *M. abscessus* and *M. bolletii* strains carrying pTEC27 (Addgene, plasmid 30182) that allows expression of tdTomato under the control of a strong mycobacterial promoter were grown in the presence of hygromycin 500 mg l⁻¹.

Whole genome sequencing, assembly and SNP analysis

The genomic DNA of *M. bolletii* subsp. *bolletii* reference strain (*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* CIP 108541^T) was sequenced at the Genopole of the Institut Pasteur by using the Genome Analyzer IIx (Illumina, San Diego, USA) with a coverage rate of 175X. The 36 bp single-end reads were generated and aligned against the reference genome of *M. abscessus* (EMBL accession number: CU458896) (Ripoll *et al.*, 2009) by using MAQ (Li *et al.*, 2008). In order to prevent the presence of potential amplification contaminants, duplicated reads were removed from the alignment maps. Two reads were considered as a duplicate if they shared the same mapping position, stemmed from the same DNA strand and possessed exactly the same sequence. In case of duplicates, the read having the best quality sum was preserved. In order to investigate large insertion–deletion events, each short-read data set was *de novo* assembled using the perl script VelvetOptimiser, provided with the VELVET package (Zerbino and Birney, 2008). The contigs of *M. bolletii* subsp. *bolletii* reference strain were deposited in the NCBI database (JRMF01000000). Contigs ordering of the R variant of *M. bolletii* was performed using MAUVE Contig Mover (Rissman *et al.*, 2009). SNPs were exported from MAUVE software and checked manually.

DNA constructs

All the plasmid constructs and primer sequences used in this study are listed in Tables S1 and S2, respectively. The *mmpL4a* open reading frame (ORF) was PCR amplified using purified genomic DNA of *M. bolletii* (extracted from the progenitor strain of the *M. bolletii* MmpL4a_Y842H mutant),

Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Finland) and the primers mmpL4af and mmpL4ar. The amplicon was digested with NdeI and HindIII and used to replace the *eGFP* ORF flanked by NdeI and HindIII recognition sequences in the replicative plasmid pVV16_*eGFP* (Vilchèze *et al.*, 2014). The resulting construct, pVV16_*mmpL4a*, contained the *mmpL4a* ORF under control of the constitutive *hsp60* promoter. Subsequently, the XbaI/HindIII fragment from pVV16_*mmpL4a* containing both the *hsp60* promoter and *mmpL4a* gene was subcloned into the integrative plasmid pMV306 (Stover *et al.*, 1991) to generate pMV306_*mmpL4a*. The mmpL4bf and mmpL4br primers, purified genomic DNA of *M. abscessus* and Phusion polymerase were used to PCR amplify the *M. abscessus mmpL4b* ORF, subsequently digested with HindIII and ligated to MscI/HindIII-linearised pMV261. Using a similar strategy, the mmpL3f and mmpL3r primers and purified *M. tuberculosis* genomic DNA were used to PCR amplify the Rv0206c/*mmpL3* ORF along with its native promoter and clone it into XbaI/HindIII digested pMV206-*Apra*. The pMV261-*mmpL4b* XbaI/HindIII fragment containing the *hsp60* promoter and *mmpL4b* coding sequence was subcloned into pMV306-*Zeo*. Site-directed mutagenesis of *mmpL4a* and *mmpL4b* was carried out using the following strategy: (i) A PCR amplicon was generated by using pMV306-*Zeo_mmpL4a* or pMV306-*Zeo_mmpL4b* as templates, a forward primer containing at the 5' end the desired mutation to be introduced in the *mmpL4a/mmpL4b* ORFs (mmpL4aY842H, mmpL4aY842A, mmpL4aY842F, mmpL4bY854F) and a reverse primer (mmpL4aY842r, mmpL4bY854r) that hybridised to the template directly adjacent to the 5' end of the forward primer; (ii) The PCR products were phosphorylated with T4 Polynucleotide kinase (Promega, USA) and self-ligated using T4 DNA ligase (NEB, UK); (iii) *E. coli* transformants containing pMV306_*mmpL4a* or pMV306-*Zeo_mmpL4b* plasmids with the desired mutations were identified by sequencing. For site-directed mutagenesis of *mmpL3*, the oligonucleotides (mmpL3D251Af, mmpL3D251Ar, mmpL3Y252Ff, mmpL3Y252Ffr, mmpL3D640Af, mmpL3D640Ar, mmpL3Y641Ff and mmpL3Y641Fr), pMV206-*Apra_mmpL3* and the Quick-Change Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) were used according to the manufacturer's recommendations. All mutations were verified by sequencing.

To generate MmpL4a-eGFP fusions, the polylinker of pVV16-eGFP was modified by replacing the NdeI-PstI-BamHI fragment between the *hsp60* promoter and the *eGFP* ORF with the NdeI-PstI-BamHI fragment produced by annealing the oligonucleotides pVV16eGFPmod1 and pVV16eGFPmod2 with each other, followed by restriction with NdeI and BamHI. This was done in order to ensure that replacement of the XbaI-*hsp60*-PstI fragment of the resulting pVV16-eGFP plasmid with the XbaI-*hsp60-mmpL4a*(wt/Y842F)-PstI fragments from pMV306_*mmpL4a* and pMV306_*mmpL4a*(Y842F) resulted in in frame fusions of the *mmpL4a* and *eGFP* coding sequences.

Sliding motility and biofilm assays

For each mycobacterial strain, 10 µl of mid-log phase culture (OD₆₀₀, 0.8–1.0) was dropped in the centre of a motility plate

containing Middlebrook 7H9 medium with 0.3% agar and without any added carbon source. The sliding distance was evaluated and measured after incubation for 10 days at 30°C under humidified conditions. Biofilm formation was assessed by inoculating mycobacterial cells (OD₆₀₀, 0.8–1.0) onto medium consisting of M63 salts supplemented with 10% of glucose, 1 mM of CaCl₂ and 1 mM of MgSO₄ and incubated without agitation at 30°C for 5 days.

Lipid extraction and analysis

GPL extraction was performed according to a previously described method (Villeneuve *et al.*, 2003). Briefly, bacteria cultured to exponential growth phase (OD₆₀₀, 0.6–1.2) in 7H9^{ODC} (30 ml) without agitation and without detergent were collected by centrifugation. Lipids were extracted from an equal mass of bacteria (based on wet weight of pellets) first with chloroform/methanol (1:2 v/v) and then three times by chloroform/methanol (1:1 v/v). Lipid extracts were pooled and dried under a stream of nitrogen before being dissolved in chloroform. Subsequently, the lipids were washed at least four times with a volume of H₂O equal to the volume of chloroform. The lipid samples were then dried under a stream of nitrogen and re-dissolved in 50 µl of dichloromethane. Volumes of 10 µl were loaded onto TLC Silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Germany). GPLs were chromatographically separated in chloroform/methanol (9:1) and treated with orcinol/sulphuric acid vapour prior to revelation by charring.

Homology modelling

The homology modelling of the *M. boletii* MmpL4a and *M. tuberculosis* MmpL3 was performed using the Phyre2 server (Kelley *et al.*, 2015) using default parameters.

Zebrafish care

All zebrafish experiments were done according to European Union guidelines for handling of laboratory animals and approved by the Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale de la région Languedoc Roussillon under the reference CEEALR36-1145. Experiments were performed using the *golden* mutant (Lamason *et al.*, 2005). Zebrafish embryos were obtained and maintained as described (Bernut *et al.*, 2014). Ages of the embryos are expressed as hours post fertilisation (hpf).

Zebrafish embryos microinfection

Fluorescent *M. boletii* expressing tdTomato were prepared and injected according to procedures as described earlier (Bernut *et al.*, 2015). Briefly, infections were carried out by microinjection of bacterial suspensions (≈ 2 nl containing ≈ 200 bacteria) into the caudal vein of 30 hpf embryos previously dechorionated and anaesthetised. The inoculum size was checked a posteriori by injection of 2 nl in sterile PBS^T and plated on 7H10^{ODC}. To follow infection kinetics and embryo survival, infected embryos were transferred into 24

well plates (2 embryos/well) and incubated at 28.5°C. Survival curves were performed by counting dead larvae every day for up to 13 days.

Bacterial burden in infected-zebrafish larvae

Bacterial loads were determined by Fluorescence Pixel Count (FPC) measurements in live embryos, as previously described (Bernut *et al.*, 2015). Shortly, 5–10 tricaine-anaesthetised larvae were laterally positioned, immobilised in 1% low melting point agarose and covered with osmotic water containing tricaine. Larvae were imaged using an epifluorescence microscope, and corresponding images were quantified for fluorescence by FPC enumeration with a home-made macro developed for the ImageJ freeware.

Microscopy, image processing and analysis

Widefield BF and fluorescence microscopy imaging were performed using a Zeiss epifluorescence microscope equipped with a Zeiss Plan Neo Fluor Z 1×/0.25 FWD objective. Images were acquired with an Axiocam503 monochrom (Zeiss) camera and processed using ZEN 2 (blue edition). For live imaging, anaesthetised-infected embryos were positioned in dishes and immobilised with 1% low-melting point agarose solution covering the entire larvae then immersed with osmotic water containing tricaine. Image processing was done using the GIMP 2.6 freeware to merge fluorescent and DIC images, to adjust contrast levels and brightness and to remove out-of-focus background fluorescence.

Macrophage culturing and infection

Bone marrow-derived mouse macrophages were obtained and cultured as described previously (Caire-Brändli *et al.*, 2014). Cells were then infected with *M. boletii* for 4 h at a multiplicity of infection (moi) of 0.5, washed four times with PBS (4–8°C) and re-fed with complete medium without antibiotics.

Processing for conventional electron microscopy (TEM)

At the desired time points post-infection, cells were fixed and processed for TEM, as reported earlier (de Chastellier, 2008). Briefly, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 100 mM Na-cacodylate buffer, pH 7.2, containing 100 mM sucrose, 5 mM MgCl₂ and 5 mM CaCl₂ for 1 hr at room temperature (RT), washed twice for 15 min with Na-cacodylate buffer and post-fixed for 1 h at RT with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer without sucrose. After three brief washes with the same buffer, the cells were gently scraped off the dishes and concentrated in 2% agarose prepared in cacodylate buffer without sucrose. Samples were then washed with 30% methanol for 15–30 min before being treated for 1 h at RT with 1% uranyl acetate in 30% methanol. The cells were then dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in Spurr resin. Thin sections (70 nm thick) were stained with 1% uranyl acetate in distilled water and then with lead citrate.

Statistical analyses

Statistical analyses of comparisons between Kaplan–Meier survival curves were performed using the log rank test with Prism 4.0 (GraphPad). Quantifications experiments were analysed with R 3.0.3 as detailed in each figure legend. Statistical significance was assumed at *P* values < 0.05.

Acknowledgements

We would like to thank A. Pawlik, L. Ma and V. Khanna for initial help in the DNA preparation, library construction and sequence assembly. We are grateful to A. Bhatt for the generous gift of the *M. smegmatis* Δ*MSMEG0250* conditional mutant, L. Ramakrishnan for pTEC27, S. de Rossi at the Montpellier RIO Imaging platform and G. Lutfalla for sharing the zebrafish facility at the University of Montpellier. The EM observations and analyses were performed by CdC and AV in the PiCSL EM core facility (Institut de Biologie du Développement/Aix Marseille Université, Marseille), a member of the France-Biolmaging French research infrastructure. The authors wish to thank Jean Paul Chauvin, head of this EM facility, for expert technical assistance with the electron microscopes and the digital camera.

This study was supported by the French National Research Agency (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) (DIMYVIR ANR-13-BSV3-0007-01). We wish also to thank the Association Gregory Lemarchal and Vaincre La Mucoviscidose (RF20130500835) for funding CD and the InfectioPôle Sud for funding AV. RB acknowledges the support by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) DEQ20130326471.

References

- 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.
- Adékambi, T., Berger, P., Raoult, D., and Drancourt, M. (2006) *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium boletii* sp. nov., *Mycobacterium phocai-cum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 133–143.
- Bailo, R., Bhatt, A., and Aínsa, J.A. (2015) Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochem Pharmacol* **96**: 159–167.
- Belardinelli, J.M., Larrouy-Maumus, G., Jones, V., Sorio de Carvalho, L.P., McNeil, M.R., and Jackson, M. (2014) Biosynthesis and translocation of unsulfated acyl-trehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **289**: 27952–27965.
- Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E943–E952.

- Bernut, A., 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* **103**: e53130.
- Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Haites, R.E., Kovacevic, S., and Coppel, R.L. (1999) Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **33**: 1244–1253.
- Brennan, P.J., and Nikaido, H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29–63.
- Brown-Elliott, B.A., and Wallace, R.J. (2002) Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **15**: 716–746.
- Byrd, T.F., and Lyons, C.R. (1999) Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* **67**: 4700–4707.
- Caire-Brändli, I., Papadopoulos, A., Malaga, W., Marais, D., Canaan, S., Thilo, L., and de Chastellier, C. (2014) Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis. *Infect Immun* **82**: 476–490.
- 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.
- Cândido, P.H.C., Nunes Lde, S., Marques, E.A., Folescu, T.W., Coelho, F.S., de Moura, V.C.N., et al. (2014) Multidrug-resistant nontuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **52**: 2990–2997.
- de Chastellier, C. (2008) EM analysis of phagosomes. *Methods Mol Biol* **445**: 261–285.
- Chim, N., Torres, R., Liu, Y., Capri, J., Batot, G., Whitelegge, J.P., and Goulding, C.W. (2015) The structure and interactions of periplasmic domains of crucial MmpL membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **22**: 1098–1107.
- Cho, Y.-J., Yi, H., Chun, J., Cho, S.-N., Daley, C.L., Koh, W.-J., and Shin, S.J. (2013) The genome sequence of 'Mycobacterium massiliense' strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the *Mycobacterium abscessus* complex at the subspecies level. *PLoS ONE* **8**: e81560.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–544.
- Converse, S.E., Mougous, J.D., Leavell, M.D., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., and Cox, J.S. (2003) MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6121–6126.
- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**: 79–83.
- Deshayes, C., Bach, H., Euphrasie, D., Attarian, R., Coureuil, M., Sougakoff, W., et al. (2010) MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **78**: 989–1003.
- Domenech, P., Reed, M.B., and Barry, C.E. (2005) Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect Immun* **73**: 3492–3501.
- Eckstein, T.M., Inamine, J.M., Lambert, M.L., and Belisle, J.T. (2000) A genetic mechanism for deletion of the *ser2* gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol* **182**: 6177–6182.
- Eicher, T., Seeger, M.A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., et al. (2014) Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *Elife* **3**: e03145.
- Frehel, C., Ryter, A., Rastogi, N., and David, H. (1986) The electron-transparent zone in phagocytized *Mycobacterium avium* and other mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**: 239–257.
- Grzegorzewicz, A.E., Pham, H., Gundi, V.A.K.B., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., et al. (2012) Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol* **8**: 334–341.
- Harada, T., Akiyama, Y., Kurashima, A., Nagai, H., Tsuyuguchi, K., Fujii, T., et al. (2012) Clinical and microbiological differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* lung diseases. *J Clin Microbiol* **50**: 3556–3561.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., and Engelhardt, H. (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 3963–3967.
- Howard, S.T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., et al. (2006) Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphology is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**: 1581–1590.
- Jackson, M. (2014) The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**: a021105.
- Jones, C.M., Wells, R.M., Madduri, A.V.R., Renfrow, M.B., Ratledge, C., Moody, D.B., and Niederweis, M. (2014) Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by interrupting siderophore recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 1945–1950.
- 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.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**: 845–858.
- Koh, W.-J., Jeon, K., Lee, N.Y., Kim, B.-J., Kook, Y.-H., Lee, S.-H., et al. (2011) Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 405–410.
- Kremer, L., and Besra, G.S. (2005) A waxy tale, by *Mycobac-*

- terium tuberculosis*. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Cole, S., Eisenach, K., McMurray, D., and Jacobs, W., Jr (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 287–305. doi: 10.1128/9781555817657.ch19
- La Rosa, V., Poce, G., Canseco, J.O., Buroni, S., Pasca, M.R., Biava, M., et al. (2012) MmpL3 is the cellular target of the antitubercular pyrrole derivative BM212. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 324–331.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.-A.P.K., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., et al. (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* **310**: 1782–1786.
- Lamichhane, G., Tyagi, S., and Bishai, W.R. (2005) Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lungs. *Infect Immun* **73**: 2533–2540.
- Leao, S.C., Tortoli, E., Viana-Niero, C., Ueki, S.Y.M., Lima, K.V.B., Lopes, M.L., et al. (2009) Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* group is needed. *J Clin Microbiol* **47**: 2691–2698.
- 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.
- Li, H., Ruan, J., and Durbin, R. (2008) Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res* **18**: 1851–1858.
- Li, W., Upadhyay, A., Fontes, F.L., North, E.J., Wang, Y., Crans, D.C., et al. (2014) Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 6413–6423.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**: 337–418.
- Lun, S., Guo, H., Onajole, O.K., Pieroni, M., Gunosewoyo, H., Chen, G., et al. (2013) Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **4**: 2907. doi:10.1038/ncomms3907
- Medjahed, H., and Reyrat, J.-M. (2009) Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1331–1338.
- Medjahed, H., Gaillard, J.-L., and Reyrat, J.-M. (2010) *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol* **18**: 117–123.
- Nunes Lde, S., Baethgen, L.F., Ribeiro, M.O., Cardoso, C.M., de Paris, F., De David, S.M.M., et al. (2014) Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011. *J Med Microbiol* **63**: 1288–1293.
- Pacheco, S.A., Hsu, F.-F., Powers, K.M., and Purdy, G.E. (2013) MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* **288**: 24213–24222.
- Park, I.K., Hsu, A.P., Tettelin, H., Shallom, S.J., Drake, S.K., Ding, L., et al. (2015) Clonal diversification and changes in lipid traits and colony morphology in *Mycobacterium abscessus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **53**: 3438–3447.
- 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.
- Rao, S.P.S., Lakshminarayana, S.B., Kondreddi, R.R., Herve, M., Camacho, L.R., Bifani, P., et al. (2013) Indolcarboxamide is a preclinical candidate for treating multidrug-resistant tuberculosis. *Sci Transl Med* **5**: 214ra168.
- Recht, J., and Kolter, R. (2001) Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **183**: 5718–5724.
- Remuiñán, M.J., Pérez-Herrán, E., Rullás, J., Alemparte, C., Martínez-Hoyos, M., Dow, D.J., et al. (2013) Tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide and N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* targeting MmpL3. *PLoS ONE* **8**: e60933.
- Ripoll, F., Deshayes, C., Pasek, S., Laval, F., Beretti, J.-L., Biet, F., et al. (2007) Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genomics* **8**: 114.
- 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.
- Rissman, A.I., Mau, B., Biehl, B.S., Darling, A.E., Glasner, J.D., and Perna, N.T. (2009) Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics* **25**: 2071–2073.
- Rottman, M., Catherinot, E., Hochedez, P., Emile, J.-F., Casanova, J.-L., Gaillard, J.-L., and Soudais, C. (2007) Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice. *Infect Immun* **75**: 5898–5907.
- Roux, A.-L., Catherinot, E., Ripoll, F., Soismier, N., Macheras, E., Ravilly, S., et al. (2009) Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol* **47**: 4124–4128.
- Roux, A.-L., Ray, A., Pawlik, A., Medjahed, H., Etienne, G., Rottman, M., et al. (2011) Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants. *Cell Microbiol* **13**: 692–704.
- 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.
- Sandhu, P., and Akhter, Y. (2015) The internal gene duplication and interrupted coding sequences in the MmpL genes of *Mycobacterium tuberculosis*: towards understanding the multidrug transport in an evolutionary perspective. *Int J Med Microbiol* **305**: 413–423.

- Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., *et al.* (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**: 456–460.
- Su, C.-C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H., and Yu, E.W. (2006) Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J Bacteriol* **188**: 7290–7296.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., *et al.* (2012) SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1797–1809.
- Tan, J.L., Ngeow, Y.F., and Choo, S.W. (2015) Support from phylogenomic networks and subspecies signatures for separation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* **53**: 3042–3046.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., *et al.* (2012) MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem Biol* **19**: 498–506.
- Vilchèze, C., Molle, V., Carrère-Kremer, S., Leiba, J., Mourey, L., Shenai, S., *et al.* (2014) Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **10**: e1004115.
- Villeneuve, C., Etienne, G., Abadie, V., Montrozier, H., Bordier, C., Laval, F., *et al.* (2003) Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids. *J Biol Chem* **278**: 51291–51300.
- Wells, R.M., Jones, C.M., Xi, Z., Speer, A., Danilchanka, O., Doornbos, K.S., *et al.* (2013) Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **9**: e1003120.
- Zerbino, D.R., and Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* **18**: 821–829.
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., and Daffé, M. (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **190**: 5672–5680.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Supplementary Information

Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium bolletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members

Audrey Bernut^{1,*}, Albertus Viljoen^{1,6,*}, Christian Dupont¹, Guillaume Sapriel³, Mickaël Blaise¹,
Christiane Bouchier⁴, Roland Brosch⁵, Chantal de Chastellier⁶, Jean-Louis Herrmann³
and Laurent Kremer^{1,2,#}

¹Centre National de la Recherche Scientifique FRE3689, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier France.

²INSERM, CPBS, 34293 Montpellier, France.

³UMR1173, INSERM, Université de Versailles St Quentin, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France.

⁴Institut Pasteur, PF1 Génopole, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

⁵Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France.

⁶Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille Université UM2, Inserm, U1104, CNRS UMR7280, 13288 Marseille, France.

*Equal contribution

#To whom correspondence should be addressed:

Tel: (+33) 4 34 35 94 47

E-mail: laurent.kremer@cpbs.cnrs.fr

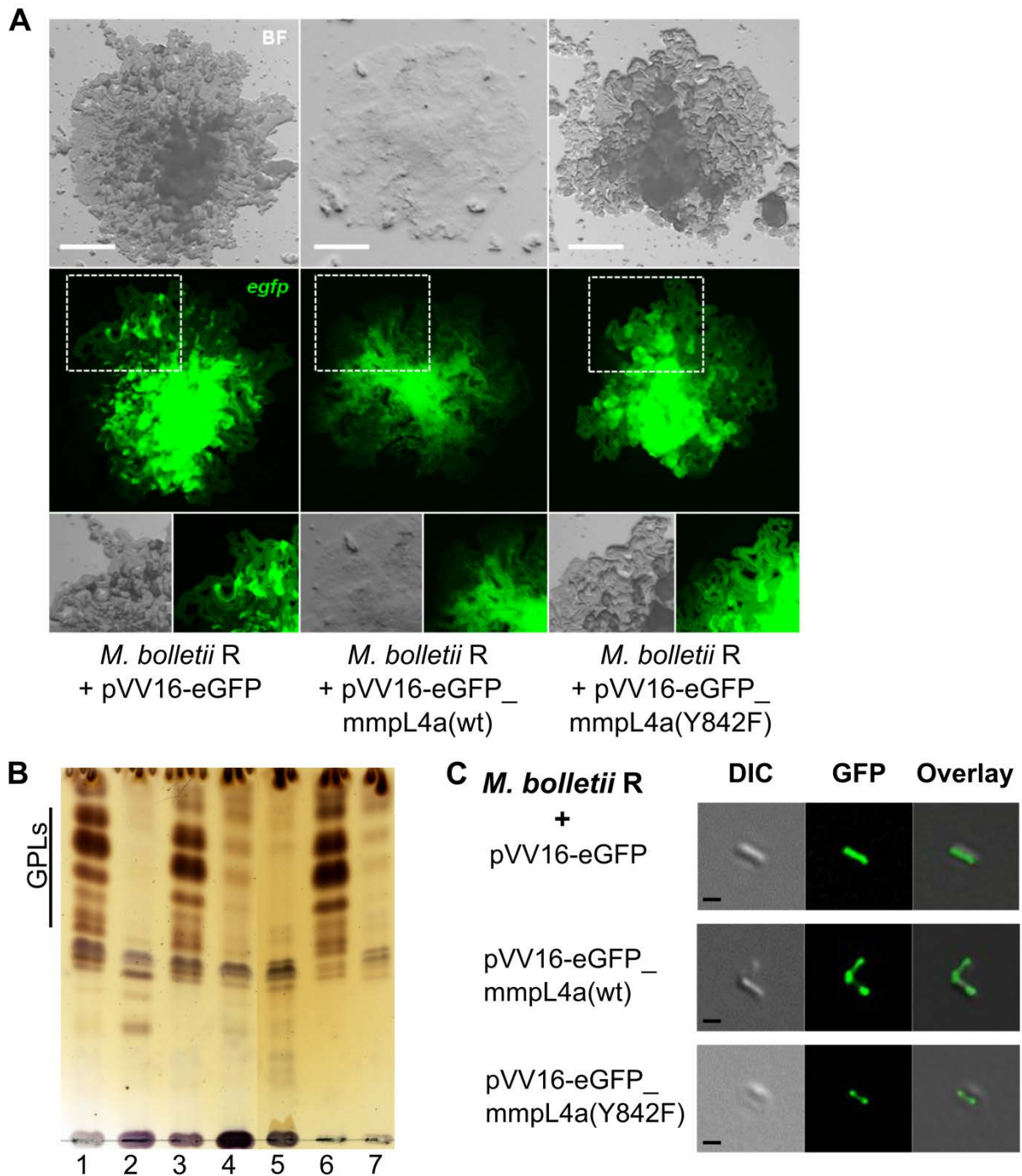


Figure S1. Fluorescence microscopy of the *M. bolletii mmpL4a_Y842H* mutant producing either MmpL4a-eGFP or MmpL4a_Y842H-eGFP fusions. (A) Representative morphology of the *M. bolletii mmpL4a_Y842H* mutant carrying either pVV16-eGFP, pVV16-*mmpL4a*(wt)_eGFP or pVV16-*mmpL4a_Y842H*_eGFP. Bacteria were grown on LB agar plates. Scale bars, 0.5 mm. **(B)** TLC showing that GPL export in *M. bolletii* R is restored by expression of eGFP fused with MmpL4a(wt), but not with MmpL4a(Y842F). 1 – *Mbol* S, 2 – *Mbol mmpL4a_Y842H* (*Mbol* R), 3 – *Mbol* R + pMV306-*mmpL4a*, 4 – *Mbol* R + pMV306-*mmpL4a*(Y842F), 5 – *Mbol* R + pVV16-eGFP, 6 – *Mbol* R + pVV16-eGFP-*mmpL4a*, 7 – *Mbol* R + pVV16-eGFP-*mmpL4a*(Y842F). **(C)** Representative images showing localization of eGFP protein throughout the cytosol and eGFP-fused with MmpL4a (wt or Y842F) at the poles. Scale bars, 1 μ m.

*mmpL4a*_Y842H mutant

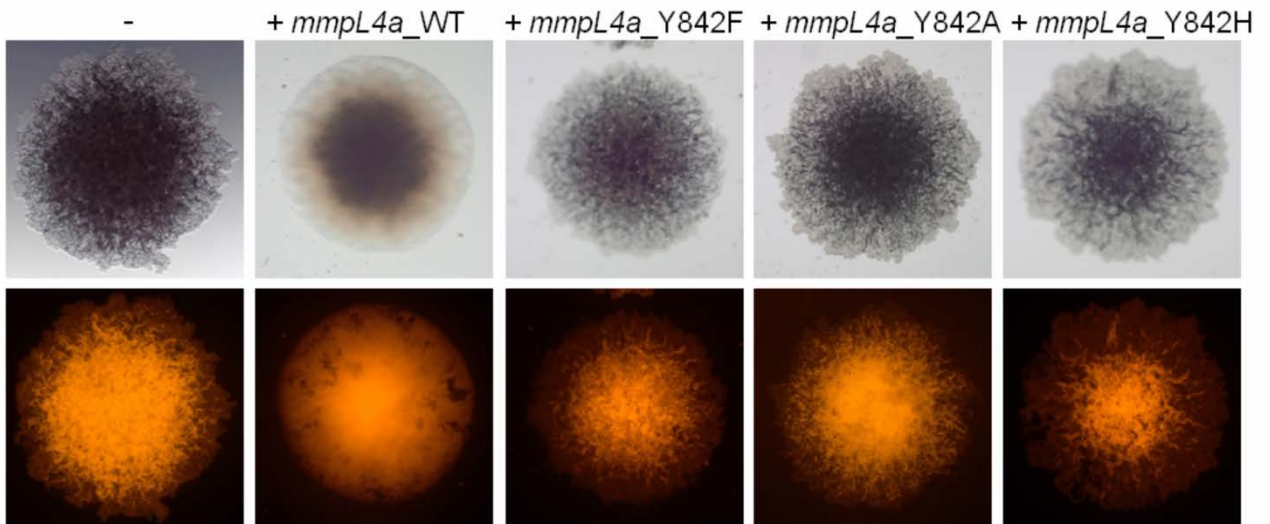


Figure S2. Morphology of the *M. bolletii* *mmpL4a* mutant complemented with various *mmpL4a* alleles. Colonies were imaged after 4 days of growth on agar plates. The smooth morphotype was only observed when a wild-type *mmpL4a* gene was introduced in the mutant. Substitutions of Tyr842 by either Phe, Ala or His residues failed to restore the smooth colony morphology. Upper images, bright field; lower images, fluorescence.

Table S1. List of bacterial strains and plasmids used in this study.

| Name | Description | Marker | Reference |
|--|---|----------------|---|
| Strains | | | |
| <i>M. bolletii</i> | <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> , CIP108541 ^T , smooth | – | Laboratoire de Référence des Mycobactéries (IP, France) |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H</i> | <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> , CIP108541 ^T , rough, contains the Tyr842His mutation in <i>MmpL4a</i> | – | This study |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H_C</i> | <i>M. bolletii mmpL4a_Y842H</i> complemented with pMV306_zeo_ <i>mmpL4a</i> , an integrative plasmid which stably expresses <i>mmpL4a</i> under the control of the <i>hsp60</i> promoter | Zeo | This study |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H_C_Y842H</i> | <i>M. bolletii mmpL4a_Y842H</i> complemented with pMV306_zeo_ <i>mmpL4a_Y842H</i> | Zeo | This study |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H_C_Y842A</i> | <i>M. bolletii mmpL4a_Y842H</i> complemented with pMV306_zeo_ <i>mmpL4a_Y842A</i> | Zeo | This study |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H_C_Y842F</i> | <i>M. bolletii mmpL4a_Y842H</i> complemented with pMV306_zeo_ <i>mmpL4a_Y842F</i> | Zeo | This study |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H_pVV16-eGFP_mmpL4a</i> | <i>M. bolletii mmpL4a_Y842H</i> containing pVV16- <i>eGFP_mmpL4a</i> , a replicative plasmid which stably expresses a fusion product of <i>mmpL4a-eGFP</i> under the control of the <i>hsp60</i> promoter | Km, Hyg | This study |
| <i>M. bolletii</i> <i>mmpL4a_Y842H_pVV16-eGFP_mmpL4a(Y842F)</i> | <i>M. bolletii mmpL4a_Y842H</i> containing pVV16- <i>eGFP_mmpL4a(Y842F)</i> , a replicative plasmid which stably expresses a fusion product of <i>mmpL4a(Y842F)-eGFP</i> under the control of the <i>hsp60</i> promoter | Km, Hyg | This study |
| <i>M. abscessus</i> S | <i>Mabs sensu stricto</i> , strain CIP104536 ^T , smooth | – | Laboratoire de Référence des Mycobactéries |
| <i>M. abscessus</i> R | <i>Mabs</i> , strain CIP104536 ^T , rough | – | Laboratoire de Référence des Mycobactéries |
| <i>M. abscessus</i> S <i>ΔmmpL4b</i> | <i>Mabs</i> mutant obtained by allelic exchange in the smooth parental strain CIP104536 ^T | Km | (Medjahed and Reyrat, 2009) |
| <i>M. abscessus</i> S <i>ΔmmpL4b_C</i> | <i>Mabs</i> S <i>ΔmmpL4b</i> complemented with pMV306_zeo_ <i>mmpL4b</i> , an integrative plasmid which stably expresses <i>mmpL4b</i> under the control of the <i>hsp60</i> promoter | Km, Zeo | (Medjahed and Reyrat, 2009) |
| <i>M. abscessus</i> S <i>ΔmmpL4b_C_Y854F</i> | <i>Mabs</i> S <i>ΔmmpL4b</i> complemented with pMV306_zeo_ <i>mmpL4b_Y854H</i> | Km, Zeo | This study |
| <i>M. smegmatis</i> <i>ΔMSMEG0250</i> | <i>mmpL3</i> conditional mutant | Hyg, acetamide | (Varela <i>et al.</i> , 2012) |

| | | | |
|---|---|-------------------------|---------------------------------|
| <i>M. smegmatis</i> Δ MSMEG0250_C | Δ MSMEG0250 complemented with pMV306_Apra_mmpL3 | Apra, ± acetamide | This study |
| <i>M. smegmatis</i> Δ MSMEG0250_C_D251A | Δ MSMEG0250 complemented with pMV306_Apra_mmpL3(D251A) | Apra, ± acetamide | This study |
| <i>M. smegmatis</i> Δ MSMEG0250_C_Y252F | Δ MSMEG0250 complemented with pMV306_Apra_mmpL3(Y252F) | Apra, ± acetamide | This study |
| <i>M. smegmatis</i> Δ MSMEG0250_C_D640A | Δ MSMEG0250 complemented with pMV306_Apra_mmpL3(D640A) | Apra, ± acetamide | This study |
| <i>M. smegmatis</i> Δ MSMEG0250_C_Y641F | Δ MSMEG0250 complemented with pMV306_Apra_mmpL3(Y641F) | Apra, ± acetamide | This study |
| <i>E. coli</i> Top10 | F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> | – | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> DH5 α | <i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44</i> Φ 80' <i>lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> | – | (Taylor <i>et al.</i> , 1993) |
| Plasmids | | | |
| pMV261 | Multi-copy <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector. Cloned genes are under the control of the constitutive <i>hsp60</i> promoter | Km | (Stover <i>et al.</i> , 1991) |
| pMV306 | Integrative <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector. Cloned genes are under the control of the constitutive <i>hsp60</i> promoter | Km | (Stover <i>et al.</i> , 1991) |
| pMV306-Zeo | Zeocin cassette cloned into pMV306 instead of kanamycin cassette | Zeo | (Vilchèze <i>et al.</i> , 2014) |
| pVV16 | Multi-copy <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector. Cloned genes are under the control of the constitutive <i>hsp60</i> promoter | Hyg/Km | (Jackson <i>et al.</i> , 2000) |
| pVV16-eGFP | pVV16 derivative containing eGFP open reading frame under control of <i>hsp60</i> promoter | Km/Hyg | (Vilchèze <i>et al.</i> , 2014) |
| pMV261-mCherry | <i>mCherry</i> gene cloned into pMV261 | Km | (Alibaud <i>et al.</i> , 2011) |
| pCR®-BluntII-TOPO® | For direct cloning of blunt-end PCR products | Zeo, Km | Invitrogen |
| pTEC27 | Multi-copy <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector to express tdTomato under the control of a strong mycobacterial promoter | Hyg | Addgene (plasmid 30182) |
| pVV16_mmpL4a | NdeI-HindIII fragment containing the eGFP open reading frame in pVV16-eGFP replaced with the <i>M. boletii mmpL4a</i> open reading frame. | Km, Hyg | This study |
| pMV306_mmpL4a | XbaI-HindIII fragment containing the <i>hsp60</i> promoter and <i>mmpL4a</i> open reading frame from pVV16- <i>mmpL4a</i> sub-cloned into pMV306. | Zeo | This study |

| | | | |
|----------------------------------|---|---------|---|
| pMV306_mmpL4a(Y842H) | T2524C nucleotide substitution introduced by site-directed mutagenesis into the <i>mmpL4a</i> open reading frame. The resulting <i>mmpL4a</i> protein product contains a Y842H amino acid substitution. | Zeo | This study |
| pMV306_mmpL4a(Y842A) | T2524G and A2525C nucleotide substitutions introduced by site-directed mutagenesis into the <i>mmpL4a</i> open reading frame. The resulting <i>mmpL4a</i> protein product contains a Y842A amino acid substitution. | Zeo | This study |
| pMV306_mmpL4a(Y842F) | A2525T nucleotide substitution introduced by site-directed mutagenesis into the <i>mmpL4a</i> open reading frame. The resulting <i>mmpL4a</i> protein product contains a Y842F amino acid substitution. | Zeo | This study |
| pMV261-mmpL4b | <i>M. abscessus mmpL4b</i> open reading frame cloned into pMV261. Expression of <i>mmpL4b</i> is under control of the <i>hsp60</i> promoter. | Km | This study |
| pMV306-Zeo-mmpL4b | XbaI-HindIII fragment containing the <i>hsp60</i> promoter and <i>mmpL4b</i> open reading frame from pMV261- <i>mmpL4b</i> sub-cloned into pMV306-Zeo. | Zeo | This study |
| pMV306-Zeo-mmpL4b (Y854F) | A2561T nucleotide substitution introduced by site-directed mutagenesis into the <i>mmpL4b</i> open reading frame. The resulting <i>mmpL4b</i> protein product contains a Y854F amino acid substitution. | Zeo | This study |
| pMV206-AprA | pMV206 in which the Km has been replaced by an apramycin resistance cassette | Apra | W.R. Jacobs (Albert Einstein College of Medicine, NY) |
| pMV206-AprA_mmpL3 | pMV206-AprA containing the <i>M. tuberculosis mmpL3</i> gene | Apra | This study |
| pMV206-AprA_mmpL3(D251A) | pMV206-AprA containing the <i>M. tuberculosis mmpL3</i> allele with a D251A substitution | Apra | This study |
| pMV206-AprA_mmpL3(Y252F) | pMV206-AprA containing the <i>M. tuberculosis mmpL3</i> allele with a Y252F substitution | Apra | This study |
| pMV206-AprA_mmpL3(D640A) | pMV206-AprA containing the <i>M. tuberculosis mmpL3</i> allele with a D640A substitution | Apra | This study |
| pMV206-AprA_mmpL3(Y641F) | pMV206-AprA containing the <i>M. tuberculosis mmpL3</i> allele with a Y641F substitution | Apra | This study |
| pVV16-eGFP_mmpL4a | pVV16-eGFP containing a fusion of the eGFP ORF with the <i>mmpL4a</i> ORF under the control of the <i>hsp60</i> promoter. | Km, Hyg | This study |
| pVV16-eGFP_mmpL4a (Y842F) | pVV16-eGFP containing a fusion of the eGFP ORF with the <i>mmpL4a</i> (Y842F) ORF under the control of the <i>hsp60</i> promoter. | Km, Hyg | This study |

References

Alibaud, L., Rombouts, Y., Trivelli, X., Burguière, A., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., *et al.* (2011) A Mycobacterium marinum TesA mutant defective for major cell wall-associated lipids is highly attenuated in Dictyostelium discoideum and zebrafish embryos. *Mol Microbiol* **80**: 919–934.

- Jackson, M., Crick, D.C., and Brennan, P.J. (2000) Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J Biol Chem* **275**: 30092–30099.
- Medjahed, H., and Reyrat, J.-M. (2009) Construction of Mycobacterium abscessus defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1331–1338.
- Stover, C.K., Cruz, V.F. de la, Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., *et al.* (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**: 456–460.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* **21**: 1677–1678.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., *et al.* (2012) MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem Biol* **19**: 498–506.
- Vilchèze, C., Molle, V., Carrère-Kremer, S., Leiba, J., Mourey, L., Shenai, S., *et al.* (2014) Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* **10**: e1004115.

Table S2. Primers used in this study.

| Primers | 5' to 3' Sequence ^{ab} |
|---------------|---|
| MASS_4115_for | TACGATCTCCTGATCGCGGGCGTGG |
| MASS_4115_rev | GAACGCTCGCACGATCAAGGTGTCTG |
| mmpL4af | GGAATTC <u>CATATG</u> AGCGCGGACGACGGCAAGG (NdeI) |
| mmpL4ar | TTT <u>AAGCTT</u> CAATTCCTCTGCAGTACCGAG (HindIII) |
| mmpL4aY842H | C ACAACCTGTTGCTGGTCTCACG |
| mmpL4aY842A | G CCAACCTGTTGCTGGTCTCACG |
| mmpL4aY842F | TTCAACCTGTTGCTGGTCTCACG |
| mmpL4aY842r | GTCAGACCCACGGCAA |
| mmpL4a_seq1 | CCGAGAGCGGAAACCGTACGGTCATCC |
| mmpL4a_seq2 | GGATGACCGTACGGTTCCGCTCTCGG |
| mmpL4a_seq3 | ATCAGATGGTCGACACCACA |
| mmpL4a_seq4 | ACCAGGGTTTGCATCTTGTC |
| mmpL4bf | CTAAACCGGGTATGAGTGCCGA |
| mmpL4br | CGTT <u>AAGCTT</u> CTAICTAGAAAGCCGCGGCA (HindIII) |
| mmpL4bY854F | TTCAACCTGCTACTGGTCTCCC |
| mmpL4bY854r | GTCAGATCCGACCGCCAGCA |
| mmpL4b_seq1 | GTGCTGCTGTGGCAGTACAT |
| mmpL4b_seq2 | CTGGTCGATCAGGTCGATTT |
| mmpL4b_seq3 | TGCTCTGCATGACCTCAATC |
| mmpL4b_seq4 | ATCGTAAAGCGGACATCACC |
| mmpL4b_seq5 | CAGGATGAGTAGCAGCGTGA |
| mmpL3f | GATC GATATC CTTCGCCAAACCGAAAGTAG (XbaI) |
| mmpL3r | AGTT AAGCTT CTAATCGCGGTGAACCAACT (HindIII) |

| | |
|---------------|--|
| mmpL3_seq1 | GTCGTCGTCATCACCCCTTG |
| mmpL3_seq2 | GTCACATCGTCGCGATCTTC |
| mmpL3_seq3 | TAACCAGCTTGCCCCAGA |
| mmpL3_seq4 | CTGTCGGCCATCCTGTCTAT |
| mmpL3_seq5 | CAGGTCGGAGAACACGAAC |
| mmpL3_seq6 | CACCACGATCGTCTTGATGT |
| mmpL3D251Af | CTGGGGATCGCCATCGCCTACGGGTTGTTTCATCGTGA |
| mmpL3D251Ar | TCACGATGAACAACCCGTAG G CGATGGCGATCCCCAG |
| mmpL3Y252Ff | GGGATCGCCATCGACTTCGGGTTGTTTCATCGTGAGCC |
| mmpL3Y252Fr | GGCTCACGATGAACAACCCG A AGTCGATGGCGATCCC |
| mmpL3D640Af | TTCGGCCTATCCACCG C CTACGAGGTGTTCTTGGTGT |
| mmpL3D640Ar | ACACCAAGAACACCTCGTAG G CGGTGGATAGGCCGAA |
| mmpL3Y641Ff | TCGGCCTATCCACCGACTTCGAGGTGTTCTTGGTGTC |
| mmpL3Y641Fr | GACACCAAGAACACCTCG A AGTCGGTGGATAGGCCGA |
| pVV16eGFPmod1 | CACTTC <u>CATATG CTGCAG</u> AGGAAT <u>GGATCC</u> ATCGCC (NdeI PstI BamHI) |
| pVV16eGFPmod2 | GGCGAT <u>GGATCC</u> ATTCTT <u>CTGCAG</u> <u>CATATG</u> GAAGTG (BamHI PstI NdeI) |

^a Restriction sites are underlined and specified inside brackets.

^b Mutagenized bases are shown in bold.

OBJECTIF 2 : Identifier des molécules actives contre le complexe *M. abscessus*, découvrir leur(s) cible(s) et expliquer leur mode d'action.



Résultats : Identification d'une molécule active contre le complexe *M. abscessus*, de sa cible et de son mode d'action.

Ce second volet de l'étude a débuté grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. L. Ballell (GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Espagne). L'accès et l'utilisation d'une banque de 177 molécules peu toxiques et actives contre *M. tuberculosis* (Ballell et al. 2013) a constitué la première étape dans la recherche de nouvelle chimiothérapie efficace et l'identification de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutiques contre *M. abscessus*.

De façon très surprenante, après le criblage de ces 177 molécules, **une seule molécule, PIPD1, a été identifiée comme active contre *M. abscessus***. Ces premiers résultats encourageants ont alors été exploités dans le cadre d'une collaboration active avec l'équipe du Dr. Y. Guerardel (CNRS, Lille) dans le but de synthétiser en plus grande quantité la molécule identifiée dans la chimiothèque GSK afin de permettre de poursuivre nos investigations sur ce composé, désignée PIPD1.

Afin, d'évaluer plus précisément l'activité et l'efficacité de PIPD1, nous avons testée la molécule :

- *in vitro* :
 - sur une collection de souches cliniques du complexe *M. abscessus*, sur d'autres mycobactéries proches de *M. abscessus* (*M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. immunogenum*, *M. mucogenicum*), sur de nombreuses bactéries Gram⁺ et Gram⁻ ainsi que sur différentes *Corynebacteries*.
 - sur macrophages (murins ou humains) infectés avec *M. abscessus*.
- *in vivo* dans des embryons de ZF infectés avec *M. abscessus*.

Dans cette étude, nous démontrons l'utilité d'un criblage sur base phénotypique de composés bactéricides contre *M. abscessus* qui nous a permis de reconnaître une nouvelle molécule dérivée de pipéridinol, présentant une activité efficace:

- ***In vitro* contre différentes souches cliniques** du complexe *M. abscessus*,
- ***Ex vivo* au sein de macrophages infectés,**
- ***In vivo*, réduisant la charge infectieuse, et augmentant la survie d'embryons infectés.**

En parallèle, un travail approfondi et mené sur l'activité de PIPD1, nous a permis d'isoler des mutants devenus spontanément résistants à PIPD1. Afin d'identifier l'origine de cette résistance nous avons :

- Réalisé des analyses génomiques et phénotypiques comparatives de différents mutants résistants à PIPD1,

Résultats : Identification d'une molécule active contre le complexe M. abscessus, de sa cible et de son mode d'action.

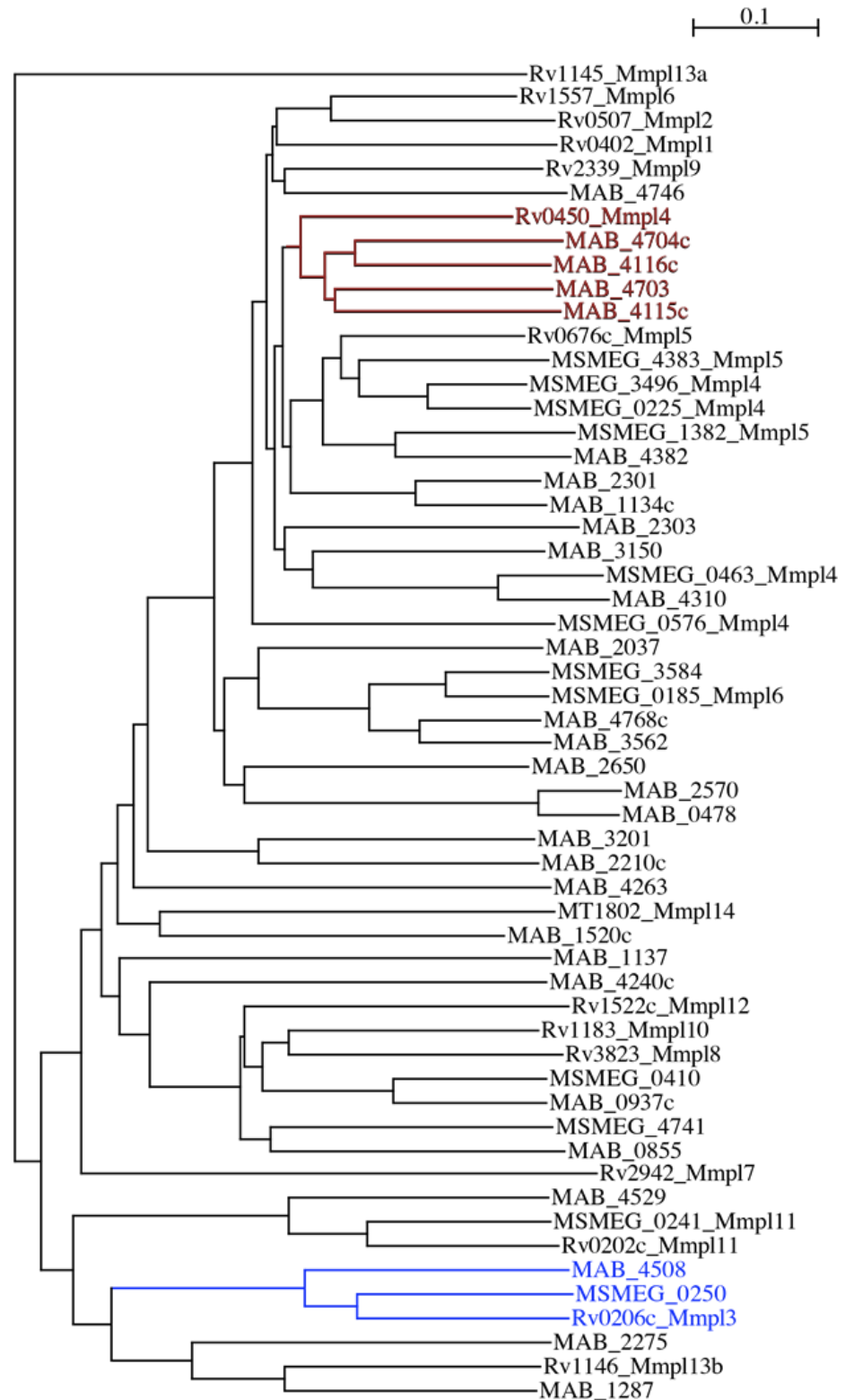


Figure 30 : Arbre phylogénétique représentant les MmpL de *M. abscessus* (MAB), *M. smegmatis* (MSMEG) et *M. tuberculosis* (Rv ou Mt).

L'arbre non enraciné a été calculé avec Clustal X avec la méthode de "neighbor joining" suivi d'une analyse par "bootstrap". Cet arbre montre les homologies entre les MmpL de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, et *M. abscessus*. En Rouge on retrouve les différents homologues de MmpL4 et en bleu de MmpL3.

Résultats : Identification d'une molécule active contre le complexe M. abscessus, de sa cible et de son mode d'action.

- Déterminé le profil lipidique de souches parentales sur-exprimant la protéine cible identifiée (native ou mutée) et traitées avec PIPD1,
- Modélisé la protéine cible afin de pouvoir cartographier les mutations responsables de la résistance à PIPD1 afin d'appréhender son mécanisme d'action.

L'analyse du génome entier des souches de *M. abscessus* spontanément résistantes à PIPD1, a permis **d'identifier de nombreuses mutations dans MAB_4508**, codant une **protéine homologue à MmpL3 de *M. tuberculosis*** (Figure 30). Les analyses biochimiques ont démontré que, bien que la synthèse des acides mycoliques *de novo* ne soit pas affectée, **PIPD1 inhibe** fortement le **transport de TMM** à travers la membrane plasmique mycobactérienne, **abrogeant** de ce fait la **mycolylation de l'AG**. La localisation des mutations conférant la résistance à PIPD1 sur un modèle d'homologie tridimensionnel de la protéine MAB_4508, a mis en évidence la présence d'une cavité **hypothétique de fixation de PIPD1**, **suggérée également par des expériences d'amarrage moléculaire**. La localisation spatiale de ces différentes mutations à proximité de cette poche pourrait ainsi limiter/empêcher la fixation de PIPD1 sur MAB_4508, expliquant la résistance de ces mutants à PIPD1.

En résumé, nos données présentent PIPD1 comme le premier inhibiteur ciblant le transport d'acides mycoliques chez une MNT et ouvrent de nombreuses possibilités d'applications thérapeutiques dans la lutte contre *M. abscessus*.

Résultats : Identification d'une molécule active contre le complexe M. abscessus, de sa cible et de son mode d'action.

**Article 2: “A new piperidinol derivative targeting
mycolic acid transport in *Mycobacterium*
abscessus”**

Auteurs

Christian Dupont, Albertus Viljoen, Faustine Dubar, Mickaël Blaise, Audrey Bernut, Alexandre Pawlik,
Christiane Bouchier, Roland Brosch, Yann Guérardel, Joël Lelièvre, Lluís Ballell, Jean-Louis Herrmann,
Christophe Biot et Laurent Kremer

Journal

Molecular Microbiology (2016) 101(3), 515-29

DOI: 10.1111/mmi.13406

A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*

Christian Dupont,^{1,2} Albertus Viljoen,¹ Faustine Dubar,³ Mickaël Blaise,¹ Audrey Bernut,¹ Alexandre Pawlik,⁴ Christiane Bouchier,⁵ Roland Brosch,⁴ Yann Guérardel,³ Joël Lelièvre,⁶ Lluís Ballell,⁶ Jean-Louis Herrmann,² Christophe Biot³ and Laurent Kremer^{1,7*}

¹Centre National de la Recherche Scientifique FRE 3689, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Université de Montpellier, 1919 route de Mende, Montpellier, 34293, France.

²UMR1173, INSERM, Université de Versailles St Quentin, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France.

³Université Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille F 59000, France.

⁴Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée, 25 rue du Dr. Roux, Paris 75724, France.

⁵Institut Pasteur, PF1 Genopole, 28 rue du Dr. Roux, Paris 75724, France.

⁶Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline Tres Cantos, Madrid 28760, Spain.

⁷INSERM, CPBS, Montpellier 34293, France.

Summary

The natural resistance of *Mycobacterium abscessus* to most commonly available antibiotics seriously limits chemotherapeutic treatment options, which is particularly challenging for cystic fibrosis patients infected with this rapid-growing mycobacterium. New drugs with novel molecular targets are urgently needed against this emerging pathogen. However, the discovery of such new chemotypes has not been appropriately performed. Here, we demonstrate the utility of a phenotypic screen for bactericidal compounds against *M. abscessus* using a library of compounds previously validated for activity against *M. tuberculosis*. We identified a new piperidinol-based

molecule, PIPD1, exhibiting potent activity against clinical *M. abscessus* strains *in vitro* and in infected macrophages. Treatment of infected zebrafish with PIPD1 correlated with increased embryo survival and decreased bacterial burden. Whole genome analysis of *M. abscessus* strains resistant to PIPD1 identified several mutations in *MAB_4508*, encoding a protein homologous to MmpL3. Biochemical analyses demonstrated that while *de novo* mycolic acid synthesis was unaffected, PIPD1 strongly inhibited the transport of trehalose monomycolate, thereby abrogating mycolylation of arabinogalactan. Mapping the mutations conferring resistance to PIPD1 on a *MAB_4508* tridimensional homology model defined a potential PIPD1-binding pocket. Our data emphasize a yet unexploited chemical structure class against *M. abscessus* infections with promising translational development possibilities.

Introduction

The number of non-tuberculous mycobacterial (NTM) infections has increased recently and even surpassed tuberculosis (TB) as a public health concern in many developed countries (Marras *et al.*, 2007; Henkle *et al.*, 2015). These infections require long treatment periods (months to years) that are often unsuccessful (Mirsaeidi *et al.*, 2014). Among the NTM commonly isolated from clinical respiratory specimens, *Mycobacterium abscessus* has recently emerged as one of the most difficult-to-manage NTM pathogens (Nessar *et al.*, 2012). NTM infections are often found to be the underlying cause of pulmonary infections, especially in patients with cystic fibrosis (CF) and with other lung disorders. Additionally, they represent a major cause of sporadic and clustered outbreaks of community-acquired and health care-associated skin and soft tissue infections (Griffith *et al.*, 1993; Brown-Elliott and Wallace, 2002). *M. abscessus* displays smooth (S) or rough (R) colony morphotypes that rely on the presence (in S) or absence (in R) of surface-associated glycopeptidolipids (GPL) (Howard *et al.*, 2006). These morphotypes are associated with different clinical

Accepted 25 April, 2016. *For correspondence. E-mail laurent.kremer@cpbs.cnrs.fr; Tel. (+33) 4 34 35 94 47.

outcomes, with the R morphotype exhibiting a hyper-virulent behavior in cellular and animal models in addition to severe diseases in human pulmonary infections (Byrd and Lyons, 1999; Catherinot *et al.*, 2009).

Infections due to *M. abscessus* are extremely difficult to treat and to eradicate since *M. abscessus* is naturally resistant to most antibiotics. The recommended treatment for pulmonary infections includes a combination of a macrolide (clarithromycin or azithromycin), an aminoglycoside (amikacin), and an intravenous β -lactam (cefoxitin or imipenem) for at least 12 months (Floto *et al.*, 2016). Surgical resection of infected lung tissue as an adjunct to antibiotic therapy is beneficial in selected patients but cannot be broadly applied. Moreover, unsuccessful eradication of *M. abscessus* is considered as a contraindication for lung transplantation by several CF centres (Lobo *et al.*, 2013), leaving patients without therapeutic options. Therefore, more specific and active and less toxic antimicrobial agents are urgently needed.

Despite being a formidable respiratory mycobacterial pathogen, it is only recently that we are beginning to understand the biological processes underpinning *M. abscessus* infection. Recent studies demonstrated that the genome of *M. abscessus* shares considerable sequence similarity with that of *Mycobacterium tuberculosis* (Ripoll *et al.*, 2009; Choo *et al.*, 2014). As predicted from DNA sequence similarity at a broad level, *M. abscessus* and *M. tuberculosis* share many biochemical pathways, suggesting that drugs in development for TB can serve as starting points to 'jump start' *M. abscessus* drug discovery programs (Philly *et al.*, 2015). Therefore, the already existing data generated during previous TB drug discovery programs could also be used directly to identify new chemotypes with strong activity against *M. abscessus*. Such a strategy would present considerable advantages, obviating the need to initiate chemical screens *de novo*.

To validate this approach, we have undertaken an *M. abscessus* 'cross-screen' with a confirmed chemical series arising from a previously known set of potent non-toxic anti-tubercular hits (Ballell *et al.*, 2013). Herein, we present a new piperidinol-based compound showing selective activity against *M. abscessus* both *in vitro* and *in vivo* and its putative molecular target identified through whole-genome sequencing of spontaneous resistant mutants.

Results

Identification and activity of a new class of piperidinol inhibitor of *M. abscessus*

We reasoned that the recent discovery of a set of 177 potent non-toxic hits against *M. tuberculosis* (Ballell *et al.*, 2013) could present a privileged starting point for new syn-

thetic lead-generation activities against *M. abscessus*. Screening of this chemical library against whole *M. abscessus* led to the identification of only one very active derivative [GSK1985270A; 4-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-ol; Fig. 1A] with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.125 μ g/ml (0.32 μ M) against both smooth (S) and rough (R) reference CIP104536 (Table 1). Notably, GSK1985270A, hereafter referred to as PIPD1, was similarly active against 10 different clinical strains isolated from CF patients or non-CF patients, exhibiting various susceptibility profiles against imipenem, amikacin, cefoxitin or clarithromycin, the most widely used drugs in clinical settings. Isolates from either CF or non-CF patients were equally susceptible to PIPD1 (Table 1). The lack of cross-resistance to PIPD1 suggests that this compound targets a different biological function not targeted by imipenem, amikacin, cefoxitin or clarithromycin. The *M. abscessus* complex is subclassified into three subspecies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Adékambi *et al.*, 2004; Bastian *et al.*, 2011). The distinction between these subspecies is clinically relevant because they respond differently to antibiotics (Bastian *et al.*, 2011). We found that 32 clinical strains comprising 12 isolates of *M. abscessus*, 12 *M. massiliense* and 8 *M. bolletii* were equally sensitive to PIPD1, all exhibiting MICs of 0.125 μ g/ml (Supporting Information Table S1).

We then determined the MIC of PIPD1 against various pathogens classically encountered in human infections, especially in CF patients (Supporting Information Table S2). PIPD1 was particularly active against several mycobacterial species such as *Mycobacterium smegmatis* as well as species closely related to the *M. abscessus* complex (*Mycobacterium chelonae*, *M. immunogenum* and *M. mucogenicum*, MIC <1 μ g/ml) but failed to show detectable activity against various Gram negative and Gram positive bacteria, including close mycobacterial relatives such as *Corynebacteria* (all MIC >125 μ g/ml). This suggests that PIPD1 targets an essential mycobacterial component that is either sufficiently divergent or absent in other genera.

To further understand the properties PIPD1 against *M. abscessus*, its minimum bactericidal concentration (MBC) was determined. MBC₉₉ data demonstrated that PIPD1 is bactericidal against *M. abscessus* S at concentrations of 0.125–0.5 μ g/ml (0.32 μ M–1.28 μ M). Exposure to *M. abscessus* S in log-phase growth to 0.25 μ g/ml (0.64 μ M) PIPD1, corresponding to 2X MIC, resulted in a reduction in viable colony-forming units (CFU) of about two logs after 72 h, indicating that this compound is bactericidal *in vitro* (Fig. 1B). A higher concentration of PIPD1 (8X MIC) did not increase the killing effect within the first 3 days, indicating that the killing was time dependent rather than concentration

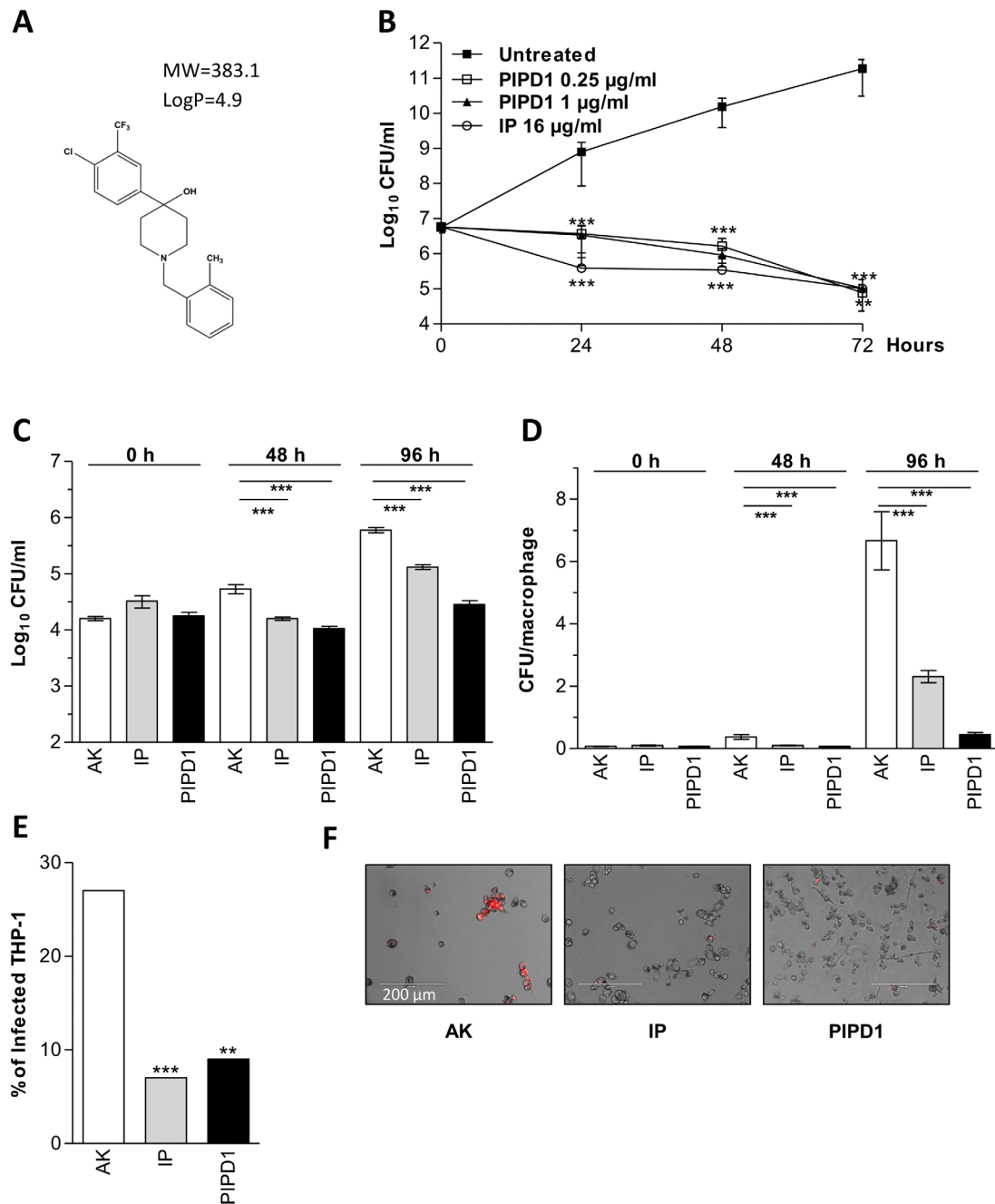


Fig. 1. Structure and bactericidal activity of GSK1985270A (PIPD1).

A. Chemical structure of 4-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-ol, referred to as PIPD1.

B. *In vitro* killing curve of *M. abscessus* CIP 104536 exposed to 4X MIC of imipenem (IP) or 2X and 8X MIC PIPD1 in CaMH broth at 30°C. The results for each drug concentration are representative of three independent experiments. Results are expressed as mean Log_{10} values \pm SEM.

C. Intracellular activity of PIPD1 in infected THP-1 cells. Macrophages were infected with *M. abscessus* CIP 104536 and treated with amikacin (50 µg/ml) to kill extracellular bacteria in the presence of imipenem at 80 µg/ml (20X MIC) or PIPD1 at 6 µg/ml (48X MIC). CFU were determined at 48 and 96 h post-treatment.

D. The number of CFU/macrophage was determined at 48 and 96 h post-treatment. Results are expressed as mean of triplicates from three independent experiments and error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistical significance was assessed by a Kruskal-Wallis test with Dunns post-test (B) or one-tailed Mann-Whitney's *t* test (C), $***P < 0.001$.

E. Following infection with *M. abscessus* expressing tdTomato, macrophages were treated and observed under the microscope at 96 h post-treatment ($n = 4300$) in order to determine the percentage of infected cells. The statistical test used was the Fisher exact test. $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. Experiments were performed in duplicate and results are representative of two independent experiments.

F. Corresponding microscopy captures of infected macrophages at 96 h post-treatment.

Table 1. Comparison of the activity of PIPD1 with various drugs active against *M. abscessus*.

| Strain | Morphotype | Imipenem | Amikacin | Cefoxitin | Clarithromycin | PIP1 |
|-----------------------|------------|----------|----------|-----------|----------------|-------|
| Non CF origin | | | | | | |
| <i>Mabs</i> CIP104536 | Rough | 2 | 16 | 64 | 64 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> CIP104536 | Smooth | 4 | 32 | 32 | 32 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 3321 | Smooth | 8 | 16 | 64 | 64 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 2069 | Smooth | 4 | 64 | 32 | 32 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 3022 | Rough | 2 | 16 | 32 | 32 | 0.125 |
| CF origin | | | | | | |
| <i>Mabs</i> 1298 | Smooth | 4 | 8 | 32 | 32 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 2587 | Smooth | 4 | 32 | 32 | 32 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> CF | Smooth | 4 | 32 | 64 | 64 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 2524 | Rough | 2 | 32 | 32 | 32 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 2648 | Rough | 4 | 32 | 64 | 64 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> 5175 | Rough | 2 | 16 | 64 | 64 | 0.125 |
| <i>Mabs</i> CF | Rough | 4 | 64 | 16 | 16 | 0.125 |

The MIC ($\mu\text{g/ml}$) was determined in Cation-Adjusted Mueller-Hinton broth for the *M. abscessus* CIP 104536 reference strain as well as for 10 clinical strains isolated from CF and non-CF patients.

dependent. Importantly, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ PIPD1 was as active as 16 $\mu\text{g/ml}$ imipenem (4X MIC) in bacterial killing (Fig. 1B).

Activity of PIPD1 against intracellular *M. abscessus*

It was previously reported that the 177 hits of the GSK library, active against *M. tuberculosis*, displayed a therapeutic index of HepG2 $\text{IC}_{50}/\text{MIC} > 50$, indicating that these compounds were not toxic to mammalian cells (Ballell *et al.*, 2013). We reassessed the cytotoxicity of our chemically synthesized PIPD1 against J774 macrophages and found that exposure to 3 $\mu\text{g/ml}$ and 6 $\mu\text{g/ml}$ PIPD1 (24X and 48X the MIC, respectively) was associated with 95 and 90% of cellular viability, further substantiating the lack of cytotoxicity against eukaryotic cell lines (data not shown). The intracellular killing activity of PIPD1 was next assessed *ex vivo* after infection of activated THP-1 macrophages. To avoid growth of extracellular mycobacteria, amikacin was maintained during the experiment at 50 $\mu\text{g/ml}$. Counting the number of macrophages indicated that amikacin had no significant effect on cell viability (data not shown). When left untreated (amikacin control) for a 96 h period, intracellular *M. abscessus* grew by at least 1.5 log, whilst exposure to PIPD1 (6 $\mu\text{g/ml}$, 48X MIC) prevented any multiplication within the macrophages (Fig. 1C). Treatment with imipenem (80 $\mu\text{g/ml}$, 20X MIC) significantly reduced the intracellular *M. abscessus* load, albeit to a lesser extent than PIPD1. Comparable results were obtained by assessing the efficacy of PIPD1 in J774 macrophages (Supporting Information Fig. S1). As for THP-1 cells, PIPD1 prevented any multiplication within these cells at 24 h and 48 h post-infection, whilst imipenem only partially reduced the intracellular load. The intracellular activity of PIPD1 was further confirmed by the reduced number of

CFU/macrophage (Fig. 1D and Supporting Information Fig. S1) and the significant decrease in the percentage of infected cells (Fig. 1E and 1F) following drug treatment. Overall, these results clearly indicate that PIPD1 is able to enter murine and human macrophages and arrests bacterial replication.

PIP1 treatment decreases bacterial loads and physiopathological signs in zebrafish

Because immunocompetent mice are not permissive to *M. abscessus* infection, thus preventing their use for *in vivo* drug assessments, a model to test the efficacy of drug treatment against acute *M. abscessus* infection has been developed employing zebrafish embryos (Bernut *et al.*, 2014b) (summarized in Fig. 2A). Initial experiments indicated that PIPD1 interfered with larval development after 9 days post-fertilization (dpf), leading to larval death, thus hampering quantitative assessment of the index of protection after prolonged drug exposure times at 6 $\mu\text{g/ml}$. Nevertheless, a significantly lower mortality rate of embryos exposed for 72 h to 3 $\mu\text{g/ml}$ PIPD1 was noticed as compared to the untreated control group (Fig. 2B). Protection from bacterial killing correlated with restricted mycobacterial growth in the drug-treated larvae as evidenced by quantitative determination of the fluorescent pixel counts (FPC) (Bernut *et al.*, 2015), which reflects the bacterial burden (Fig. 2C), corroborated by whole embryo imaging (Fig. 2D). As reported previously for imipenem and clarithromycin (Bernut *et al.*, 2014b), the increased survival rate of the PIPD1-treated embryos may also be explained by the reduced symptoms, particularly the abscesses, which represent a hallmark sign of the *M. abscessus*-induced physiopathology in zebrafish (Bernut *et al.*, 2014a) (Fig. 2E).

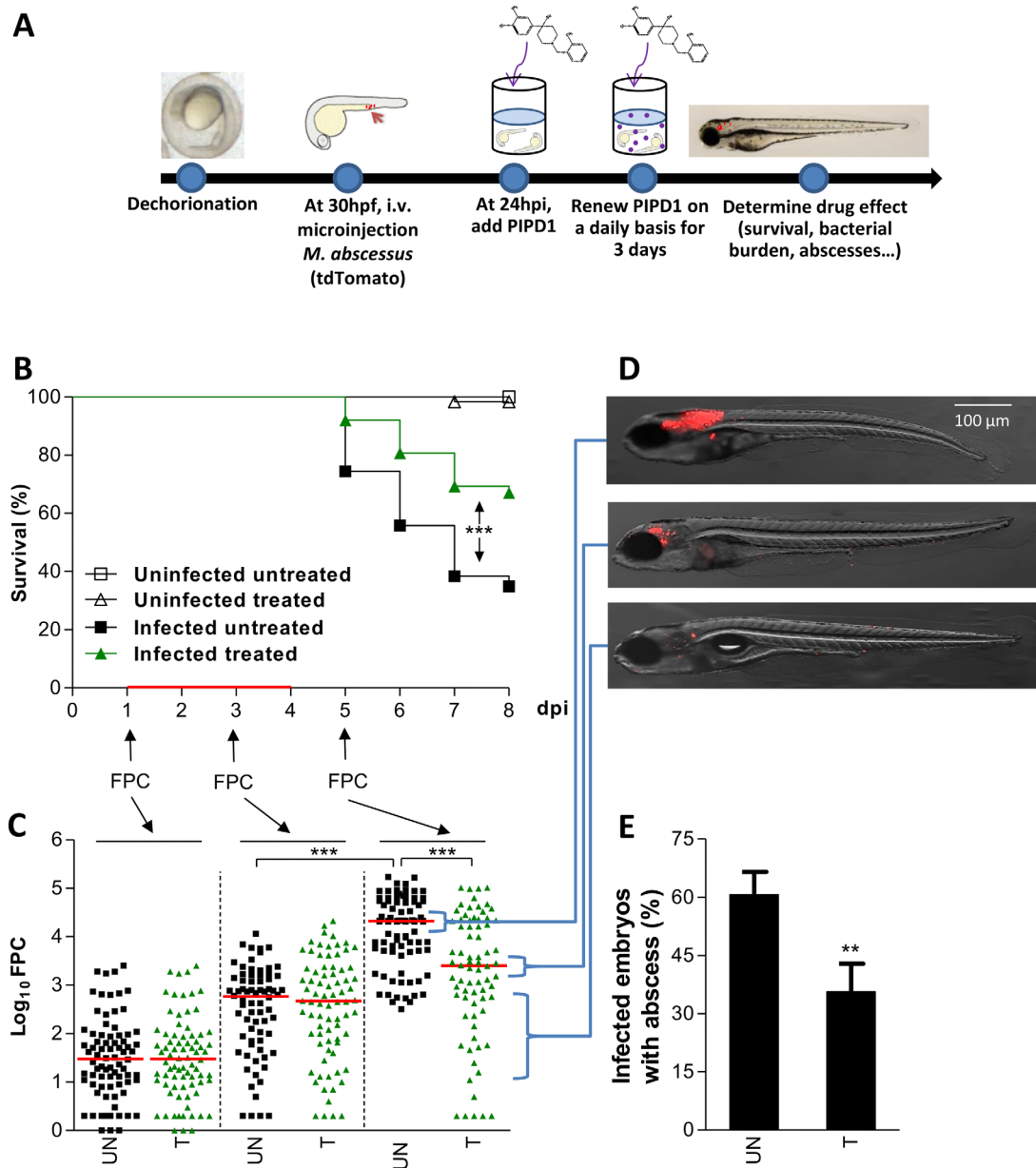


Fig. 2. PIPD1 treatment in *M. abscessus*-infected zebrafish embryos.

A. Schematic representation of the protocol used.

B. Survival curve of embryos infected with around 70 CFU of rough *M. abscessus* and treated or not with 3 μg/ml PIPD1. Duration of the treatment is represented by a red line ($n = 94$, pool of three independent experiments).

C. The bacterial burden was assessed at the indicated time points before, during and after treatment, by fluorescence microscopy and using customized software to quantify the number of fluorescent pixel counts (FPC). The graphs represent data from three independent experiments. UN, untreated; T, treated. Each symbol represents individual embryos and horizontal red lines indicate the medians.

D. Whole embryo imaging treated or not with PIPD1. A representative image is shown to illustrate the bacterial burden of non-treated fish (upper panel) or treated fish with moderate (middle panel) or low bacterial loads (lower panel).

E. Percentage of infected embryos with abscess at 5 dpi ($n = 37$, pool of three independent experiments). Statistical significance was determined by the log-rank test (B), Kruskal-wallis with Dunn's Multiple Comparison test (C) or Fisher's exact test of a contingency table (E), ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Mutations in MAB_4508 confer resistance to PIPD1

To search for the mechanism of resistance and as an indication of the potential molecular target of the inhibitor, a comprehensive approach was used involving the selection

of spontaneous PIPD1-resistant mutants of *M. abscessus* followed by whole-genome sequencing. Spontaneous resistant strains selected with 6 μg/ml PIPD1 arose at a frequency of around 1.6×10^{-8} . In an initial experiment,

Table 2. Characteristics of the 23 spontaneous PIPD1-resistant mutants of *M. abscessus*.

| PIPD1-resistant strain | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | MIC fold change | Mutation in <i>MAB_4508</i> | |
|------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|----------------|
| | | | SNP description | AA change |
| Smooth | | | | |
| CIP104536 (S) | 0.125 | - | - | - |
| R1 | 8 | 64 | G925C | A309P |
| R2 | 4 | 32 | T779C | L260P |
| R3 | 4 | 32 | T1652C | L551S |
| R4 | 4 | 32 | T1652C | L551S |
| R5 | 1 | 8 | G38C | R11P |
| R6 | 1 | 8 | T1838C | V613A |
| R7 | 4 | 32 | G939A, A1846T | M313I, I616F |
| R8 | 2 | 16 | C1211T | P404L |
| R9 | 4 | 32 | C974T | T325I |
| Rough | | | | |
| CIP104536 (R) | 0.125 | - | - | - |
| R10 | 2 | 32 | G1653del, A1654del, C1656del | L551F, I552del |
| R11 | 4 | 32 | C974T | T325I |
| R12 | 4 | 32 | G1653C | L551F |
| R13 | 4 | 32 | T1640G | V547G |
| R14 | 2 | 16 | C974T | T325I |
| R15 | 4 | 32 | C974T | T325I |
| R16 | 2 | 16 | G1653C | L551F |
| R17 | 2 | 16 | C974T | T325I |
| R18 | 2 | 16 | G1653C | L551F |
| R19 | 0.5 | 4 | G1152A | M384I |
| R20 | 2 | 16 | C974T | T325I |
| R21 | 1 | 8 | G1849T | V617F |
| R22 | 2 | 16 | G1849T | V617F |
| R23 | 4 | 32 | (G939-T944)del | (M313-L314)del |

MIC ($\mu\text{g/ml}$) were determined in Cation-adjusted Mueller-Hinton broth. Resistant strains were derived from either *M. abscessus* CIP104536 S or R parental strains in several independent experiments. Single nucleotide polymorphism identification in *MAB_4508* and corresponding amino acid changes are also indicated.

two resistors (R1 and R2) were isolated, exhibiting 64- and 32-fold increased resistance levels (MICs of 8 and 4 $\mu\text{g/ml}$) as compared to the parental strain, respectively (Table 2). Whole-genome sequencing, followed by comparative analysis of the sequences with the parental strain, identified a single nucleotide polymorphism (SNP) in *MAB_4508* in both resistors. In R1, a G925C was found, resulting in an amino acid replacement at position 309 (A309P) whereas in R2 another SNP (T779C) occurred, leading to an amino acid change at position 260 (L260P). Subsequent isolation of PIPD1-resistant mutants using either the S or the R parental strains led to the selection of 21 additional resistors (R3 to R9 for smooth mutants and R10 to R23 for rough mutants), all characterized by MIC upshifts ranging from 4- to 64-fold for PIPD1 (Table 2). In all strains (23/23), PCR and sequencing led to the identification of additional SNPs or indels within *MAB_4508*. Most amino acid changes occurred at position L551 (6/23 strains), either by a Ser (R3 and R4) or a Phe (R12, R16, R18 and R10 that carries also a deletion of the adjacent I552 residue). The T325I mutation was also found to occur at a high frequency (6/23 strains) in both the S variant (R9) and R variant (R11, R14, R15, R17 and R20). The V617F

mutation was found in two strains (R21 and R22). In addition, several missense mutations were found in single resistant strains, including R11P (R5), V613A (R6), P404L (R8), G547G (R13), M384I (R19). R7 possesses two SNPs (G939A/A1846T) resulting in the introduction of a double M313I/I616F point mutation whereas R23 was characterized by a 6-bp deletion leading to the loss of the M313/L314 dipeptide but keeping conserved the downstream amino acid sequence (Table 2). A comparison of growth of different resistant strains on agar plates containing increasing concentrations of PIPD1 is shown in Supporting Information Fig. S2. Whereas PIPD1 abrogated growth of the parental S and R strains, growth of all four resistant mutants tested harboring A309P, L260P, L551F/I552del and V547G mutations was sustained even at 6.25 $\mu\text{g/ml}$ (50X MIC), further confirming that mutations in *MABS_4508* confer high resistance levels to PIPD1.

Genetic validation of *MAB_4508* as the target of PIPD1

To validate *MAB_4508* as a specific target of PIPD1, several *MAB_4508* alleles were cloned under the control of the constitutive *hsp60* promoter to allow

Table 3. MIC of PIPD1, amikacin and imipenem against *M. abscessus* S strains overexpressing several MAB_4508 variants.

| | pMV261 | pMV261_4508 | pMV261_4508 (T325I) | pMV261_4508 (V547G) | pMV261_4508 (L551F) | pMV261_4508 (V617F) |
|-----------------|--------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| PIP1D1 | 0.125 | 0.125 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| MIC fold change | 1 | 1 | 16 | 16 | 8 | 16 |
| Amikacin | 64 | 64 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| Imipenem | 8 | 16 | 8 | 8 | 8 | 16 |

Bacteria were transformed with either the empty pMV261 or the pMV261_4508 derivatives under the control of the *hsp60* promoter. MIC (in $\mu\text{g/ml}$) was determined in Cation-adjusted Mueller-Hinton broth.

overexpression of the wild-type or mutated versions of the protein in *M. abscessus*. Whereas overproduction of the wild-type protein failed to result in increased MIC values as compared to the control strain carrying the empty pMV261, overexpression of four mutated proteins carrying the T325I, V547G, L551F or V617F mutations resulted in 8- to 16-fold increased resistance levels (Table 3). The effect was specific to PIPD1 as the MIC of amikacin or imipenem against the same recombinant strains were comparable (Table 3). This indicates that transferring the single point mutations identified in the PIPD1 spontaneous resistant mutants to a susceptible strain is sufficient to confer resistance to PIPD1.

PIP1D1 inhibits mycolic acid transport in M. abscessus

Preliminary amino acid alignments suggested that MAB_4508 belongs to one of the most important transporter families, the MmpL proteins, members of the resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily (Domenech *et al.*, 2005). The possible relationship and function of MAB_4508 with the *M. tuberculosis* MmpL homologues was analyzed by primary sequences comparison and phylogeny analysis (Supporting Information Fig. S3). MAB_4508 is the most related homologue of MmpL3 sharing 63% and 60% of identity with MmpL3 from *M. tuberculosis* (Rv0206c) and *M. smegmatis* (MSMSEG_0250), respectively. MmpL3 represents the only essential MmpL member in *M. tuberculosis* (Domenech *et al.*, 2005) and in *M. smegmatis* (Varela *et al.*, 2012) and has been shown to translocate trehalose-monomycolate (TMM) across the plasma membrane (Varela *et al.*, 2012)(Grzegorzewicz *et al.*, 2012). This identification prompted us to investigate the mechanism of action by PIPD1 through metabolic labeling with [1,2- ^{14}C]acetic acid of untreated and PIPD1-treated cultures in order to monitor (glycol)lipid synthesis. When applied at concentrations of up to 50X MIC (6.25 $\mu\text{g/ml}$), PIPD1 had no effect on *de novo* mycolic acid biosynthesis (Fig. 3A and 3D). However, following apolar lipid extraction and their subsequent separation by TLC, a clear dose-dependent inhibition of trehalose dimycolate

(TDM) was observed concomitantly with a dose-dependent accumulation of TMM (Fig. 3B and 3D), the latter being the substrate of MmpL3 for the transport of mycolic acids onto the mycobacterial surface where TDM is formed. To test whether PIPD1 treatment also impacts arabinogalactan (AG) mycolylation, radiolabeled mycolic acids were extracted from delipidated bacteria (Grzegorzewicz *et al.*, 2012). The dose-dependent inhibition of [1,2- ^{14}C] acetic acid incorporation suggests that PIPD1, by its effect on mycolated transport, indirectly inhibits AG mycolylation characterized by a pronounced decrease of both forms of cell wall-bound mycolic acids (α and α') (Fig. 3C and 3D). α - and α' -mycolic acids correspond to long-chain (C_{77-79}) and short-chain (C_{62-64}) mycolic acids in *M. abscessus* (Fig. 3F). Importantly, both the strain overproducing the MAB_4508(L551F) and the spontaneous mutant bearing the MAB_4508(L551S) allele and expressing high resistance levels to PIPD1, were more refractory to the inhibition of TMM transport and to inhibition of AG mycolylation as compared to the control strain (Fig. 3E). Overall, this underlines a unique mode of action resulting in the abolition of mycolic acid translocation from the cytoplasm, where they are synthesized, to the periplasmic side of the plasma membrane for subsequent use in the formation of the virulence-associated outer membrane trehalose-containing glycolipids or transfer onto the essential cell wall AG.

Mapping the resistance mutations on a structural model unravels a potential drug-binding pocket

To get structural insights into the mechanism conferring resistance to PIPD1, the various mutations identified in the resistant strains were mapped on a topology prediction model. Interestingly, whereas the mutations were scattered throughout the whole peptide sequence nearly all, except R11P and M384I, were located inside transmembrane (TM) helices, notably L260P in TM4, A309P and M313I in TM5, T325I in TM6, P404L in TM7, V547G and L551S in TM8, whereas three mutations (V613A, I616F and V617F) were in TM10 (Fig. 4A). We and others

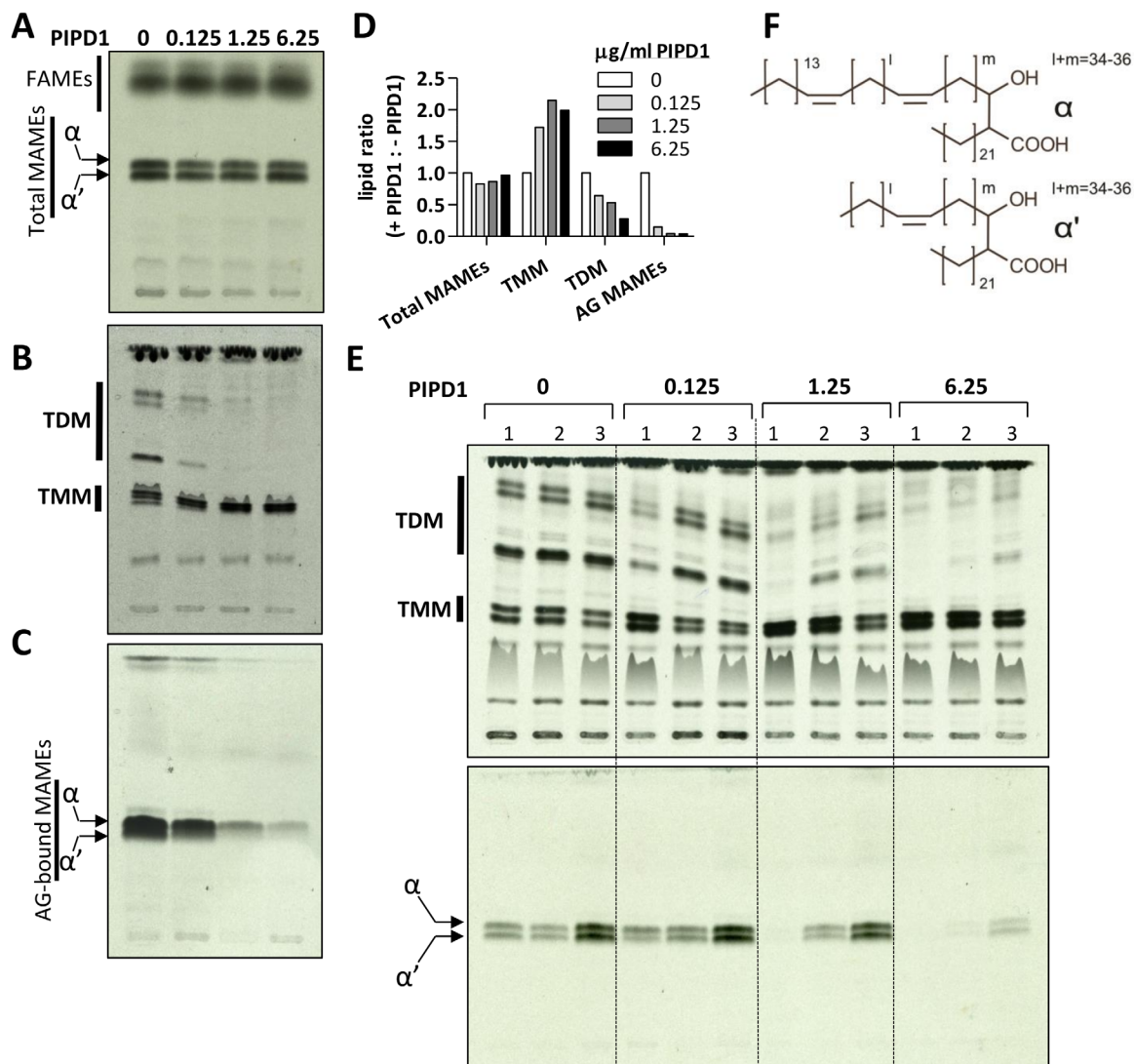


Fig. 3. Effect of PIPD1 on mycolic acid transfer in *M. abscessus*. Exponentially growing *M. abscessus* S was incubated with increasing concentrations of PIPD1 and labeled with ^{14}C -acetate. A. Equal counts (100, 000 cpm) of total mycolic acid methyl esters (MAME) and fatty acid methyl esters (FAME) were loaded and resolved on a 1D TLC plate using petroleum ether/acetone (95:5, v/v). B. Apolar and polar fractions were extracted and equal counts of the apolar fraction were loaded and TMM and TDM were visualized using chloroform/methanol/water (40:8:1, v/v/v). C. Equal volumes of radiolabeled MAMES extracted from delipidated cells were loaded and α and α' mycolic acids were separated using petroleum ether/acetone (95:5, v/v). D. Histogram plots obtained from the densitometric analysis of the TLC shown in A–C. The histograms depict the ratio of lipid observed for treated samples (0.125–6.25 $\mu\text{g/ml}$ PIPD1) to the untreated sample. E. Upper panel. Autoradiograph of a TLC obtained with equal counts (100, 000 cpm) of the apolar lipid fractions from 1 - *M. abs* S pMV261, 2 - *M. abs* S pMV261-*MAB_4508*(L551F) or 3 - *M. abs* S PIPD1-resistant mutant R4 (carrying the L551S mutation), treated as in A. Lower panel. The corresponding MAME profile is shown (50,000 cpm per lane). F. Structure of *M. abscessus* α and α' mycolic acids.

recently reported three-dimensional (3D) homology models of MmpL proteins, including MmpL3 from *M. tuberculosis* (Sandhu and Akhter, 2015) (Bernut *et al.*, 2016). This prompted us to generate a homology model of MAB_4508 in order to gain access to spatial information that may be relevant in linking these mutations with drug resistance and functional activity of the transporter. Unex-

pectedly, among the twelve mutations identified previously, eight were in close vicinity (Fig. 4B). The side chains of these residues in M313/A309 in TM5, V547/L551 in TM8, V613/I616/V617 in TM10 and, to a lesser extent T325 in TM6, are facing each other (Fig. 4B).

Interestingly, the surface representation of the 3D model unraveled a potential large cavity formed by

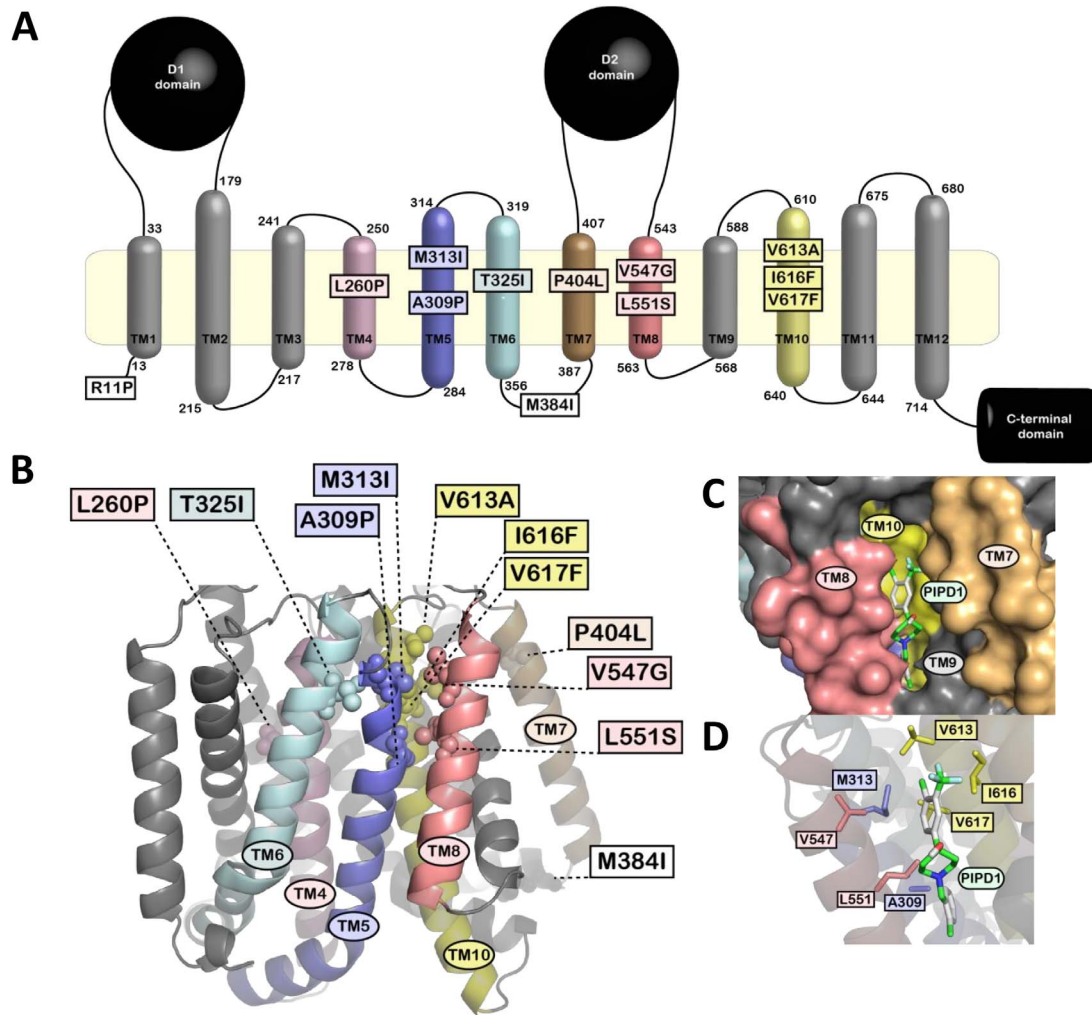


Fig. 4. Mapping the mutations conferring resistance to PIPD1 on MAB_4508 predictive structural models.

A. The soluble D1 and D2 and C-terminal domains are represented as black spheres or as a cylinder respectively. The twelve predicted transmembrane helices (TM1 to TM12) are represented as cylinders with the coloured ones bearing the resistance mutations to PIPD1. The identity of each mutation is reported in a coloured rectangle.

B. Clusterization of the mutations on a 3D homology model centered on the MAB_4508 TM region. Only the TM helices are represented. The colour code is the same as in A. Each mutation is indicated in the coloured rectangle and the side chains of the mutated residue are represented as spheres.

C. Surface representation and docking of PIPD1 in MAB_4508. PIPD1 is represented in sticks.

D. Side-chains of the mutated residues defining the putative PIPD1-binding pocket are represented by sticks.

residues from the TM5, TM7, TM8, TM9 and TM10 helices. Whether the seven mutations described above could define this cavity as a putative PIPD1-binding pocket was next investigated. In agreement with this hypothesis, docking experiments suggested that this cavity could easily accommodate PIPD1 without generating steric hindrance with any of the surrounding residues (Fig. 4C and 4D). Although care should be taken with interpretation of these structural observations, which are strictly based on a homology model, it is tempting to speculate that the PIPD1 resistance mutations in TM5, TM6, TM8 and TM10 may alter binding of PIPD1 to this pocket, resulting in the loss of TMM transport inhibition.

Discussion

M. abscessus is notorious for being one of the most drug resistant mycobacterial species for which treatment options remain highly challenging (Nessar *et al.*, 2012). Given the lack of new active molecules, recent studies have explored the possible synergy of already existing drug combinations against *M. abscessus* (Maurer *et al.*, 2014) or with the aim of repurposing old drugs (Singh *et al.*, 2014). Whole-cell phenotypic screening has been validated as an efficient method for the identification of novel structural classes of antimicrobials and proven to be more effective to generate lead compounds than

rational drug-design strategies (Payne *et al.*, 2007). Herein, we carried out a phenotypic screen on whole *M. abscessus* with a validated chemical series highly active against *M. tuberculosis* (Ballell *et al.*, 2013) and describe a new structural class of piperidinol compounds exhibiting promising activity against *M. abscessus*. That *M. abscessus* is refractory to most anti-TB drugs was confirmed here since only one candidate out of the 177 hits active against *M. tuberculosis* exhibited a very low MIC. Nevertheless, this study validates the usefulness of integrating data obtained during previous TB drug discovery campaigns to directly identify new chemotypes with strong activity against *M. abscessus* without initiating chemical screens *de novo*. This method could also be successfully applied for the search of active compounds against other NTM.

PIPD1 was also extremely active against a vast panel of clinical strains exhibiting different susceptibility profiles to cefoxitin, amikacin, imipenem and clarithromycin, regardless of whether they were isolated from CF or non-CF patients. Its efficacy was also independent on the bacterial morphotype and on the *M. abscessus* subspecies. This is of particular interest since *M. abscessus*, *M. massiliense* and *M. bolletii* infections are known to exhibit different drug sensitivity test results, responses to antibiotics and clinical symptoms (Koh *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2012). PIPD1 displays also appreciable activity not only against intracellular *M. abscessus*, but also significantly reduced the bacterial burden and the pathological symptoms in zebrafish and decreased larval mortality. Currently, we are synthesizing structural analogues of PIPD1 to develop derivatives with increased *in vivo* potency and improved pharmacological properties which would be more favorable for prolonged time exposures to the infected embryos.

Whole-genome sequencing of *in vitro*-selected mutants resistant to PIPD1 identified 12 amino acid replacements in *MAB_4508*, encoding the mycolic acid transporter of *M. abscessus*. Consistent with these findings, PIPD1 failed to inhibit mycolic acid biosynthesis but instead inhibited the translocation of TMM. This results in the abolition of TDM formation as well as the subsequent transfer onto AG, reflecting most likely the inaccessibility for the intracellularly generated TMM to the Ag85 family of mycolyltransferases (Belisle *et al.*, 1997), in a manner similar to the adamantyl-urea AU1235 (Grzegorzewicz *et al.*, 2012) or SQ109 (Tahlan *et al.*, 2012). The mode of action of PIPD1 is distinct from the one of tetrahydropyrazol-derived carboxamide (THPP), recently shown to inhibit mycolic acid biosynthesis rather than transport (Cox *et al.*, 2016), despite the fact that multiple mutations in MmpL3 conferred resistance to this inhibitor (Remuiñán *et al.*, 2013).

Mining the *M. abscessus* genome database revealed the presence of an extensively over-represented family comprising at least 29 putative MmpL members (data not shown). MmpL proteins belong to the resistance, nodulation and division (RND) family of membrane transporters (Domenech *et al.*, 2005) and are known to mediate the transport of a wide variety of substrates across the cell membranes and are considered as key virulence factors (Domenech *et al.*, 2005; Bernut *et al.*, 2016) of which major efflux pumps represent the most well-studied bacterial members (Murakami, 2008). Thanks to homology to RND efflux pumps (Bolla *et al.*, 2014), a 3D model of MAB_4508 was built, which allowed us to (i) position the various mutations identified in the PIPD1-resistant strains and to (ii) unravel a yet undiscovered cavity which could greatly accommodate PIPD1, based on docking studies. This cavity may also accommodate other recently described MmpL3 drug candidates as some of the reported mutations conferring resistance to these drugs are in the close neighbourhood of our mutations (data not shown). This hypothesis may explain the very large diversity of compounds targeting MmpL3. Indeed, multiple chemotypes have recently been shown to inhibit MmpL3 which currently represents one of the most promising anti-tubercular drug targets (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; La Rosa *et al.*, 2012; Tahlan *et al.*, 2012; Lun *et al.*, 2013; Remuiñán *et al.*, 2013; Cox *et al.*, 2016). Interestingly, the N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] reported to inhibit MmpL3 in *M. tuberculosis* (Remuiñán *et al.*, 2013) and present among the 177 potent non-toxic hits against *M. tuberculosis* (Ballell *et al.*, 2013) was inactive against *M. abscessus* (data not shown). This indicates that one cannot predict *M. tuberculosis* MmpL3 inhibitors to be specific for *M. abscessus*. However, our results indicate that MAB_4508 can be viewed as an attractive drug target to be further exploited against *M. abscessus* and presumably also against other NTM.

From a functional perspective, this model puts forward the attractive hypothesis that binding of PIPD1 in that cavity may disturb the important and well conserved residues in MmpL proteins previously proposed to participate in the proton motive force (PMF) which supplies the energy for substrate transport (Bernut *et al.*, 2016). Interestingly, V613, I616 and V617 in TM10, that are part of the putative PIPD1-binding cavity, are located in the same spatial vicinity as the PMF-driven D625 and Y626 residues in TM10 whose side chains are facing the other PMF essential residue D265 in TM4 (Bernut *et al.*, 2016) (Supporting Information Fig. S4). Binding of PIPD1 may thus destabilize key structural elements and/or arrangements that are required for the proton relay (Bernut *et al.*, 2016). This may subsequently abolish the PMF and the transport of TMM across the

membrane. This uncoupling effect has recently been reported for several anti-tubercular drugs targeting MmpL3 (Feng *et al.*, 2015). However, ultimate confirmation of the existence of the PIPD1-binding pocket and whether this binding directly interferes with the transmembrane electrochemical proton gradient awaits the elucidation of the structure of MAB_4508/MmpL3 and establishment of a functional assay.

In summary, PIPD1 represents the first example of a new and very promising molecular scaffold altering the mycolic acid profile of mycobacteria intrinsically resistant to isoniazid, a major anti-TB drug inhibiting mycolic acid biosynthesis. This indicates that targeting the transport of mycolic acids rather than its biosynthesis, has serious translational potential for development into a real tool for *M. abscessus* treatment and control.

Experimental procedures

Synthesis of 4-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-ol

PIPID1 was synthesized according to the method described earlier (Hutchinson *et al.*, 2006), with slight modifications as reported in the Supplementary information.

Bacterial strains

M. abscessus CIP104536^T, *M. boletii* CIP108541^T and *M. massiliense* CIP108297^T reference strains were used along with a series of clinical isolates reported previously (Singh *et al.*, 2014). Strains were routinely grown and maintained at 30°C in Middlebrook 7H9 broth (BD Difco) supplemented with 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich) and 10% oleic acid, albumin, dextrose, catalase (OADC enrichment; BD Difco) (7H9^{T/OADC}) or on Middlebrook 7H10 agar (BD Difco) containing 10% OADC enrichment (7H10^{OADC}). Media were supplemented with 500 µg/ml hygromycin when transformed with pTEC27 (Addgene, plasmid 30182) for tdTomato expression or with 200 µg/ml kanamycin when transformed with the pMV261 derivatives. For drug susceptibility testing, cultures were grown in Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CaMHB; Sigma-Aldrich).

Drug susceptibility testing

The MIC were determined according to the CLSI guidelines (Woods, *et al.*, 2011). The broth microdilution method was used in CaMHB with an inoculum of 5×10^6 CFU/ml in the exponential growth phase. One-hundred microlitres of drug dilutions were added to 100 µl of bacterial suspension and incubated at 30°C for 3–5 days at 30°C. MICs were recorded by visual inspection and by absorbance at 560 nm to confirm visual recording. Experiments were done in triplicate in three independent occasions. Drug susceptibility of other bacterial pathogens was determined using the resazurin-based microtitre assay (Palomino *et al.*, 2002). Log-phase cultures were

diluted 1/10 in CaMHB at concentrations from 1 to 5×10^6 bacteria/ml. 100 µl of the bacterial suspensions was added in 96-well plates containing 100 µl of CaMHB with or without PIPD1 at a starting concentration of 250 µg/ml for Gram positive and Gram negative bacteria and 50 µg/ml for mycobacteria. A volume of 10 µl of resazurin (0.025% w/v) was added to each well and bacterial viability was assessed after 18–24 h of incubation for gram positive and gram negative bacteria and up to 7 days for mycobacteria by colorimetric reading and comparison with resazurin turnover in the absence of compound.

The minimum bactericidal concentrations (MBC) based on CFU enumerations were determined as follows. Briefly, microtiter plates were set up as for MIC determination and serial dilutions of the bacterial suspension exposed to the various drug concentrations were plated at 30°C for 4–5 days prior to bacterial enumeration and compared to the initial bacterial inoculum. The MBC was defined as the minimal drug concentration responsible for the killing of 99% of CFU obtained from two independent experiments. Kill kinetics were performed by monitoring the CFU at various time points and incubation at 30°C. Each determination was done in triplicate.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated using J774 macrophages grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium with GlutaMAXTM (Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum (DMEM^{FBS}). Cells were seeded in 96-well flat-bottom culture microplates at 1×10^5 cells/well and incubated overnight at 37°C in the presence of 5% CO₂ to allow cells to adhere. The medium was removed and replaced by 180 µl of fresh medium containing PIPD1 at two different concentrations (3 µg/ml, >24X MIC and 6 µg/ml, >48X MIC). Cells were then incubated for a further 48 h before 20 µl of Cell-Titer Blue Reagent (Promega) was added to each well and the cells were incubated for another 2 h at 37°C with 5% CO₂. OD₅₆₀ was recorded using a microplate reader. Percentage of cell survival was determined considering the control wells (cells incubated in DMSO-containing medium). Toxicity was considered significant when the cell survival was greater than 50%. Experiments were performed three times independently.

Intramacrophage killing assay

J774 macrophage cell lines were grown in DMEM^{FBS} and seeded 1×10^4 cells/well in 12-well flat-bottom culture microplates and incubated overnight at 37°C in the presence of 5% CO₂. THP-1 were grown in RPMI^{FBS} and differentiated with 20 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) in 12-well flat-bottom tissue culture microplates (1×10^5 cells/well) and incubated for 48 h at 37°C. Cells were infected with an MOI of 1:8 for J774 macrophages and 1:2 for THP-1 cells and incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 2 h. Wells were carefully washed three times with 1X PBS and DMEM^{FBS} (or RPMI^{FBS}) supplemented with 200 µg/ml amikacin to prevent extracellular bacterial growth, re-incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 1 h, washed again three times with PBS prior the addition of

1 ml of DMEM^{FBS} (or RPMI^{FBS}) supplemented with either 50 µg/ml amikacin alone (negative control of intracellular activity), amikacin plus 6 µg/ml PIPD1 or amikacin plus 80 µg/ml imipenem. At various time points, cells were washed three times with PBS and lysed by adding 100 µl of 1% Triton X100. Cell lysis was stopped by adding 900 µl PBS and serial dilutions were plated to monitor the intracellular bacterial counts. As non-treated cells were also counted under the microscope, a normalization of CFU/cells was done. Experiments were done three times independently.

Zebrafish drug treatment

All zebrafish experiments were done according to the Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale de la Région Languedoc Roussillon under the reference CEEALR36-1145. Experiments were performed using the *golden* mutant (Lamason *et al.*, 2005). Zebrafish embryos were obtained and maintained as described (Bernut *et al.*, 2014a). Ages of the embryos are expressed as hours post fertilization (hpf). Fluorescent *M. abscessus* CIP108297^T (R) expressing tdTomato were prepared and injected according to procedures described earlier (Bernut *et al.*, 2015). Briefly, infections were carried out by microinjection of bacterial suspensions (2 nL containing ≈100 bacteria) into the caudal vein of 30 hpf embryos previously dechorionated and anesthetized with tricaine. The inoculum size was checked *a posteriori* by injection of 2 nL in sterile PBS^T and plated on 7H10^{OADC}. To follow infection kinetics and embryo survival, infected embryos were transferred into 24 well plates (2 embryos/well) and incubated at 28.5°C. Survival curves were performed by counting dead larvae every day for up to 8 days when control embryos started to die. PIPD1 treatment (at 3 µg/ml in osmotic water) of infected embryos and uninfected embryos (used as negative controls of toxicity) was started 24 hpi for 3 days. The drug-containing solution was renewed every day. At the end of the treatment, embryos were washed three times with osmotic water. Fluorescence Pixel Count (FPC) measurements were used to evaluate the bacterial loads on live embryos, as reported earlier (Bernut *et al.*, 2015). All experiments were done at least three times independently.

Microscopy

To quantify bacterial loads and abscesses, infected larvae were tricaine-anesthetized, embedded in 1% low-melting-point agarose on dishes and covered with water supplemented with tricaine. Pictures of live infected larvae were acquired with a Zeiss microscope equipped with a Zeiss Plan Neo Fluor Z 1x/0.25 FWD objective and an Axio-cam503 monochrome camera (Zeiss) by using ZEN 2 software. Overlays of fluorescent and bright-field images were processed and assembled using GIMP freeware. To determine the percentage of infected THP-1 cells, pictures of live infected macrophages were obtained using an EVOSTMfl inverted fluorescence microscope equipped with a High-sensitivity monochrome camera. Overlays of fluorescent and bright-field images were processed and assembled.

Selection of resistant *M. abscessus* mutants

Exponentially growing *M. abscessus* cultures were plated on 7H10^{OADC} containing 6 µg/ml PIPD1. After 1 week of incubation at 30°C, single colonies were selected and grown in liquid medium and individually assessed for MIC determination and scored for resistance to PIPD1 (Supporting Information Table S3).

Whole genome sequencing and target identification

DNA libraries were prepared for the Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) platform using the Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) following the manufacturer's recommendations. Index have been introduced to allow multiplexed sequencing. Quality and quantity for each library have been checked with the Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc., Ames, IA). A 125 bp single read run was performed and a coverage of around 100x for each genome was obtained. SNP identification was performed using an in-house sequence analysis pipeline, as previously described (Boritsch *et al.*, 2016). Identification of SNPs in the resistant strains was done by PCR amplification using MAB_4508seq1 and MAB_4508seq7 (Supporting Information Table S4) to produce a 3549 bp amplicon to gain full coverage sequencing of the *MAB_4508* gene. SNPs were confirmed by at least two independent sequencing reactions.

DNA constructs

All plasmids and primers used in this study are listed with relevant details in Supporting Information Tables S3 and S4 respectively. *MAB_4508* was PCR amplified using purified genomic DNA of *M. abscessus*, Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Finland) and the primers MAB_4508f and MAB_4508r. The amplicon was digested with HindIII and ligated to MscI/HindIII linearised pMV261 (Stover *et al.*, 1991), allowing expression of *MAB_4508* under the control of the constitutive *hsp60* promoter. Following the same strategy, but using genomic DNA of PIPD1-resistant isolates R11, R12, R13 and R21 as original template DNA in the PCR reaction, pMV261-MAB_4508 constructs were created in which the *MAB_4508* mutations T315I, L551F, V547G and V617F were present respectively. All constructs were verified by sequencing.

Whole-cell radiolabeling experiments and lipid analysis

For visualizing drug-induced changes in the lipid profile, increasing drug concentrations of PIPD1 were added to exponentially-growing cultures for 1 h and metabolic labeling of lipids was performed by adding 1 µCi/ml of [2-¹⁴C]acetate (56 mCi/mmol, Amersham Biosciences) for an additional 2 h at 37°C. Cells were harvested and delipidated as described (Kremer *et al.*, 2002). The apolar lipid fraction containing TMM and TDM was separated on a 1D TLC plate using the chloroform/methanol/water (40:8:1, v/v/v) and revealed after exposure to a film. Delipidated cells were further processed to extract the mycolic acids (Coxon *et al.*, 2013) and

analyzed by TLC/autoradiography using petroleum ether/acetone (95:5, v/v) and exposure to a film to reveal [¹⁴C]-labeled mycolic acid methyl esters.

Homology modeling and docking studies

The two-dimensional topology prediction of MAB_4508 was made according to the 3D model and available information from the literature (Chim *et al.*, 2015) defining the D1 and D2 periplasmic domains. The tridimensional homology model of MAB_4508 was performed using the Phyre2 program (Kelley *et al.*, 2015) using the crystal structure of *Neisseria gonorrhoeae* MtrD as template (Bolla *et al.*, 2014), as reported earlier (Bernut *et al.*, 2016). PIPD1 docking studies were carried out with the AutoDock Vina software (Trott and Olson, 2010) by centering the docking search on a cavity in the vicinity of A309, M313, V547, L551, V613, I616 and V617 defined with a grid dimension of 40 × 50 × 70 points. Docking was made keeping the amino acids side chains rigid and the ligand flexible. Three ligand conformations were found to fit into the cavity but only one is shown in Fig. 4. The ligand and receptor were prepared with the AutoDockTools software (Morris *et al.*, 2009).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed on Prism 5.0 (Graphpad) and detailed for each figure legend. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

Acknowledgements

The authors would like to thank Shubhra Singh for help with initial screening, Laure Papin for the kindly gift of THP1 cells, Laurence Ma for valuable technical assistance and GSK for the generous gift of the chemical library. CB and FD are indebted to the Research Federation FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the technical environment conducive to achieving this work. This study was supported by the French National Research Agency (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) (DIMYVIR ANR-13-BSV3-0007-01). We wish also to thank the Association Gregory Lemarchal and Vaincre La Mucoviscidose (RF20130500835) for funding CD and the InfectioPôle Sud for funding AV. LK and RB acknowledge the support by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (DEQ20150331719 and DEQ20130326471). This study was funded by grant from the Université de Lille1 (Bonus Qualité Recherche) to FD. The authors have not conflict of interest to declare.

References

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.

Ballell, L., Bates, R.H., Young, R.J., Alvarez-Gomez, D., Alvarez-Ruiz, E., Barroso, V., *et al.* (2013) Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis. *ChemMedChem* **8**: 313–321.

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.

Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420–1422.

Bernut, A., Herrmann, J.-L., Kissa, K., Dubremetz, J.-F., Gaillard, J.-L., Lutfalla, G., and Kremer, L. (2014a) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E943–952.

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., 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* **103**: e53130.

Bernut, A., Viljoen, A., Dupont, C., Sapriel, G., Blaise, M., Bouchier, C., *et al.* (2016) Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Mol Microbiol* **99**: 866–883.

Bolla, J.R., Su, C.-C., Do, S.V., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Long, F., *et al.* (2014) Crystal structure of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrD inner membrane multidrug efflux pump. *PLoS One* **9**: e97903.

Boritsch, E.C., Frigui, W., Cascioferro, A., Malaga, W., Etienne, G., Laval, F., *et al.* (2016) *pks5*-recombination-mediated surface remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* emergence. *Nat Microbiol* **1**: 15019.

Brown-Elliott, B.A., and Wallace, R.J. (2002) Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **15**: 716–746.

Byrd, T.F., and Lyons, C.R. (1999) Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* **67**: 4700–4707.

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.

Chim, N., Torres, R., Liu, Y., Capri, J., Batot, G., Whitelegge, J.P., and Goulding, C.W. (2015) The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **22**: 1098–1107.

Choo, S.W., Wee, W.Y., Ngeow, Y.F., Mitchell, W., Tan, J.L., Wong, G.J., *et al.* (2014) Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus* reveals high evolutionary potential. *Sci Rep* **4**: 4061.

- Cox, J.A.G., Abrahams, K.A., Alemparte, C., Ghidelli-Disse, S., Rullas, J., Angulo-Barturen, I., et al. (2016) THPP target assignment reveals EchA6 as an essential fatty acid shuttle in mycobacteria. *Nat Microbiol* **1**: 15006.
- Coxon, G.D., Craig, D., Corrales, R.M., Vialla, E., Gannoun-Zaki, L., and Kremer, L. (2013) Synthesis, anti-tubercular activity and mechanism of resistance of highly effective thiacetazone analogues. *PLoS One* **8**: e53162.
- Domenech, P., Reed, M.B., and Barry, C.E. (2005) Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infect Immun* **73**: 3492–3501.
- Feng, X., Zhu, W., Schurig-Briccio, L.A., Lindert, S., Shoen, C., Hitchings, R., et al. (2015) Anti-infectives targeting enzymes and the proton motive force. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: E7073–7082.
- 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: executive summary. *Thorax* **71**: 88–90.
- Griffith, D.E., Girard, W.M., and Wallace, R.J. (1993) Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* **147**: 1271–1278.
- Grzegorzewicz, A.E., Pham, H., Gundi, V.A.K.B., Scherman, M.S., North, E.J., Hess, T., et al. (2012) Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol* **8**: 334–341.
- Harada, T., Akiyama, Y., Kurashima, A., Nagai, H., Tsuyuguchi, K., Fujii, T., et al. (2012) Clinical and microbiological differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* lung diseases. *J Clin Microbiol* **50**: 3556–3561.
- Henkle, E., Hedberg, K., Schafer, S., Novosad, S., and Winthrop, K.L. (2015) Population-based incidence of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in Oregon 2007 to 2012. *Ann Am Thorac Soc* **12**: 642–647.
- Howard, S.T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., et al. (2006) Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**: 1581–1590.
- Hutchinson, A.J., Chenard, B.L., Li, G., Gosh, M., Tarrant, J.G., Yoon, T., et al. (2006) Preparation of aryl-substituted piperazine derivatives as MCH modulators. Assignee: Neurogen Corporation, USA Jan 12, 2006 US 20060009456 A1.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10**: 845–858.
- Koh, W.-J., Jeon, K., Lee, N.Y., Kim, B.-J., Kook, Y.-H., Lee, S.-H., et al. (2011) Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 405–410.
- Kremer, L., Guérardel, Y., Gurcha, S.S., Loch, C., and Besra, G.S. (2002) Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology* **148**: 3145–3154.
- La Rosa, V., Poce, G., Canseco, J.O., Buroni, S., Pasca, M.R., Biava, M., et al. (2012) MmpL3 is the cellular target of the antitubercular pyrrole derivative BM212. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 324–331.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.-A.P.K., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., et al. (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* **310**: 1782–1786.
- Lobo, L.J., Chang, L.C., Esther, 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.
- Lun, S., Guo, H., Onajole, O.K., Pieroni, M., Gunosewoyo, H., Chen, G., et al. (2013) Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* **4**: 2907.
- Marras, T.K., Chedore, P., Ying, A.M., and Jamieson, F. (2007) Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997–2003. *Thorax* **62**: 661–666.
- Maurer, F.P., Bruderer, V.L., Ritter, C., Castelberg, C., Bloemberg, G.V., and Böttger, E.C. (2014) Lack of antimicrobial bactericidal activity in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 3828–3836.
- Mirsaeidi, M., Farshidpour, M., Allen, M.B., Ebrahimi, G., and Falkinham, J.O. (2014) Highlight on advances in non-tuberculous mycobacterial disease in North America. *Biomed Res Int* **2014**: 919474.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**: 2785–2791.
- Murakami, S. (2008) Multidrug efflux transporter, AcrB—the pumping mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 459–465.
- 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.
- Palomino, J.-C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., and Portaels, F. (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2720–2722.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., and Pompliano, D.L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 29–40.
- Phillely, J.V., Wallace, R.J., Benwill, J.L., Taskar, V., Brown-Elliott, B.A., Thakkar, F., et al. (2015) Preliminary results of bedaquiline as salvage therapy for patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. *Chest* **148**: 499–506.
- Remuñán, M.J., Pérez-Herrán, E., Rullás, J., Alemparte, C., Martínez-Hoyos, M., Dow, D.J., et al. (2013) Tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide and N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* targeting MmpL3. *PLoS One* **8**: e60933.
- 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.
- Sandhu, P., and Akhter, Y. (2015) The internal gene duplication and interrupted coding sequences in the MmpL genes

- of *Mycobacterium tuberculosis*: towards understanding the multidrug transport in an evolutionary perspective. *Int J Med Microbiol* **305**: 413–423.
- Singh, S., Bouzinbi, N., Chaturvedi, V., Godreuil, S., and Kremer, L. (2014) *In vitro* evaluation of a new drug combination against clinical isolates belonging to the *Mycobacterium abscessus* complex. *Clin Microbiol Infect* **20**: O1124–1127.
- Stover, C.K., De la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., *et al.* (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**: 456–460.
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., *et al.* (2012) SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1797–1809.
- Trott, O., and Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **31**: 455–461.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., *et al.* (2012) MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chem Biol* **19**: 498–506.
- Woods, G.L., Brown-Elliott, B.A., Conville, P.S., Desmond, E.P., Hall, G.S., Lin, G., *et al.* (2011) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae and Other Aerobic Actinomycetes: Approved Standard*. Second Edition. M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Figure S1. Intramacrophage activity of PIPD1. The activity on intracellular *M. abscessus* was tested in J774 macrophages at 37°C. Cells were infected with *M. abscessus* CIP 10453 at an MOI of 1:8 and treated with amikacin (50 µg/

ml) to kill extracellular bacteria in the presence of imipenem at 80 µg/ml (20 X MIC) or PIPD1 at 6 µg/ml (48 X MIC). CFU were determined after 24 and 48 hrs post-treatment for J774 cells (left panel). The number of CFU/macrophage is shown in the right panel. The experiment was performed in triplicate and results are representative of three independent experiments. Results are expressed as mean values ± SEM *p<0.05, ***p<0.001 using the Mann Whitney test. Experiments were performed in triplicate and results are representative of three independent experiments.

Figure S2. Drug susceptibility phenotypes of *M. abscessus*. One microliter of tenfold serially diluted bacterial suspension of exponentially growing cultures wild-type and resistant strains (R1 and R2 derived from the S variant, R10 and R13 derived from the R background) were spotted on Middlebrook 7H10 plates in the absence or presence of PIPD1 (3.1 and 6.2 µg/ml). Plates were incubated at 37°C for 5 days.

Figure S3. Phylogenetic tree of MmpL proteins. The tree comprises all *M. tuberculosis* MmpL proteins, including MmpL3 from *M. smegmatis* (MSMEG_0250) and MAB_4508. The tree was calculated with ClustalX with the neighbor joining method, followed by a bootstrap analysis and rooted with the *E. coli* AcrB efflux pump.

Figure S4. The putative PIPD1-binding site is in the close vicinity of the highly conserved and essential residues D265, D625, Y626 on TM4 and TM10 that are part of the proton pathway.

Table S1. MICs (µg/ml) of PIPD1 in Cation-adjusted Mueller-Hinton broth for 32 clinical isolates belonging to the *M. abscessus* complex.

Table S2. Bacterial susceptibility to PIPD1 (in µg/ml) as measured by using a resazurin reduction microtitre assay.

Table S3. MIC of PIPD1, amikacin and imipenem against *M. abscessus* S strains overexpressing several MAB_4508 variants. Bacteria were transformed with either the empty pMV261 or the pMV261_4508 derivatives under the control of the *hsp60* promoter. MIC (in µg/ml) was determined in Cation-adjusted Mueller-Hinton broth.

Table S4. List of bacterial strains and plasmids used in this study.

Table S5. Primers used in this study.

Supplementary Information

A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*

Christian Dupont^{1,7}, Albertus Viljoen¹, Faustine Dubar³, Mickaël Blaise¹, Audrey Bernut¹, Alexandre Pawlik⁴, Christiane Bouchier⁵, Roland Brosch⁴, Yann Guérardel³, Joël Lelièvre⁶, Lluis Ballell⁶, Jean-Louis Herrmann⁷, Christophe Biot³, and Laurent Kremer^{1,2,#}

¹Centre National de la Recherche Scientifique FRE 3689, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, Université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34293, Montpellier France.

²INSERM, CPBS, 34293 Montpellier, France.

³Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F 59000 Lille, France

⁴Institut Pasteur, Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France.

⁵Institut Pasteur, PF1 Genopole, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

⁶Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline Tres Cantos, Madrid, 28760, Spain

⁷UMR1173, INSERM, Université de Versailles St Quentin, 2 avenue de la Source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France.

#To whom correspondence should be addressed:

Tel: (+33) 4 34 35 94 47; E-mail: laurent.kremer@cpbs.cnrs.fr

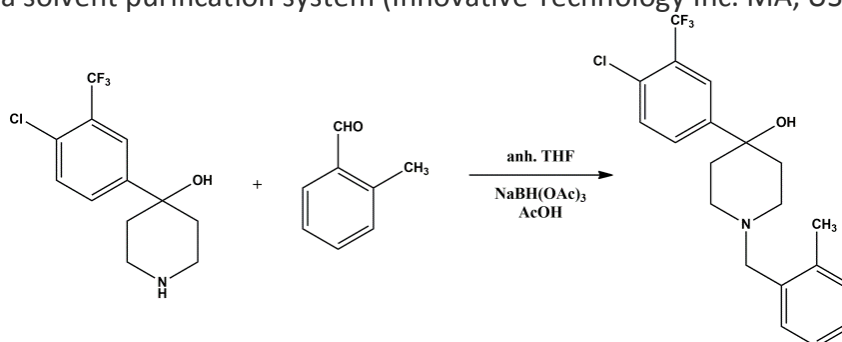
Supplementary Methods

Synthesis of 4-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-(2-methylbenzyl)piperidin-4-ol.

Commercially available 4-[4-chloro-3(trifluoromethyl)phenyl]-4-piperidinol was reacted by a reductive amination with *o*-tolualdehyde in dry THF under acidic catalysis with an excess of NaBH(OAc)₃ under a nitrogen atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure before the residue was dissolved in AcOEt. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted with EtOAc to obtain PIPD1. This one-step procedure was typically associated with 80% yields.

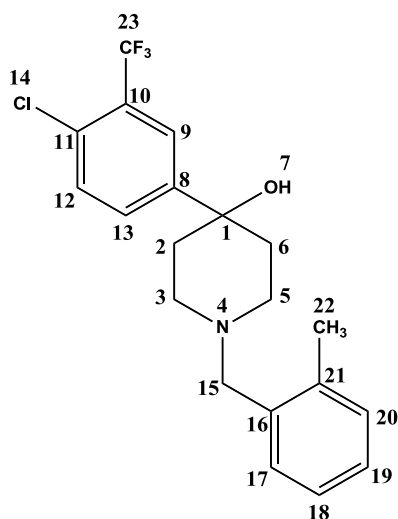
Chemistry. Nuclear magnetic resonance (¹H, ¹³C) spectra were recorded at room temperature on a Brüker AC 300 spectrometer. TMS was used as an internal standard and CDCl₃ as the solvent. ¹H NMR analyses were obtained at 300 MHz (s: singlet, br s: broad singlet, d: doublet, t: triplet, dd: double doublet, td: double triplet), and ¹³C NMR analyses were obtained at 75.4 MHz. The chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to TMS (δ = 0.00). Mass spectra were recorded by means of a Waters Micromass Quattro II triple quadrupole LC mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) sources. Column chromatography, carried out on a silica gel (Merck Kieselgel 60) was used for the purification of the compound. Reactions were monitored by TLC using coated silica gel plates and detection by UV lamp. The purity degree of the compound was checked by combustion analysis and proved to be higher than 95%.

4-[4-chloro-3(trifluoromethyl)phenyl]-4-piperidinol, *o*-tolualdehyde, Sodium triacetoxyborohydride and glacial acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Dry THF was obtained from a solvent purification system (Innovative Technology Inc. MA, USA, Pure-Solv).



Scheme of the synthesis strategy of 4-(4-Chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-1-[4-(2-methoxy-ethoxy)-2,3-dimethyl-benzyl]-piperidin-4-ol (PIPD1).

Under N₂, a solution of *o*-tolualdehyde (0.5 g, 2 mmol) and 4-[4-chloro-3(trifluoromethyl)phenyl]-4-piperidinol (0.57 g, 2 mmol) in 10 mL of dry THF was added slowly in a suspension of NaBH(OAc)₃ (1.14 g, 5 mmol). After 15min, 0.1 mL of AcOH was added before the mixture was stirred for 24h at RT. The reaction mixture was dried under reduced pressure and the organic residue diluted with 100 mL of EtOAc. The organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO₃ (twice), brine then dried over Na₂SO₄ and concentrated to an oil under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel chromatography eluting with 10% MeOH-DCM. A colorless oil was obtained with 81% yield (0.6 g, 1.6 mmol)



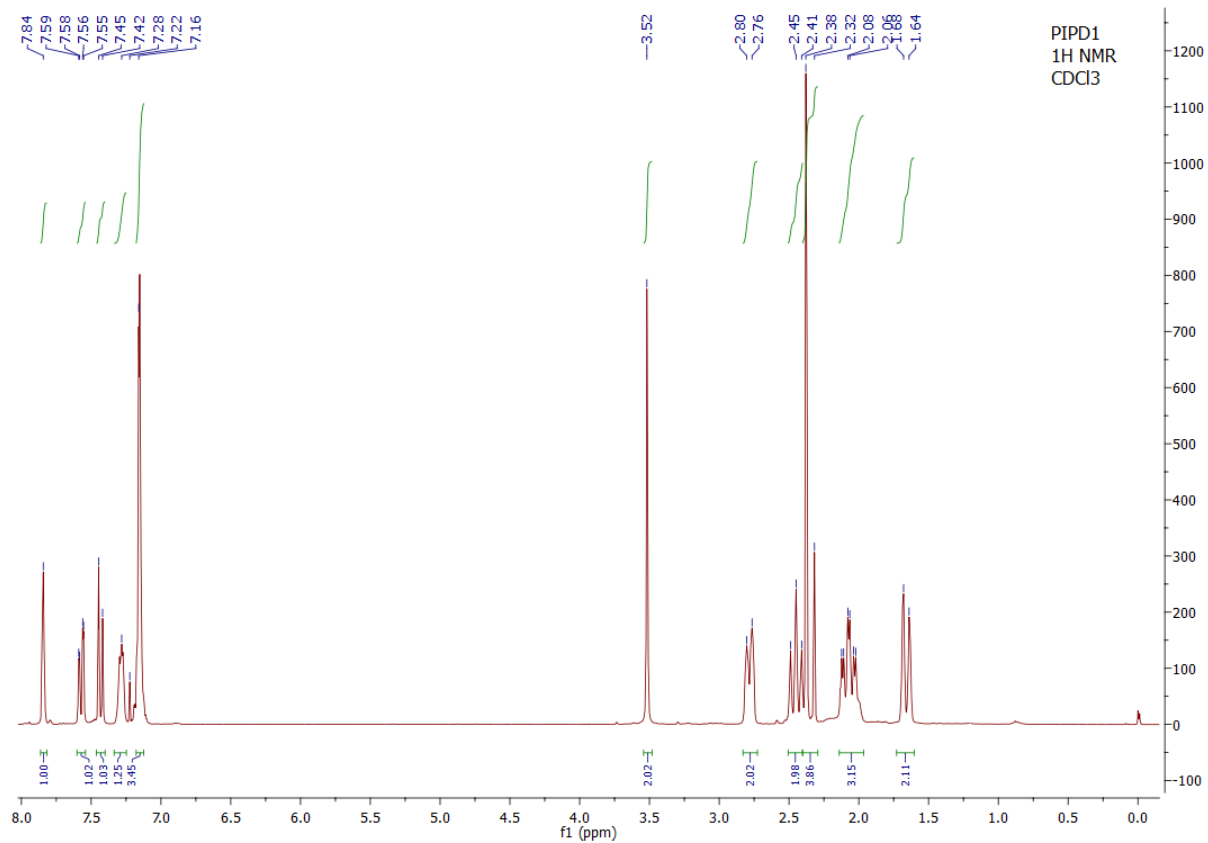
Structure of PIPD1.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (s, 1H, H_9), 7.57 (dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, 1H, H_{12}), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_{13}), 7.28 (m, H_{17}), 7.16 (m, $\text{H}_{18}, \text{H}_{19}$ and H_{20}), 3.52 (s, 2H, 2H_{15}), 2.78 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H, H_{5a} and H_{3a}), 2.45 (t, $J = 11.9$ Hz, 2H, H_{5b} and H_{3b}), 2.35 (d, $J = 18.6$ Hz, 3H, CH_3), 2.07 (td, $J = 13.0, 4.5$ Hz, 2H, H_{6a} and H_{2a}), 1.66 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H, H_{6b} and H_{2b}).

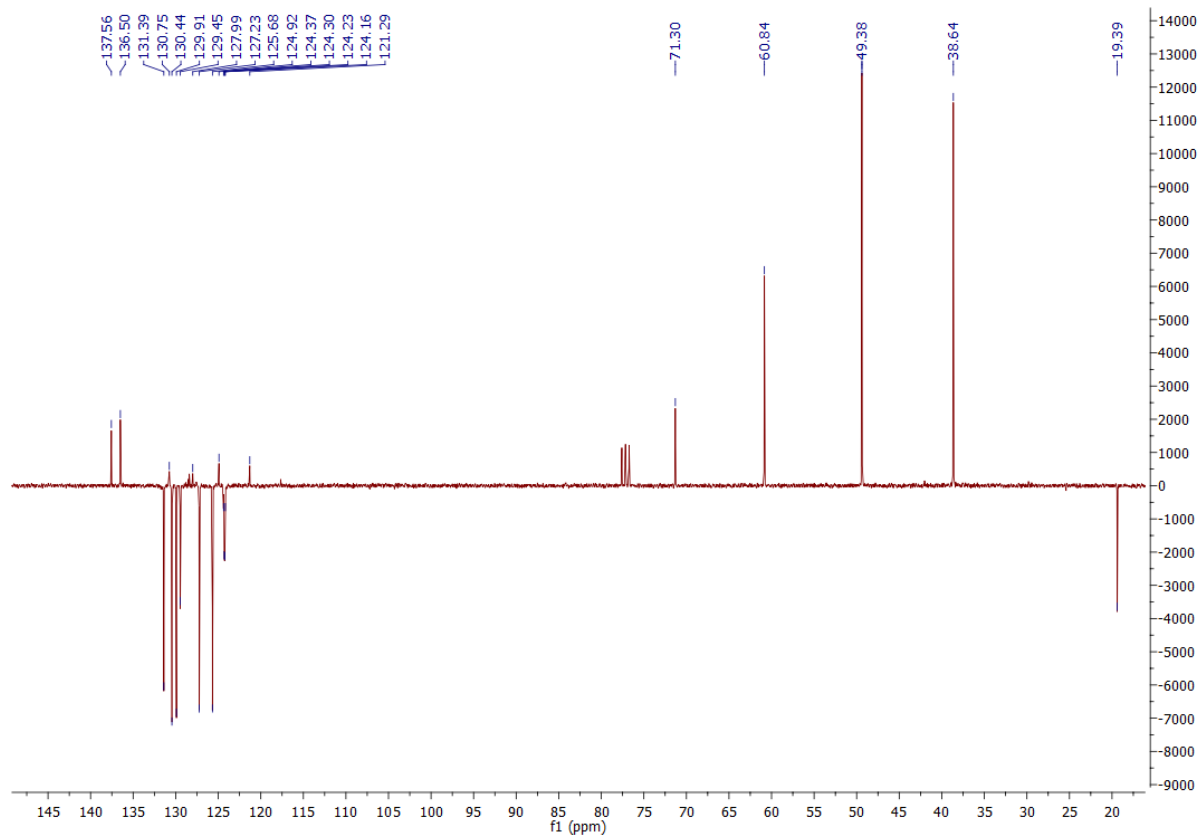
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 137.6 (C^{IV} , C_{16}), 136.5 (C^{IV} , C_{21}), 131.4 (CH_{arom} , C_{13}), 130.7 (C^{IV} , C_{11}), 130.4 (CH_{arom} , C_{20}), 129.9 (CH_{arom} , C_{17}), 129.4 (CH_{arom} , C_{12}), 128.0 (C^{IV} , C_{10}), 127.2 (CH_{arom} , C_{18}), 125.7 (CH_{arom} , C_{19}), 124.9 (C^{IV} , C_8), 124.3 (q, $J = 5.4$ Hz, CH_{arom} , C_9), 121.3 (C^{IV} , C_{23}), 71.3 (C^{IV} , C_1), 60.8 (CH_2 , C_{15}), 49.4 (2CH_2 , C_5 and C_3), 38.6 (2CH_2 , C_2 and C_6), 19.4 (CH_3 , C_{22}).

m/z (MALDI) 383.19, 384.15, 385.18

Combustible elemental analysis (C, H, N): Calc. C, 62.58%; H 5.51%; N 3.65%. Determ. C, 63.08%; H, 5.54%; N, 63.08%.



¹H NMR spectra of PIPD1 (CDCl₃, 300 MHz)



¹³C NMR spectra of PIPD1 (CDCl₃, 75.4 MHz)

Supplementary Figures

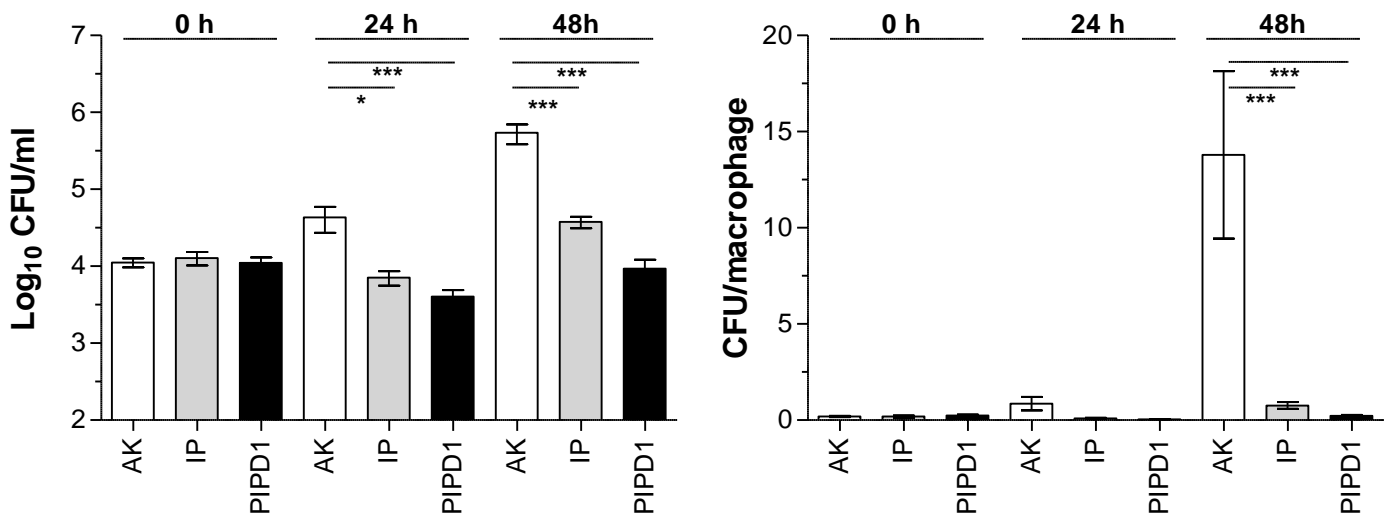


Figure S1. Intramacrophage activity of PIPD1. The activity on intracellular *M. abscessus* was tested in J774 macrophages at 37°C. Cells were infected with *M. abscessus* CIP 10453 at an MOI of 1:8 and treated with amikacin (50 µg/ml) to kill extracellular bacteria in the presence of imipenem at 80 µg/ml (20 X MIC) or PIPD1 at 6 µg/ml (48 X MIC). CFU were determined after 24 and 48 hrs post-treatment for J774 cells (left panel). The number of CFU/macrophage is shown in the right panel. The experiment was performed in triplicate and results are representative of three independent experiments. Results are expressed as mean values ± SEM *p<0.05, ***p<0.001 using the Mann Whiney test. Experiments were performed in triplicate and results are representative of three independent experiments.

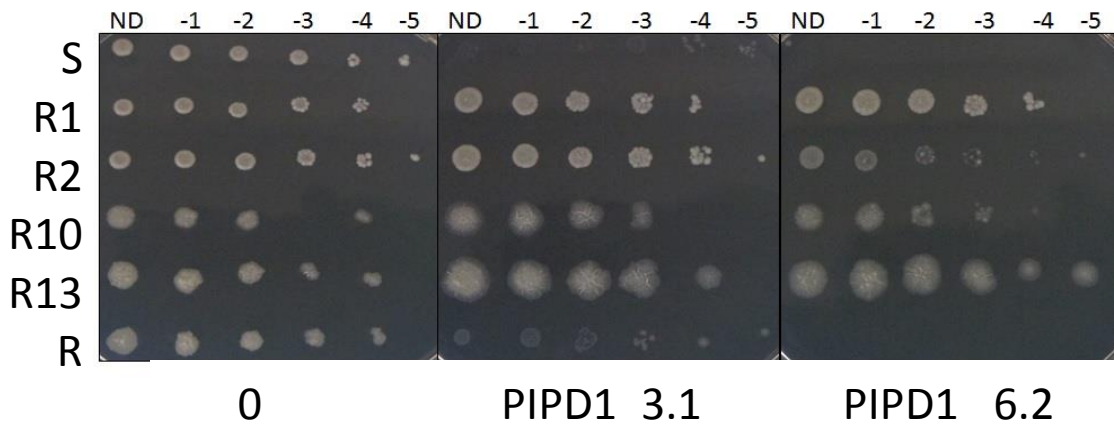


Figure S2. Drug susceptibility phenotypes of *M. abscessus*. One microliter of 10-fold serially diluted bacterial suspension of exponentially growing cultures wild-type and resistant strains (R1 and R2 derived from the S variant, R10 and R13 derived from the R background) were spotted on Middlebrook 7H10 plates in the absence or presence of PIPD1 (3.1 and 6.2 $\mu\text{g/ml}$). Plates were incubated at 37°C for 5 days.

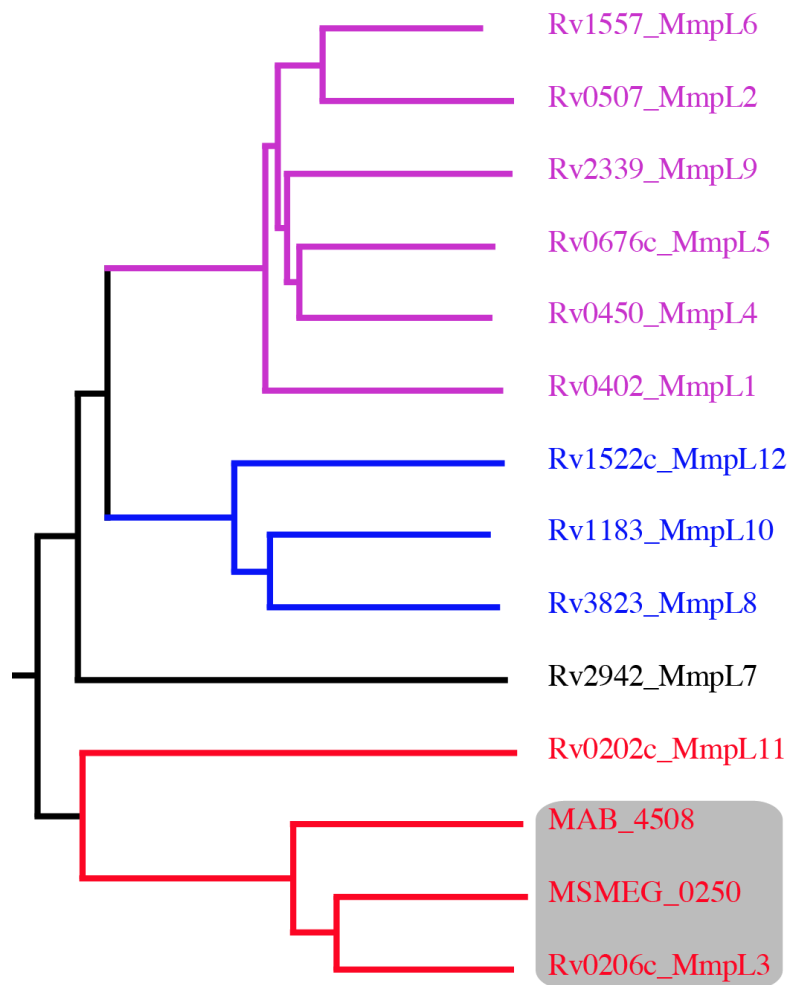


Figure S3. Phylogenetic tree of MmpL proteins. The tree comprises all *M. tuberculosis* MmpL proteins, including MmpL3 from *M. smegmatis* (MSMEG_0250) and MAB_4508. The tree was calculated with Clustalx with the neighbor joining method, followed by a bootstrap analysis and rooted with the *E. coli* AcrB efflux pump.

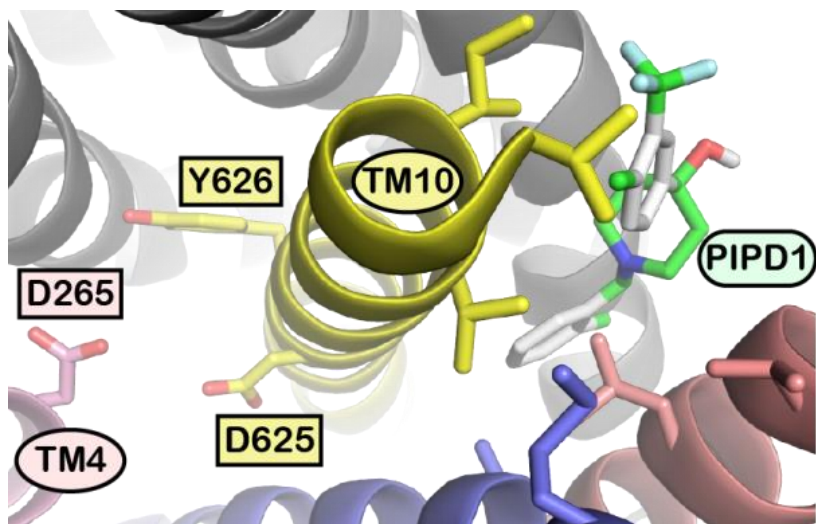


Figure S4. The putative PIPD1-binding site is in the close vicinity of the highly conserved and essential residues D265, D625, Y626 on TM4 and TM10 that are part of the proton pathway.

Supplementary Tables

Table S1. MICs ($\mu\text{g/ml}$) of PIPD1 in Cation-adjusted Mueller-Hinton broth for 32 clinical isolates belonging to the *M. abscessus* complex.

| Clinical isolates (number of strains) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) |
|--|--|
| <i>M. abscessus</i> | |
| Smooth (6) | 0.125 |
| Rough (6) | 0.125 |
| <i>M. massiliense</i> | |
| Smooth (9) | 0.125 |
| Rough (3) | 0.125 |
| <i>M. bolletii</i> | |
| Smooth (5) | 0.125 |
| Rough (3) | 0.125 |

Table S2. Bacterial susceptibility to PIPD1 (in $\mu\text{g/ml}$) as measured by using a resazurin reduction microtitre assay.

| Gram negative | |
|-------------------------------------|------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >250 |
| <i>Escherichia coli</i> | >250 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | >250 |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i> | >250 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | >250 |
| Gram positive | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 125 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | >250 |
| <i>Corynebacterium</i> spp. | 125 |
| Mycobacteria | |
| <i>Mycobacterium abscessus</i> | 0.23 |
| <i>Mycobacterium chelonae</i> | 0.23 |
| <i>Mycobacterium immunogenum</i> | 0.23 |
| <i>Mycobacterium mucogenicum</i> | 0.82 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 3.1 |
| <i>Mycobacterium peregrinum</i> | 62.5 |
| <i>Mycobacterium senegalense</i> | 62.5 |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> | 62.5 |
| <i>Mycobacterium peregrinum</i> | 62.5 |
| <i>Mycobacterium confluentis</i> | 62.5 |
| <i>Mycobacterium brumae</i> | 125 |
| <i>Mycobacterium chitinae</i> | 125 |
| <i>Mycobacterium avium</i> | 125 |
| <i>Mycobacterium intracellulare</i> | 125 |
| <i>Mycobacterium xenopi</i> | 125 |

Table S3. List of bacterial strains and plasmids used in this study.

| Name | Description | Marker | Reference |
|---|---|--------|--|
| Strains | | | |
| <i>M. abscessus</i> S | <i>Mabs sensu stricto</i> , strain CIP104536 ^T , smooth | – | Laboratoire de Référence des Mycobactéries |
| <i>M. abscessus</i> R | <i>Mabs</i> , strain CIP104536 ^T , rough | – | Laboratoire de Référence des Mycobactéries |
| <i>M. abscessus</i> S R1-R9 | <i>Mabs</i> PIPD1 resistant mutants produced in the S variant | – | This study |
| <i>M. abscessus</i> R R10-R23 | <i>Mabs</i> PIPD1 resistant mutants produced in the R variant | – | This study |
| <i>M. abscessus</i> S pMV261 | <i>Mabs</i> S carrying the pMV261 empty vector | Kan | This study |
| <i>M. abscessus</i> S pMV261-MAB_4508(WT) | <i>Mabs</i> S carrying the pMV261-MAB_4508 vector, over-expressing MAB_4508 (MmpL3) | Kan | This study |
| <i>M. abscessus</i> S pMV261-MAB_4508(T315I) | <i>Mabs</i> S carrying the pMV261-MAB_4508 vector, over-expressing MAB_4508 (MmpL3) with a T315I mutation | Kan | This study |
| <i>M. abscessus</i> S pMV261-MAB_4508(L551F) | <i>Mabs</i> S carrying the pMV261-MAB_4508 vector, over-expressing MAB_4508 (MmpL3) with a L551F mutation | Kan | This study |
| <i>M. abscessus</i> S pMV261-MAB_4508(V547G) | <i>Mabs</i> S carrying the pMV261-MAB_4508 vector, over-expressing MAB_4508 (MmpL3) with a V547G mutation | Kan | This study |
| <i>M. abscessus</i> S pMV261-MAB_4508(V617F) | <i>Mabs</i> S carrying the pMV261-MAB_4508 vector, over-expressing MAB_4508 (MmpL3) with a V617F mutation | Kan | This study |
| <i>E. coli</i> DH5α | <i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> | – | (Taylor <i>et al.</i> , 1993) |
| Plasmids | | | |
| pMV261 | Multi-copy <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector. Cloned genes are under the control of the constitutive <i>hsp60</i> promoter | Kan | (Stover <i>et al.</i> , 1991) |
| pMV261-MAB_4508(WT) | MAB_4508 open reading frame introduced into pMV261 downstream of the <i>hsp60</i> promoter. | Kan | This study |

| | | | |
|-------------------------------|---|-----|-------------------------|
| pMV261-MAB_4508(T315I) | MAB_4508 open reading frame, with T315I mutation, introduced into pMV261 downstream of the hsp60 promoter. | Kan | This study |
| pMV261-MAB_4508(L551F) | MAB_4508 open reading frame, with L551F mutation, introduced into pMV261 downstream of the hsp60 promoter. | Kan | This study |
| pMV261-MAB_4508(V547G) | MAB_4508 open reading frame, with V547G mutation, introduced into pMV261 downstream of the hsp60 promoter. | Kan | This study |
| pMV261-MAB_4508(V617F) | MAB_4508 open reading frame, with V617F mutation, introduced into pMV261 downstream of the hsp60 promoter. | Kan | This study |
| pTEC27 | Multi-copy <i>E. coli</i> /mycobacterial shuttle vector to express tdTomato under the control of a strong mycobacterial promoter. | Hyg | Addgene (plasmid 30182) |

References

- Stover, C.K., Cruz, V.F. de la, Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., *et al.* (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**: 456–460.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R. (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* **21**: 1677–1678.

Table S4. Primers used in this study.

| Primers | 5' to 3' Sequence ^a |
|--------------|---|
| MAB_4508seq1 | GGCCACCGTCTTTACCAATA |
| MAB_4508seq2 | TCGATCTCGAGGACATACCC |
| MAB_4508seq3 | CGATACCCGCATAGGTCAGT |
| MAB_4508seq4 | GAAGGCTACGACACCGAAAC |
| MAB_4508seq5 | CCGAATGCCAGGTA ⁽ CTTCAT |
| MAB_4508seq6 | ACGGCCTGTCCAGTGA ⁽ CTAC |
| MAB_4508seq7 | GTGCCGTACCTGAATGTCCT |
| MAB_4508f | TGTTGCCTGGTGGGGCCGAATGGT |
| MAB_4508r | AGTT <u>AAGCTT</u> GTGCCGTACCTGAATGTCCT (HindIII) |

^a Restriction sites are underlined and specified inside brackets.

**OBJECTIF 3 : Améliorer les propriétés thérapeutiques et physico-chimiques
d'analogues structuraux de PIPD1**

| Analogues | CMI µg/ml | CMI mol/L | Survie (%) | |
|-----------|-----------|-----------|------------|----------|
| | | | 50xCMI | 100x CMI |
| PIPD1 | 0.125 | 0.32 | 100 | 70 |
| FMD88 | 0.125 | 0.25 | 94 | 72 |
| FMD93 | 0.125 | 0.27 | 90 | 88 |
| FMD96 | 0.125 | 0.30 | 51 | 32 |
| FMD89 | 0,125 | 0.31 | 84 | 62 |
| FMD65 | 0.25 | 0.62 | 65 | 95 |
| FMD91 | 0,25 | 0.62 | 45 | 43 |
| FMD10 | 0.250 | 0.65 | 75 | 54 |
| FMD94 | 0,5 | 1.14 | 69 | 35 |
| FMD3 | 1 | 2.60 | 100 | 64 |
| FMD15 | 1 | 2.71 | 86 | 75 |
| FMD33 | 1 | 2.86 | 100 | 90 |
| FMD61 | 2 | 4.77 | 100 | 100 |
| FMD63 | 2 | 5.22 | 100 | 100 |
| FMD66 | 2 | 5.22 | 81 | 72 |
| FMD32 | 2 | 6.34 | 100 | 84 |
| FMD6 | 4 | 8.38 | X | X |
| FMD103 | 4 | 9.58 | 46 | 35 |
| FMD9 | 4 | 9.72 | X | X |
| FMD92 | 4 | 9.92 | 46 | 37 |
| FMD102 | 4 | 12.07 | 51 | 38 |
| FMD99 | 4 | 14.22 | 26 | 25 |
| FMD64 | 16 | 36.60 | X | X |
| FMD62 | 32 | 70.76 | X | X |
| FMD46 | 64 | 261.12 | X | X |
| FMD37 | >128 | >350.56 | X | X |
| FMD0 | 128 | 458.68 | X | X |
| FMD16 | >128 | 623.93 | X | X |

Tableau 6 : Activités d'analogues structuraux dérivés de PIPD1 vis-à-vis de *M. abscessus* et toxicité éventuelle testée sur des macrophages J774.

Les CMI (µg/ml) ont été effectuées dans le milieu Mueller-Hinton ajusté. Les composés présentant une CMI intéressante sont indiqués en bleu. La détermination de la toxicité éventuelle des composés a été réalisée sur des macrophages en culture dans le milieu DMEM complété avec 10% de FBS et basée sur l'utilisation du test de viabilité « Cell titer blue ». Les concentrations évaluées pour chaque composé sont 50 fois et 100 fois supérieures à la CMI de chaque composé. Les composés cytotoxiques sont indiqués en rouge et correspondent à une survie de macrophages <50%. Ces expérimentations, CMI et toxicités, ont été effectuées deux fois de façon indépendante. Les molécules dont la toxicité n'a pas été étudiée sont indiquées par X.

Les résultats préalablement obtenus concernant PIPD1 nous ont encouragés à poursuivre notre collaboration avec l'équipe du Dr Guérardel afin de générer des analogues structuraux de PIPD1 par pharmacomodulation et de développer des composés plus actifs et présentant des propriétés physico-chimiques améliorées. La création d'une chimiothèque de 27 composés dérivés de PIPD1 a été réalisée par le Dr. F. Dubar (CNRS, Lille)

Stratégie :

Dans un premier temps, chaque lot de molécules a été testé *in vitro* contre *M. abscessus*. Puis, l'orientation des modifications apportées à la structure de ces analogues a été réalisée en fonction des CMI obtenues *in vitro*. L'augmentation, la diminution, ou le maintien de l'activité de ces analogues comparativement à l'activité de PIPD1, nous a permis d'identifier les modifications générant une augmentation ou une perte d'activité de ces nouvelles molécules. Le niveau de toxicité des analogues présentant les activités biologiques les plus intéressantes, a également été évalué dans un premier temps sur des lignées de macrophages J774 afin de vérifier que les changements apportés n'induisaient pas une toxicité éventuelle qui en feraient de « mauvais » candidats. En fonction de ces résultats, des tests d'activités intracellulaires sur des macrophages infectés par *M. abscessus* seront effectués. Dans un second temps, les analogues dont l'activité intracellulaire sera maintenue seront finalement testés *in vivo* dans le modèle zebrafish, en utilisant PIPD1 comme molécule de référence.

Résultats :

I Activité *in vitro*

L'activité des 27 analogues différents de PIPD1 a été évaluée *in vitro* en suivant la méthode de micro-dilution en plaque 96 puits (voir Matériel et Méthodes). Nos résultats montrent qu'un certain nombre d'analogues présentant des activités très proches de celle de PIPD1 (0.125µg/ml), notamment FMD10, 65, 88, 93, 96, 89, (Tableau 6). Cependant aucun analogue ne présente une activité accrue par rapport à PIPD1.

II Toxicité sur macrophages J774

L'évaluation de la toxicité potentielle de ces différents analogues a été réalisée sur des macrophages et a permis d'identifier des composés ayant une toxicité accrue lorsque des concentrations 100 fois supérieures à la CMI ont été utilisées, en particulier FMD 94, 96 ou 102.

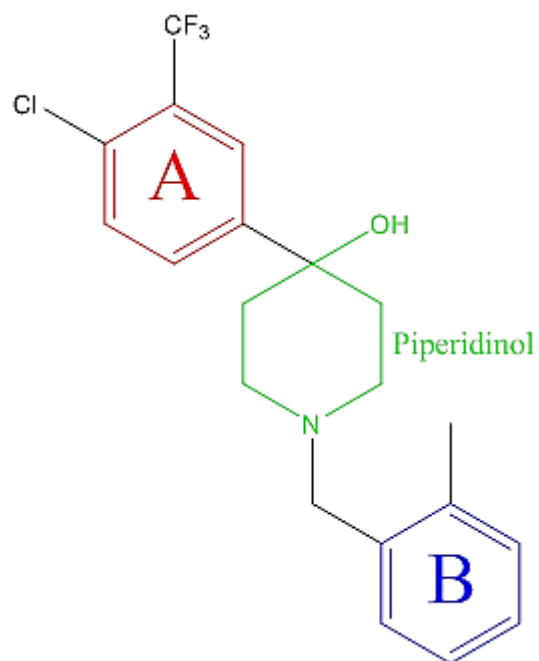


Figure 31 : Structure chimique de PIPD1

PIP-1 peut être séparé en trois parties : deux cycles aromatiques, notées A et B et une partie centrale correspondant au noyau piperidinol.

D'autres présentent une toxicité déjà apparente à des concentrations correspondantes à 50 fois la CMI, comme les composés FMD91, 92, 99 ou 103 (Tableau 6). Ces résultats indiquent que la modification du cycle B de PIPD1 par un ion chlore ou méthyle en position ortho, méta ou para, est responsable de l'augmentation de la toxicité de ces molécules.

III Relations structure/activité

L'évaluation de l'activité anti-*M. abscessus* des analogues de PIPD1 a permis de dresser un premier bilan de la relation structure – activité de ces composés. En effet, les résultats suggèrent que les cycles aromatiques et le groupement alcool du piperidinol sont essentiels pour l'activité biologique des molécules (Figure 31). D'autre part, la position des substituants sur le cycle B semble également importante puisque la présence de groupements en ortho semble favorable à une bonne activité anti-mycobactérienne, tandis que la présence de groupements en méta ou en para fait chuter l'activité biologique. L'encombrement stérique représente également un paramètre important puisque l'introduction de groupement possédant un volume plus important (ferrocene, aromatique substitué par une pipéridine...) provoque une baisse importante de l'activité contre *M. abscessus* (Tableau 7).

Bien qu'il semble clair que la présence de groupements électrodonneurs en position ortho du cycle B soit indispensable à une bonne activité biologique des composés, des tests supplémentaires seront nécessaires pour affiner cette conclusion. La synthèse de nouveaux dérivés, sur la base d'une substitution du cycle A, est également envisagée pour essayer d'étayer ces conclusions. Le cycle piperidinol central devra également faire l'objet d'une étude particulière avec le remplacement de la fonction hydroxyle par d'autres groupements bioisostères.

Objectifs 3 : Études des caractères physico-chimiques d'analogues structuraux dérivés des molécules parentales décrites dans l'objectif 2 et actives contre M. abscessus

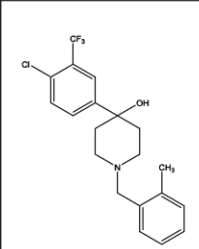
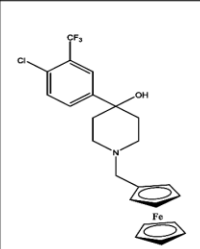
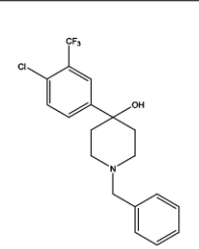
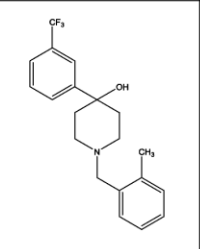
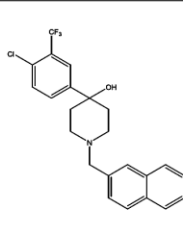
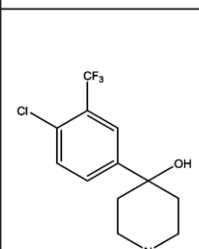
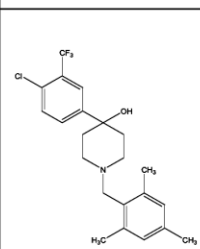
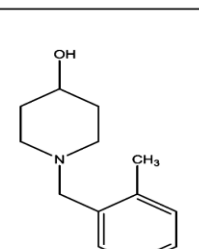
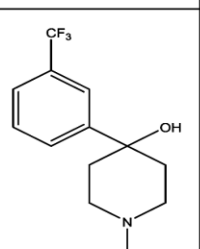
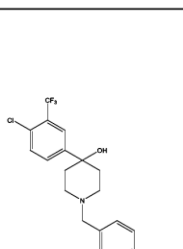
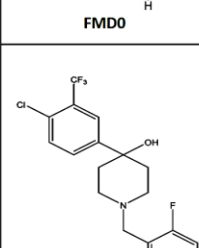
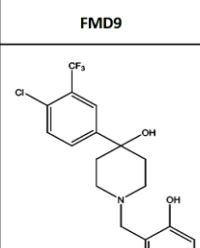
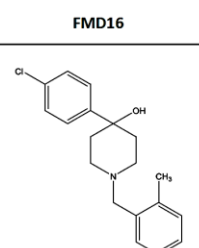
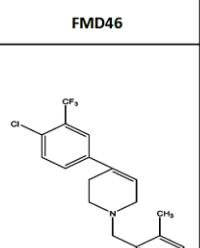
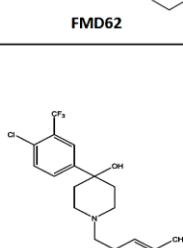
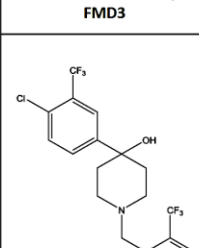
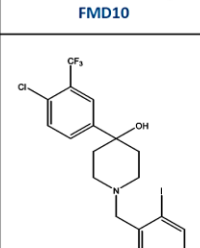
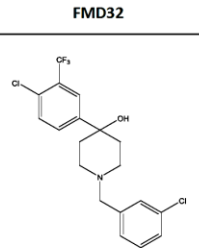
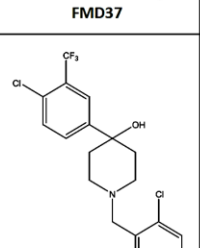
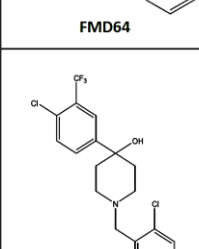
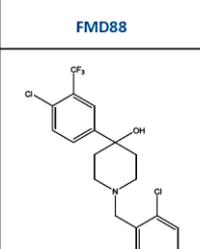
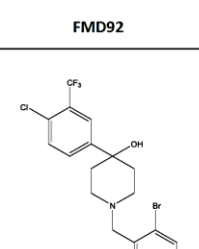
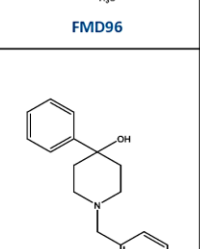
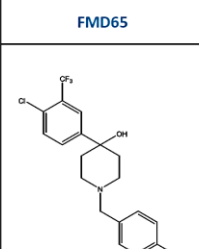
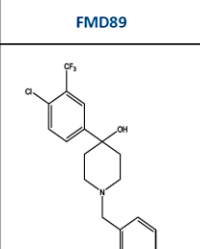
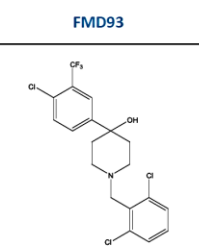
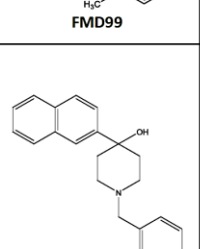
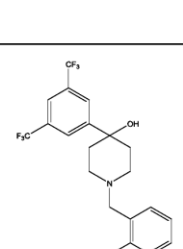
| | | | | |
|---|---|---|---|--|
|  PIPD1 |  FMD6 |  FMD15 |  FMD33 |  FMD61 |
|  FMD0 |  FMD9 |  FMD16 |  FMD46 |  FMD62 |
|  FMD3 |  FMD10 |  FMD32 |  FMD37 |  FMD63 |
|  FMD64 |  FMD88 |  FMD92 |  FMD96 | |
|  FMD65 |  FMD89 |  FMD93 |  FMD99 | |
|  FMD66 |  FMD91 |  FMD94 |  FMD102 |  FMD103 |

Tableau 7 : Structure de PIPD1 et de ses analogues

Discussion générale et perspectives

Le complexe *M. abscessus*, (*M. abscessus*, *M. bolletii*, *M. massiliense*) représente actuellement un problème en santé humaine, en particulier chez les personnes atteintes de mucoviscidose. Le souci majeur imputé aux mycobactéries du complexe *M. abscessus* réside dans la grande difficulté à traiter ces patients du fait de leur résistance naturelle à la plupart des antibiotiques utilisés en clinique (Nessar et al., 2012). Face à ce constat, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux traitements, dont la découverte va dépendre d'une meilleure compréhension des mécanismes de résistance innée aux antibiotiques, et de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

A l'instar d'autres mycobactéries, *M. abscessus* possède une paroi, particulièrement riche en lipides impliquée dans la résistance aux traitements. Cette paroi renferme également de nombreuses protéines membranaires, dont les transporteurs MmpL (De Rossi et al., 2006). Ces derniers, en effet, appartiennent à la superfamille des RND et permettent l'export de différents substrats à travers la membrane mycobactérienne, tels que les composés organiques, métaux lourds, lipides ou antibiotiques (Nikaido, 2011). *M. abscessus* possède au moins 31 gènes codant de potentielles MmpL (Deshayes et al., 2010), pour lesquelles peu d'éléments relatifs à leur rôle dans les mécanismes de transport des lipides, de résistance aux antibiotiques ou dans la physiopathologie infectieuse sont connus.

La première partie de ce projet de thèse a permis d'élucider des mécanismes responsables de la transition d'un morphotype S en un morphotype R et de l'acquisition d'un phénotype invasif chez *M. bolletii*. L'obtention d'un morphotype R stable *in vitro* a été obtenue suite à l'électroporation d'ADN chez cette mycobactérie, ce qui représente un événement très rare et surprenant dans la mesure où de tels changements de morphotypes surviennent généralement que dans un contexte infectieux *in vivo* (Jönsson et al., 2007)(Rottman et al., 2007). Cette étude rend compte de l'importance de MmpL4a dans la production et le transport de GPL. En effet, le variant R dépourvu de GPL se caractérise par l'acquisition de la capacité à produire des cordes, la perte de la capacité à former des biofilms ou à se déplacer par glissement *in vitro*. Elle souligne également son rôle dans la virulence de *M. bolletii*, puisque chez l'embryon de ZF, le variant R induit une production massive de cordes mycobactériennes, lesquelles conduisent à la formation d'abcès. Il s'en suit une infection aigüe et une mortalité rapide des larves infectées. D'autre part, ces résultats apportent des informations importantes quant au rôle essentiel des résidus Tyr et Asp associés aux TM4 et TM10 dans l'établissement de l'activité proto-motrice des MmpL. L'obtention de la structure complète de MmpL3, dont l'activité est dépendante du gradient de pH, devrait aider à comprendre comment le TMM est transporté à travers la membrane.

Dans la continuité logique de ces travaux de thèse, nous nous sommes focalisés dans la recherche de molécules actives contre le complexe *M. abscessus*. Nous démontrons dans cette étude l'utilité d'un criblage sur base phénotypique de composés bactéricides contre *M. abscessus* en utilisant une bibliothèque de molécules validées contre *M. tuberculosis* (Ballell et al., 2013). L'idée d'utiliser les données existantes obtenues précédemment lors de campagnes de criblage chez *M. tuberculosis* offre l'avantage de ne pas avoir recours à un criblage *de novo*, d'où un gain en temps et un gain financier. Notre étude démontre le succès d'une telle approche puisqu'elle a permis d'identifier un nouveau composé dérivé du pipéridinol, PIPD1, présentant une activité puissante *in vitro* contre différentes souches cliniques du complexe *M. abscessus*. Ainsi, une telle approche pourrait également être élargie à d'autres MNT multirésistantes aux antibiotiques, particulièrement contre *M. avium* qui également présente chez les patients atteints de mucoviscidose.

Notre équipe pionnière dans l'utilisation du ZF pour l'étude des infections à *M. abscessus* a pu démontrer le haut potentiel de ce modèle pour la recherche de molécules actives contre ce pathogène (Bernut et al., 2014a, 2014b; Dubée et al., 2015). Dans le cas de PIPD1, le ZF nous a également permis de confirmer l'efficacité thérapeutique *in vivo* de PIPD1 sur *M. abscessus*.

L'analyse du génome entier de souches de *M. abscessus* spontanément résistantes à PIPD1, a permis d'identifier 12 mutations différentes dans *MAB_4508*, codant pour une protéine homologue à MmpL3 essentielle à la survie de *M. tuberculosis* (Varela et al., 2012). Les analyses biochimiques ont démontré que, bien que la synthèse des acides mycoliques *de novo* ne soit pas affectée par PIPD1, la molécule inhibe fortement le transport de TMM à travers la membrane plasmique mycobactérienne, abrogeant de ce fait la mycolylation de l'AG (Figure 32). La localisation des mutations conférant la résistance à PIPD1 sur un modèle d'homologie tridimensionnel de la protéine *MAB_4508*, a mis en évidence une poche hypothétique de fixation de PIPD1. La localisation spatiale des mutations au voisinage de cette poche, laquelle est en partie formée par la région TM10 renfermant le couple Asp/Tyr décrit précédemment, pourrait ainsi limiter/empêcher la fixation de PIPD1 sur *MAB_4508*, expliquant la résistance de ces mutants à PIPD1.

Cette étude met également en exergue une classe de structure chimique encore inexploitée et dont les possibilités d'application seraient très encourageantes dans la lutte contre les infections à *M. abscessus*. Le développement d'une banque de dérivés structuraux dans le but d'améliorer les propriétés pharmacologiques et physicochimiques de PIPD1 est actuellement en cours. L'évaluation de l'activité de ces analogues *in vitro* a permis de poser un premier bilan sur la relation structure – activité de ces composés. La création de ces nouvelles molécules actives, a permis l'identification de groupements impliqués dans l'activité antibiotique (Cycles aromatiques, groupement alcool) ou dans

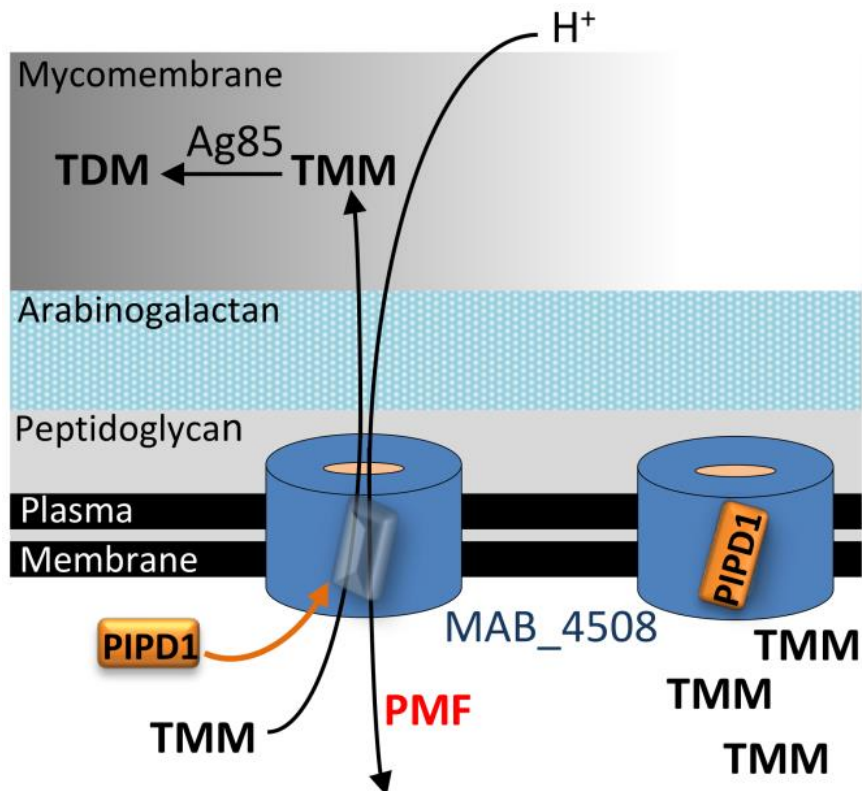


Figure 32 : Mécanisme d'action de PIPD1 chez *M. abscessus*.

La fixation de PIPD1 à MAB_4508 (MmpL3) abolirait l'établissement de la force protonotrice (PMF) qui permet transport du TMM à travers la paroi. Le déficit en TMM (donneur d'acides mycoliques pour l'antigène 85) à la surface de la bactérie conduit à un arrêt de la mycolylation de l'arabinogalactane.

la toxicité de ces analogues (Chlore et méthyle en position ortho, méta ou para du cycle B).

A terme, ces études pourraient permettre le développement de molécules actives encore plus efficaces et potentiellement moins toxiques. Ces analogues seront utilisés dans un premier temps dans le traitement de macrophages infectés pour évaluer leur niveau d'activité intracellulaire contre *M. abscessus*, et dans un second temps pour évaluer l'efficacité *in vivo* en utilisant le modèle ZF.

Les résultats obtenus durant ces différentes études ont mis en évidence :

- d'une part l'implication des homologues de MmpL4 et de MmpL3 chez *M. abscessus*, respectivement dans le transport des GPL et du TMM qui possèdent des rôles majeurs dans le maintien de la virulence et de la survie de cette mycobactérie,
- d'autre part une nouvelle classe de molécules inhibant la mycolylation de l'AG.

Chez *M. tuberculosis*, seules 8 des 13 MmpL ont des fonctions établies (Chalut, 2016), que ce soit dans la biosynthèse ou le transport de différents lipides. Certains de ces lipides, engagés dans la structure particulière de l'enveloppe font que certaines MmpL sont impliquées dans la physiopathologie infectieuse. D'autres, en tant que pompe à efflux, sont responsables de la résistance naturelle des mycobactéries aux antibiotiques. Chez *M. abscessus*, parmi les 31 protéines homologues de MmpL, très peu ont vu leurs fonctions identifiées. La description des structures et des fonctions de ces protéines semble donc importante dans le cadre de perspectives à visée thérapeutique et dans la lutte contre cette mycobactérie en ciblant des MmpL engagées dans la virulence ou la survie du bacille.

Suite à nos travaux de nombreuses questions demeurent sans réponse. Quelles sont les rôles des 29 MmpL restantes chez *M. abscessus* ? Quel est le degré d'implication de la force proto-motrice dans le maintien des fonctions de ces transporteurs chez *M. abscessus* ? Enfin, concernant PIPD1, est-il possible de développer de nouveaux dérivés structurellement proches de PIPD1 mais présentant des propriétés améliorées ?

I Rôle des MmpL

Chez *M. tuberculosis*, l'étude de mutants a permis de déterminer le rôle de plusieurs MmpL (Camacho et al., 2001; Domenech et al., 2004; Grzegorzewicz et al., 2012; Jones et al., 2014; Boritsch et al., 2016; Burbaud et al., 2016). L'obtention des mutants par mutagenèse dirigée (ADN recombinant), aléatoire (transposon) ou encore par la sélection de mutants spontanément résistant à différentes molécules actives, mutés dans les gènes *mmpL* chez *M. abscessus*, peut être envisagée malgré le nombre très élevé de ces gènes chez *M. abscessus*, et le fait que certains gènes *mmpL*

peuvent s'avérer essentiels. L'étude phénotypique, génétique, et structurale de ces mutants permettrait d'obtenir des éléments de réponse sur l'identification des fonctions de ces MmpL chez *M. abscessus*.

La structure d'AcrB, obtenu par cristallographie en 2002 (Murakami et al., 2002), a permis d'identifier des résidus indispensables au maintien de la force proto-motrice d'AcrB, notamment les résidus Lys940 du TM10, le Thr978 du TM11, l'Asp407 et l'Asp408 du TM4 et enfin le résidu Ser481 du TM6 (Su et al., 2006) (Eicher et al., 2014). L'identification de résidus indispensables à la force proto-motrice d'AcrB a permis, par la comparaison de modèles d'homologie, de comprendre quel résidu pouvait être responsable de cette force chez les MmpL comme MmpL3. Cette méthode de construction de modèle topologique, pour la compréhension des mécanismes d'action de ces transporteurs, est utilisée en raison de l'absence de structures obtenues par cristallographie de ces MmpL. Bien que très difficiles à produire de manière soluble et à cristalliser, l'accès à une structure tridimensionnelle d'une protéine MmpL permettrait de comprendre comment agissent les inhibiteurs et de concevoir de nouvelles molécules qui ciblent spécifiquement ces TM4 et TM10 contenant des éléments essentiels à l'activité de ces transporteurs. Toutefois, une étude récente a permis de proposer une structure à basse résolution (20Å) d'une protéine MmpL de *Corynebacterium glutamicum* (CmpL1) par cryo-microscopie électronique (Belardinelli et al., 2016), laissant présager de l'obtention de données structurales plus informatives dans un avenir proche.

Idéalement obtenir les structures cristallographiques de MmpL permettrait le développement d'antibiotiques ciblant plus spécifiquement les différents MmpL de façon plus efficace en se basant sur les relations structure-activité (SAR) (Liu et al., 2012)(Kim et al., 2015), c'est-à-dire la relation entre la structure d'une protéine et/ou d'un composé chimique et leur action/relation. La recherche de structure de ces MmpL s'avère donc fondamentale, dans le but i) de comprendre les fonctions des MmpL encore méconnus et ii) développer des nouveaux antibiotiques se basant sur des études de SAR.

II PIPD1 et analogues

Certains analogues à PIPD1 pourraient présenter des degrés de toxicité moindres tout en conservant leur niveau d'efficacité contre *M. abscessus*. Ces composés, ainsi que PIPD1, devront également être testés chez le ZF en contexte mucoviscidose nous permettant d'étudier l'efficacité de ces molécules dans un contexte *in vivo* mimant la mucoviscidose. Chez le ZF des morphants *cftr* sont générés grâce à la technique antisens morpholino. Il existe également une lignée ZF *cftr* (Navis et al., 2013) dont l'élevage au sein de notre laboratoire est actuellement en cours. L'emploi du modèle murin est également à prévoir dans l'évaluation de la toxicité et l'efficacité de ces molécules.

L'utilisation de souris permissives aux infections à *M. abscessus* (souris immunodéprimées Nude, GM-CSF KO, IFN γ -KO etc...) et de porc (dans l'évaluation de la toxicité avant un passage chez l'Homme) représenterait une étape supplémentaire et importante dans le développement et la validation d'un nouveau traitement (Ordway et al., 2008) (Swindle et al., 2012)(De Groote et al., 2014)(Bernut et al., 2014a)(Le Moigne et al., 2016). PIPD1 n'étant pas hydrosoluble, le développement de ce composé sous forme soluble dans l'eau est toujours à l'étude. Développer et évaluer l'efficacité des formes liposomales de PIPD1 pourraient représenter une éventualité si la forme hydrosoluble de ce composé n'est pas obtenue. En effet, des études d'efficacité de formes liposomales de différentes molécules ont été menées, notamment pour la clofazimine, et ont montré que des formes liposomales pouvaient diminuer les doses des traitements tout en maintenant l'activité antibactérienne (Mehta et al., 1993; Kansal et al., 1997). Une alternative pourrait consister à utiliser des nanoparticules englobant l'antibiotique. L'injection par voie intraveineuse de rifampicine encapsulée dans des nanoparticules a été évaluée dans le modèle ZF infecté par *M. marinum* et a montré une nette amélioration de la survie des embryons traités et une localisation spécifique du complexe rifampicine + nanoparticules au niveau des macrophages (Fenaroli et al., 2014).

III Expertises et outils à dispositions

L'utilisation du modèle ZF dans notre équipe a permis pour la première fois de mettre au point un modèle animal immunocompétent permissif aux infections à *M. abscessus*. L'utilisation de ce modèle a permis l'étude de la physiopathologie différentielle entre les variants R et S de *M. abscessus* (Bernut et al., 2014a, 2014b). Il permet, par ailleurs, de cribler un certain nombre de molécules thérapeutiques dont l'efficacité est visualisable en temps réel face aux infections à *M. abscessus*. Grâce à une mutagenèse dirigée dans un variant R de *M. abscessus* (Halloum et al., 2016) notre équipe a pu mettre à jour le rôle important d'une déshydratase, MAB_4780, dans la virulence du variant R de *M. abscessus*, en réalisant le premier mutant dans un variant R de *M. abscessus*. Le mutant Δ MAB_4780 présente une virulence extrêmement atténuée à la fois dans les embryons de ZF, a perdu sa capacité intrinsèque à former de cordes, de se multiplier dans les macrophages, et de développer des granulomes. Ainsi, des techniques similaires de mutagenèse dirigée et l'analyse phénotypique des différents mutants dans des contextes *in vitro* et *in vivo* pourraient être appliquées dans le cadre d'une étude systématique d'inactivation et de caractérisation de l'ensemble des MmpLs de *M. abscessus*. Dans l'éventualité où le gène serait essentiel, tel que pour MAB_4508, des mutants conditionnels pourraient être réalisés grâce à l'utilisation d'outils déjà développés dans l'équipe de JL Herrmann pour réaliser l'expression conditionnelle du gène *fadD32* (Cortes et al., 2011). En plus du modèle cellulaire, l'emploi du modèle amibe peut également être envisagé.

Précédemment, un mutant inactivé dans *tesA* (thioesterase A) chez *M. marinum* a été montré comme atténué dans le modèle ZF mais aussi chez *Dictyostelium discoideum* (Alibaud et al., 2011). Des mutants de *M. marinum* exprimant différents profils de LOS, sont phagocytés en plus grande quantité par des macrophages, mais aussi par *Acanthamoeba polyphaga* et *Acanthamoeba castellanii* (Alibaud et al., 2014)(Singh et al., 2016). Ce modèle a également démontré que lorsque *M. abscessus* est préalablement cultivée en présence d'amibes, de la PLC est exprimée et augmente la virulence de ces mycobactéries dans le modèle murin (N'Goma et al., 2015). Ces différents modèles d'amibes pourraient également être utilisés dans le criblage de mutants atténués ou permettant l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

IV Conclusions générales

Finalement, nos études ont mis en évidence i) l'implication des homologues de MmpL4 et de MmpL3 chez *M. abscessus* dans le transport de GPL et de TMM, avec comme rôles majeurs le maintien de la virulence et la survie de la bactérie, et ii) une nouvelle classe de molécules inhibant la mycolylation de l'AG. Ces résultats montrent l'intérêt des MmpL comme cible dans l'espoir de développer des traitements contre ce pathogène émergent, et particulièrement néfaste dans la mucoviscidose.

Des études doivent être menées afin d'identifier le rôle des 29 homologues MmpL dont les fonctions restent à ce jour indéterminées chez *M. abscessus*. Les différents outils actuellement disponibles devraient faciliter les études futures sur ces MmpL dans le but de :

1. déterminer leurs différentes fonctions dans l'assemblage de la paroi,
2. identifier de nouveaux résidus impliqués dans l'établissement de la force proto-motrice,
3. caractériser les contributions des différentes MmpL dans la virulence et la résistance de *M. abscessus*
4. développer de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant certaines MmpL.

La découverte de PIPD1 inhibant potentiellement la force proto-motrice de MAB_4508, constitue un premier pas vers le développement d'un traitement ciblant de manière spécifique et efficace *M. abscessus*. Des études complémentaires devront être menées afin de :

1. développer des analogues structuraux potentiellement optimisés dans leurs propriétés physico-chimiques,
2. de confirmer les applications de PIPD1 et de ses dérivés *via* l'utilisation de modèles *in vivo*, tels que le ZF et la souris.

Matériel et méthodes

I Souches bactériennes et conditions de cultures

I A Milieu de culture des mycobactéries

Les différentes mycobactéries utilisées durant cette thèse sont issues de stocks glycérol 20% congelés à -80°C; elles sont striées sur le milieu Middlebrook 7H10 (Difco™) additionné de 10% de milieu OADC (Acide oléique/ albumine/ dextrose/ catalase) (7H10), et incubées à 30°C pendant 4 à 7 jours. Ensuite, une colonie isolée de cette boîte est mise en pré-culture liquide de 1 mL de 7H9 (Difco™) contenant 0,05% de Tween80 et 10% de milieu OADC (7H9^T) à 30°C durant une semaine. Ces pré-cultures sont ensuite diluées dans 10 à 50 mL de 7H9^T et mises à incuber sans agitations à 30°C. Précisons que l'ajout de Tween80 est nécessaire pour limiter la formation d'agrégat de mycobactéries, et particulièrement pour les variants R de *M. abscessus*. Pour l'évaluation de l'activité d'antibiotiques utilisant le milieu 7H9, il est important de ne pas mettre de Tween80 qui en tant que détergent peut fausser les valeurs obtenues. Les évaluations d'antibiotiques ont été effectuées en utilisant le milieu Mueller Hinton ajusté en cations (CAMH) comme cela est préconisé par le Clinical and Laboratory standards Institute de 2011. La transformation des différentes souches de mycobactéries avec le plasmide pTEC27, contenant le gène *tdTomato* sous le contrôle d'un promoteur mycobactérien fort, contient un gène de résistance à l'hygromycine (HYG) et nécessite l'ajout de 500µg/mL de cet antibiotique pour les cultures de mycobactéries, et de 25µg/mL pour des cultures d'*Escherichia coli* contenant ce plasmide. Les différents milieux sont détaillés dans le [tableau 8](#).

I B Evaluation de motilité par glissement

Pour chaque souche de mycobactéries, 10µL de culture en phase exponentielle sont inoculés au centre d'un milieu de « sliding » ([tableau 8](#)). Le diamètre de distance parcourue par glissement est évalué et mesuré après une incubation de 10 jours à 30°C sans agitation. Les géloses de « sliding » sont mises en plaque 6 puits, et chaque espace entre les puits est rempli d'eau pour maintenir l'humidité du milieu durant l'incubation.

I C Evaluation de la formation de biofilm

Pour chaque souche, 10 µL de culture en phase exponentielle sont inoculés en milieu « biofilm » ([tableau 8](#)) préparé en plaque 6 puits. Pour le développement de biofilms, les plaques sont mises à incuber 5 jours à 30 °C sans agitation.

Matériel et méthodes

| OADC | Milieu 7h9 ^T | Milieu 7H10 |
|--|--|--|
| Eau distillées 950mL NaCl 8,5G BSA Fraction V 50 g D-glucose 20 g Catalase 40 mg Acide oléique 500 µL | Eau distillée 900mL Middlebrook 7H9 (Difco TM) 4,7 g Glycérol 5 mL | Eau distillée 900mL Middlebrook 7H10 (Difco TM) 4,7 g Glycérol 5 mL |
| Filtration | Autoclave. Ajouter 100 mL d'OADC stérile pour une concentration finale de 10% (v/v), et 2,5 mL de tween80 pour une concentration finale de 0,05% (v/v). | Autoclave. Ajouter 100 mL d'OADC stérile pour une concentration finale de 10% (v/v). |
| Milieu LB liquide | Milieu LB solide | Milieu PBS 1X |
| Eau distillées 900 mL Bacto-tryptone 10 g Extrait de levure 5 g NaCl 5g | Eau distillées 900 mL Bacto-tryptone 10 g Extrait de levure 5 g NaCl 5g Agar 15 g | Eau distillées 1000 mL NaCl 8 g Kcl 0,2 g Na ₂ HPO ₄ 1,44g KH ₂ PO ₄ 0,24g |
| Autoclave. | Autoclave. | Le pH est ajusté à 7,4. Autoclave. |
| Milieu sliding mobility | Sel M63 | Milieu Biofilm |
| Eau distillées 900 mL Middlebrook 7H9 (Difco TM) 4,7 g Agar 3 g | Eau distillées 900 mL Na ₂ HPO ₄ 13,6 g Sulfate d'aluminium 2 g FeSO ₄ .7h ₂ O 0,5 g Acide casaminique 5 g | Milieu M63 94 mL Glucose 40% (stérile) 5 mL CaCl ₂ 0,1 M (stérile) 1 mL MgSO ₄ 1 M (stérile) 100 µL |
| Autoclave. | Le pH est ajusté à 7,4(KOH) ajout l'ajout de FeSO ₄ .7h ₂ O et de l'acide casaminique. Autoclave. | Le pH est ajusté à 7,4. |
| Milieu Mueller Hinton | | |
| Eau distillées 1000 mL Mueller hinton (Sigma-aldrich) 21 g Autoclave. | | |

Tableau 8 : Composition des différents milieux utilisés pour les cultures des mycobactéries.

II Méthodes de biochimie et biologie moléculaire

II A Préparation des plasmides

L'ADN plasmidique est obtenu à partir de culture d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid (Machery-Nagel) en suivant le protocole et les recommandations du fournisseur. Cet ADN est ensuite quantifié au spectrophotomètre (Nanodrop).

II B Préparation de mycobactéries électro-compétentes

Toute cette préparation s'effectue à 4°, les milieux de cultures doivent donc être préalablement mis à 4°C. La culture mycobactérienne, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée à 13400 rpm pendant 10 minutes. Le culot est lavé dans un volume équivalent de glycérol 10%, et cela deux fois consécutivement. Le culot bactérien est alors repris dans 1/100^{ème} du volume initial en glycérol 10% complété de 0,05% de Tween 80. Les suspensions de bactéries peuvent alors être séparées en différents aliquots de 200µL, et être utilisées directement ou conservées à -80°C.

II C Electro- transformations

Dans une cuve à électroporation de 2 mm, à 4°C, à 200µL de mycobactéries électro-compétentes sont ajoutés 2 µL d'ADN plasmidique (100 ng). Cette suspension est soumise à un choc électrique de 2,5kV (25µF ; 600 Ω) en utilisant un appareil d'électroporation. Les bactéries transformées sont ensuite incubées 120 minutes à 30°C sans agitation dans 200µL de 7H9^T avant d'être étalées sur milieu 7H10 HYG (500µg/mL) et incubées une semaine à 30°C. Les clones isolés exprimant tdTomato sont alors conservés à -80°C.

II D Extraction et analyse d'acides mycoliques

Voir article qui suit :

Article 3 : “ Extraction and Purification of Mycobacterial Mycolic Acids”

Auteurs

Dupont Christian, Laurent Kremer.

Journal

Bio-Protocol 2014.

DOI: 10.21769/BioProtoc.1265

Extraction and Purification of Mycobacterial Mycolic Acids

Christian M. Dupont and Laurent Kremer*

Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Université Montpellier, Montpellier, France

*For correspondence: lremer@univ-montp2.fr

[Abstract] Mycolic acids are major long-chain fatty acids, containing up to 80-90 carbon atoms that represent essential components of the mycobacterial cell wall (Pawelczyk and Kremer, 2014). Each mycobacterial species possesses a specific mycolic acid profile characterized by various chemical modifications that decorate the lipid. Mycolic acids play a critical role in the architecture and impermeability of the cell envelope, hence the natural resistance of mycobacteria to most antibiotic treatments. They are also key determinants of virulence in pathogenic species, including *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), the causative agent of tuberculosis. In addition, they are known as the primary target of several first-line and second-line antitubercular drugs. Thus, the unique enzymes involved in the mycolic acid biosynthetic pathway represent an attractive reservoir of targets for future chemotherapy whose developments are particularly warranted in the context of multi-drug-resistant and extensively-drug-resistant strains of *M. tuberculosis*. Herein, we describe a protocol to extract the mycolic acids from mycobacteria. Purification of the various subspecies may be particularly useful for subsequent structural studies involving mass spectrometry or NMR. The qualitative and quantitative biochemical characterization of the mycolic acid pattern by thin layer chromatography can be used to address how drugs alter mycolic acid biosynthesis (Alahari *et al.*, 2007, Hartkoorn *et al.*, 2012), to study the phenotypes of genetically modified mutants affected in this metabolic pathway (Bhatt *et al.*, 2007) or to unravel new mycolic acid regulatory mechanisms (Vilcheze *et al.*, 2014). The same protocol can be applied to all mycobacteria, including environmental and pathogenic species.

Materials and Reagents

1. *Mycobacterial* cultures including *Mycobacterium tuberculosis*, BCG, *M. smegmatis* and *M. abscessus* but can be extended to any other species.
2. Tyloxapol (C₁₇H₃₀O₄) (Sigma-Aldrich, catalog number: T8761)
3. Glycerol (C₃H₈O₃, 99.5%) (Euromedex, catalog number: 50405)
4. Potassium diphosphate (K₂HPO₄) (Merck KGaA, catalog number: 1.05104)
5. L-asparagine monohydrate (C₄H₁₀N₂O₄, ≥99%) (Sigma-Aldrich, catalog number: A8381)
6. Citric acid (C₆H₈O₇, 99%) (Sigma-Aldrich, catalog number: C0759)

7. Ferric ammonium citrate ($C_7H_{13}FeNO_7$) (Sigma-Aldrich, catalog number: F5879)
8. Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, catalog number: Z4750)
9. Magnesium sulfate ($MgSO_4$) (Sigma-Aldrich, catalog number: M7506)
10. Tetrabutyl ammonium hydroxyde (TBAH) ($C_{16}H_{37}NO$, 40% solution) (Sigma-Aldrich, catalog number: 178780)
11. Dichloromethane (CH_2Cl_2 , $\geq 99.8\%$) (Carlo Erba, catalog number: 412622000)
12. Iodomethane (CH_3I , 99%) (Sigma-Aldrich, catalog number: I850-7)
13. Diethylether ($CH_3CH_2OCH_2CH_3$, 99.5%) (Carlo Erba, catalog number: 447521)
14. Hexane [$CH_3(CH_2)_4CH_3$, pure isomeric mixture] (Carlo Erba, catalog number: 339852)
15. Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$, 99.9%) (Carlo Erba, catalog number: 448251)
16. Molybdophosphoric acid hydrate ($H_5Mo_{12}O_{41}P$) (Sigma-Aldrich, catalog number P7390)
17. Rhodamine 6G ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, Dye content $\sim 95\%$) (Sigma-Aldrich, catalog number R4127)
18. Middlebrook 7H9 broth (Difco, catalog number: 271310)
19. Sauton's media (see Recipes)

Equipment

1. Aluminium Silica gel TLC plates 60F₂₅₄ (Merck KGaA, catalog number: 1.05554.0001)
2. Plastic Silica gel TLC plates 60F₂₅₄ (Merck KGaA, catalog number: 1.05735.0001)
3. Round-bottom borosilicate glass tubes (Corning, catalog number: 99449-16) with phenolic screw caps (Corning, catalog number: 9998-15)
4. 10 μ l capillary tubes Ringcaps (Dutscher Scientific, catalog number: 090512)
5. Spectrophotometer
6. 75 cm² tissue culture flasks (Sarstedt, catalog number: 83.1813)
7. 37 °C incubator or 30 °C incubator for growing mycobacteria such as *M. marinum*
Notes: Atypical mycobacteria and BCG should be handled according to institutional standards of practice for biosafety whereas M. tuberculosis cultures should be handled in biosafety level 3 facility.
8. 50 ml conical Corning CentriStart tubes (Corning, catalog number: 430828)
9. 15 ml conical Corning CentriStart tubes (Corning, catalog number: 430790)
10. Centrifuge with swinging bucket rotor for spinning down bacterial cultures (for example, Prolabo, model: HR340 with the 15 ml and 50 ml adaptors)
11. pH meter
12. Ultrasonic waterbath (Bandelin Sonorex, model: RK102H)
13. Stuart Rotator SB3
14. Stuart block heater (Stuart, model: SBH200D)

15. TLC developing tank
16. Zymark TurboVap evaporator (Biotage, catalog number: C133718)
17. Handheld UV lamp VL-6-LC 365 nm/254 nm
18. 1800W Heat gun (Power Performance, model: PHG1800T2)
19. Reagent Sprayer, all glass, with 100 ml Erlenmeyer flask (CAMAG, catalog number: 022.6100)
20. TLC Spray Cabinet (CAMAG, catalog number: 022.6230)

Procedure

A. Inoculation and growth of mycobacterial cultures

1. Inoculate liquid cultures (in either Sauton's broth or Middlebrook 7H9 broth) of mycobacteria from frozen stocks, prepared from mid-log phase mycobacterial cultures ($OD_{600} = 0.8$ to 1.0) that were frozen in 50% glycerol at -80 °C. For inoculation, the doubling rate of the mycobacterial species needs to be kept in mind. *M. smegmatis* doubles approximately every 3-4 h, whereas BCG and *M. tuberculosis* double approximately every 24 h at 37 °C.
2. These pre-cultures are inoculated in 25 ml Sauton's broth medium (or Middlebrook 7H9 broth) in 75 cm² tissue culture flasks. Include appropriate antibiotics if required for maintaining a plasmid when growing a transformed mycobacterial strain.
3. The mycobacterial cultures are incubated at 37 °C with no or slow shaking. Measure the OD_{600} of the culture and harvest exponentially growing mycobacteria ($OD_{600} = 0.8$ to 1.0) by centrifugation at 3,000 rpm for 10 min at room temperature. Discard the supernatant.
4. Resuspend the pellet in 5 ml of water and transfer the bacterial suspension in 15 ml conical plastic tubes. Pellet the bacterial cells again by centrifugation. This wash step is important to remove the remaining traces of medium. The bacterial pellet is then transferred to a round-bottom glass tube prior to lipid hydrolysis. All subsequent procedures will be performed in glass tubes due to the presence of organic solvents.

B. Fatty acid/mycolic acid extraction

1. Resuspend the bacterial pellet in 2 ml of tetrabutyl ammonium hydroxyde (TBAH) and incubate overnight at 100°C using a heating block. This step allows complete fatty/mycolic acid hydrolysis.
2. The next day, let the tube cool down at room temperature and proceed with methyl esterification of the fatty/mycolic acids: To the 2 ml of TBAH mixture, add 4 ml CH₂Cl₂, 300 µl CH₃I and 2 ml water. Mix the tube for 1 h at room temperature on a rotator.

3. Centrifuge at 3,500 rpm for 10 min at room temperature. This will allow to separating the mixture in two phases: A lower organic phase containing the lipids and an upper aqueous phase. Discard the upper phase to waste.
4. Add 4 ml of water, mix the tube for 15 min and spin down at 3,500 rpm for 10 min at room temperature. Repeat this wash step 2 more times and remove the upper phase to waste.
5. Dry the lower organic phase in the same tube under a stream of nitrogen using a TurboVap evaporator. Evaporation of the organic phase takes around 30 min.
6. To the dried residue, add 3 ml diethylether and sonicate in a waterbath for 10 min at room temperature.
7. Centrifuge at 3,500 rpm for 10 min at room temperature and, using a Pasteur pipette, transfer the fatty acid/mycolic acid methyl esters in a new glass tube.
8. Evaporate the diethylether under a stream of nitrogen and resuspend the residue in 100-200 μl CH_2Cl_2 .

C. Thin layer chromatography

1. Load 10-30 μl on an aluminium TLC plate using 10 μl capillary tubes (Figure 1).



Figure 1. Loading the lipid samples with a capillary tube directly at the origin of the TLC plate

2. Fatty acid methyl esters (FAMES) and mycolic acid methyl esters (MAMES) are separated by thin layer chromatography in a TLC tank using hexane/ethyl acetate (19:1, v/v). When the solvent front reaches the top of the TLC plate, the plate is taken out, dried very briefly and placed again in the tank for a second round of migration. This allows to better separate the various mycolic acid subspecies.
3. Spray the TLC plate with 5% ethanolic molybdophosphoric acid using a reagent sprayer in a TLC spray cabinet (Figure 2).
4. Lipids are revealed following charring using a heat gun, which emits a stream of very hot air. Bands corresponding to the different mycolic acids will appear as represented in Figure 3.

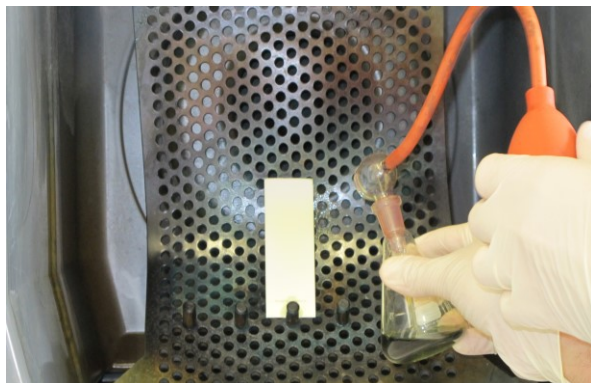


Figure 2. Homogenous spraying of the TLC plate with molybdophosphoric acid in a spray cabinet

D. Purification of the mycolic acid subspecies

1. Mycolic acid methyl esters are loaded on preparative plastic TLC plates and separated, as described above.
2. Spray the plate with 0.01% ethanolic Rhodamine 6G and visualize the mycolic acid subspecies using a handheld UV lamp.
3. Scrape off the bands corresponding to the individual mycolic acid subspecies and put the lipid-loaded silica powder into a glass tube.
4. Extract from mycolic acid with diethyl ether as mentioned above (steps B6-8).
5. If necessary, resolve again the lipids individually on new preparative TLC plates and repeat the whole procedure.
6. Evaporate the diethylether under a stream of nitrogen and resuspend the lipids in 100-200 μl CH_2Cl_2 .
7. Assess purity of the mycolic acid methyl esters on a standard TLC plate as described in steps C1-4.

Representative data

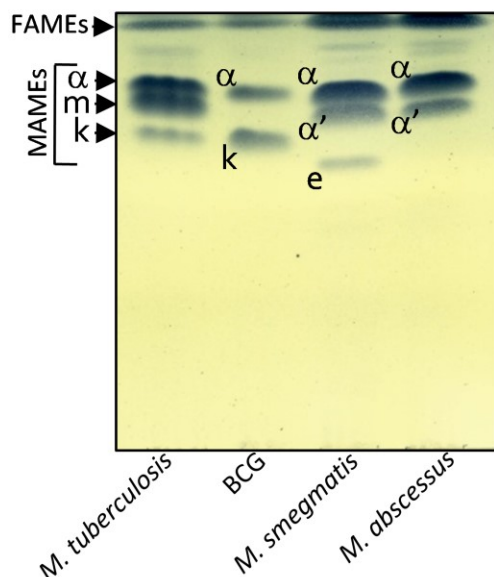


Figure 3. Mycolic acid profile of various *mycobacterial* species. Cultures of *M. tuberculosis* CDC1551, BCG Pasteur, *M. smegmatis* mc²155 and *M. abscessus* CIP104536^T were grown in Sauton's medium. FAMES and MAMES were extracted and analyzed by one-dimensional TLC using hexane/ethyl acetate (19:1, v/v; 2 runs) and revealed by spraying the plate with molybdophosphoric acid followed by charring. -, m, k, corresponding respectively to alpha-, methoxy- and keto-mycolic acids are characteristic of *M. tuberculosis*. BCG Pasteur lacks methoxy mycolic acids. *M. abscessus* possesses only - and '-mycolic acids shared with *M. smegmatis* which produces also epoxy-mycolic acids (e). FAME, fatty acid methyl ester; MAME, mycolic acid methyl ester.

Notes

For all steps involving organic solvents, use glass pipettes and tubes and work under a chemical hood.

Recipes

1. Sauton's media (1 L)
 - Dipotassium phosphate 0.5 g
 - L-asparagine monohydrate 4.0 g
 - Citric acid monohydrate 2.0 g
 - Ferric ammonium citrate 0.05 g

1% zinc sulfate monohydrate 0.1 ml
 Magnesium sulfate heptahydrate 0.5 g
 100% glycerol 60 ml
 5% tyloxapol 5 ml
 Water to 1 L
 Dissolve the above components
 Adjust pH to 7-7.2 with 5 N NaOH
 Make up the volume to 1 L with water
 Autoclave for 10 min
 Store at room temperature

Acknowledgments

The authors wish to thank Vaincre la Mucoviscidose for funding CMD. This protocol was adapted from a previous work by this protocol was adapted from a previous work by Besra (1998).

References

1. Alahari, A., Trivelli, X., Guérardel, Y., Dover, L. G., Besra, G. S., Sacchetti, J. C., Reynolds, R. C., Coxon, G. D. and Kremer, L. (2007). [Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria](#). *PLoS One* 2(12): e1343.
2. Besra, G. S. (1998). [Preparation of cell-wall fractions from mycobacteria](#). *Methods Mol Biol* 101: 91-107.
3. Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurucha, S. S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S. A., Kobayashi, K., Besra, G. S. and Jacobs, W. R., Jr. (2007). [Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12): 5157-5162.
4. Hartkoorn, R. C., Sala, C., Neres, J., Pojer, F., Magnet, S., Mukherjee, R., Uplekar, S., Boy-Rottger, S., Altmann, K. H. and Cole, S. T. (2012). [Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin – nature's isoniazid](#). *EMBO Mol Med* 4 (10): 1032-1042.

III Détermination de concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) et cinétiques

III A Préparation des plaques de cultures

Pour déterminer les CMI, CMB et courbes de croissances, les mycobactéries sont cultivées dans 10 mL de Mueller Hinton ajusté en cations (CAMH) et mises à incuber à 30 ° C de 72 à 120 heures pour limiter la formation d'agrégats. Les cultures sont centrifugées pendant 10 minutes dans des Falcons 50 mL à 4000 tours par minute. Le surnageant est jeté, et le culot est remis en suspension dans 1 mL de CAMH. La suspension est ensuite passée à travers une seringue de 1 mL avec une aiguille de 26G 15 fois de suite. Ces suspensions sont soumises à 10 secondes de sonication avec 10 secondes de repos entre chaque sonication, et cela 3 fois. Cette étape de traitement physique est très importante pour diminuer le nombre d'agrégats bactériens.

L'absorbance est alors évaluée *via* un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600nm. La densité optique (DO) de la culture est mesurée, et la suspension est diluée de sorte à être à 5×10^6 bactéries/mL (On estime que 1 DO équivaut à $3 \cdot 10^8$ mycobactéries/mL). Dans tous les puits d'une plaque à 96 puits à fond plat, 100 μ L de suspension mycobactérienne sont introduits afin d'être à $5 \cdot 10^5$ bactéries/puits. Dans les puits de la première colonne, le volume final de suspension bactérienne contenant les différents antibiotiques à la concentration désirée est de 200 μ L. La première ligne de la plaque est utilisée comme contrôle de croissance, et donc aucun antibiotique n'y est ajouté. Les différentes molécules utilisées sont diluées de sorte à être dans la première colonne à une concentration de 512, 256 ou 128 μ g/mL. Chaque molécule est utilisée dans 3 lignes de la même plaque pour vérifier les variations intra-expérimentations.

On procède ensuite à une dilution d'un facteur deux de la gauche vers la droite de la plaque. Ces plaques sont ensuite incubées à 30 ° C pendant 3-4 jours en prenant les puits contrôles comme repères de croissances.

III B CMI

La lecture des plaques pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices s'effectue de deux façons :

- on utilise un lecteur de microplaques (Tecan) à une longueur d'onde de 600nm afin d'obtenir les différentes valeurs de DO des différents puits,
- et on procède à une lecture visuelle des puits.

Pour déterminer les différentes valeurs de CMI visuellement, les différents points critiques utilisés sont issus des recommandations du CLSI. On cherche les puits pour lesquels visuellement aucune bactérie ne semble s'être développée comparativement au puits contrôle (CMI 99). Dans la pratique, il subsiste toujours de très petits agrégats. La difficulté, notamment avec *M. abscessus* qui développe naturellement beaucoup d'agrégats (principalement dans le CAMH), est de différencier un agrégat de bactéries issues de l'inoculum (et qui ne se sont pas développées à cause de la présence de molécules inhibitrices ou bactéricides) d'un agrégat de bactéries se développant normalement après inoculation. Cette difficulté est d'autant plus accentuée avec les différents variants R de *M. abscessus* qui forment plus de cordes que les variant S. Pour limiter des erreurs de lecture, une étape de comptage des bactéries dans les puits après incubation comparativement à l'inoculum peut être nécessaire.

III C CMB

Les plaques sont préparées de la même façon que pour les CMI. Après incubations des plaques, on détermine visuellement les valeurs de CMI, et on procède à une dilution en série (dans du PBS ?) de 2 gammes de dilutions inférieures et de 4 gammes supérieures à la CMI de chaque molécule évaluée. On étale 20 μ L de ces dilutions sur milieu 7H10 afin de quantifier le nombre de bactéries réellement vivantes dans les différents puits. On incube 1 semaine à 30°C, et on comptabilise le nombre de bactéries de chaque condition. On définit la CMB lorsque 99% des bactéries sont mortes comparativement aux bactéries de l'inoculum ayant servi à la mise en plaque 96 puits.

Enfin on détermine pour chaque molécule le caractère bactéricide, bactériostatique des molécules. Ceci est permis grâce au rapport CMB/CMI. Si ce rapport est inférieur à 4, on considère que la molécule est bactéricide, s'il est compris entre 8 et 16 la molécule est bactériostatique, et au-delà de 32 les bactéries sont considérées comme tolérantes à la molécule.

III D Courbes de croissances

Pour établir une courbe de croissance illustrant l'activité bactéricide ou bactériostatique de certaines molécules, on prépare les plaques 96 puits de la même façon que pour les CMI et CMB, sauf que l'on prépare plusieurs plaques pour les mêmes molécules. Ainsi on peut prélever 1, 2, 3, 4, 5 jours après incubations dans les différents puits correspondant à ces temps d'incubation, dans différents puits et procéder à des dilutions en série afin de comptabiliser les bactéries présentes. On procède de la même façon pour des cultures non traitées, pour obtenir la cinétique de croissance normale des bactéries.

IV Infection de macrophages

IV A Culture

La lignée de macrophages murins J774 est cultivée dans le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), et est incubée dans une étuve à CO₂ à 37°C. La lignée de cellules humaines THP-1 est cultivée dans le milieu de culture Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) avec 10% de SVF, et est également incubée dans une étuve à CO₂ à 37°C.

La veille des infections, les macrophages sont déposés dans des plaques 24 puits à raison de 5.10^4 macrophages par puits dans le cas d'infections de J774. Les cellules THP-1 nécessitent d'être différenciées en macrophages. Pour cela après centrifugation à 100 rpm pendant 10 minutes, les cellules sont suspendues dans du milieu RPMI+SVF10%, contenant 20ng/mL de PMA (Phorbol Myrisate Acetate), qui permet la différenciation chimique en macrophages. Les macrophages THP-1 sont déposés dans des plaques 24 puits à raison et 5.10^5 macrophages par puits dans le cas d'infections 2 à 3 jours avant celles-ci.

IV B Infection de macrophages par *M. abscessus*

Les mycobactéries provenant d'une culture en phase exponentielle sont lavées avec du tampon PBS et diluées dans du DMEM+SVF10%, ou RPMI+SVF10% pour ensemercer les macrophages avec une multiplicité d'infection (MOI) de 1 (THP-1) ou 2 (J774) bactéries par macrophage. Les différentes souches de *M. abscessus* sont traitées physiquement de la même façon que pour la préparation des suspensions des plaques de cultures.

Les plaques sont ensuite centrifugées (cette étape n'est pas obligatoire) pendant 5 minutes à 1000 rpm puis incubées à 37°C pendant 30-60 minutes. Les puits sont lavés 3 fois avec du PBS (1 mL pour 3 puits à chaque lavage). Puis on ajoute dans la plaque 500 µL de milieu DMEM+SVF10% ou RPMI+SVF10% avec de l'amikacine (200µg/mL) afin de tuer les bactéries extracellulaires lors de l'incubation de 1h à 37°C. L'inoculum ayant servi aux infections est dilué en série, et étalé sur 7H10 (0h). Après 1h d'incubation, les puits de cellules sont lavés 3 fois avec le tampon PBS puis les cellules sont lysées à l'aide de 100µL de Triton 1% pendant 2 min puis 900µL de tampon PBS sont ajoutés. Cette suspension est diluée (entre 100 et 10000 fois) avant étalement sur 7H10 pour le dénombrement.

Les autres puits servant à des temps d'incubation plus longs sont lavés de la même façon, et du milieu contenant les différentes molécules est mis dans les puits. Chaque milieu (avec ou sans

molécules d'intérêt), contient de l'amikacine à 50 µg/mL pour limiter la multiplication extracellulaire durant l'incubation. Enfin en fonction des différents temps d'incubation, les puits sont lavés, les cellules lysées et les bactéries étalées sur 7H10 comme précédemment. Pour les temps d'incubation les plus longs, les milieux contenant les antibiotiques sont renouvelés tous les 2 jours pour limiter la perte d'activité de ces derniers par oxydation.

Le taux d'infection des macrophages est obtenu en effectuant le rapport du dénombrement bactérien du temps 1h sur le dénombrement de l'inoculum.

La multiplication bactérienne dans les macrophages est obtenue en effectuant le rapport du dénombrement bactérien des différents temps d'incubation sur le dénombrement de l'inoculum.

V Méthodes d'infections du zebrafish

Voir article qui suit :

**Article 4 : “Deciphering and Imaging
Pathogenesis and Cording of Mycobacterium
Abscessus in Zebrafish Embryos”**

Auteurs

Bernut Audrey, Christian Dupont, Alain Sahuquet, Jean-louis Herrmann, Georges Lutfalla, and Laurent Kremer.

Journal

Jove 2015

doi:10.3791/53130.

Video Article

Deciphering and Imaging Pathogenesis and Cording of *Mycobacterium abscessus* in Zebrafish Embryos

Audrey Bernut^{1,2}, Christian Dupont^{1,2}, Alain Sahuquet¹, Jean-Louis Herrmann³, Georges Lutfalla¹, Laurent Kremer^{1,2}¹Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, CNRS, UMR 535, Université Montpellier²Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, CNRS, FRE 3689, Université Montpellier³Unité de Formation et de Recherche des Sciences de la Santé, EA3647-EPIM, Université Versailles St QuentinCorrespondence to: Georges Lutfalla at lutfalla@univ-montp2.fr, Laurent Kremer at laurent.kremer@cpbs.cnrs.frURL: <http://www.jove.com/video/53130>DOI: [doi:10.3791/53130](https://doi.org/10.3791/53130)Keywords: Infection, Issue 103, *Mycobacterium abscessus*, zebrafish, infection, pathogenesis, innate immunity, macrophage, micro-injection, fluorescence microscopy, live imaging, cording.

Date Published: 9/9/2015

Citation: Bernut, A., Dupont, C., Sahuquet, A., Herrmann, J.L., Lutfalla, G., Kremer, L. Deciphering and Imaging Pathogenesis and Cording of *Mycobacterium abscessus* in Zebrafish Embryos. *J. Vis. Exp.* (103), e53130, doi:10.3791/53130 (2015).

Abstract

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos are increasingly used as an infection model to study the function of the vertebrate innate immune system in host-pathogen interactions. The ease of obtaining large numbers of embryos, their accessibility due to external development, their optical transparency as well as the availability of a wide panoply of genetic/immunological tools and transgenic reporter line collections, contribute to the versatility of this model. In this respect, the present manuscript describes the use of zebrafish as an *in vivo* model system to investigate the chronology of *Mycobacterium abscessus* infection. This human pathogen can exist either as smooth (S) or rough (R) variants, depending on cell wall composition, and their respective virulence can be imaged and compared in zebrafish embryos and larvae. Micro-injection of either S or R fluorescent variants directly in the blood circulation *via* the caudal vein, leads to chronic or acute/lethal infections, respectively. This biological system allows high resolution visualization and analysis of the role of mycobacterial cording in promoting abscess formation. In addition, the use of fluorescent bacteria along with transgenic zebrafish lines harbouring fluorescent macrophages produces a unique opportunity for multi-color imaging of the host-pathogen interactions. This article describes detailed protocols for the preparation of homogenous *M. abscessus* inoculum and for intravenous injection of zebrafish embryos for subsequent fluorescence imaging of the interaction with macrophages. These techniques open the avenue to future investigations involving mutants defective in cord formation and are dedicated to understand how this impacts on *M. abscessus* pathogenicity in a whole vertebrate.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/53130/>

Introduction

Mycobacterium abscessus is an emerging pathogen that causes a wide spectrum of clinical syndromes in humans. These include cutaneous infections as well as severe chronic pulmonary infections, mostly encountered in immunocompromised and in cystic fibrosis patients^{1,2,3,4}. *M. abscessus* is also regarded as a major rapidly-growing mycobacterial species responsible for nosocomial and iatrogenic infections in humans. Moreover, several recent reports highlighted the possibility that *M. abscessus* could cross the blood-brain barrier and induce important lesions in the central nervous system (CNS)^{5,6}. Despite being a rapid grower, *M. abscessus* exhibits also several pathogenic features that are related to those of *Mycobacterium tuberculosis*, including the capacity to remain silent for years within granulomatous structures and to generate caseous lesions in the lungs⁷. More alarming is the low sensitivity of *M. abscessus* to antibiotics, rendering these infections extremely difficult to treat leading to a significant therapeutic failure rate^{8,9}. The important threat of this species is mainly its intrinsic resistance to antibiotics, which is of major concern in public health institutions¹⁰ and a contraindication to lung transplantation¹¹.

M. abscessus displays smooth (S) or rough (R) colony morphotypes that lead to different clinical outcomes. In contrast to the S strain, R bacteria have a tendency to grow end to end, leading to a rope or cord-like structure^{12,13}. Several independent studies based on either cellular or animal models revealed the hyper-virulence phenotype of the R morphotype^{14,15}. From epidemiological studies, the most severe cases of *M. abscessus* pulmonary infections appear to be associated with R variants¹⁶ which are the only variant that has been seen to persist for years in an infected host³. The morphotype difference relies on the presence (in S) or loss (in R) of surface-associated glycopeptidolipids (GPL)¹². However, due to the inherent limitations of the currently available cellular/animal models used to study *M. abscessus* infection, our knowledge regarding the pathophysiological events of the R or S variants remains obscure. Infection of immuno-competent mice *via* intravenous or aerosol routes leads to transient colonization, impeding the use of mice to study persistent infections and for *in vivo* drug susceptibility testing¹⁷. Therefore, developing animal models amenable to the manipulation of the host response is a major challenge. In this context, non-mammalian models of infection have been developed recently, including *Drosophila melanogaster*¹⁸ that offers several advantages such as cost, speed and ethical acceptability over the mouse model. The zebrafish (*Danio rerio*) model of infection has also been explored to visualize, by non-invasive imaging, the progression

and chronology of *M. abscessus* infection in a live animal¹⁹. Importantly, a proof of concept was also established to demonstrate its suitability for *in vivo* antibiotic assessments against *M. abscessus*^{17,20}.

The zebrafish have been widely used during the last two decades to study the interactions between various pathogens and the host immune system²¹. The increasing success of this alternative vertebrate model relies on major and unique opportunities that motivated and validated its use for a better understanding of numerous viral and bacterial infections^{19,22,23,24,25,26,27,28,29}. As opposed to most other animal models, zebrafish embryos are optically transparent, allowing non-invasive fluorescence imaging³⁰. This has led to study *M. abscessus* infected zebrafish embryos with unprecedented details, culminating with the description of extracellular cording, that represent an example of bacterial morphological plasticity. Cording represents a new mechanism of subversion of the immune system and a key mechanism promoting pathogenesis of acute *M. abscessus* infection¹⁹.

This report describes new tools and methods using the zebrafish embryo to decipher the pathophysiological traits of *M. abscessus* infection and to study the intimate interactions between the bacilli and the innate immune system. First, a detailed microinjection protocol that includes processing of the bacterial inoculum, embryo preparation, and infection *per se*, is presented. Methods specifically adapted to assess *M. abscessus* virulence by measuring various parameters, such as host survival and bacterial burden, are presented. Special focus is given on how to monitor, at a spatiotemporal level, the fate and progression of the infection and the host immune response to *M. abscessus* using video microscopy. Moreover, to investigate the contribution and role of macrophages during *M. abscessus* infection, methods to generate macrophages-depleted embryos (using either genetically- or chemically-based approaches) are described. Finally, protocols to visualize the specific interactions with macrophages or neutrophils using either fixed or living embryos are documented.

The aim of this report is to stimulate further studies to shed new light into *M. abscessus* virulence mechanisms and particularly the role of cording in the establishment of an acute and uncontrolled infection process.

Protocol

Zebrafish experimental procedures must comply with the relevant institutional and governmental regulations. For the present study, zebrafish experiments were done at the University Montpellier, according to European Union guidelines for handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and approved under the reference CEEA-LR-13007.

1. Preparation of Reagents and Microinjection Equipment

1. Prepare fish water by dissolving 0.06 g Instant Ocean Sea salt in 1 L distilled water³¹, then autoclave to sterilize (120 °C for 20 min) and store at 28.5 °C for up to 1 month.
2. Prepare methylene blue solution by dissolving 1 g of methylene blue in 1 L distilled water. Add 300 µl of methylene blue solution in 1 L fish water to obtain blue fish water, then autoclave to sterilize and store at 28.5 °C for up to 1 month.
NOTE: The addition of methylene blue in fish water prevents mold growth.
3. Preparation of Phosphate Buffered Saline (PBS)
 1. Prepare a 10 X PBS stock solution by dissolving 5.696 g Na₂HPO₄, 680 mg KH₂PO₄, 969 mg KCl and 78.894 g NaCl in 1 L distilled water and adjust the pH to 7.0 with HCl. To obtain 1 X PBS, dilute 100 ml of the 10 X PBS solution in 900 ml distilled water and autoclave during 20 min at 120 °C to sterilize.
 2. Add 0.05% Tween 80 to obtain 1 X PBST and store at RT for up to 1 year.
4. Prepare oleic Acid Dextrose Catalase (OADC) enrichment by dissolving 8.5 g NaCl, 50 g Bovine Serum Albumin, 20 g D-Glucose, 40 mg Catalase from bovine liver and 0.5 g of oleic acid in 1 L distilled water then filter sterilize the solution and store it at 4 °C for up to 6 months.
5. Prepare 100 ml of ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonic acid (tricaine) stock solution, by dissolving 400 mg tricaine powder in 97.9 ml distilled water. Add 2.1 ml of 1 M Tris (pH 9) to adjust the pH at 7.0 and store the solution at -20 °C.
6. Prepare the microcapillary injection needles by pulling borosilicate glass capillaries (1mm O.D. X 0.78 mm I.D.) using a micropipette puller device with the following settings : Air pressure 650; Heat 999; Pull 50; Velocity 80; Time 200.
7. Prepare a 1.5% agar solution in blue fish water and pour 25 ml of melted agar in 100 mm petri dishes. On the top of the melted agar, place homemade molds in order to imprint specific channels. "V"-shaped channels are used to position embryos while the "U"-shaped are used for eggs (**Figure 1**)³¹. Once solidified, remove carefully the imprint.
NOTE: Cover the agar with blue fish water to avoid dehydration and store at 4 °C for up to 2 months.

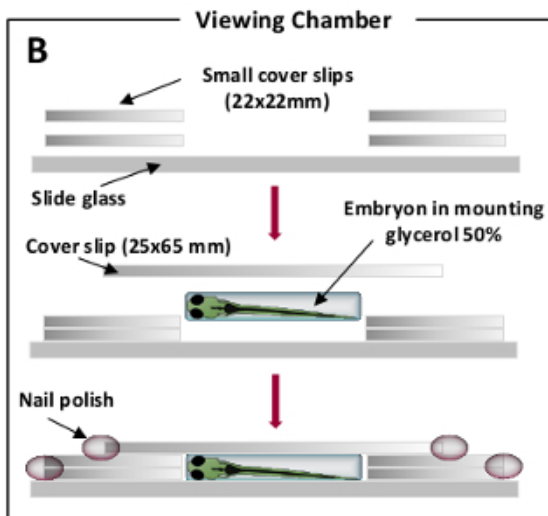
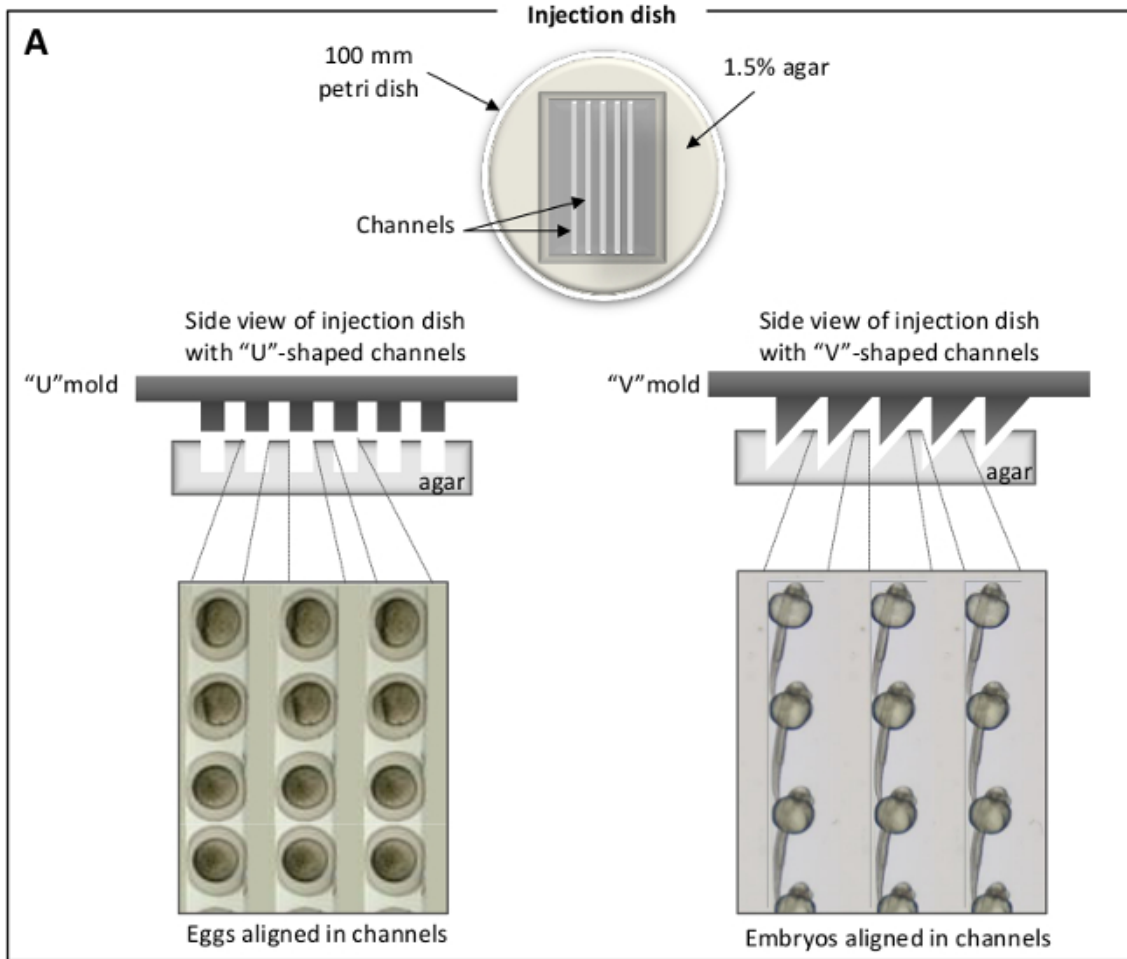


Figure 1. Positioning chambers for zebrafish injections. (A) U-shaped channels for eggs (left panel) and V-shaped channels for embryos (right panel). Zebrafish eggs/embryos are laid in the channels and aligned along the same axis. **(B)** Viewing chambers for microscopic observation. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

2. Preparation and Storage of the *M. abscessus* Inoculum

1. *M. abscessus* growth conditions
 1. Plate out *M. abscessus* from a -80°C glycerol stock onto a Middlebrook 7H10 agar containing 10% of OADC and 0.5% glycerol ($7\text{H}10^{\text{OADC}}$) and supplemented with the appropriate antibiotic depending on the resistance marker carried by the vector encoding the fluorescent protein. Incubate the plates at 30°C for 4-5 days.

2. Pick up a fluorescence-positive mycobacterial colony and inoculate 1 ml Middlebrook 7H9 broth supplemented with OADC, 0.2% glycerol, 0.05% Tween 80 (7H9^{OADC/T}) with the required antibiotic in a 15 ml sterile plastic tube. Incubate at 30 °C for 1 week without shaking.
NOTE: Tween 80 restricts clumping and bacterial aggregation.
 3. Resuspend the pre-culture obtained in 2.1.2 in 50 ml Middlebrook 7H9^{OADC/T} in 150 cm² tissue culture flasks to a final 0.1 OD₆₀₀ (corresponding to around 5.10⁷ bacteria/ml) and incubate further at 30 °C for 4 days to obtain an exponentially-growing culture (OD₆₀₀ = 0.6 to 0.8).
NOTE: To minimize clumping, especially of the rough variant, incubation should not exceed 5 days. Both smooth and rough variants display a similar growth rate.
2. Preparation of the *M. abscessus* inocula
NOTE: Due to high propensity of rough *M. abscessus* to form large aggregates and to produce cords, a specific treatment is necessary to generate homogeneous and quantitatively controlled inocula prior to microinjections in the embryos. This treatment is also applied to smooth bacteria that produce aggregates, albeit to a lesser extent than the rough strain.
 1. Harvest exponentially-growing cultures from 150 cm² tissue culture flasks by centrifugation at 4,000 x g for 15 min at RT in a 50 ml sterile plastic tube and resuspend the bacterial pellet in 1 ml 7H9^{OADC/T}. Aliquot 200 µl of bacterial suspensions into 1.5 ml microcentrifuge tubes.
NOTE: Working with small volumes in 1 ml syringes is necessary to obtain highly homogeneous suspensions.
 2. Homogenize the bacterial suspensions with a 26-G needle (15 up-and-down sequences), sonicate three times for 10 sec (with 10 sec breaks between each sonication sequence) using a waterbath sonicator. Add 1 ml of 7H9^{OADC/T} and vortex briefly. Centrifuge 3 min at 100 x g.
 3. Carefully collect the mycobacteria-containing supernatants to avoid the clumps and pool the homogenous suspensions in a 50 ml sterile plastic tube.
 4. Check visually for the presence of eventual remaining bacterial aggregates.
NOTE: If aggregates are still present, proceed to an additional centrifugation step at 100 x g for 2 min, and collect the supernatant.
 5. Centrifuge the suspension at 4,000 x g for 5 min, resuspend the pellet in 200 µl 7H9^{OADC/T} and proceed to the injection.
 6. Assess the final bacterial concentration by plating serial dilutions (in 1 x PBST) on 7H10^{OADC} agar and counting colony forming units (CFU) after 4 days incubation at 30 °C. CFUs should be determined for each new batch.
 7. Prepare frozen inocula stocks by storing 5 µl aliquots at -80 °C.
NOTE: The CFU assessment of the -80°C frozen aliquots is a pre-requisite to determine the exact number of viable bacteria as freeze/thawing may affect bacterial viability of the inoculum. These frozen inocula are ready to be used for subsequent injections. Since all aliquots contain the same number of CFU, they allow injecting bacteria in a reproducible manner from one experiment to another.
 3. Inoculum quality control
NOTE: Ziehl-Neelsen staining (specific to mycobacteria) can be used to compare the quality of the bacterial suspensions prior to and after the homogenization procedures described in 2.2.
 1. Spot and spread out one droplet of the homogenized bacterial suspension on a glass slide and allow it to dry completely, fix the smear for at least 30 min on a hot plate set to 65-70 °C and stain using a Ziehl-Neelsen staining protocol.
 2. Observe the bacterial smear with a microscope using a 100 X objective and compare with a smear of a non-processed bacterial suspension (**Figure 2**).

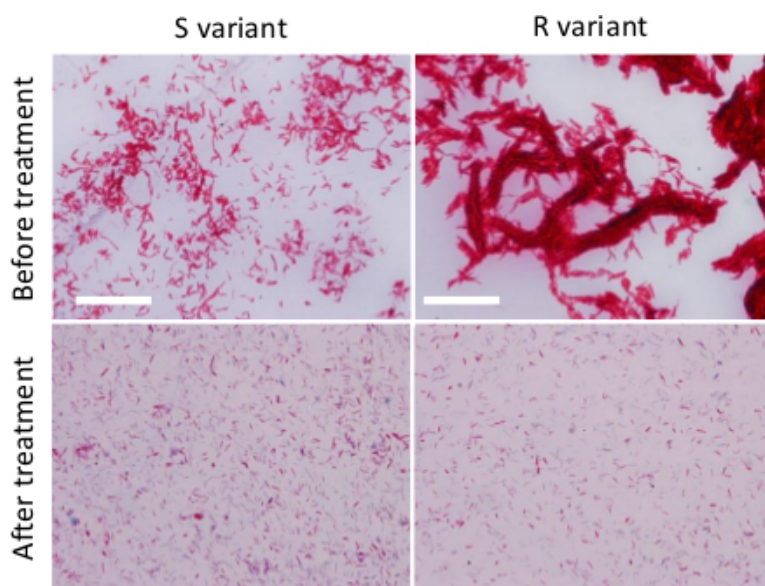


Figure 2. Preparation of dispersed *M. abscessus* inocula. Ziehl-Neelsen staining of R or S variants grown on broth medium prior to any treatment (upper panels) or after treatment (lower panels) to reduce the size and number of mycobacterial aggregates (successive steps of syringing, sonication and decantation). Bacteria were observed using a microscope with 100 X APO oil 1.4 NA objective). Scale bars: 20 µm. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

3. Preparing Zebrafish Embryos

1. Spawning and collecting zebrafish eggs
 1. The day before spawning, breed adult zebrafish by placing 2 males and 1 female (usually a 2:1 ratio allows optimal fertilization rate) into a breeding chamber, consisting of a separate fish tank with an egg collection basket³¹.
NOTE: Egg collection baskets are used to protect the eggs from being eaten by the parents and facilitate egg harvesting.
 2. At 1 hpf, harvest eggs and only properly developed embryos in a 100 mm Petri dish filled with 25 ml blue fish water (maximum 100 embryos per dish) and keep them at 28.5 °C. Non-fertilized eggs are discarded.
2. Preparation of zebrafish embryos for injections
 1. At about 24 hr post-fertilization (hpf), dechorionate the embryos with fine tweezers in a 100 mm Petri dish and keep them at 28.5 °C.
 2. Collect the 30-48 hpf embryos using a pipette and transfer them to a "V"-shaped positioning chamber filled with 25 ml of fish water containing 270 mg/L tricaine. Lay the embryos properly in the channels using a homemade microloader tip tool (homemade clipped micro loader tip) optimized for an easier micro-manipulation.
NOTE: Orientate the dorsal side downwards for intravenous injections in the caudal vein or the dorsal side upwards for tail muscle injections.

4. Micro-injection Procedure

NOTE: The micro-injection procedure for *M. abscessus* is similar to the one described previously for *M. marinum* injections³². To assess the chronology of *M. abscessus* infection (survival, bacterial loads, kinetic and characteristics of infection), injections in the caudal vein of 30 hpf embryos are preferred. To visualize the recruitment of immune cell, injections are done in localized sites such as is in tail muscles in 48 hpf embryo.

1. Dilute the mycobacterial inoculum in 1 X PBST (depending on the number of CFU to be administered as determined in Step 2.2.6), containing 10% red phenol to check proper injection.
2. Load a microcapillary injection needle with 5-10 µl of the bacterial inoculum using a microloader tip, connect the microinjection needle into the holder of the three-dimensional micromanipulator connected to the injector and break off the top of the needle with fine tweezers to obtain an opening diameter of 5-10 µm.
3. Calibrate the injection volume by adjusting the microinjection pressure (20-50 hPa) and time (0.2 sec).
NOTE: The required injection volume is calibrated by visual determination of the diameter of a droplet expelled into the yolk of an embryo.
4. For caudal vein injection, position the embryo with the ventral side facing the needle (as described in section 3.2.2) and place the needle tip close to the urogenital opening, targeting the caudal vein, and gently push the tip of needle into the embryo until it just pierces the caudal vein region. Deliver the desired volume of bacterial preparation, usually 1-3 nl containing around 100 CFU/nl.
5. For intramuscular injection, position the embryo with the dorsal side facing the needle (as in section 3.2.2), place the needle over one somite and inject a small volume (1 nl) of inoculum.
NOTE: As for caudal vein injections, intramuscular infections are also challenging to perform. Care must be taken to avoid an overloading that may injure the surrounding tissues.
6. At the end of the injection procedure, control the size of the inoculum by injecting the same volume of bacterial suspension in a drop of sterile PBST followed by plating on 7H10^{OADC} and counting the CFU. Around 100 embryos can be injected with a needle.
NOTE: Because rough *M. abscessus* may continue to form aggregates in the needle, injections need to be done immediately after preparation of the inoculum.
7. Transfer the infected fish individually in 24-well plates containing 2 ml/well fish water and incubate at 28.5 °C. Embryos injected with 1-3 nl 1 X PBST can be used as controls.
8. Proper infection of fluorescent bacteria in embryos is monitored using a fluorescence microscope.

5. Generation of Macrophage-Depleted Embryos

NOTE: Selective depletion of macrophages from tissues is used to investigate their contribution and role during infection. To visualize the proper depletion of macrophages, it is recommended to use a transgenic line with fluorescent macrophages, where mCherry is specifically expressed under the control of the macrophage specific *mpeg1* promoter¹⁹.

1. Lipo-clodronate-based procedure
NOTE: The lipo-clodronate procedure allows a selective depletion of macrophages from tissues (but no neutrophils)¹⁹. This compound does neither alter the survival of embryos nor affect the integrity of bacteria. A detailed protocol to prepare liposome-encapsulated clodronate has been reported previously³³.
 1. At 24 hpf, dechorionate the embryos and transfer them to a "V"-shaped injection dish filled with fish water supplemented with tricaine to maintain the embryos in an anesthetized state until the end of the injection procedure, as described in 3.2.2. Orientate the dorsal side downwards.
 2. Load a microcapillary injection needle with liposome-encapsulated clodronate (lipo-clodronate), connect the microinjection needle into the holder of the three-dimensional micromanipulator and break off the top of the needle with fine tweezers to obtain a tip opening diameter of 10 µm.
 3. To calibrate the injection volume, adjust the microinjection pressure to 20 hPa and the injection time to 0.2 sec. Place the needle tip close to the urogenital opening, targeting the caudal vein, and gently push the tip of needle into the embryo until it just pierces the caudal vein region and deliver the desired volume of solution (2-3 nl, 3 times).

NOTE: The lipo-clodronate suspension is very sticky and should be vortexed prior to injection to avoid blocking the vascular system and killing of the embryo. It is crucial to proceed to several successive injections of small volumes.

4. Transfer the embryos in 100 mm petri dishes containing fish water and keep them at 28.5 °C until infection.
5. Control the proper depletion of macrophages by fluorescent microscopy.

NOTE: Complete macrophage depletion is effective for 4 days after lipo-clodronate administration.

2. Morpholino-based procedure

1. The day before spawning, breed adult zebrafish by placing 2 males and 1 female separated by a plastic barrier in a breeding chamber.
2. The next day, ≈ 30 min after that the light turns on in the zebrafish facility, remove the barrier separating males and females. Wait for about 20 min after beginning of the spawning to optimize the fertilization rate. Harvest the eggs and slow their development by transferring them in a 100 mm petri dish filled with cold blue fish water (4 °C).

NOTE: The control of the spawning is crucial for the morpholinos-based experiments. Morpholinos can only be injected into the eggs up to the four cells stage.

3. Collect the eggs using a pipette and deposit the eggs down in the “U”-shaped injection-chamber filled with cold blue fish water and block the eggs in the channels using a homemade microloader tip tool.
4. Prepare the *pu.1* morpholino solution containing 10% of red phenol, as previously described¹⁹. Load a microcapillary injection needle with the morpholino preparation and connect the microinjection needle into the holder of the three-dimensional micromanipulator, then break off the tip of the needle with fine tweezers to obtain a tip opening diameter of 5-10 μm.
5. To calibrate the injection volume, adjust the microinjection pressure to 20-50 hPa and the injection time to 0.2 sec. Place the needle tip close to the egg and gently push the tip of needle through the chorion into the egg and deliver the desired morpholino solution volume, typically 3-5 nl.
6. After micro-injection, transfer the eggs in a 100 mm petri dish in fish water and incubate at 28.5 °C till the infection procedure begins.
7. Analyze the proper (complete) depletion of macrophages in *pu.1* morphants by fluorescent microscopy at 30 to 48 hpf.

NOTE: Depending on the concentration injected, *pu.1* morpholinos may also affect the number of early neutrophils. To confirm the proper depletion of macrophages without altering the number of neutrophils, it is recommended to use a double transgenic zebrafish line with fluorescent macrophages and neutrophils (with GFP expression specifically driven by the *mpx* promoter)¹⁹.

6. Bacterial Burden Quantification

1. Determination by CFU enumeration

1. At the desired time point, collect groups of infected embryo (5 per conditions) in 1.5 ml microcentrifuge tubes (1 embryo/tube), cryo-anesthetize the embryos by incubation on ice for 10 min and euthanize using an overdose of tricaine (300-500 mg/L)
2. Wash the embryos with sterile water twice and dispense them in a new tube, lyse each embryo with 2% Triton X-100 diluted in 1 X PBST using a 26-G needle and homogenize the suspension until complete lysis. Centrifuge the suspension and resuspend the pellet in 1 X PBST with 0.05% Tween 80. Serial dilutions of the homogenates are plated on Middlebrook 7H10^{OADC} and supplemented with BBL MGIT PANTA, as recommended by the supplier.

NOTE: *M. abscessus* being more susceptible to NaOH treatment than *M. marinum*, decontamination of fish lysates without affecting *M. abscessus* growth can be successfully achieved using the BBL MGIT PANTA antibiotic cocktail.

3. Incubate the plates for 4 days at 30 °C and count colonies.

2. Determination by Fluorescence Pixel Count (FPC) measurements in live embryos

NOTE: To determine the bacterial loads *via* fluorescence emission, serial images of infected embryos are acquired and fluorescence intensity measured by FPC (identification of bacteria by particle analysis) using a homemade macro developed for the ImageJ freeware. A particle analysis requires a binary black and white image that relies on a threshold range that allows to discriminating the fluorescent signal of interest from the background.

1. At the desired time point, tricain-anesthetize infected embryos (5-10 per condition) in 35 mm petri dishes as described in 3.2.2.
2. Remove water and submerge the embryos and the whole dish surface with 1% low melting point agarose in fish water, then align laterally the embryos. Cover the solidified agarose with fish water containing tricaine.
3. Acquire fluorescence images of the entire embryo using an epifluorescence microscope with a 10 X objective.

NOTE: The fluorescence image acquisition is a critical step of the FPC measurements procedure. It is important to use a calibrated monitor with a colour calibration probe. Adjusting the optimal time of exposure to obtain a minimal background during acquisition prevents saturation of the signal. Images must be in an 8-bit tiff format. Identical settings are kept during the whole experiment for quantitative purposes.

4. Remove carefully the agarose from the embryos with a homemade microloader tip tool. These embryos can be used for subsequent analyses if required. Prior to the quantification of the bacterial load, each picture shall be quality controlled. To analyze the images and convert the fluorescence intensity into FPC per fish, open the ImageJ freeware.

NOTE: The FPC value reflects the bacterial burden as shown previously using *M. marinum*³⁴.

5. Determine the required threshold for image analysis using an image of an uninfected embryo (several control embryos can be used to obtain an average threshold). Go to Image → Adjust → Threshold and then move the bottom slider in the threshold window to the right until the background becomes completely black (*i.e.*, to obtain a background should be at zero). Record the corresponding value.
6. Within Image J, open the FPC macro (supplementary file) and follow the prompts: locate the folder of images to be measured and then enter the threshold as previously determined and click on “OK”.

NOTE: The macro automatically subtracts the background. A threshold is then applied. Florescent signals are identified following the particle analysis.

7. Copy and paste the data from the summary window to the desired software for data analysis.

NOTE: In contrast to the CFU determination method, the FPC method is non-invasive and allows re-use the embryos for subsequent analyses and, importantly, monitoring the dynamics/kinetics of the bacterial burden on an individual basis. It, therefore, allows to significantly reducing the number of animals, in agreement with ethical rules.

7. Imaging *M. abscessus*-infected Embryos

1. Live imaging of *M. abscessus* infection
 1. Mount tricaine-anesthetized embryos (see 3.2.2) in 1% low melting point agarose in a 35 mm petri dish prior to epifluorescence microscopy observations. Use a glass bottom dish for inverted confocal microscopy or in a single cavity depression slide for upright confocal microscopy. Orientate the embryo to the desired position and cover the solidified agarose with fish water containing tricaine.
 2. Use an epifluorescence microscope with a 10 X objective for sequential fluorescence acquisition and transmission images of the entire embryo. Alternatively, use a confocal microscope with 40X or 63X objectives to visualize the activity of immune cells after an infection.
2. Imaging fixed *M. abscessus* infected embryos
 1. Euthanize the embryos as described in 6.1.1 and transfer them to 1.5 ml micro-centrifuge tubes and fix the embryos in 4% paraformaldehyde in 1 X PBST for 2 hr at RT or O/N at 4 °C. Remove paraformaldehyde by washing the embryos twice with 1 X PBST for 10 min.
NOTE: To preserve fluorescence, fixed embryos must be protected from light.
 2. To preserve the integrity of the tissues and fluorescence, embryos are incubated successively in increasing glycerol concentration solutions (10, 20, 30, 40 and 50% diluted in 1 X PBST), for 10 min per condition.
NOTE: Fixed embryos can be stored for several months in 50% glycerol at 4 °C.
 3. Lay the embryo embedded in 50% glycerol in a viewing chamber (**Figure 1B**)³¹.
 4. Image using 40X or 63X objectives on a confocal microscope.

Representative Results

Although various anatomical sites can be injected³², caudal vein injections are often used to generate systemic infection for subsequent analyses including survival experiments, bacterial burden determination, phagocytosis activity or cord formation. Injections in the tail muscles are used to assess the recruitment of macrophages at the site of injection (**Figure 3A**). To investigate and compare the virulence of R and S variants of *M. abscessus*, fluorescent bacterial suspensions are injected in the caudal vein of 30 hpf embryos (**Figure 3A**)¹⁹. In contrast to the S variant, the R morphotype induces a more robust and lethal infection in zebrafish embryos (**Figure 3B**), characterized by the rapid development of bacterial abscesses within the Central Nervous System (CNS) (**Figure 3C**). Systemic injections with both the R and S variants lead to CNS infections and difference in the pathology and virulence phenotypes can be quantified either by fluorescence microscopy observation (**Figure 3C**), by enumerating the CFU per fish (**Figure 3D**) or by determining the FPC of acquired images (**Figure 3E**). Importantly, CFU and FPC determination are correlated and point out to larger bacterial loads for the R strain than the S strain at 3 and 5 dpi. Overall, these results strongly support zebrafish as a relevant and non-invasive model of infection to study the chronology of the infection process.

Perhaps one of the most spectacular features was revealed by video-microscopy that allows visualizing serpentine cords within the CNS of embryos infected with the R variant (**Figure 4**). Thanks to the optical transparency of the embryos, the kinetic of R-cord formation could be monitored and imaged in a non-invasive manner, illustrating the high propensity of the R variant to replicate extracellularly. This uncontrolled replication rate, combined with cellular/tissue destruction rapidly leads to the development of abscesses and ultimately larval death.

Macrophages are known to play an important role during mycobacterial infection and particularly by driving the granuloma formation³⁵. Two complementary strategies can be used to study *M. abscessus* growth/virulence in macrophage-depleted embryos: the lipo-clodronate- and morpholino-based procedures (**Figure 5A**). Infection of macrophage-depleted embryos with the R variant leads to a massive increase in the bacterial loads and cord production as revealed by video-microscopy (**Figure 5B**), leading to extremely rapid death (100% dead embryos at 3 dpi; **Figure 5C**). This clearly indicates that macrophages are required to control *M. abscessus* infection.

To further investigate the role of macrophages during infection, specific transgenic embryos harboring red fluorescent macrophages (*mpeg1:mCherry*) can be used¹⁹. Injection of *M. abscessus* expressing Wasabi into the tail muscle or in the caudal vein induces a marked recruitment of myeloid cells, mainly macrophages, at the site of infection. This recruitment leads to efficient phagocytosis of individual bacteria (**Figure 6A-6B**). Despite the presence of macrophages, confocal microscopy reveals the appearance of large bacterial cords that macrophages cannot phagocytize (**Figure 6C**). Taken together, these findings highlight a new mechanism of immune evasion based on the role of cording in preventing mycobacterial phagocytosis.

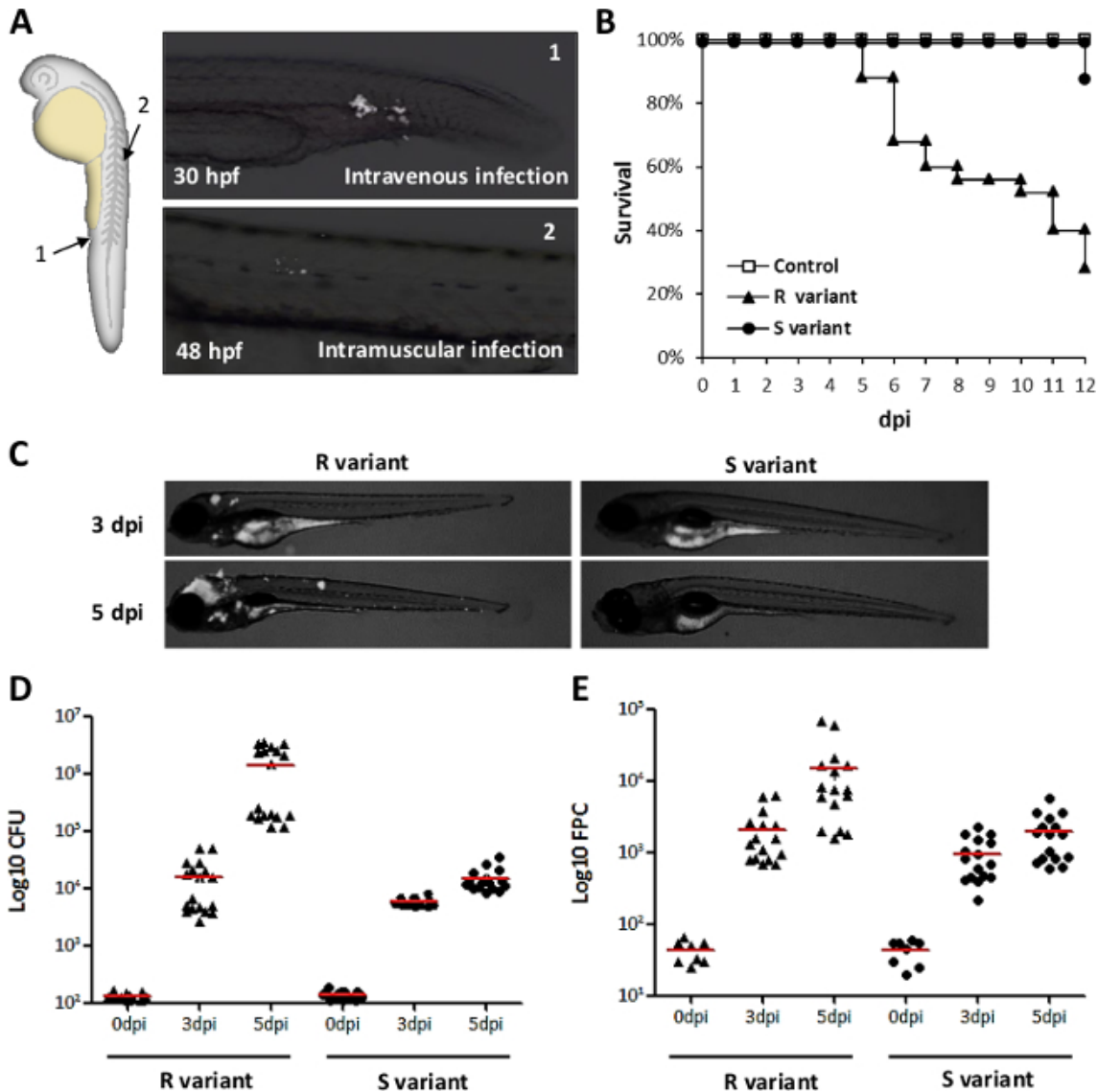


Figure 3. *M. abscessus* infection in zebrafish embryos. **(A)** (Top panel) Intravenous infection performed by injecting fluorescent *M. abscessus* (shown in white) in the caudal vein (arrow 1), posterior to the urogenital opening, in 30 hpf embryos. (Lower panel) Intramuscular infection performed by injecting fluorescent mycobacteria (shown in white) in the tail muscle over a somite (arrow 2), in 48 hpf embryos. **(B-E)** 30 hpf embryos intravenously infected with tdTomato-*M. abscessus* (R and S variants). **(B)** Survival curves of embryos infected with ≈ 300 CFU either R or S variants or PBS injected controls ($n=20$). Representative results from three independent experiments are shown. **(C)** Spatiotemporal visualization of either the R or the S variant expressing tdTomato (white) at various time points post-infection performed by fluorescence live imaging. For each strain, a representative fluorescence and transmission overlay of whole infected embryos is shown. The same embryos were imaged at 3 and 5 dpi. **(D-E)** Bacterial loads within embryos infected with either R or S variants (≈ 200 CFU) determined by CFU counting **(D)** or FPC measurements **(E)**. **(D)** CFU from lysate of individual embryos at various time points post-infection determined by plating onto Middlebrook 7H10^{OADC} supplemented with BBL MGIT PANTA. Results are expressed as mean log \pm SD (horizontal bars) CFU per embryo from three independent experiments ($n=5$). **(E)** FPC measurements from individual living embryos at various time points post-infection based on particle analysis using ImageJ. Results are expressed as mean log \pm SD (horizontal bars) FPC per embryo from three independent experiments ($n=5$). All images were obtained with an epifluorescence microscope equipped with a digital color camera. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

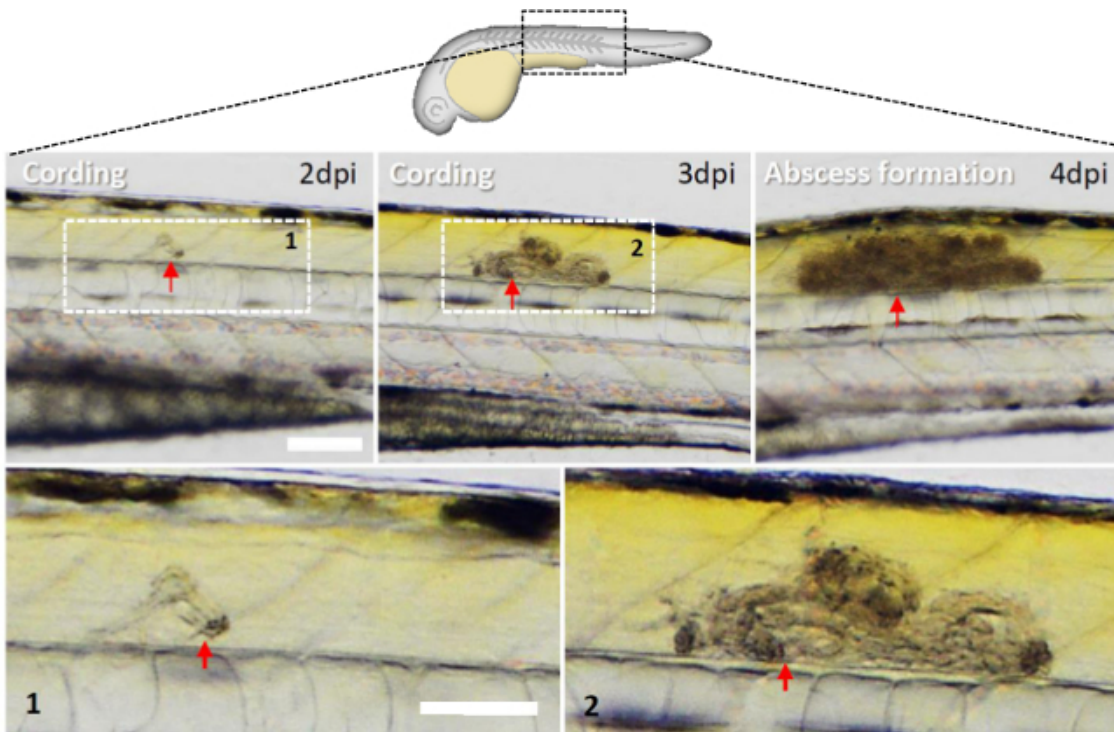


Figure 4. *In vivo* cording of the R variant. 30 hpf embryos infected intravenously with the R variant of *M. abscessus* and imaged at various time points post-infection to visualize the progression of cord formation. The red arrow is used as a fixed reference point in order to follow the spatiotemporal evolution of the cord. The DIC pictures of the part of the tail containing the growing serpentine cord are boxed (microscope equipped with a color camera). Scale bars: 100 μ m. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

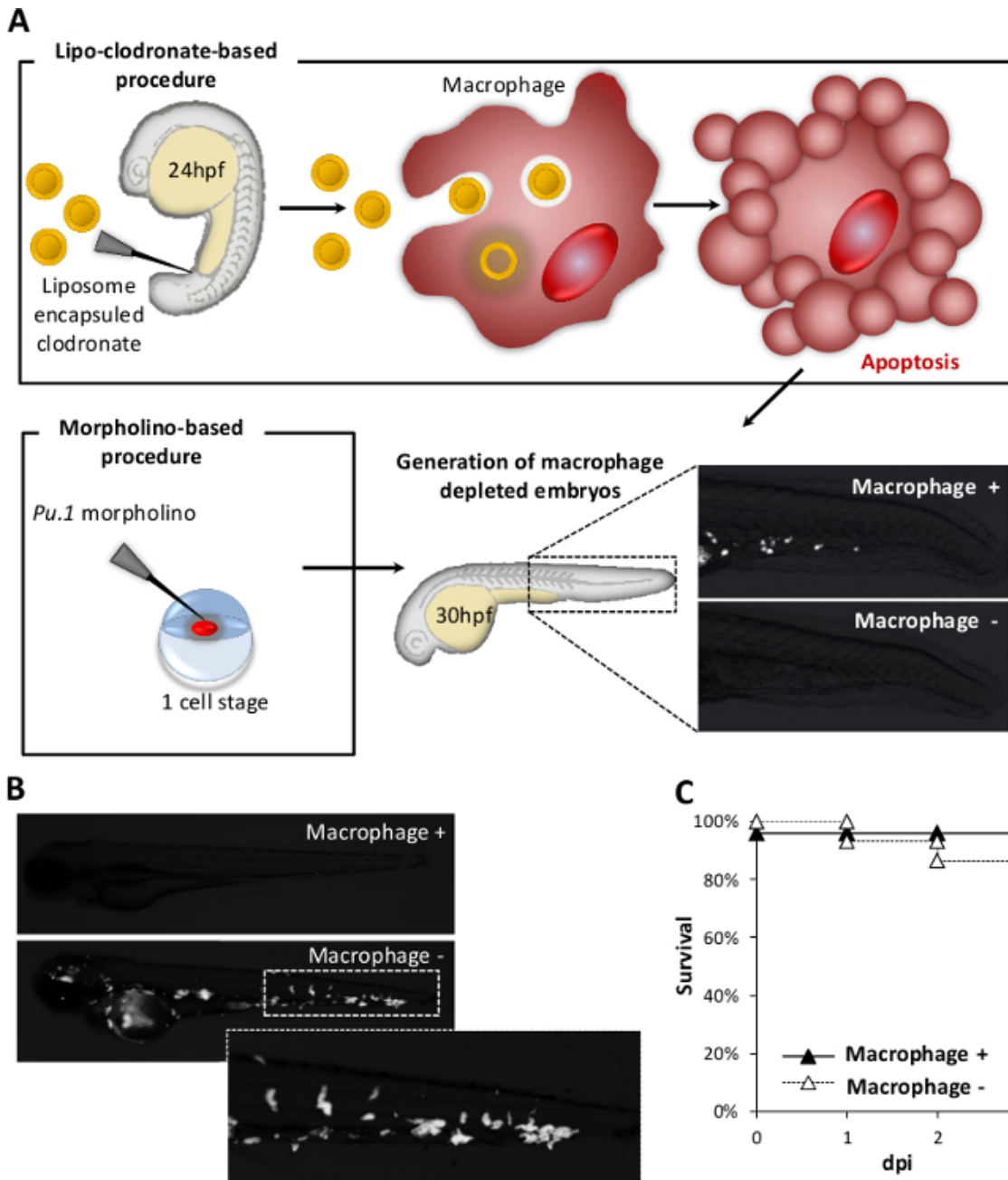


Figure 5. Depletion of macrophages leads to increased cord proliferation. (A) Embryos are depleted using the lipo-clodronate-based procedure or the morpholino-based procedure. (Top panel) Clodronate-encapsulated liposomes (lipo-clodronate) are injected intravenously in 24 hpf *Tg(mpeg1:mCherry)* embryos. Within the circulation, lipo-clodronate is rapidly engulfed by macrophages that undergo subsequent apoptosis. (Left-lower panel) Injection of the morpholino preparation to knock-down the expression of the *pu.1* gene into fertilized *Tg(mpeg1:mCherry)* zebrafish eggs. (Right-down panel) The correct depletion of macrophages in embryos is checked by fluorescence microscopy. (B-C) 30 hpf macrophage-containing (+) or macrophage-depleted (-) embryos (following lipo-clodronate treatment) are infected with *M. abscessus* R expressing tdTomato (shown in white). (B) Live imaging at 2 dpi shows exacerbation of the infection within macrophage-depleted embryos and hyper-cording. (C) Survival curves of the macrophage-containing or macrophage-depleted embryos infected with ≈ 300 CFU *M. abscessus* R (n=20). Representative results from three independent experiments are shown. All images were acquired with a microscope connected to a color camera. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

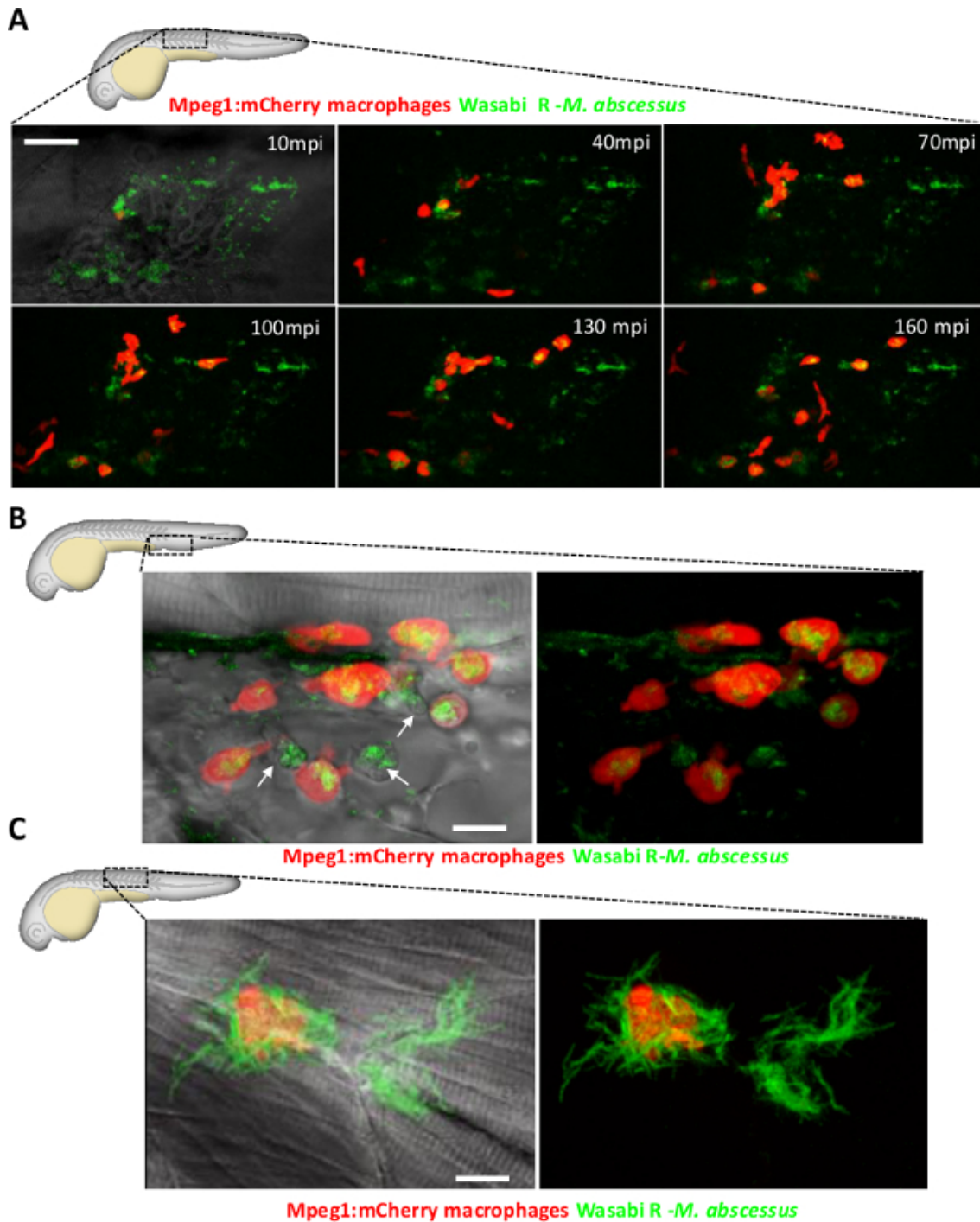


Figure 6. Behavior of macrophages in embryos infected either locally or systemically with *M. abscessus*. (A) 48 hpf *Tg(mpeg1:mCherry)* zebrafish embryos are infected intramuscularly with Wasabi-expressing *M. abscessus* R. Live imaging using a confocal microscope to visualize recruited macrophages phagocytizing individual mycobacteria (in minutes post-infection, mpi). Maximum intensity projection showing an intense recruitment of macrophages (red) to the injection site (confocal microscope with 40X APO water 0.8 NA objective). Scale bar: 20 μ m. (B-C) 48 hpf *Tg(mpeg1:mCherry)* embryos intravenously infected with *M. abscessus* R expressing Wasabi were fixed and imaged by confocal microscopy (40X) at 4 hpi (B) and 3 dpi (C). (B) Maximum intensity projection of macrophage (red) or other myeloid cells, presumably neutrophils (arrows), containing isolated mycobacteria (green) close to the site of injection (confocal microscope with 63X APO oil 1.33 NA objective). Scale bar: 10 μ m. (C) Maximum intensity projection showing one macrophage (red) unable to phagocytize a cord (green) (confocal microscope with 63X APO oil 1.33 NA objective). Scale bar: 5 μ m. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

The zebrafish has recently emerged as an excellent vertebrate model system for studying the dynamics of bacterial infection using wide field and confocal imaging in real-time³⁶. The combination of dispersed mycobacterial suspensions (protocol 2.2) together with micro-injection methods

(protocol 4) allows reproducible systemic infections, and subsequent monitoring and visualization of the progression of the infection with a special focus on the bacterial interactions with host macrophages. Virulence of *M. abscessus* *in vivo* can be investigated thanks to the use of wild-type golden zebrafish³⁷. To study interactions between *M. abscessus* and host myeloid cells, several transgenic zebrafish lines can be used such as *Tg(mpeg1:mCherry)* to visualize macrophages¹⁹. Additional transgenic reporter lines such as the *as Tg(mpx:GFP)*³⁸ or *Tg(lyz:DsRed)*³⁹ with either green or red neutrophils, respectively, can also be used to address the specific role of these granulocytes in response to the infection.

M. abscessus, and particularly the R variant, exhibits a natural propensity to form massive bacterial aggregates¹⁹, thus preventing reproducible micro-injection. In addition, the fact that the R variant forms much larger clumps than the S variant also precludes the potential comparison of the virulence phenotypes for the two isogenic variants. The protocol described in section 2 allows obtaining homogenous and dispersed *M. abscessus* suspensions for micro-injection in embryos. This preparation can be applied to any other mycobacterial species or mutant strains displaying excessive aggregating properties. Since the sonication step can alter the outermost mycobacterial cell wall layer, care should be taken to assess the impact of this physical treatment on bacterial viability for each new strain.

Determination of bacterial burdens routinely relies on CFU counting after plating lysed embryos on selective agar medium at various time points post-infection, as described in protocol 6.1. This procedure includes several limitations: since animals are euthanized, each embryo (or group of embryos) can be used for the determination of a single time point. In addition, this method remains inaccurate due to a large proportion of bacteria that are killed and/or lost during lysis, subsequent serial dilutions, or mainly by clumping. Counting the CFU is also a laborious task. As an alternative, the protocol 6.2 describes an efficient method to quantify the *M. abscessus* burden that includes limited handling steps, based on the analysis of fluorescent images of infected embryos with pixel quantification, as developed originally for *M. marinum*^{40,41}. This FPC method based on particle analysis, shows a good correlation with the CFU countings. Similarly, by combining microscopy and fluorescence quantification, relative changes in innate immune cell numbers per embryo can be quantified by image analysis using adequate transgenic lines.

Zebrafish embryos can be used to evaluate the role of immune cell during infection and macrophage depletion was found to adversely affect host survival in response to *M. abscessus* infection. Specific macrophage depletion can be efficiently generated using the lipo-clodronate-based procedure (protocol 5.1) or the morpholino-based procedure (protocol 5.2). Nevertheless, since the presence of macrophages is crucial for the establishment and the maintenance of the vascular system and for correct embryonic development, it is recommended to ablate macrophage production at 24 hpf using lipo-clodronate.

The zebrafish embryo appears as a unique model to study *M. abscessus* infections and the role of extracellular cording as an immune system subversion strategy. If determinants controlling cording in *M. abscessus* can be identified, they could lead to the development of innovative therapeutic options. Linking the use of zebrafish together with innovative high throughput technologies⁴² also opens the field to drug discovery and new pharmacological approaches against this drug-resistant pathogen.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The authors are grateful to K. Kissa for helpful discussions and for providing lipo-clodronate and L. Ramakrishnan for the generous gift of pTEC27 and pTEC15 that allow expression of tdTomato and Wasabi, respectively. This work forms part of the projects of the French National Research Agency (ZebraFlam ANR-10-MDI-009 and DIMYVIR ANR-13-BSV3-007-01) and the European Community's Seventh Framework Program (FP7-PEOPLE-2011-ITN) under grant agreement no. PITN-GA-2011-289209 for the Marie-Curie Initial Training Network FishForPharma. We wish also to thank the Association Gregory Lemarchal and Vaincre La Mucoviscidose (RF20130500835) for funding C.M. Dupont.

References

1. Brown-Elliott, B. A., Wallace, R. J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**, (4), 716-746 (2002).
2. Aitken, M. L., Limaye, A., *et al.* Respiratory outbreak of Mycobacterium abscessus subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **185**, (2), 231-232 (2012).
3. Gilljam, M., Lindblad, A., Ridell, M., Wold, A. E., Welinder-Olsson, C. Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**, (5), 1497-1504 (2007).
4. Roux, A. -L., Catherinot, E., *et al.* Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**, (12), 4124-4128 (2009).
5. Lee, M. -R., Cheng, A., *et al.* CNS infections caused by Mycobacterium abscessus complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**, (1), 222-225 (2012).
6. Talati, N. J., Roupahel, N., Kuppalli, K., Franco-Paredes, C. Spectrum of CNS disease caused by rapidly growing mycobacteria. *The Lancet Infectious Diseases*. **8**, (6), 390-398 (2008).
7. Medjahed, H., Gaillard, J. -L., Reytrat, J. -M. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field. *Trends in Microbiology*. **18**, (3), 117-123 (2010).
8. Griffith, D. E., Girard, W. M., Wallace, R. J. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *The American Review of Respiratory Disease*. **147**, (5), 1271-1278 (1993).
9. Nessar, R., Cambau, E., Reytrat, J. M., Murray, A., Gicquel, B. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**, (4), 810-818 (2012).
10. Sanguinetti, M., Ardito, F., *et al.* Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant Mycobacterium abscessus a patient with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**, (2), 816-819 (2001).

11. Griffith, D. E., Aksamit, T., *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **175**, (4), 367-416 (2007).
12. Howard, S. T., Rhoades, E., *et al.* Spontaneous reversion of Mycobacterium abscessus a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology (Reading, England)*. **152**, (Pt 6), 1581-1590 (2006).
13. Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T. F., Julián, E., Brambilla, C., Luquin, M. Demonstration of cord formation by rough Mycobacterium abscessus variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**, (6), 2293-2295 (2011).
14. Byrd, T. F., Lyons, C. R. Preliminary characterization of a Mycobacterium abscessus mutant in human and murine models of infection. *Infection and Immunity*. **67**, (9), 4700-4707 (1999).
15. Catherinot, E., Clarissou, J., *et al.* Hypervariance of a rough variant of the Mycobacterium abscessus type strain. *Infection and Immunity*. **75**, (2), 1055-1058 (2007).
16. Catherinot, E., Roux, A. -L., *et al.* Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**, (1), 271-274 (2009).
17. Bernut, A., Le Moigne, V., Lesne, T., Lutfalla, G., Herrmann, J. -L., Kremer, L. In vivo assessment of drug efficacy against Mycobacterium abscessus using the embryonic zebrafish test system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **58**, (7), 4054-4063 (2014).
18. Oh, C. -T., Moon, C., Jeong, M. S., Kwon, S. -H., Jang, J. Drosophila melanogaster for Mycobacterium abscessus infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*. **15**, (12), 788-795 (2013).
19. Bernut, A., Herrmann, J. -L., *et al.* Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**, (10), E943-E952 (2014).
20. Dubée, V., Bernut, A., *et al.* β -Lactamase inhibition by avibactam in Mycobacterium abscessus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **70**, (4), 1051-1058 (2015).
21. Torraca, V., Masud, S., Spaink, H. P., Meijer, A. H. Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Disease Models Mechanisms*. **7**, (7), 785-797 (2014).
22. Alibaud, L., Rombouts, Y., *et al.* A Mycobacterium marinum TesA mutant defective for major cell wall-associated lipids is highly attenuated in Dictyostelium discoideum and zebrafish embryos. *Molecular Microbiology*. **80**, (4), 919-934 (2011).
23. Clay, H., Volkman, H. E., Ramakrishnan, L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*. **29**, (2), 283-294 (2008).
24. Palha, N., Guivel-Benhassine, F., *et al.* Real-time whole-body visualization of Chikungunya Virus infection and host interferon response in zebrafish. *PLoS pathogens*. **9**, (9), e1003619 (2013).
25. Mostowy, S., Boucontet, L., *et al.* The zebrafish as a new model for the in vivo study of Shigella flexneri with phagocytes and bacterial autophagy. *PLoS pathogens*. **9**, (9), e1003588 (2013).
26. Prajsnar, T. K., Cunliffe, V. T., Foster, S. J., Renshaw, S. A. A novel vertebrate model of Staphylococcus aureus reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. *Cellular Microbiology*. **10**, (11), 2312-2325 (2008).
27. Van der Sar, A. M., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Bitter, W. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in Microbiology*. **12**, (10), 451-457 (2004).
28. Vergunst, A. C., Meijer, A. H., Renshaw, S. A., O'Callaghan, D. Burkholderia cenocepacia creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infection and Immunity*. **78**, (4), 1495-1508 (2010).
29. Levrard, J. -P., Disson, O., *et al.* Real-time observation of Listeria monocytogenes-phagocyte interactions in living zebrafish larvae. *Infection and Immunity*. **77**, (9), 3651-3660 (2009).
30. Meijer, A. H., Spaink, H. P. Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Current Drug Targets*. **12**, (7), 1000-1017 (2011).
31. Westerfield, M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*. (2007).
32. Benard, E. L., van der Sar, A. M., Ellett, F., Lieschke, G. J., Spaink, H. P., Meijer, A. H. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *Journal of Visualized Experiments*. (61), e3781 (2012).
33. Van Rooijen, N., Sanders, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Journal of Immunological Methods*. **174**, (1-2), 83-93 (1994).
34. Adams, K. N., Takaki, K., *et al.* Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell*. **145**, (1), 39-53 (2011).
35. Ramakrishnan, L. Looking within the zebrafish to understand the tuberculous granuloma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **783**, 251-266 (2013).
36. Davis, J. M., Clay, H., Lewis, J. L., Ghori, N., Herbomel, P., Ramakrishnan, L. Real-time visualization of Mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*. **17**, (6), 693-702 (2002).
37. Lamason, R. L., Mohideen, M. -A. P. K., *et al.* SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science (New York, NY)*. **310**, (5755), 1782-1786 (2005).
38. Renshaw, S. A., Loynes, C. A., Trushell, D. M. I., Elworthy, S., Ingham, P. W., Whyte, M. K. B. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*. **108**, (13), 3976-3978 (2006).
39. Hall, C., Flores, M. V., Storm, T., Crosier, K., Crosier, P. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC developmental biology*. **7**, 42 (2007).
40. Takaki, K., Davis, J. M., Winglee, K., Ramakrishnan, L. Evaluation of the pathogenesis and treatment of Mycobacterium marinum in zebrafish. *Nature Protocols*. **8**, (6), 1114-1124 (2013).
41. Stoop, E. J. M., Schipper, T., *et al.* Zebrafish embryo screen for mycobacterial genes involved in the initiation of granuloma formation reveals a newly identified ESX-1 component. *Disease Models Mechanisms*. **4**, (4), 526-536 (2011).
42. Carvalho, R., de Sonneville, J., *et al.* A high-throughput screen for tuberculosis progression. *PLoS One*. **6**, (2), e16779 (2011).

Références bibliographiques

- Abdallah, A. M.; Gey van Pittius, N. C.; Champion, P. a D.; Cox, J.; Luirink, J.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Appelmelk, B. J.; Bitter, W.** "Type VII Secretion--Mycobacteria Show the Way.". *Nature reviews. Microbiology* **2007**, *5* (11), 883–891.
- Abel, L.; El-Baghdadi, J.; Bousfiha, A. A.; Casanova, J.-L.; Schurr, E.** "Human Genetics of *Tuberculosis*: A Long and Winding Road.". *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **2014**, *369* (1645), 20130428.
- Adams, K. N.; Takaki, K.; Connolly, L. E.; Wiedenhof, H.; Winglee, K.; Humbert, O.; Edelstein, P. H.; Cosma, C. L.; Ramakrishnan, L.** "Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism". *Cell* **2011**, *145* (1), 39–53.
- Adékambi, T.; Reynaud-Gaubert, M.; Greub, G.; Gevaudan, M.-J.; Scola, B. La; Raoult, D.; Drancourt, M.** "Amoebal Coculture of "*Mycobacterium massiliense*" Sp. Nov. from the Sputum of a Patient with Hemoptoic Pneumonia". *Society* **2004**, *42* (12), 5493–5501.
- Adékambi, T.; Berger, P.; Raoult, D.; Drancourt, M.** "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.". *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2006**, *56* (Pt 1), 133–143.
- Alderwick, L. J.; Radmacher, E.; Seidel, M.; Gande, R.; Hitchen, P. G.; Morris, H. R.; Dell, A.; Sahn, H.; Eggeling, L.; Besra, G. S.** "Deletion of Cg-Emb in *Corynebacterianeae* Leads to a Novel Truncated Cell Wall Arabinogalactan, Whereas Inactivation of Cg-ubiA Results in an Arabinan-Deficient Mutant with a Cell Wall Galactan Core". *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (37), 32362–32371.
- Alibaud, L.; Rombouts, Y.; Trivelli, X.; Burguière, A.; Cirillo, S. L. G.; Cirillo, J. D.; Dubremetz, J. F.; Guérardel, Y.; Lutfalla, G.; Kremer, L.** "A *Mycobacterium marinum* TesA Mutant Defective for Major Cell Wall-Associated Lipids Is Highly Attenuated in Dictyostelium Discoideum and Zebrafish Embryos". *Molecular Microbiology* **2011**, *80* (4), 919–934.
- Alibaud, L.; Pawelczyk, J.; Gannoun-Zaki, L.; Singh, V. K.; Rombouts, Y.; Drancourt, M.; Dziadek, J.; Guérardel, Y.; Kremer, L.** "Increased Phagocytosis of *Mycobacterium marinum* Mutants Defective in Lipooligosaccharide Production a Structure-Activity Relationship Study". *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (1), 215–228.
- Andries, K.; Villellas, C.; Coeck, N.; Thys, K.; Gevers, T.; Vranckx, L.; Lounis, N.; De Jong, B. C.; Koul, A.** "Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Bedaquiline". *PLoS ONE* **2014**, *9* (7), 1–11.

- Appelgren, P.; Farnebo, F.; Dotevall, L.; Studahl, M.; Jönsson, B.; Petrini, B.** "Late-Onset Posttraumatic Skin and Soft-Tissue Infections Caused by Rapid-Growing Mycobacteria in Tsunami Survivors." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2008**, *47* (2), e11–e16.
- Ashford, D. a; Whitney, E.; Raghunathan, P.; Cosivi, O.** "Epidemiology of Selected Mycobacteria That Infect Humans and Other Animals." *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* **2001**, *20* (1), 325–337.
- Asselineau, J.; Lederer, E.** "Structure of the Mycolic Acids of Mycobacteria". *Nature* **1950**, *166* (4227), 782–783.
- Astagneau, P.; Desplaces, N.; Vincent, V.; Chicheportiche, V.; Botharel, A. H.; Maugat, S.; Lebascle, K.; Léonard, P.; Desenclos, J. C.; Grosset, J.; et al.** "Mycobacterium Xenopi Spinal Infections after Discovertebral Surgery: Investigation and Screening of a Large Outbreak". *Lancet* **2001**, *358* (9283), 747–751.
- Astarie-Dequeker, C.; Le Guyader, L.; Malaga, W.; Seaphanh, F. K.; Chalut, C.; Lopez, A.; Guilhot, C.** "Phthiocerol Dimycocerosates of *M. tuberculosis* Participate in Macrophage Invasion by Inducing Changes in the Organization of Plasma Membrane Lipids". *PLoS Pathogens* **2009**, *5* (2).
- Baidya, A.; Tripathi, M.; Pandey, P.; Singh, U. B.** "Mycobacterium abscessus as a Cause of Chronic Meningitis: A Rare Clinical Entity". *The American Journal of the Medical Sciences* **2016**, *351* (4), 437–439.
- Bailey, J.; Oliveri, A.; Levin, E. D.** "Zebrafish Model Systems for Developmental Neurobehavioral Toxicology". *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* **2013**, *99* (1), 14–23.
- Bailo, R.; Bhatt, A.; Aínsa, J. a.** "Commentary: Lipid Transport in *Mycobacterium tuberculosis* and Its Implications in Virulence and Drug Development". *Biochemical Pharmacology* **2015**, *96*, 159–167.
- Ballell, L.; Bates, R. H.; Young, R. J.; Alvarez-Gomez, D.; Alvarez-Ruiz, E.; Barroso, V.; Blanco, D.; Crespo, B.; Escribano, J.; González, R.; et al.** "Fueling Open-Source Drug Discovery: 177 Small-Molecule Leads against *Tuberculosis*". *ChemMedChem* **2013**, *8* (2), 313–321.
- Balough, K.; McCubbin, M.; Weinberger, M.; Smits, W.; Ahrens, R.; Fick, R.** "The Relationship between Infection and Inflammation in the Early Stages of Lung Disease from Cystic Fibrosis". *Pediatr Pulmonol* **1995**, *20* (2), 63–70.
- Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; Lisle,**

G. De; Jr, W. R. J. "inhA, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*". *Science* **1994**, *263* (September), 227–230.

Banerjee, A.; Sugantino, M.; Sacchetti, J. C.; Jacobs, W. R. "The mabA Gene from the inhA Operon of *Mycobacterium tuberculosis* Encodes a 3-Ketoacyl Reductase That Fails to Confer Isoniazid Resistance". *microbiology* **1998**, *66800* (1 998), 2697–2704.

Bastian, S.; Veziris, N.; Roux, A. L.; Brossier, F.; Gaillard, J. L.; Jarlier, V.; Cambau, E. "Assessment of Clarithromycin Susceptibility in Strains Belonging to the *Mycobacterium abscessus* Group by erm(41) and Rrl Sequencing". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55* (2), 775–781.

Bear, C. E.; Li, C.; Kartner, N.; Bridges, R. J.; Jensen, T. J.; Ramjeesingh, M.; Riordan, J. R. "Purification and Functional Reconstitution of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)". *Cell* **1992**, *68* (4), 809–818.

Belardinelli, J. M.; Larrouy-Maumus, G.; Jones, V.; De Carvalho, L. P. S.; McNeil, M. R.; Jackson, M. "Biosynthesis and Translocation of Unsulfated Acyltrehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (40), 27952–27965.

Belardinelli, J. M.; Yazidi, A.; Yang, L.; Fabre, L.; Li, W.; Jacques, B.; Angala, S. K.; Rouiller, I.; Zgurskaya, H. I.; Sygusch, J.; et al. "Structure-Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from *Mycobacterium tuberculosis*". *ACS Infectious Diseases* **2016**, acsinfecdis.6b00095.

Belisle, J. T.; Vissa, V. D.; Sievert, T.; Takayama, K.; Brennan, P. J.; Besra, G. S. "Role of the Major Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Cell Wall Biogenesis". *Science* **1997**, *276* (1997), 1997.

Bernut, A.; Le Moigne, V.; Lesne, T.; Lutfalla, G.; Herrmann, J.-L.; Kremer, L. "In vivo Assessment of Drug Efficacy against *Mycobacterium abscessus* Using the Embryonic Zebrafish Test System". *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2014a**.

Bernut, A.; Herrmann, J.-L.; Lutfalla, G.; Kremer, L. "Les Cordes Mycobactériennes: Un Nouveau Moyen D'ä Chappement Au Système Immunitaire?". *Medecine/Sciences* **2014b**, *30* (5), 499–502.

Bernut, A.; Herrmann, J.-L. ; Kissa, K.; Dubremetz, J.-F.; Gaillard, J.-L.; Lutfalla, G.; Kremer, L. "*Mycobacterium abscessus* Cording Prevents Phagocytosis and Promotes Abscess Formation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014c**, *111* (10), E943-52.

Besada, E. "Rapid Growing Mycobacteria and TNF-Alpha Blockers: Case Report of a Fatal Lung Infection with *Mycobacterium abscessus* in a Patient Treated with Infliximab, and Literature

Review." *Clinical and experimental rheumatology* **2011**, 29 (4), 705–707.

Bhamidi, S.; Scherman, M. S.; Rithner, C. D.; Prenni, J. E.; Chatterjee, D.; Khoo, K. H.; McNeil, M. R. "The Identification and Location of Succinyl Residues and the Characterization of the Interior Arabinan Region Allow for a Model of the Complete Primary Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolyl Arabinogalactan". *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283 (19), 12992–13000.

Bhatt, A.; Kremer, L.; Dai, A. Z.; James, C.; Jr, W. R. J.; Sacchetti, J. C.; Jacobs, W. R. "Conditional Depletion of KasA , a Key Enzyme of Mycolic Acid Biosynthesis , Leads to Mycobacterial Cell Lysis Conditional Depletion of KasA , a Key Enzyme of Mycolic Acid Biosynthesis , Leads to Mycobacterial Cell Lysis". *Journal of Bacteriology* **2005**, 187 (22), 7596–7606.

Bhatt, A.; Fujiwara, N.; Bhatt, K.; Gurcha, S. S.; Kremer, L.; Chen, B.; Chan, J.; Porcelli, S. A.; Kobayashi, K.; Besra, G. S.; et al. "Deletion of kasB in *Mycobacterium tuberculosis* Causes Loss of Acid-Fastness and Subclinical Latent *Tuberculosis* in Immunocompetent Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104 (12), 5157–5162.

Bitter, W.; Houben, E. N. G.; Bottai, D.; Brodin, P.; Brown, E. J.; Cox, J. S.; Derbyshire, K.; Fortune, S. M.; Gao, L. Y.; Liu, J.; et al. "Systematic Genetic Nomenclature for Type VII Secretion Systems". *PLoS Pathogens* **2009a**, 5 (10).

Bitter, W.; Houben, E. N. G.; Luirink, J.; Appelmelk, B. J. "Type VII Secretion in Mycobacteria: Classification in Line with Cell Envelope Structure". *Trends in Microbiology* **2009b**, 17 (8), 337–338.

Blanc-Potard, A.-B.; Lafay, B. "MgtC as a Horizontally-Acquired Virulence Factor of Intracellular Bacterial Pathogens: Evidence from Molecular Phylogeny and Comparative Genomics." *Journal of molecular evolution* **2003**, 57 (4), 479–486.

Bloch, K.; Vance, D. "Control Mechanisms in the Synthesis of Saturated Fatty Acids." *Annual Review of Biochemie* **1977**.

Bolla, J. R.; Su, C.-C.; Do, S. V; Radhakrishnan, A.; Kumar, N.; Long, F.; Chou, T.-H.; Delmar, J. A.; Lei, H.-T.; Rajashankar, K. R.; et al. "Crystal Structure of the Neisseria Gonorrhoeae MtrD Inner Membrane Multidrug Efflux Pump". *Plos One* **2014**, 9 (6), e97903.

Boritsch, E. C.; Frigui, W.; Cascioferro, A.; Malaga, W.; Etienne, G.; Laval, F.; Pawlik, A.; Le Chevalier, F.; Orgeur, M.; Ma, L.; et al. "pks5-Recombination-Mediated Surface Remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* Emergence". *Nature Microbiology* **2016**, 1 (2), 15019.

Bradbury, N. A. "Intracellular CFTR: Localization and Function". *Physiological Reviews* **1999**, 79 (1),

S175-191.

Breen, R. A. M.; Smith, C. J.; Bettinson, H.; Dart, S.; Bannister, B.; Johnson, M. A.; Lipman, M. C. I. "Paradoxical Reactions during *Tuberculosis* Treatment in Patients with and without HIV Co-Infection". *Thorax* **2004**, *59* (8), 704–707.

Briken, V.; Porcelli, S. A.; Besra, G. S.; Kremer, L. "Mycobacterial Lipoarabinomannan and Related Lipoglycans: From Biogenesis to Modulation of the Immune Response". *Molecular Microbiology* **2004**, *53* (2), 391–403.

Brown, A. K.; Bhatt, A.; Singh, A.; Saparia, E.; Evans, A. F.; Besra, G. S. "Identification of the Dehydratase Component of the Mycobacterial Mycolic Acid-Synthesizing Fatty Acid Synthase-II Complex". *Microbiology* **2007**, *153* (12), 4166–4173.

Brown-elliott, B. A.; Jr, R. J. W.; Wallace, R. J. "Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria". *Clinical Microbiology Reviews* **2002**.

Bryant, J. M.; Grogono, D. M.; Greaves, D.; Foweraker, J.; Roddick, I.; Inns, T.; Reacher, M.; Haworth, C. S.; Curran, M. D.; Harris, S. R.; et al. "Whole-Genome Sequencing to Identify Transmission of *Mycobacterium abscessus* between Patients with Cystic Fibrosis: A Retrospective Cohort Study". *Lancet* **2013**, *381* (9877), 1551–1560.

Burbaud, S.; Laval, F.; Lemassu, A.; Daffé, M.; Guilhot, C.; Chalut, C. "Trehalose Polyphosphates Are Produced by a Glycolipid Biosynthetic Pathway Conserved across Phylogenetically Distant Mycobacteria". *Cell Chemical Biology* **2016**, *23* (2), 278–289.

Byrd, T. F.; Lyons, C. R. "Preliminary Characterization of a *Mycobacterium abscessus* Mutant in Human and Murine Models of Infection". *Infection and immunity* **1999**, *67* (9), 4700–4707.

Cai, S. S.; Chopra, K.; Lifchez, S. D. "Management of *Mycobacterium abscessus* Infection After Medical Tourism in Cosmetic Surgery and a Review of Literature". *Annals of plastic surgery* **2016**, *0* (0), 1–5.

Camacho, L. R.; Constant, P.; Raynaud, C.; Lanéelle, M. A.; Triccas, J. A.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Guilhot, C. "Analysis of the Phthiocerol Dimycocerosate Locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence That This Lipid Is Involved in the Cell Wall Permeability Barrier". *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (23), 19845–19854.

Cambau, E. "Mycobactéries Atypiques". In *Biologie médicale*; **2013**; pp 1–15.

Cambier C.J.; Takaki, K. K.; Larson, R. P.; Hernandez, R. E.; David M. Tobin, K. B. U.; Cosma, C. L.; and Lalita Ramakrishnan^{1, 2, 4}. "Mycobacteria Manipulate Macrophage Recruitment through Coordinated Use of Membrane Lipids". *Nature* **2014**, *67* (3), 223–230.

Campos-Herrero, M. I.; Chamizo, F. J.; Caminero, J. A.; Gilarranz, R.; Cabrera, G.; Cuyás, J. "Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Patients on the Island of Gran Canaria. A Population Study". *Journal of Infection and Chemotherapy* **2016**, 1–6.

Cândido, P. H. C.; De Nunes, L. S.; Marques, E. A.; Folescu, T. W.; Coelho, F. S.; De Moura, V. C. N.; Da Silva, M. G.; Gomes, K. M.; Lourenço, M. C. D. S.; Aguiar, F. S.; et al. "Multidrug-Resistant Nontuberculous Mycobacteria Isolated from Cystic Fibrosis Patients". *Journal of Clinical Microbiology* **2014**, *52* (8), 2990–2997.

Carbonne, A.; Brossier, F.; Arnaud, I.; Bougmiza, I.; Caumes, E.; Meningaud, J. P.; Dubrou, S.; Jarlier, V.; Cambau, E.; Astagneau, P. "Outbreak of Nontuberculous Mycobacterial Subcutaneous Infections Related to Multiple Mesotherapy Injections". *Journal of Clinical Microbiology* **2009**, *47* (6), 1961–1964.

Carel, C.; Nukdee, K.; Cantaloube, S.; Bonne, M.; Diagne, C. T.; Laval, F.; Daffé, M.; Zerbib, D. "*Mycobacterium tuberculosis* Proteins Involved in Mycolic Acid Synthesis and Transport Localize Dynamically to the Old Growing Pole and Septum". *PLoS ONE* **2014**, *9* (5).

Catherinot, E.; Clarissou, J.; Etienne, G.; Ripoll, F.; Emile, J. F.; Daffé, M.; Perronne, C.; Soudais, C.; Gaillard, J. L.; Rottman, M. "Hypervirulence of a Rough Variant of the *Mycobacterium abscessus* Type Strain". *Infection and Immunity* **2007**, *75* (2), 1055–1058.

Catherinot, E.; Roux, A.-L.; Macheras, E.; Hubert, D.; Matmar, M.; Dannhoffer, L.; Chinet, T.; Morand, P.; Poyart, C.; Heym, B.; et al. "Acute Respiratory Failure Involving an R Variant of *Mycobacterium abscessus*". *Journal of clinical microbiology* **2009**, *47* (1), 271–274.

Catherinot, E.; Roux, A.-L.; Vibet, M.-A.; Bellis, G.; Ravilly, S.; Lemonnier, L.; Le Roux, E.; Bernède-Bauduin, C.; Le Bourgeois, M.; Herrmann, J.-L.; et al. "*Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* Complex Target Distinct Cystic Fibrosis Patient Subpopulations.". *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* **2013**, *12* (1), 74–80.

Caverly, L. J.; Caceres, S. M.; Fratelli, C.; Happoldt, C.; Kidwell, M.; Malcolm, K. C.; Nick, J. A.; Nichols, D. P. "*Mycobacterium abscessus* Morphotype Comparison in a Murine Model". *PloS one* **2015**, 1–18.

- Caverly, L. J.; Spilker, T.; LiPuma, J. J.** "Complete Genome Sequence of *Mycobacterium abscessus* Subsp. *bolletii*". *Genome announcements* **2016**, 4 (3), 2015–2016.
- Chalut, C.** "MmpL Transporter-Mediated Export of Cell-Wall Associated Lipids and Siderophores in Mycobacteria". *Tuberculosis* **2016**, No. July, 1–15.
- Chalut, C.; Botella, L.; de Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Guilhot, C.** "The Nonredundant Roles of Two 4'-phosphopantetheinyl Transferases in Vital Processes of Mycobacteria.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103 (22), 8511–8516.
- Chatterjee, D.; Lowell, K.; Mcneil, M. R.; Brennans, P. J.; Brennans, J.** "Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*". *The Journal of biological chemistry* **1992**, 267 (9), 6234–6239.
- Chim, N.; Torres, R.; Liu, Y.; Capri, J.; Batot, G.; Whitelegge, J. P.; Goulding, C. W.** "The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from *Mycobacterium tuberculosis*". *Chemistry & biology* **2015**, 22 (8), 1098–1107.
- Cho, Y. J.; Yi, H.; Chun, J.; Cho, S. N.; Daley, C. L.; Koh, W. J.; Shin, S. J.** "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* **2013**, 8 (11), 1–10.
- Choi, K.; Kremer, L.; Besra, G.; Rock, C.** "Identification and Substrate Specificity of β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] Synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Biological Chemistry* **2000**.
- Choo, S. W.; Wee, W. Y.; Ngeow, Y. F.; Mitchell, W.; Tan, J. L.; Wong, G. J.; Zhao, Y.; Xiao, J.** "Genomic Reconnaissance of Clinical Isolates of Emerging Human Pathogen *Mycobacterium abscessus* Reveals High Evolutionary Potential.". *Scientific reports* **2014**, 4, 4061.
- Clatworthy, A. E.; Lee, J. S. W.; Leibman, M.; Kostun, Z.; Davidson, A. J.; Hung, D. T.** "*Pseudomonas aeruginosa* Infection of Zebrafish Involves Both Host and Pathogen Determinants". *Infection and Immunity* **2009**, 77 (4), 1293–1303.
- Clay, H.; Davis, J. M.; Beery, D.; Huttenlocher, A.; Lyons, S. E.; Ramakrishnan, L.** "Dichotomous Role of the Macrophage in Early *Mycobacterium marinum* Infection of the Zebrafish.". *Cell host & microbe* **2007**, 2 (1), 29–39.
- Cohen-Gonsaud, M.; Ducasse, S.; Hoh, F.; Zerbib, D.; Labesse, G.; Quemard, A.** "Crystal Structure of MabA from *Mycobacterium tuberculosis*, a Reductase Involved in Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis". *Journal of Molecular Biology* **2002**, 320 (2), 249–261.

Cole, S. T.; Barrell, B. G. "Analysis of the Genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv". *Novartis Found Symp* **1998**, *217*, 160–172.

Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; et al. "Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence.". *Nature* **1998**, *393* (6685), 537–544.

Cole, S. T.; Eiglmeier, K.; Parkhill, J.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Wheeler, P. R.; Honoré, N.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; et al. "Massive Gene Decay in the Leprosy Bacillus.". *Nature* **2001**, *409* (6823), 1007–1011.

Collins, M. D.; Falsen, E.; Akervall, E.; Sjoden, B.; Alvarez, A. "Note: *Corynebacterium Kroppenstedtii* Sp. Nov., a Novel Corynebacterium That Does Not Contain Mycolic Acids". *International Journal of Systematic Bacteriology* **1998**, *48* (4), 1449–1454.

Collins Matthew D.; Burton, R. A.; Jones, D. "*Corynebacterium amycolatum* Sp. Nov. a New Mycolic Acid-Less Corynebacterium Species from Human Skin". *FEMS microbiology letters* **1988**, *49*, 1–3.

Colucci-Guyon, E.; Tinevez, J.-Y.; Renshaw, S. a; Herbolmel, P. "Strategies of Professional Phagocytes *In vivo*: Unlike Macrophages, Neutrophils Engulf Only Surface-Associated Microbes.". *Journal of cell science* **2011**, *124* (Pt 18), 3053–3059.

Converse, S. E.; Mougous, J. D.; Leavell, M. D.; Leary, J. a; Bertozzi, C. R.; Cox, J. S. "MmpL8 Is Required for Sulfolipid-1 Biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* Virulence.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100* (10), 6121–6126.

Cordillot, M.; Dubée, V.; Triboulet, S.; Dubost, L.; Marie, A.; Hugonnet, J. E.; Arthur, M.; Mainardia, J. L. "*In vitro* Cross-Linking of *Mycobacterium tuberculosis* Peptidoglycan by L,D-Transpeptidases and Inactivation of These Enzymes by Carbapenems". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, *57* (12), 5940–5945.

Cortes, M.; Singh, A. K.; Reytrat, J.-M.; Gaillard, J.-L.; Nassif, X.; Herrmann, J.-L. "Conditional Gene Expression in *Mycobacterium abscessus*". *PloS one* **2011**, *6* (12), e29306.

Cortesia, C.; Vilchèze, C.; Bernut, A.; Contreras, W.; Gómez, K.; de Waard, J.; Jacobs, W. R.; Kremer, L.; Takiff, H. "Acetic Acid, the Active Component of Vinegar, Is an Effective Tuberculocidal Disinfectant". *mBio* **2014**, *5* (2).

Cosivi, O.; Grange, J. M.; Daborn, C. J.; Raviglione, M. C.; Fujikura, T.; Cousins, D.; Robinson, R. A.; Huchzermeyer, H. F. A. K.; De Kantor, I.; Meslin, F. X. "Zoonotic *Tuberculosis* due to *Mycobacterium*

bovis in Developing Countries". *Emerging Infectious Diseases* **1998**, 4 (1), 59–70.

Cox, J. A. G.; Abrahams, K. A.; Alemparte, C.; Ghidelli-disse, S.; Rullas, J.; Angulo-barturen, I.; Singh, A.; Gurcha, S. S.; Nataraj, V.; Bethell, S.; et al. "THPP Target Assignment Reveals EchA6 as an Essential Fatty Acid Shuttle in Mycobacteria". *Nature Microbiology* **2016**.

Cox, J. S.; Chen, B.; McNeil, M.; Jacobs, W. R. "Complex Lipid Determines Tissue-Specific Replication of *Mycobacterium tuberculosis* in Mice.". *Nature* **1999**, 402 (6757), 79–83.

Crick, D. C.; Mahapatra, S.; Brennan, P. J. "Biosynthesis of the Arabinogalactan-Peptidoglycan Complex of *Mycobacterium tuberculosis*". *Glycobiology* **2001**, 11 (9), 107R–118R.

Cronan, M. R.; Tobin, D. M. "Fit for Consumption: Zebrafish as a Model for *Tuberculosis*". *Disease models & mechanisms* **2014**, 7 (7), 777–784.

Cullen, A. R.; CANNON, C. L.; MARK, E. J.; ANDREW A. COLIN. "*Mycobacterium abscessus* Infection in Cystic Fibrosis. Colonization or Infection?". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2000**, 161, 641–645.

Cystic Fibrosis Foundation. "Patient Registry". **2014**.

Daffé, M. "The Cell Envelope of Tubercle Bacilli.". *Tuberculosis* **2015**, 95 Suppl 1, S155-8.

Daffé, M.; Laneelle, M. a. "Distribution of Phthiocerol Diester, Phenolic Mycosides and Related Compounds in Mycobacteria.". *Journal of general microbiology* **1988**, 134 (7), 2049–2055.

Daffé, M.; Draper, P. *The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to Their Pathogenicity*; **1998**; Vol. 39.

Daffé, M.; Lacave, C.; Lanéelle, M. a; Lanéelle, G. "Structure of the Major Triglycosyl Phenol-Phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (Strain Canetti)". *European journal of biochemistry / FEBS* **1987**, 167, 155–160.

Dakin, C. J.; Numa, A. H.; Wang, H. E.; Morton, J. R.; Vertzyas, C. C.; Henry, R. L. "Inflammation, Infection, and Pulmonary Function in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis". *American journal of respiratory and critical care medicine* **2002**, 165 (7), 904–910.

Daniel, J.; Oh, T. J.; Lee, C. M.; Kolattukudy, P. E. "AccD6, a Member of the Fas II Locus, Is a Functional Carboxyltransferase Subunit of the Acyl-Coenzyme A Carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Bacteriology* **2007**, 189 (3), 911–917.

Davis, J. M.; Clay, H.; Lewis, J. L.; Ghori, N.; Herbomel, P.; Ramakrishnan, L. "Real-Time Visualization of Mycobacterium-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos". *Immunity* **2002**, *17*, 693–702.

Deshayes, C.; Kocincova, D.; Etienne, G.; Reyat, J. . "Glycopeptidolipids: A Complex Pathway for Small Pleiotropic Molecules." In *The mycobacterial cell envelope*; Daffé, M., Reyat, J. M., Eds.; **2008**; pp 345–366.

Deshayes, C.; Bach, H.; Euphrasie, D.; Attarian, R.; Coureuil, M.; Sougakoff, W.; Laval, F.; Av-Gay, Y.; Daffé, M.; Etienne, G.; et al. "MmpS4 Promotes Glycopeptidolipids Biosynthesis and Export in *Mycobacterium smegmatis*". *Molecular Microbiology* **2010**, *78* (4), 989–1003.

Devulder, G.; Pérouse de Montclos, M.; Flandrois, J. P. "A Multigene Approach to Phylogenetic Analysis Using the Genus Mycobacterium as a Model". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2005**, *55* (1), 293–302.

Di, A.; Brown, M. E.; Deriy, L. V.; Li, C.; Szeto, F. L.; Chen, Y.; Huang, P.; Tong, J.; Naren, A. P.; Bindokas, V.; et al. "CFTR Regulates Phagosome Acidification in Macrophages and Alters Bactericidal Activity." *Nature cell biology* **2006**, *8* (9), 933–944.

Domenech, P.; Reed, M. B.; Dowd, C. S.; Manca, C.; Kaplan, G.; Barry, C. E. "The Role of MmpL8 in Sulfatide Biogenesis and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (20), 21257–21265.

Domenech, P.; Reed, M. B.; Iii, C. E. B. "Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance". *Infection and Immunity* **2005**, *73* (6), 3492–3501.

Dubée, V.; Bernut, A.; Herrmann, J.-L.; Kissa, K.; Dubremetz, J.-F.; Gaillard, J.-L.; Lutfalla, G.; Kremer, L. "β-Lactamase Inhibition by Avibactam in *Mycobacterium abscessus*". *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2015**, *70* (December 2014), 1051–1058.

Eicher, T.; Seeger, M. A.; Anselmi, C.; Zhou, W.; Brandstätter, L.; Verrey, F.; Diederichs, K.; Faraldo-Gómez, J. D.; Pos, K. M. "Coupling of Remote Alternating-Access Transport Mechanisms for Protons and Substrates in the Multidrug Efflux Pump AcrB." *eLife* **2014**, *3*, e03145.

Emiralioglu, N.; Ersöz, D. D.; Oğuz, B.; Saribas, Z.; Yalçın, E.; Özçelik, U.; Özsüreççi, Y.; Cengiz, A. B.; Kiper, N. "Pulmonary *Mycobacterium abscessus* Infection in a Patient with Triple A Syndrome".

Journal of Tropical Pediatrics **2016**, fmv104.

Etienne, G.; Villeneuve, C.; Billman-Jacobe, H.; Astarie-Dequeker, C.; Dupont, M. A.; Daffé, M. "The Impact of the Absence of Glycopeptidolipids on the Ultrastructure, Cell Surface and Cell Wall Properties, and Phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*". *Microbiology* **2002**, *148* (10), 3089–3100.

Etienne, G.; Malaga, W.; Laval, F.; Lemassu, A.; Guilhot, C.; Daffé, M. "Identification of the Polyketide Synthase Involved in the Biosynthesis of the Surface-Exposed Lipooligosaccharides in Mycobacteria". *Journal of Bacteriology* **2009**, *191* (8), 2613–2621.

Fairhurst, R. M.; Kubak, B. M.; Shpiner, R. B.; Levine, M. S.; Pegues, D. A.; Ardehali, A. "*Mycobacterium abscessus* Empyema in a Lung Transplant Recipient". *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* **2002**, *21* (3), 391–394.

Falkinham, J. O. "Nontuberculous Mycobacteria in the Environment". *Clinics in Chest Medicine* **2002**, *23* (3), 529–551.

Fenaroli, F.; Westmoreland, D.; Benjaminsen, J.; Kolstad, T.; Skjeldal, F. M.; Meijer, A. H.; Vaart, M. Van Der; Ulanova, L.; Roos, N. "Nanoparticles as Drug Delivery System against *Tuberculosis* in Zebra Fish Embryos : Direct Visualization and Treatment". *ACS Nano* **2014**, No. 7, 7014–7026.

Fernandes, N. D.; Kolattukudy, P. E. "Cloning, Sequencing and Characterization of a Fatty Acid Synthase- Encoding Gene from *Mycobacterium tuberculosis* Var. Bovis BCG". *Gene* **1996**, *170* (1), 95–99.

Floto, R. A.; Olivier, K. N.; Saiman, L.; Daley, C. L.; Herrmann, J.-L.; Nick, J. A.; Noone, P. G.; Bilton, D.; Corris, P.; Gibson, R. L.; et al. "US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society Consensus Recommendations for the Management of Non-Tuberculous Mycobacteria in Individuals with Cystic Fibrosis: Executive Summary.". *Thorax* **2016**, *71* (1), 88–90.

Furuya, E. Y.; Paez, A.; Srinivasan, A.; Cooksey, R.; Augenbraun, M.; Baron, M.; Brudney, K.; Della-Latta, P.; Estivariz, C.; Fischer, S.; et al. "Outbreak of *Mycobacterium abscessus* Wound Infections Among "lipotourists" from the United States Who Underwent Abdominoplasty in the Dominican Republic.". *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2008**, *46* (8), 1181–1188.

Galil, K.; Miller, L. A.; Yakrus, M. A.; Wallace, R. J.; Mosley, D. G.; England, B.; Huitt, G.; McNeil, M.

M.; Perkins, B. A. "Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* Linked to Injection of Unapproved Alternative Medication". *Emerging Infectious Diseases* **1999**, 5 (5), 681–687.

Galmés-Truyols, A.; Giménez-Duran, J.; Bosch-Isabel, C.; Nicolau-Riutort, A.; Vanrell-Berga, J.; Portell-Arbona, M.; Seguí-Prat, B.; Gumá-Torá, M.; Martí-Alomar, I.; Rojo-Arias, M. Ángeles; et al. "An Outbreak of Cutaneous Infection due to *Mycobacterium abscessus* Associated to Mesotherapy". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2011**, 29 (7), 510–514.

Gao, L. Y.; Laval, F.; Lawson, E. H.; Groger, R. K.; Woodruff, A.; Morisaki, J. H.; Cox, J. S.; Daffe, M.; Brown, E. J. "Requirement for kasB in Mycobacterium Mycolic Acid Biosynthesis, Cell Wall Impermeability and Intracellular Survival: Implications for Therapy". *Molecular Microbiology* **2003**, 49 (6), 1547–1563.

Gavalda, S.; Léger, M.; van der Rest, B.; Stella, A.; Bardou, F.; Montrozier, H.; Chalut, C.; Burlet-Schiltz, O.; Marrakchi, H.; Daffé, M.; et al. "The Pks13/FadD32 Crosstalk for the Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*". *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284 (29), 19255–19264.

Gavalda, S.; Bardou, F.; Laval, F.; Bon, C.; Malaga, W.; Chalut, C.; Guilhot, C.; Mourey, L.; Daffé, M.; Quémard, A. "The Polyketide Synthase Pks13 Catalyzes a Novel Mechanism of Lipid Transfer in Mycobacteria". *Chemistry and Biology* **2014**, 21 (12), 1660–1669.

Geijtenbeek, T. B. H.; van Vliet, S. J.; Koppel, E. A.; Sanchez-Hernandez, M.; Vandenbroucke-Grauls, C.; Appelmelk, B.; van Kooyk, Y. "Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function". *Journal of Experimental Medicine* **2003**, 197 (1), 7–17.

Gemberling, M.; Bailey, T. J.; Hyde, D. R.; Poss, K. D. "The Zebrafish as a Model for Complex Tissue Regeneration". *Trends in Genetics* **2013**, 29 (11), 611–620.

Glickman, M. S.; Cox, J. S.; Jacobs, W. R. "A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*". *Molecular Cell* **2000**, 5 (4), 717–727.

Goren, M. B.; Brokl, O.; Schaefer, W. B. "Lipids of Putative Relevance to Virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: Phthiocerol Dimycocerosate and the Attenuation Indicator Lipid". *Infection and Immunity* **1974**, 9 (1), 150–158.

Goude, R.; Parish, T. "The Genetics of Cell Wall Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*". *Future Microbiol* **2008**, 3, 299–313.

Grange, J. M. "Infection and Disease due to the Environmental Mycobacteria". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1987**, 81 (2), 179–182.

Grayfer, L.; Hodgkinson, J. W.; Belosevic, M. "Antimicrobial Responses of Teleost Phagocytes and Innate Immune Evasion Strategies of Intracellular Bacteria". *Developmental and comparative immunology* **2013**.

Griffin, J. E.; Gawronski, J. D.; DeJesus, M. A.; Ioerger, T. R.; Akerley, B. J.; Sasseti, C. M. "High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for Mycobacterial Growth and Cholesterol Catabolism". *PLoS Pathogens* **2011**, 7 (9), 1–9.

Griffith, D. E. "Emergence of Nontuberculous Mycobacteria as Pathogens in Cystic Fibrosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2003**, 167 (6), 809–810.

Griffith, D. E. "Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease". *Current opinion in infectious diseases* **2010**, 23 (2), 185–190.

Griffith, D. E.; Aksamit, T. R. "Therapy of Refractory Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease". *Current opinion in infectious diseases* **2012**, 25 (2), 218–227.

Griffith, D. E.; Girard, W. M.; Wallace, R. J. "Clinical Features of Pulmonary Disease Caused by Rapidly Growing Mycobacteria An Analysis of 154 Patients". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **1993**, 147, 1271–1278.

Griffith, D. E.; Aksamit, T.; Brown-Elliott, B. A.; Catanzaro, A.; Daley, C.; Gordin, F.; Holland, S. M.; Horsburgh, R.; Huitt, G.; Iademarco, M. F.; et al. "An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2007**, 175 (4), 367–416.

Griffith, D. E.; Brown-Elliott, B. A.; Benwill, J. L.; Wallace, R. J. "Mycobacterium abscessus: "Pleased to Meet You, Hope You Guess My Name???"". *Annals of the American Thoracic Society* **2015**, 12 (3), 436–439.

De Groote, M. A.; Johnson, L.; Podell, B.; Brooks, E.; Basaraba, R.; Gonzalez-Juarrero, M. "GM-CSF Knockout Mice for Preclinical Testing of Agents with Antimicrobial Activity against *Mycobacterium abscessus*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2014a**, 69 (4), 1057–1064.

De Groote, M. A.; Johnson, L.; Podell, B.; Brooks, E.; Basaraba, R.; Gonzalez-Juarrero, M. "GM-CSF Knockout Mice for Preclinical Testing of Agents with Antimicrobial Activity against *Mycobacterium abscessus*". *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2014b**, 69 (4), 1057–1064.

- Grzegorzewicz, A. E.; Pham, H.; Gundi, V. a K. B.; Scherman, M. S.; North, E. J.; Hess, T.; Jones, V.; Gruppo, V.; Born, S. E. M.; Korduláková, J.; et al. "Inhibition of Mycolic Acid Transport across the *Mycobacterium tuberculosis* Plasma Membrane." *Nature chemical biology* **2012**, *8* (4), 334–341.
- Gutierrez, M. C.; Supply, P.; Brosch, R. "Pathogenomics of Mycobacteria". *Genome Dynamics*. 2009, pp 198–210.
- Halloum, I.; Carrère-Kremer, S.; Blaise, M.; Viljoen, A.; Bernut, A.; Le Moigne, V.; Vilchèze, C.; Guérardel, Y.; Lutfalla, G.; Herrmann, J.-L.; et al. "Deletion of a Dehydratase Important for Intracellular Growth and Cording Renders Rough *Mycobacterium abscessus* Avirulent." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**.
- Harada, T.; Akiyama, Y.; Kurashima, A.; Nagai, H.; Tsuyuguchi, K.; Fujii, T.; Yano, S.; Shigeto, E.; Kuraoka, T.; Kajiki, A.; et al. "Clinical and Microbiological Differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* Lung Diseases". *Journal of Clinical Microbiology* **2012**, *50* (11), 3556–3561.
- Hartkoorn, R. C.; Uplekar, S.; Cole, S. T. "Cross-Resistance between Clofazimine and Bedaquiline through Upregulation of mmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, *58* (5), 2979–2981.
- Hinton, D. E.; Kullman, S. W.; Hardman, R. C.; Volz, D. C.; Chen, P. J.; Carney, M.; Bencic, D. C. "Resolving Mechanisms of Toxicity While Pursuing Ecotoxicological Relevance?". *Marine Pollution Bulletin* **2005**, *51* (8–12), 635–648.
- Hoffmann, C.; Leis, A.; Niederweis, M.; Plitzko, J. M.; Engelhardt, H. "Disclosure of the Mycobacterial Outer Membrane: Cryo-Electron Tomography and Vitreous Sections Reveal the Lipid Bilayer Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (10), 3963–3967.
- Howard, S. T.; Rhoades, E.; Recht, J.; Pang, X.; Alsup, A.; Kolter, R.; Lyons, C. R.; Byrd, T. F. "Spontaneous Reversion of *Mycobacterium abscessus* from a Smooth to a Rough Morphotype Is Associated with Reduced Expression of Glycopeptidolipid and Reacquisition of an Invasive Phenotype." *Microbiology (Reading, England)* **2006**, *152* (Pt 6), 1581–1590.
- Howe, K.; Clark, M. D.; Torroja, C. F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J. E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* **2013**, *496* (7446), 498–503.

Hui, S. H.; Noonan, L.; Chavada, R. "Post Liposuction *Mycobacterium abscessus* Surgical Site Infection in a Returned Medical Tourist Complicated by a Paradoxical Reaction during Treatment". *Infectious Disease Reports* **2015**, 7 (4), 87–90.

Hwang, T.; Kirk, K. L. "The CFTR Ion Channel : Gating , Regulation , and Anion Permeation". *Cold Spring Harb Perspect Med* **2013**, 1–16.

Hwang, W. Y.; Fu, Y.; Reyon, D.; Maeder, M. L.; Tsai, S. Q.; Sander, J. D.; Peterson, R. T.; Yeh, J. R.; Joung, J. K. "Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System". *Nat Biotechnol* **2013**, 31 (3), 227–229.

Van Ingen, J. "Treatment of Pulmonary Disease Caused by Opportunist Mycobacteria.". *The lancet* **2015**, 44 (6), 449–454.

Jackson, M.; Raynaud, C.; Lanéelle, M. A.; Guilhot, C.; Laurent-Winter, C.; Ensergueix, D.; Gicquel, B.; Daffé, M. "Inactivation of the Antigen 85C Gene Profoundly Affects the Mycolate Content and Alters the Permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* Cell Envelope". *Molecular Microbiology* **1999**, 31 (5), 1573–1587.

Jackson, M.; Crick, D. C.; Brennan, P. J. "Phosphatidylinositol Is an Essential Phospholipid of Mycobacteria". *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (39), 30092–30099.

Jain, A.; Chow, E. D.; Cox, J. S. "The MmpL Prtotein Family". In *The Mycobacterial Cell Envelope*; **2008**; pp 201–210.

Jankute, M.; Cox, J. A. G.; Harrison, J.; Besra, G. S. "Assembly of the Mycobacterial Cell Wall.". *Annual review of microbiology* **2015**, 69, 405–423.

Jarlier, V.; Nikaido, H. "Permeability Barrier to Hydrophilic Solutes in *Mycobacterium chelonae*". *Journal of Bacteriology* **1990**, 172 (3), 1418–1423.

Jeon, B.-Y.; Kwak, J.; Lee, S.-S.; Cho, S.; Won, C. J.; Kim, J. M.; Shin, S. J. "Comparative Analysis of Immune Responses to *Mycobacterium abscessus* Infection and Its Antigens in Two Murine Models.". *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **2009**, 47 (5), 633–640.

John, G.; Yildirim, A. Ö.; Rubin, B. K.; Gruenert, D. C.; Henke, M. O. "TLR-4-Mediated Innate Immunity Is Reduced in Cystic Fibrosis Airway Cells". *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2010**, 42 (4), 424–431.

John, G. S.; Brot, N.; Ruan, J.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Weissbach, H.; Nathan, C.

"Peptide Methionine Sulfoxide Reductase from *Escherichia Coli* and *Mycobacterium tuberculosis* Protects Bacteria against Oxidative Damage from Reactive Nitrogen Intermediates". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (17), 9901–9906.

Jones, C. M.; Wells, R. M.; Madduri, A. V. R.; Renfrow, M. B.; Ratledge, C.; Moody, D. B.; Niederweis, M. "Self-Poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by Interrupting Siderophore Recycling". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111* (5), 1945–1950.

de Jong, B. C.; Antonio, M.; Gagneux, S. "Mycobacterium Africanum-Review of an Important Cause of Human *Tuberculosis* in West Africa". *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2010**, *4* (9).

Jönsson, B.; Ridell, M.; Wold, A. E. "Phagocytosis and Cytokine Response to Rough and Smooth Colony Variants of *Mycobacterium abscessus* by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells". *Apmis* **2012**, *121* (1), 45–55.

Jönsson, B. E.; Gilljam, M.; Lindblad, A.; Ridell, M.; Wold, A. E.; Welinder-Olsson, C. "Molecular Epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with Focus on Cystic Fibrosis". *Journal of clinical microbiology* **2007**, *45* (5), 1497–1504.

Kaevska, M.; Lvonicik, S.; Slana, I.; Kulich, P.; Kralik, P. "Microscopy, Culture, and Quantitative Real-Time Pcr Examination Confirm Internalization of Mycobacteria in Plants". *Applied and Environmental Microbiology* **2014**, *80* (13), 3888–3894.

Kahn, A.; Agrwal, N.; Carey, E. J.; Madura, J. A.; Hewitt, W. R.; Lambert, K. L.; Gryns, T. E.; Vikram, H. R. "Gastric Lap-Band Infection due to *Mycobacterium abscessus* Presenting as New-Onset Ascites in a Cirrhotic Patient". *Infectious Diseases* **2016**, *48* (8), 632–635.

Kalueff, A. V.; Stewart, A. M.; Gerlai, R. "Zebrafish as an Emerging Model for Studying Complex Brain Disorders". *Trends in Pharmacological Sciences* **2014**, *35* (2), 63–75.

Kang, Y. A.; Koh, W.-J. "Antibiotic Treatment for Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease". *Expert Review of Respiratory Medicine* **2016**, *10* (5), 557–568.

Kansal, R. G.; Gomez-Flores, R.; Sinha, I.; Mehta, R. T. "Therapeutic Efficacy of Liposomal Clofazimine against *Mycobacterium avium* Complex in Mice Depends on Size of Initial Inoculum and Duration of Infection". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41* (1), 17–23.

Kemper, C. a; Deresinski, S. C. "*Mycobacterium avium* Complex Infection in AIDS". *AIDS clinical review* **2008**, 153–228.

Khoo, K. H.; Dell, A.; Morris, H. R.; Brennan, P. J.; Chatterjee, D. "Inositol Phosphate Capping of the Nonreducing Termini of Lipoarabinomannan from Rapidly Growing Strains of *Mycobacterium*". *Journal of Biological Chemistry*. 1995, pp 12380–12389.

Kim, B.-J.; Kim, B.-R.; Lee, S.-Y.; Kook, Y.-H.; Kim, B.-J. "Rough Colony Morphology of *Mycobacterium massiliense* Type II Genotype Is due to the Deletion of Glycopeptidolipid Locus within Its Genome.". *BMC genomics* **2013**, *14* (1), 890.

Kim, H. Y.; Kim, B. J.; Kook, Y.; Yun, Y. J.; Shin, J. H.; Kim, B. J.; Kook, Y. H. "*Mycobacterium massiliense* Is Differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by Erythromycin Ribosome Methyltransferase Gene (Erm) and Clarithromycin Susceptibility Patterns". *Microbiology and Immunology* **2010**, *54* (6), 347–353.

Kim, S.; Han, L.; Yu, B.; Hähnke, V. D.; Bolton, E. E.; Bryant, S. H. "PubChem Structure-Activity Relationship (SAR) Clusters". *Journal of Cheminformatics* **2015**, *7* (1), 1–22.

Kissa, K.; Herbomel, P. "Blood Stem Cells Emerge from Aortic Endothelium by a Novel Type of Cell Transition.". *Nature* **2010**, *464* (7285), 112–115.

Knox, B. P.; Deng, Q.; Rood, M.; Eickhoff, J. C.; Keller, N. P.; Huttenlocher, A. "Distinct Innate Immune Phagocyte Responses to *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae in Zebrafish Larvae". *Eukaryotic Cell* **2014**, *13* (10), 1266–1277.

Koh, W. J.; Jeon, K.; Lee, N. Y.; Kim, B. J.; Kook, Y. H.; Lee, S. H.; Park, Y. K.; Kim, C. K.; Shin, S. J.; Huitt, G. A.; et al. "Clinical Significance of Differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2011**, *183* (3), 405–410.

Koh, W.-J.; Jeong, B.-H.; Jeon, K.; Kim, S.-Y.; Park, K. U.; Park, H. Y.; Huh, H. J.; Ki, C.-S.; Lee, N. Y.; Lee, S.-H.; et al. "Oral Macrolide Therapy Following Short-Term Combination Antibiotic Treatment for *Mycobacterium massiliense* Lung Disease". *Chest* **2016**.

Koppel, E. A.; Ludwig, I. S.; Sanchez Hernandez, M.; Lowary, T. L.; Gadikota, R. R.; Tuzikov, A. B.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; van Kooyk, Y.; Appelmelk, B. J.; Geijtenbeek, T. B. H. "Identification of the Mycobacterial Carbohydrate Structure That Binds the C-Type Lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1". *Immunobiology* **2004**, *209* (1–2), 117–127.

Kremer, L.; Besra, G. S.; Brennan, P. J.; Baulard, A. R. "Le Lipoarabinomannane : Structure et Fonctions D'un Glycolipide Impliqué Dans La Pathogénie Tuberculeuse". *Médecine Science* **1999**, *15*,

842–850.

Kremer, L.; Nampoothiri, K. M.; Lesjean, S.; Dover, L. G.; Graham, S.; Betts, J.; Brennan, P. J.; Minnikin, D. E.; Locht, C.; Besra, G. S. "Biochemical Characterization of Acyl Carrier Protein (AcpM) and Malonyl-CoA:AcpM Transacylase (mtFabD), Two Major Components of *Mycobacterium tuberculosis* Fatty Acid Synthase II". *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (30), 27967–27974.

Kulchavenya, E. "Extrapulmonary *Tuberculosis*: Are Statistical Reports Accurate?". *Therapeutic advances in infectious disease* **2014**, 2 (2), 61–70.

Kurth, D. G.; Gago, G. M.; de la Iglesia, A.; Lyonnet, B. B.; Lin, T. W.; Morbidoni, H. R.; Tsai, S. C.; Gramajo, H. "ACCase 6 Is the Essential Acetyl-CoA Carboxylase Involved in Fatty Acid and Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacteria". *Microbiology* **2009**, 155 (8), 2664–2675.

Kusunoki, S.; Ezaki, T. "Proposal of *Mycobacterium* *Peregrinum* Sp. Nov., Norn. Rev., and Elevation of *Mycobacterium chelonae* Subsp. *abscessus* (Kubica et Al.) to Species Status: *Mycobacterium abscessus* Comb. Nov.". *International journal of systematic bacteriology* **1992**, No. 8, 240–245.

De La Rua-Domenech, R. "Human *Mycobacterium bovis* Infection in the United Kingdom: Incidence, Risks, Control Measures and Review of the Zoonotic Aspects of Bovine *Tuberculosis*". *Tuberculosis* **2006**, 86 (2), 77–109.

Lahiri, R.; Randhawa, B.; Krahenbuhl, J. "Application of a Viability-Staining Method for *Mycobacterium Leprae* Derived from the Athymic (Nu/nu) Mouse Foot Pad". *Journal of Medical Microbiology* **2005**, 54 (3), 235–242.

Lai, C. C.; Chao, C. M.; Gau, S. J.; Hsueh, P. R. "Thoracic Empyema and Bacteremia due to *Mycobacterium abscessus* in a Patient with Liver Cirrhosis". *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2013**, 46 (6), 482–484.

Lam, S. H.; Chua, H. L.; Gong, Z.; Lam, T. J.; Sin, Y. M. "Development and Maturation of the Immune System in Zebrafish, *Danio rerio*: A Gene Expression Profiling, in Situ Hybridization and Immunological Study". *Developmental and Comparative Immunology* **2004**, 28 (1), 9–28.

Lamichhane, G.; Tyagi, S.; Bishai, W. R. "Designer Arrays for De Ned Mutant Analysis To Detect Genes Essential for Survival of". *Society* **2005**, 73 (4), 2533–2540.

Lau, G. W.; Hassett, D. J.; Ran, H.; Kong, F. "The Role of Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* Infection". *Trends in Molecular Medicine* **2004**, 10 (12), 599–606.

Lauren, C.; Homeyer, D. C.; Zapor, M.; Hartzell, J.; Warkentien, T.; Weintrob, A. C.; Ganesan, A.; Burgess, T.; Snedrud, E.; Waterman, P.; et al. "Isolation of Rapidly Growing Nontuberculous Mycobacteria in Wounds Following Combat-Related Injury". *Military Medicine* **2016**, *181* (6), 530–536.

Lavollay, M.; Dubée, V.; Heym, B.; Herrmann, J. L.; Gaillard, J. L.; Gutmann, L.; Arthur, M.; Mainardi, J. L. "In vitro Activity of Cefoxitin and Imipenem against *Mycobacterium abscessus* Complex". *Clinical Microbiology and Infection* **2014**, *20* (5), 7–10.

Leao, S. C.; Tortoli, E.; Viana-Niero, C.; Ueki, S. Y. M.; Lima, K. V. B.; Lopes, M. L.; Yubero, J.; Menendez, M. C.; Garcia, M. J. "Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggests That Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* Group Is Needed". *Journal of Clinical Microbiology* **2009**, *47* (9), 2691–2698.

Leao, S. C.; Tortoli, E.; Euzéby, J. P.; Garcia, M. J. "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* ". *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2011**, *61* (Pt 9), 2311–2313.

Lea-Smith, D. J.; Pyke, J. S.; Tull, D.; McConville, M. J.; Coppel, R. L.; Crellin, P. K. "The Reductase That Catalyzes Mycolic Motif Synthesis Is Required for Efficient Attachment of Mycolic Acids to Arabinogalactan". *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (15), 11000–11008.

Lederer, E.; Adam, A.; Ciorbaru, R.; Petit, J. F.; Wietzerbin, J. "Cell Walls of Mycobacteria and Related Organisms; Chemistry and Immunostimulant Properties". *Molecular and Cellular Biochemistry* **1975**, *7* (2), 87–104.

Lee, M.; Tsai, C.; Hu, J.; Lee, S.; Ko, J.; Wang, H.; Yu, C.; Lee, L. "Among Ventilator-Dependent Patients in Taiwan Chronic Respiratory Care Facilities". **2016**, *11*, 491–500.

Lee, M.-R.; Cheng, A.; Lee, Y.-C.; Yang, C.-Y.; Lai, C.-C.; Huang, Y.-T.; Ho, C.-C.; Wang, H.-C.; Yu, C.-J.; Hsueh, P.-R. "CNS Infections Caused by *Mycobacterium abscessus* Complex: Clinical Features and Antimicrobial Susceptibilities of Isolates.". *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2012a**, *67* (1), 222–225.

Lee, W.-I.; Huang, J.-L.; Wu, T.-S.; Lee, M.-H.; Chen, I.-J.; Yu, K.-H.; Liu, C.-Y.; Yang, C.-H.; Hsieh, M.-Y.; Lin, Y.-L.; et al. "Patients with Inhibitory and Neutralizing Auto-Antibodies to Interferon- γ Resemble the Sporadic Adult-Onset Phenotype of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease

- (MSMD) Lacking Bacille Calmette-Guerin (BCG)-Induced Diseases." *Immunobiology* **2012b**.
- Lefebvre, A.-L.; Dubée, V.; Cortes, M.; Dorchêne, D.; Arthur, M.; Mainardi, J.-L.** "Bactericidal and Intracellular Activity of β -Lactams against *Mycobacterium abscessus*." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2016**, 1–8.
- Lemassu, a; Daffé, M.** "Structural Features of the Exocellular Polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*." *The Biochemical journal* **1994**, 297, 351–357.
- Lerat, I.; Cambau, E.; Roth Dit Bettoni, R.; Gaillard, J.-L.; Jarlier, V.; Truffot, C.; Veziris, N.** "In vivo Evaluation of Antibiotic Activity against *Mycobacterium abscessus*." *The Journal of infectious diseases* **2014**, 209 (6), 905–912.
- Lesley, R.; Ramakrishnan, L.** "Insights into Early Mycobacterial Pathogenesis from the Zebrafish." *Current opinion in microbiology* **2008**, 11 (3), 277–283.
- Leung, J. M.; Olivier, K. N.** "Nontuberculous Mycobacteria: The Changing Epidemiology and Treatment Challenges in Cystic Fibrosis." *Current opinion in pulmonary medicine* **2013**, 19 (6), 662–669.
- Levraud, J. P.; Disson, O.; Kissa, K.; Bonne, I.; Cossart, P.; Herbomel, P.; Lecuit, M.** "Real-Time Observation of *Listeria monocytogenes*-Phagocyte Interactions in Living Zebrafish Larvae." *Infection and Immunity* **2009**, 77 (9), 3651–3660.
- Levy, L.; Ji, B.** "The Mouse Foot-Pad Technique for Cultivation of *Mycobacterium leprae*." *Leprosy review* **2006**, 77, 5–24.
- Li, W.; Upadhyay, A.; Fontes, F. L.; North, E. J.; Wang, Y.; Crans, D. C.; Grzegorzewicz, A. E.; Jones, V.; Franzblau, S. G.; Lee, R. E.; et al.** "Novel Insights into the Mechanism of Inhibition of MmpL3, a Target of Multiple Pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, 58 (11), 6413–6423.
- Liu, B.; Liu, K.; Lu, Y.; Zhang, D.; Yang, T.; Li, X.; Ma, C.; Zheng, M.; Wang, B.; Zhang, G.; et al.** "Systematic Evaluation of Structure-Activity Relationships of the Riminophenazine Class and Discovery of a C2 Pyridylamino Series for the Treatment of Multidrug-Resistant *Tuberculosis*." *Molecules* **2012**, 17 (4), 4545–4559.
- Lobo, L. J.; Chang, L. C.; Esther, C. R.; Gilligan, P. H.; Tulu, Z.; Noone, P. G.** "Lung Transplant Outcomes in Cystic Fibrosis Patients with Pre-Operative *Mycobacterium abscessus* Respiratory Infections." *Clinical Transplantation* **2013**, 27 (4), 523–529.

- Lun, S.; Guo, H.; Onajole, O. K.; Pieroni, M.; Gunosewoyo, H.; Chen, G.; Tipparaju, S. K.; Ammerman, N. C.; Kozikowski, A. P.; Bishai, W. R. "Indoleamides Are Active against Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*". *Nature Communications* **2013**, 4 (May), 1–8.
- Macheras, E.; Konjek, J.; Roux, A.; Thiberge, J.; Palaci, M.; Bastian, S.; Lea, S. C.; Gutierrez, C.; Richter, E.; Ru, S.; et al. "Multilocus Sequence Typing Scheme for the *Mycobacterium abscessus* Complex". *Journal of Clinical Microbiology* **2014**, 165, 82–90.
- Mahapatra, S.; Scherman, H.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. "N Glycolylation of the Nucleotide Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis of *Mycobacterium* Spp. Is Altered by Drug Treatment". *Journal of Bacteriology* **2005**, 187 (7), 2341–2347.
- Makarov, V.; Lechartier, B.; Zhang, M.; Neres, J.; Sar, A. M. Van Der; Raadsen, S. A.; Hartkoorn, R. C.; Ryabova, O. B.; Vocat, A.; Decosterd, L. A.; et al. "Towards a New Combination Therapy for *Tuberculosis* with next Generation Benzothiazinones". *EMBO Molecular Medecine* **2014**, 6 (3), 372–383.
- Malcolm, K. C.; Nichols, E. M.; Caceres, S. M.; Kret, J. E.; Martiniano, S. L.; Sagel, S. D.; Chan, E. D.; Caverly, L.; Solomon, G. M.; Reynolds, P.; et al. "*Mycobacterium abscessus* Induces a Limited Pattern of Neutrophil Activation That Promotes Pathogen Survival". *PLoS ONE* **2013**, 8 (2).
- Marrakchi, H.; Ducasse, S.; Labesse, G.; Montrozier, H.; Margeat, E.; Emorine, L.; Charpentier, X.; Daffé, M.; Quémard, A. "MabA (FabG1), a *Mycobacterium tuberculosis* Protein Involved in the Long-Chain Fatty Acid Elongation System FAS-II". *Microbiology* **2002**, 148 (4), 951–960.
- Marrakchi, H.; Lanéelle, M. A.; Daffé, M. "Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and beyond". *Chemistry and Biology* **2014**, 21 (1), 67–85.
- Matsui, H.; Verghese, M. W.; Kesimer, M.; Schwab, U. E.; Randell, S. H.; Sheehan, J. K.; Grubb, B. R.; Boucher, R. C. "Reduced Three-Dimensional Motility in Dehydrated Airway Mucus Prevents Neutrophil Capture and Killing Bacteria on Airway Epithelial Surfaces". *The Journal of Immunology* **2005**, 175 (2), 1090–1099.
- Matsui, H.; Wagner, V. E.; Hill, D. B.; Schwab, U. E.; Rogers, T. D.; Button, B.; Taylor 2nd, R. M.; Superfine, R.; Rubinstein, M.; Iglewski, B. H.; et al. "A Physical Linkage between Cystic Fibrosis Airway Surface Dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103 (48), 18131–18136.
- Maurer, F. P.; Bruderer, V. L.; Ritter, C.; Castelberg, C.; Bloemberg, G. V.; Böttger, E. C. "Lack of

Antimicrobial Bactericidal Activity in *Mycobacterium abscessus*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, 58 (7), 3828–3836.

McDonnell, G.; Russell, A. D. "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance". *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, 12 (1), 147–179.

McIntosh, M.; Williamson, H.; Benbow, M. E.; Kimbirauskas, R.; Quaye, C.; Boakye, D.; Small, P.; Merritt, R. "Associations between *Mycobacterium ulcerans* and Aquatic Plant Communities of West Africa: Implications for Buruli Ulcer Disease". *EcoHealth* **2014**, 11 (2), 184–196.

McNeil, M.; Daffe, M.; Brennan, P. J. "Evidence for the Nature of the Link between the Arabinogalactan and Peptidoglycan of Mycobacterial Cell Walls". *Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265 (30), 18200–18206.

McNeil, M.; Daffe, M.; Brennan, P. J. "Location of the Mycolyl Ester Substituents in the Cell Walls of Mycobacteria". *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266 (20), 13217–13223.

Medjahed, H.; Reyrat, J.-M. "Construction of *Mycobacterium abscessus* Defined Glycopeptidolipid Mutants: Comparison of Genetic Tools". *Applied and environmental microbiology* **2009**, 75 (5), 1331–1338.

Medjahed, H.; Gaillard, J.-L.; Reyrat, J.-M. "*Mycobacterium abscessus*: A New Player in the Mycobacterial Field.". *Trends in microbiology* **2010**, 18 (3), 117–123.

Meeker, N. D.; Trede, N. S. "Immunology and Zebrafish: Spawning New Models of Human Disease.". *Developmental and comparative immunology* **2008**, 32 (7), 745–757.

Mehta, R. T.; Keyhani, A.; Mcqueen, T. J.; Rosenbaum, B.; Rolston, K. V.; Tarrand, J. J. "*In vitro* Activities of Free and Liposomal Drugs against *Mycobacterium avium*-M-Intracellulare Complex and M-Tuberculosis". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1993**, 37 (12), 2584–2587.

Minnikin, D. E. "Lipids: Complex Lipids, Their Chemistry, Biosynthesis and Roles.". In *The Biology of Mycobacteria*; **1982**; p 95–184.

Minnikin, D. E.; Kremer, L.; Dover, L. G.; Besra, G. S. "The Methyl-Branched Fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*". *Chemistry and Biology* **2002**, 9 (5), 545–553.

Mirsaeidi, M.; Ebrahimi, G.; Farshidpour, M.; Allen, M. B.; Falkinham III, J. O. "Highlight on Advances in Nontuberculous Mycobacterial Disease in North America". *International Journal of Mycobacteriology* **2014**, 4, 154–155.

- Miyasaka, T.; Kunishima, H.; Komatsu, M.; Tamai, K.** "In vitro Efficacy of Imipenem in Combination with Six Antimicrobial Agents against *Mycobacterium abscessus*". *International journal of antimicrobial agents* **2007**, *30*, 255–258.
- Mohan, A.; Padiadpu, J.; Baloni, P.; Chandra, N.** "Complete Genome Sequences of a *Mycobacterium smegmatis* Laboratory". *Genome announcements* **2015**, *3* (1), 4–5.
- Le Moigne, V.; Gaillard, J. L.; Herrmann, J. L.** "Vaccine Strategies against Bacterial Pathogens in Cystic Fibrosis Patients". *Medecine et Maladies Infectieuses* **2015**.
- Le Moigne, V.; C, B.; C, G.; G, A.; A, B.; B, P.; JL, G.; L, K.; JL, H.; AB, B.-P.** "MgtC as a Host-Induced Factor and Vaccine Candidate against *Mycobacterium abscessus* Infection.". *Infect Immun.* **2016**.
- Moore, M.; Frerichs, J. B.** "An Unusual Acid-Fast Infection of the Knee with Subcutaneous, Abscess-Like Lesions of the Gluteal Region". *Journal of Investigative Dermatology* **1953**, *20* (2), 133–169.
- Morlock, G. P.; Metchock, B.; Sikes, D.; Crawford, J. T.; Cooksey, R. C.** "*Mycobacterium tuberculosis* Isolates". *Society* **2003**, *47* (12), 3799–3805.
- Mostowy, S.; Boucontet, L.; Mazon Moya, M. J.; Sirianni, A.; Boudinot, P.; Hollinshead, M.; Cossart, P.; Herbomel, P.; Levraud, J. P.; Colucci-Guyon, E.** "The Zebrafish as a New Model for the *In vivo* Study of Shigella Flexneri Interaction with Phagocytes and Bacterial Autophagy". *PLoS Pathogens* **2013**, *9* (9), 12–16.
- Mueller, P. S.; Edson, R. S.** "Disseminated *Mycobacterium abscessus* Infection Manifesting as Fever of Unknown Origin and Intra-Abdominal Lymphadenitis: Case Report and Literature Review". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2001**, *39* (1), 33–37.
- Muhlebach, M. S.; Reed, W.; Noah, T. L.** "Quantitative Cytokine Gene Expression in CF Airway". *Pediatric Pulmonology* **2004**, *37* (5), 393–399.
- Mukherjee, R.; Chatterji, D.** "Glycopeptidolipids: Immuno-Modulators in Greasy Mycobacterial Cell Envelope". *IUBMB Life* **2012**, *64* (3), 215–225.
- Mukhopadhyay, S.; Nair, S.; Ghosh, S.** "Pathogenesis in *Tuberculosis*: Transcriptomic Approaches to Unraveling Virulence Mechanisms and Finding New Drug Targets". *FEMS Microbiology Reviews* **2012**, *36* (2), 463–485.
- Murakami, S.; Nakashima, R.; Yamashita, E.; Yamaguchi, A.** "Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB". *Nature* **2002**, *419* (6907), 587–593.

- Murillo, J.; Torres, J.; Bofill, L.; Irausquin, E.; Guzma, M.; Castro, J.; Rubino, L.; Cordido, M.; Diseases, T.; Group, S.** "Skin and Wound Infection by Rapidly Growing Mycobacteria". *Archives dermatology* **2000**, 136.
- N’Goma, J. C. B.; Le Moigne, V.; Soismier, N.; Laencina, L.; Le Chevalier, F.; Roux, A. L.; Poncin, I.; Serveau-Avesque, C.; Rottman, M.; Gaillard, J. L.; et al.** "Mycobacterium abscessus Phospholipase C Expression Is Induced during Coculture within Amoebae and Enhances *M. abscessus* Virulence in Mice". *Infection and Immunity* **2015**, 83 (2), 780–791.
- Nakayama, Y.; Nakayama, H.; Takeya, K.** "Studies of the Relationship Between Mycobacterium Fortuitum and Mycobacterium Runyonii". *American Review of Respiratory Disease* **1970**, 101 (8).
- Nasevicius, a; Ekker, S. C.** "Effective Targeted Gene “Knockdown” in Zebrafish.". *Nature genetics* **2000**, 26 (2), 216–220.
- Nash, K. A.; Brown-Elliott, A. B.; Wallace, R. J.** "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* **2009**, 53 (4), 1367–1376.
- Navis, A.; Marjoram, L.; Bagnat, M.** "Cftr Controls Lumen Expansion and Function of Kupffer’s Vesicle in Zebrafish.". *Development (Cambridge, England)* **2013**, 140 (8), 1703–1712.
- Neely, M.; Pfeifer, J.; Caparon, M.** "Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis". *Infection and immunity* **2002**, 70 (7), 3904–3914.
- Nessar, R.; Reytrat, J.-M.; Davidson, L. B.; Byrd, T. F.** "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, England)* **2011**, 157 (Pt 4), 1187–1195.
- Nessar, R.; Cambau, E.; Reytrat, J. M.; Murray, A.; Gicquel, B.** "Mycobacterium abscessus: A New Antibiotic Nightmare.". *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2012**, 67 (4), 810–818.
- Neyrolles, O.; Guilhot, C.** "Recent Advances in Deciphering the Contribution of *Mycobacterium tuberculosis* Lipids to Pathogenesis". *Tuberculosis* **2011**, 91 (3), 187–195.
- Nguyen, L.; Chinnapapagari, S.; Thompson, C. J.** "FbpA-Dependent Biosynthesis of Trehalose Dimycolate Is Required for the Intrinsic Multidrug Resistance, Cell Wall Structure, and Colonial Morphology of *Mycobacterium smegmatis*". *Journal of Bacteriology* **2005**, 187 (19), 6603–6611.

- Nikaido, H.** "Structure and Mechanism of RND-Type Multidrug Efflux Pumps". *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology* **2011**, 4 (164), 1–45.
- Novosad, S. A.; Beekmann, S. E.; Polgreen, P. M.; Mackey, K.; Winthrop, K. L.** "Treatment of *Mycobacterium abscessus* Infection". *Emerging Infectious Diseases* **2016**, 22 (3), 511–514.
- Oh, C. T.; Moon, C.; Park, O. K.; Kwon, S. H.; Jang, J.** "Novel Drug Combination for *Mycobacterium abscessus* Disease Therapy Identified in a *Drosophila* Infection Model". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2014**, 69 (6), 1599–1607.
- Oh, C.-T.; Moon, C.; Jeong, M. S.; Kwon, S.-H.; Jang, J.** "*Drosophila Melanogaster* Model for *Mycobacterium abscessus* Infection.". *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2013**, 15 (12), 788–795.
- Oh, T. J.; Daniel, J.; Kim, H. J.; Sirakova, T. D.; Kolattukudy, P. E.** "Identification and Characterization of Rv3281 as a Novel Subunit of a Biotin-Dependent Acyl-CoA Carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv". *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (7), 3899–3908.
- Olivier, K. N.; Weber, D. J.; Wallace, R. J.; Faiz, A. R.; Lee, J. H.; Zhang, Y.; Brown-Elliott, B. A.; Handler, A.; Wilson, R. W.; Schechter, M. S.; et al.** "Nontuberculous Mycobacteria: I: Multicenter Prevalence Study in Cystic Fibrosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2003**, 167 (6), 828–834.
- Oloya, J.; Opuda-Asibo, J.; Kazwala, R.; Demelash, A. B.; Skjerve, E.; Lund, A.; Johansen, T. B.; Djonne, B.** "Mycobacteria Causing Human Cervical Lymphadenitis in Pastoral Communities in the Karamoja Region of Uganda.". *Epidemiology and infection* **2008**, 136 (5), 636–643.
- Ordway, D.; Henao-Tamayo, M.; Smith, E.; Shanley, C.; Harton, M.; Troudt, J.; Bai, X.; Basaraba, R. J.; Orme, I. M.; Chan, E. D.** "Animal Model of *Mycobacterium abscessus* Lung Infection.". *Journal of leukocyte biology* **2008**, 83 (6), 1502–1511.
- Ortalo-Magné, A.; Lemassu, A.; Lanéelle, M. A.; Bardou, F.; Silve, G.; Gounon, P.; Marchal, G.; Daffé, M.** "Identification of the Surface-Exposed Lipids on the Cell Envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacterial Species". *Journal of Bacteriology* **1996a**, 178 (2), 456–461.
- Ortalo-Magné, A.; Andersen, Å. B.; Daffé, M.** "The Outermost Capsular Arabinomannans and Other Mannoconjugates of Virulent and Avirulent Tubercle Bacilli". *Microbiology* **1996b**, 142 (4), 927–935.
- Pacheco, S. A.; Hsu, F.; Powers, K. M.; Purdy, G. E.** "MmpL11 Protein Transports Mycolic Acid-Containing Lipids to the Mycobacterial Cell Wall and Contributes to Biofilm Formation in

- Mycobacterium smegmatis*". *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (33), 24213–24222.
- Painter, R. G.; Valentine, V. G.; Lanson, N. A.; Leidal, K.; Zhang, Q.; Lombard, G.; Thompson, C.; Viswanathan, A.; Nauseef, W. M.; Wang, G.; et al.** "CFTR Expression in Human Neutrophils and the Phagolysosomal Chlorination Defect in Cystic Fibrosis". *Biochemistry* **2006**, 45 (34), 10260–10269.
- Pak, J. E.; Ekendé, E. N.; Kifle, E. G.; O'Connell, J. D.; De Angelis, F.; Tessema, M. B.; Derfoufi, K.-M.; Robles-Colmenares, Y.; Robbins, R. A.; Goormaghtigh, E.; et al.** "Structures of Intermediate Transport States of ZneA, a Zn(II)/proton Antiporter.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, 110 (46), 18484–18489.
- Palha, N.; Guivel-Benhassine, F.; Briolat, V.; Lutfalla, G.; Sourisseau, M.; Ellett, F.; Wang, C. H.; Lieschke, G. J.; Herbomel, P.; Schwartz, O.; et al.** "Real-Time Whole-Body Visualization of Chikungunya Virus Infection and Host Interferon Response in Zebrafish". *PLoS Pathogens* **2013**, 9 (9).
- Parish, T.; Roberts, G.; Laval, F.; Schaeffer, M.; Daffé, M.; Duncan, K.** "Functional Complementation of the Essential Gene *fabG1* of *Mycobacterium tuberculosis* by *Mycobacterium smegmatis* *fabG* but Not *Escherichia Coli* *fabG*". *Journal of Bacteriology* **2007**, 189 (10), 3721–3728.
- Park, I. K.; Hsu, A. P.; Tettelin, H.; Shallom, S. J.; Drake, S. K.; Ding, L.; Wu, U. I.; Adamo, N.; Rebecca Prevots, D.; Olivier, K. N.; et al.** "Clonal Diversification and Changes in Lipid Traits and Colony Morphology in *Mycobacterium abscessus* Clinical Isolates". *Journal of Clinical Microbiology* **2015**, 53 (11), 3438–3447.
- Park, J. S.; Tamayo, M. H.; Gonzalez-Juarrero, M.; Orme, I. M.; Ordway, D. J.** "Virulent Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Grow Rapidly and Induce Cellular Necrosis but Minimal Apoptosis in Murine Macrophages". *Journal of Leukocyte Biology* **2006**, 79 (1), 80–86.
- Pawelczyk, J.; Brzostek, A.; Kremer, L.; Dziadek, B.; Rumijowska-Galewicz, A.; Fiolka, M.; Dziadek, J.** "Accd6, a Key Carboxyltransferase Essential for Mycolic Acid Synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, Is Dispensable in a Nonpathogenic Strain". *Journal of Bacteriology* **2011**, 193 (24), 6960–6972.
- Pawlik, A.; Garnier, G.; Orgeur, M.; Tong, P.; Lohan, A.; Le Chevalier, F.; Sapriel, G.; Roux, A.-L.; Conlon, K.; Honoré, N.; et al.** "Identification and Characterization of the Genetic Changes Responsible for the Characteristic Smooth-to-Rough Morphotype Alterations of Clinically Persistent *Mycobacterium abscessus*". *Molecular microbiology* **2013**, 90, 612–629.
- Peralta, G.; Tobin-D'Angelo, M.; Parham, A.; Edison, L.; Lorentzson, L.; Smith, C.; Drenzek, C.** "Notes

from the Field: *Mycobacterium abscessus* Infections Among Patients of a Pediatric Dentistry Practice - Georgia, 2015." *Morbidity and mortality weekly report* **2016**, 65 (13), 355–356.

Pérez-Guerrero, L.; Milián-Suazo, F.; Arriaga-Díaz, C.; Romero-Torres, C.; Escartín-Chávez, M. "Epidemiología Molecular de Las *Tuberculosis* Bovina Y Humana En Una Zona Endémica de Querétaro, México". *Salud Publica de Mexico* **2008**, 50 (4), 286–291.

Pérez-Lago, L.; Navarro, Y.; García-de-Viedma, D. "Current Knowledge and Pending Challenges in Zoonosis Caused by *Mycobacterium bovis*: A Review". *Research in Veterinary Science* **2014**, 97 (S), S94–S100.

Pfyffer, G. E. *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition Chapter 30: Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*; Pfaller, M. A., Richter, S. S., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Carroll, K. C., Warnock, D. W., Eds.; American Society of Microbiology, **2015**.

Pierre-audigier, C.; Ferroni, A.; Bourgeois, M. Le; Offredo, C.; Vu-thien, H.; Fauroux, B.; Mariani, P.; Bingen, E.; Guillemot, D.; Quesne, G.; et al. "Age-Related Prevalence and Distribution of Nontuberculous Mycobacterial Species among Patients with Cystic Fibrosis Age-Related Prevalence and Distribution of Nontuberculous Mycobacterial Species among Patients with Cystic Fibrosis". *Journal of Clinical Microbiology* **2005**, 43 (7), 3467–3470.

Poce, G.; Consalvi, S.; Biava, M. "MmpL3 Inhibitors : Diverse Chemical Scaffolds Inhibit the Same Target .". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2014**, 1, 1–10.

Portevin, D.; De Sousa-D'Auria, C.; Montrozier, H.; Houssin, C.; Stella, A.; Lanéelle, M. A.; Bardou, F.; Guilhot, C.; Daffé, M. "The Acyl-AMP Ligase FadD32 and AccD4-Containing Acyl-CoA Carboxylase Are Required for the Synthesis of Mycolic Acids and Essential for Mycobacterial Growth: Identification of the Carboxylation Product and Determination of the Acyl-CoA Carboxylase Componen". *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280 (10), 8862–8874.

Prajsnar, T. K.; Cunliffe, V. T.; Foster, S. J.; Renshaw, S. a. "A Novel Vertebrate Model of *Staphylococcus aureus* Infection Reveals Phagocyte-Dependent Resistance of Zebrafish to Non-Host Specialized Pathogens." *Cellular microbiology* **2008**, 10 (11), 2312–2325.

Prajsnar, T. K.; Renshaw, S. A.; Ogryzko, N. V.; Foster, S. J.; Serror, P.; Mesnagea, S. "Zebrafish as a Novel Vertebrate Model to Dissect Enterococcal Pathogenesis". *Infection and Immunity* **2013**, 81 (11), 4271–4279.

- Prammananan, T.; Sander, P.; Brown, B. a; Frischkorn, K.; Onyi, G. O.; Zhang, Y.; Böttger, E. C.; Wallace, R. J.** "A Single 16S Ribosomal RNA Substitution Is Responsible for Resistance to Amikacin and Other 2-Deoxystreptamine Aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*". *The Journal of infectious diseases* **1998**, *177* (July), 1573–1581.
- Prinz, B. M.; Michaelis, S.; Kettelhack, N.; Mueller, B.; Burg, G.; Kempf, W.** "Subcutaneous Infection with *Mycobacterium abscessus* in a Renal Transplant Recipient". *Dermatology* **2004**, *208* (3), 259–261.
- Puech, V.; Bayan, N.; Salim, K.; Leblon, G.; Daffé, M.** "Characterization of the *In vivo* Acceptors of the Mycoloyl Residues Transferred by the Corynebacterial PS1 and the Related Mycobacterial Antigens 85". *Molecular Microbiology* **2000**, *35* (5), 1026–1041.
- Puech, V.; Guilhot, C.; Perez, E.; Tropis, M.; Armitige, L. Y.; Gicquel, B.; Daffé, M.** "Evidence for a Partial Redundancy of the Fibronectin-Binding Proteins for the Transfer of Mycoloyl Residues onto the Cell Wall Arabinogalactan Termini of *Mycobacterium tuberculosis*". *Molecular Microbiology* **2002**, *44* (4), 1109–1122.
- Quémard, A.** "New Insights into the Mycolate-Containing Compound Biosynthesis and Transport in Mycobacteria". *Trends in Microbiology* **2016**, *24*, 1–14.
- Quémard, A.; Sacchetti, J. C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W. R.; Blanchard, J. S.** "Enzymatic Characterization of the Target for Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*". *Biochemistry* **1995**, *34* (26), 8235–8241.
- Rajni; Rao, N.; Meena, L. S.** "Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An Overview". *Biotechnology research international* **2011**, *2011*, 274693.
- Ramakrishnan, L.** "Looking within the Zebrafish to Understand the Tuberculous Granuloma.". *The new paradigm of immunity to tuberculosis* **2013a**, *783*, 225–250.
- Ramakrishnan, L.** "The Zebrafish Guide to *Tuberculosis* Immunity and Treatment". *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **2013b**, *78* (1), 179–192.
- Ratcliffe, H. L.; Palladino, S. V.** "Tuberculosis Induced by Droplet Nuclei Infection". *Response* **1952**.
- Ratledge, C.** "Iron, Mycobacteria and *Tuberculosis*". *Tuberculosis* **2004**, *84* (1–2), 110–130.
- Recht, J.; Kolter, R.** "Glycopeptidolipid Acetylation Affects Sliding Motility and Biofilm Formation in

Mycobacterium smegmatis". *Journal of Bacteriology* **2001**, *183* (19), 5718–5724.

Reed, M. B.; Domenech, P.; Manca, C.; Su, H.; Barczak, A. K.; Kreiswirth, B. N.; Kaplan, G.; Barry, C. E. "A Glycolipid of Hypervirulent *Tuberculosis* Strains That Inhibits the Innate Immune Response.". *Nature* **2004**, *431* (7004), 84–87.

Registre français de la mucoviscidose. "Bilan Des Données 2014". *Registre français de la mucoviscidose* **2014**, 1–19.

Remuiñán, M. J.; Pérez-Herrán, E.; Rullás, J.; Alemparte, C.; Martínez-Hoyos, M.; Dow, D. J.; Afari, J.; Mehta, N.; Esquivias, J.; Jiménez, E.; et al. "Tetrahydropyrazolo[1,5-a]Pyrimidine-3-Carboxamide and N-Benzyl-6',7'-Dihydrospiro[Piperidine-4,4'-Thieno[3,2-c]Pyran] Analogues with Bactericidal Efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* Targeting MmpL3". *PLoS ONE* **2013**, *8* (4).

Ren, H.; Dover, L. G.; Islam, S. T.; Alexander, D. C.; Chen, J. M.; Besra, G. S.; Liu, J. "Identification of the Lipooligosaccharide Biosynthetic Gene Cluster from *Mycobacterium marinum*". *Molecular Microbiology* **2007**, *63* (5), 1345–1359.

Ripoll, F.; Deshayes, C.; Pasek, S.; Laval, F.; Beretti, J.-L.; Biet, F.; Risler, J.-L.; Daffé, M.; Etienne, G.; Gaillard, J.-L.; et al. "Genomics of Glycopeptidolipid Biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*". *BMC genomics* **2007**, *8*, 114.

Ripoll, F.; Pasek, S.; Schenowitz, C.; Dossat, C.; Barbe, V.; Rottman, M.; Macheras, E.; Heym, B.; Herrmann, J.-L.; Daffé, M.; et al. "Non Mycobacterial Virulence Genes in the Genome of the Emerging Pathogen *Mycobacterium abscessus*". *PloS one* **2009**, *4* (6), e5660.

Rodríguez, G.; Ortegón, M.; Camargo, D.; Orozco, L. C. "Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* Infection: Histopathology of 71 Patients.". *The British journal of dermatology* **1997**, *137* (2), 214–218.

Rodriguez, G. M. "Control of Iron Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*". *Trends in Microbiology* **2006**, *14* (7), 320–327.

Rodriguez-Coste, M. A.; Chirca, I.; Steed, L. L.; Salgado, C. D. "Epidemiology of Rapidly Growing Mycobacteria Bloodstream Infections". *American Journal of the Medical Sciences* **2016**, *351* (3), 253–258.

De Rossi, E.; Aínsa, J. A.; Riccardi, G. "Role of Mycobacterial Efflux Transporters in Drug Resistance: An Unresolved Question". *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, *30* (1), 36–52.

Rottman, M.; Catherinot, E.; Hochedez, P.; Emile, J. F.; Casanova, J. L.; Gaillard, J. L.; Soudais, C.

"Importance of T Cells, Gamma Interferon, and Tumor Necrosis Factor in Immune Control of the Rapid Grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 Mice". *Infection and Immunity* **2007**, 75 (12), 5898–5907.

Rounioja, S.; Saralahti, A.; Rantala, L.; Parikka, M.; Henriques-Normark, B.; Silvennoinen, O.; Rämetsä, M. "Defense of Zebrafish Embryos against Streptococcus Pneumoniae Infection Is Dependent on the Phagocytic Activity of Leukocytes". *Developmental and Comparative Immunology* **2012**, 36 (2), 342–348.

Roux, A.; Catherinot, E.; Soismier, N.; Heym, B.; Bellis, G.; Lemonnier, L.; Chiron, R.; Fauroux, B.; Le, M.; Munck, A.; et al. "Comparing *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium abscessus* Lung Infections in Cystic Fibrosis Patients". *Journal of Cystic Fibrosis* **2015**, 14 (1), 63–69.

Roux, A.-L.; Catherinot, E.; Ripoll, F.; Soismier, N.; Macheras, E.; Ravilly, S.; Bellis, G.; Vibet, M.-A.; Le Roux, E.; Lemonnier, L.; et al. "Multicenter Study of Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Cystic Fibrosis in France.". *Journal of clinical microbiology* **2009**, 47 (12), 4124–4128.

Roux, A.-L.; Ray, A.; Pawlik, A.; Medjahed, H.; Etienne, G.; Rottman, M.; Catherinot, E.; Coppée, J.-Y.; Chaoui, K.; Monsarrat, B.; et al. "Overexpression of Proinflammatory TLR-2-Signalling Lipoproteins in Hypervirulent Mycobacterial Variants.". *Cellular microbiology* **2011**, 13 (5), 692–704.

Rowe, H. M.; Withey, J. H.; Neely, M. N. "Zebrafish as a Model for Zoonotic Aquatic Pathogens". *Developmental and Comparative Immunology* **2014**, 46 (1), 96–107.

Rubio, M.; March, F.; Moreno, C. "Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the *Mycobacterium abscessus* Complex". *PloS one* **2015**, No. 41, 1–10.

Runyon, E. H. "Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease.". *The Medical clinics of North America* **1959**, 43 (1), 273–290.

Russell, D. G. "Who Puts the Tubercle in *Tuberculosis*?". *Nature reviews. Microbiology* **2007**, 5 (1), 39–47.

Sacco, E.; Legendre, V.; Laval, F.; Zerbib, D.; Montrozier, H.; Eynard, N.; Guilhot, C.; Daffé, M.; Quémard, A. "Rv3389C from *Mycobacterium tuberculosis*, a Member of the (R)-Specific Hydratase/dehydratase Family". *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2007a**, 1774 (2), 303–311.

Sacco, E.; Covarrubias, A. S.; O'Hare, H. M.; Carroll, P.; Eynard, N.; Jones, T. A.; Parish, T.; Daffé, M.; Bäckbro, K.; Quémard, A. "The Missing Piece of the Type II Fatty Acid Synthase System from

Mycobacterium tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007b**, *104* (37), 14628–14633.

Sánchez-Chardi, A.; Olivares, F.; Byrd, T. F.; Julián, E.; Brambilla, C.; Luquin, M. "Demonstration of Cord Formation by Rough *Mycobacterium abscessus* Variants: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory." *Journal of clinical microbiology* **2011**, *49* (6), 2293–2295.

Sandhu, P.; Akhter, Y. "The Internal Gene Duplication and Interrupted Coding Sequences in the MmpL Genes of *Mycobacterium tuberculosis*: Towards Understanding the Multidrug Transport in an Evolutionary Perspective". *International Journal of Medical Microbiology* **2015**, *305* (3), 413–423.

Sani, M.; Houben, E. N. G.; Geurtsen, J.; Pierson, J.; De Punder, K.; Van Zon, M.; Wever, B.; Piersma, S. R.; Jiménez, C. R.; Daffé, M.; et al. "Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins". *PLoS Pathogens* **2010**, *6* (3).

Sapriel, G.; Konjek, J.; Orgeur, M.; Bouri, L.; Frezal, L.; Roux, A.-L.; Dumas, E.; Brosch, R.; Bouchier, C.; Brisse, S.; et al. "Genome-Wide Mosaicism within *Mycobacterium abscessus*: Evolutionary and Epidemiological Implications". *BMC genomics* **2016**, *17* (1), 118.

van der Sar, A. M.; Musters, R. J. P.; van Eeden, F. J. M.; Appelmelk, B. J.; Vandembroucke-Grauls, C. M. J. E.; Bitter, W. "Zebrafish Embryos as a Model Host for the Real Time Analysis of *Salmonella typhimurium* Infections". *Cellular Microbiology* **2003**, *5* (9), 601–611.

van der Sar, A. M.; Appelmelk, B. J.; Vandembroucke-Grauls, C. M. J. E.; Bitter, W. "A Star with Stripes: Zebrafish as an Infection Model". *Trends in microbiology* **2004**, *12* (10), 451–457.

Sarma, S.; Sharma, S.; Baweja, U. K.; Mehta, Y. "*Mycobacterium abscessus* Bacteremia in an Immunocompetent Patient Following a Coronary Artery Bypass Graft." *Journal of cardiovascular disease research* **2011**, *2* (1), 80–82.

Sassetti, C. M.; Boyd, D. H.; Rubin, E. J. "Genes Required for Mycobacterial Growth Defined by High Density Mutagenesis." *Mol Microbiol* **2003**, *48* (1), 77–84.

Sassi, M.; Drancourt, M. "Genome Analysis Reveals Three Genomespecies in *Mycobacterium abscessus*." *BMC genomics* **2014**, *15*, 359.

Sayes, F.; Sun, L.; Di Luca, M.; Simeone, R.; Degaiffier, N.; Fiette, L.; Esin, S.; Brosch, R.; Bottai, D.; Leclerc, C.; et al. "Strong Immunogenicity and Cross-Reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 Type VII Secretion-Encoded PE-PPE Proteins Predicts Vaccine Potential". *Cell Host and Microbe* **2012**, *11* (4), 352–363.

- Schaeffer, M. L.; Agnihotri, G.; Volker, C.; Kallender, H.; Brennan, P. J.; Lonsdale, J. T. "Purification and Biochemical Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthases KasA and KasB". *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (50), 47029–47037.
- Schäfer, G.; Jacobs, M.; Wilkinson, R. J.; Brown, G. D. "Non-Opsonic Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by Phagocytes". *Journal of Innate Immunity* **2009**, 1 (3), 231–243.
- Seddon, P.; Fidler, K.; Raman, S.; Wyatt, H.; Ruiz, G.; Elston, C.; Perrin, F.; Gyi, K.; Bilton, D.; Drobniewski, F.; et al. "Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Clinics, United Kingdom, 2009". *Emerging Infectious Diseases* **2013**, 19 (7), 1128–1130.
- Sekizuka, T.; Kai, M.; Nakanaga, K.; Nakata, N.; Kazumi, Y.; Maeda, S.; Makino, M.; Hoshino, Y.; Kuroda, M. "Complete Genome Sequence and Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium massiliense* JCM 15300 in the *Mycobacterium abscessus* Group Reveal a Conserved Genomic Island MmGI-1 Related to Putative Lipid Metabolism". *PLoS ONE* **2014**, 9 (12), 1–25.
- Sennhauser, G.; Bukowska, M. A.; Briand, C.; Grütter, M. G. "Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Molecular Biology* **2009**, 389 (1), 134–145.
- Shah, I.; Chilkar, S.; Patil, M.; Ali, U. "Acute Respiratory Distress during Paradoxical Reaction to Antituberculous Therapy in an 8-Month-Old Child". *Lung India* **2012**, 29 (4), 381–383.
- Sharma, R.; Lahiri, R.; Scollard, D. M.; Pena, M.; Williams, D. L.; Adams, L. B.; Figarola, J.; Truman, R. W. "The Armadillo: A Model for the Neuropathy of Leprosy and Potentially Other Neurodegenerative Diseases.". *Disease models & mechanisms* **2013**, 6 (1), 19–24.
- Shinnick, T. M.; Good, R. C. "Mycobacterial Taxonomy". *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **1994**, 13 (11), 884–901.
- Siegrist, M. S.; Unnikrishnan, M.; McConnell, M. J.; Borowsky, M.; Cheng, T.-Y.; Siddiqi, N.; Fortune, S. M.; Moody, D. B.; Rubin, E. J. "Mycobacterial Esx-3 Is Required for Mycobactin-Mediated Iron Acquisition.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106 (44), 18792–18797.
- Sinagra, J. L. M.; Kanitz, E. E.; Cerocchi, C.; Cota, C.; Fantetti, O.; Prignano, G.; Donati, P.; Tortoli, E. M.; D'Ancona, F. P.; Capitanio, B. "*Mycobacterium abscessus* Hand-and-Foot Disease in Children: Rare or Emerging Disease?". *Pediatric Dermatology* **2014**, 31 (3), 292–297.
- Singh, S.; Bouzinbi, N.; Chaturvedi, V.; Godreuil, S. "In vitro Evaluation of a New Drug Combination against Clinical Isolates Belonging to the *Mycobacterium abscessus* Complex". *Clinical Microbiology*

and Infection 2014.

Singh, V. K.; Laurence Berry; Bernut, A.; Singh, S.; Carrère-Kremer, S.; Viljoen, A.; Alibaud, L.; Majlessi, L.; Brosch, R.; Chaturvedi, V.; et al. "A Unique PE_PGRS Protein Inhibiting Host Cell Cytosolic Defenses and Sustaining Full Virulence of *Mycobacterium marinum* in Multiple Hosts". *Cellular Microbiology* 2016.

Slayden, R. a; Barry, C. E. "The Role of KasA and KasB in the Biosynthesis of Meromycolic Acids and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*". *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 2002, 82 (4–5), 149–160.

Smibert, O.; Snell, G. I.; Bills, H.; Westall, G. P.; Morrissey, C. O. "*Mycobacterium abscessus* Complex - a Particular Challenge in the Setting of Lung Transplantation.". *Expert review of anti-infective therapy* 2016, 14 (3), 325–333.

Smith, J. J.; Travis, S. M.; Greenberg, E. P.; Welsh, M. J. "Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria because of Abnormal Airway Surface Fluid". *Cell* 1996, 85 (2), 229–236.

Sondén, B.; Kocíncová, D.; Deshayes, C.; Euphrasie, D.; Rhayat, L.; Laval, F.; Frehel, C.; Daffé, M.; Etienne, G.; Reytrat, J. M. "Gap, a Mycobacterial Specific Integral Membrane Protein, Is Required for Glycolipid Transport to the Cell Surface". *Molecular Microbiology* 2005, 58 (2), 426–440.

Soroka, D.; Dubée, V.; Soulier-Escrihuela, O.; Cuinet, G.; Hugonnet, J. E.; Gutmann, L.; Mainardi, J. L.; Arthur, M. "Characterization of Broad-Spectrum *Mycobacterium abscessus* Class A β -Lactamase". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014, 69 (3), 691–696.

Stec, J.; Onajole, O. K.; Lun, S.; Guo, H.; Merenbloom, B.; Vistoli, G.; Bishai, W. R.; Kozikowski, A. P. "Indole-2-Carboxamide-Based MmpL3 Inhibitors Show Exceptional Antitubercular Activity in an Animal Model of *Tuberculosis* Infection". *Journal of Medicinal Chemistry* 2016, acs.jmedchem.6b00415.

Stewart, A. M.; Braubach, O.; Spitsbergen, J.; Gerlai, R.; Kalueff, A. V. "Zebrafish Models for Translational Neuroscience Research: From Tank to Bedside". *Trends in Neurosciences* 2014, 37 (5), 264–278.

Stinear, T. P.; Seemann, T.; Harrison, P. F.; Jenkin, G. a; Davies, J. K.; Johnson, P. D. R.; Abdellah, Z.; Arrowsmith, C.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; et al. "Insights from the Complete Genome Sequence of *Mycobacterium marinum* on the Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* Insights from the Complete Genome Sequence of *Mycobacterium marinum* on the Evolution of *Mycobacterium*

tuberculosis". *Genome Research* **2008**, 729–741.

Stutts, M. J.; Canessa, C. M.; Olsen, J. C.; Hamrick, M.; Cohn, J. A.; Rossier, B. C.; Boucher, R. C. "CFTR as a cAMP-Dependent Regulator of Sodium Channels.". *Science* **1995**, No. 17.

Su, C. C.; Li, M.; Gu, R.; Takatsuka, Y.; McDermott, G.; Nikaido, H.; Yu, E. W. "Conformation of the AcrB Multidrug Efflux Pump in Mutants of the Putative Proton Relay Pathway". *Journal of Bacteriology* **2006**, 188 (20), 7290–7296.

Sulzenbacher, G.; Canaan, S.; Bordat, Y.; Neyrolles, O.; Stadthagen, G.; Roig-Zamboni, V.; Rauzier, J.; Maurin, D.; Laval, F.; Daffé, M.; et al. "LppX Is a Lipoprotein Required for the Translocation of Phthiocerol Dimycocerosates to the Surface of *Mycobacterium tuberculosis*". *The EMBO journal* **2006**, 25 (7), 1436–1444.

Swindle, M. M.; Makin, A.; Herron, A. J.; Clubb, F. J.; Frazier, K. S. "Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing". *Veterinary Pathology* **2012**, 49 (2), 344–356.

Székely, R.; Cole, S. T. "Mechanistic Insight into Mycobacterial MmpL Protein Function". *Molecular microbiology* **2016**, 99 (January), 831–834.

Tabouret, G.; Astarie-Dequeker, C.; Demangel, C.; Malaga, W.; Constant, P.; Ray, A.; Honoré, N.; Bello, N. F.; Perez, E.; Daffé, M.; et al. "Mycobacterium Leprae Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered *M. bovis* BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes". *PLoS Pathogens* **2010**, 6 (10).

Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Whitney Barnes, S.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E.; et al. "SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of *Mycobacterium tuberculosis*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**, 56, 1797–1809.

Tailleux, L.; Schwartz, O.; Herrmann, J. L.; Pivert, E.; Jackson, M.; Amara, a; Legres, L.; Dreher, D.; Nicod, L. P.; Gluckman, J. C.; et al. "DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells". *Journal of Experimental Medicine* **2002**, 197 (1), 121–127.

Tailleux, L.; Pham-Thi, N.; Bergeron-Lafaurie, A.; Herrmann, J. L.; Charles, P.; Schwartz, O.; Scheinmann, P.; Lagrange, P. H.; De Blic, J.; Tazi, A.; et al. "DC-SIGN Induction in Alveolar Macrophages Defines Privileged Target Host Cells for Mycobacteria in Patients with *Tuberculosis*". *PLoS Medicine* **2005**, 2 (12), 1269–1279.

Takaki, K.; Cosma, C. L.; Troll, M. A.; Ramakrishnan, L. "An *In vivo* Platform for Rapid High-

Throughput Antitubercular Drug Discovery". *Cell Reports* **2012**, 2 (1), 175–184.

Takaki, K.; Davis, J. M.; Winglee, K.; Ramakrishnan, L. "Evaluation of the Pathogenesis and Treatment of *Mycobacterium marinum* Infection in Zebrafish". *Nature Protocols* **2013**, 8 (6), 1114–1124.

Tamplin, O. J.; White, R. M.; Jing, L.; Kaufman, C. K.; Lacadie, S. A.; Li, P.; Taylor, A. M.; Zon, L. I. "Small Molecule Screening in Zebrafish: Swimming in Potential Drug Therapies". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **2012**, 1 (3), 459–468.

Tan, J. L.; Ngeow, Y. F.; Choo, S. W. "Support from Phylogenomic Networks and Subspecies Signatures for Separation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium bolletii*". *Journal of Clinical Microbiology* **2015**, 53 (9), 3042–3046.

Tat, J.; Liu, M.; Wen, X. Y. "Zebrafish Cancer and Metastasis Models for *In vivo* Drug Discovery". *Drug Discovery Today: Technologies* **2013**, 10 (1), e83–e89.

Tekaia, F.; Gordon, S. V.; Garnier, T.; Brosch, R.; Barrell, B. G.; Cole, S. T. "Analysis of the Proteome of *Mycobacterium tuberculosis in silico*". *Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **1999**, 79 (6), 329–342.

Thoma-Uszynski, S.; Stenger, S.; Takeuchi, O.; Ochoa, M. T.; Engele, M.; Sieling, P. A.; Barnes, P. F.; Rollinghoff, M.; Bolcskei, P. L.; Wagner, M.; et al. "Induction of Direct Antimicrobial Activity through Mammalian Toll-like Receptors". *Science (New York, N.Y.)* **2001**, 291 (5508), 1544–1547.

Titball, R. W. "Bacterial Phospholipase C". *Microbiological Reviews* **1993**, 57 (2), 347–366.

Tobin, D. M.; Ramakrishnan, L. "Comparative Pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*". *Cellular Microbiology* **2008**, 10 (5), 1027–1039.

Tomashefski, J. F.; Stern, R. C.; Demko, C. A.; Doershuk, C. F. "Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis". *Journal of the Royal Society of Medicine* **1996**, 105 Suppl, S14-8.

Torraca, V.; Masud, S.; Spaik, H. P.; Meijer, A. H. "Macrophage-Pathogen Interactions in Infectious Diseases: New Therapeutic Insights from the Zebrafish Host Model". *Disease models & mechanisms* **2014**, 7 (7), 785–797.

Tortoli, E. "Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: The New Mycobacteria of the 1990s". *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16 (2), 319–354.

Tortoli, E. "Phylogeny of the Genus Mycobacterium: Many Doubts, Few Certainties". *Infection*,

Genetics and Evolution **2012**, *12* (4), 827–831.

Touchette, M. H.; Holsclaw, C. M.; Previti, M. L.; Solomon, V. C.; Leary, J. A.; Bertozzi, C. R.; Seeliger, J. C. "The rv1184c Locus Encodes Chp2, an Acyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis* Polyacyltrehalose Lipid Biosynthesis". *Journal of bacteriology* **2015**, *197* (1), 201–210.

Traver, D.; Herbomel, P.; Patton, E. E.; Murphey, R. D.; Yoder, J. A.; Litman, G. W.; Catic, A.; Amemiya, C. T.; Zon, L. I.; Trede, N. S. "The Zebrafish as a Model Organism to Study Development of the Immune System.". *Adv Immunol* **2003**, *81*, 253–330.

Trede, N. S.; Langenau, D. M.; Traver, D.; Look, A. T.; Zon, L. I. "The Use of Zebrafish to Understand Immunity". *Immunity* **2004**, *20* (4), 367–379.

Trivedi, O. A.; Arora, P.; Sridharan, V.; Tickoo, R.; Mohanty, D.; Gokhale, R. S. "Enzymic Activation and Transfer of Fatty Acids as Acyl-Adenylates in Mycobacteria". *Nature* **2004**, *428* (6981), 441–445.

Varela, C.; Rittmann, D.; Singh, A.; Krumbach, K.; Bhatt, K.; Eggeling, L.; Besra, G. S.; Bhatt, A. "MmpL Genes Are Associated with Mycolic Acid Metabolism in Mycobacteria and Corynebacteria". *Chemistry and Biology* **2012**, *19* (4), 498–506.

Varghese, B.; Shajan, S. E.; Al, M. O.; Al-Hajoj, S. A. "First Case Report of Chronic Pulmonary Lung Disease Caused by *Mycobacterium abscessus* in Two Immunocompetent Patients in Saudi Arabia". *Annals of Saudi Medicine* **2012**, *32* (3), 312–314.

Venkatakrishnan, A.; Stecenko, A.; King, G.; Blackwell, T.; Bringham, K.; Christman, J.; Blackwell, T. "Exaggerated Activation of Nuclear Factor- κ B and Altered I κ B-B Processin in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells". *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**, *23*, 396–403.

Vergunts, A. C.; Meijer, A. H.; Stephen A., R.; David, O. "*Burkholderia cenocepacia* Creates an Intramacrophage Replication Niche in Zebrafish Embryos, Followed by Bacterial Dissemination and Establishment of Systemic Infection". *Infection and Immunity* **2010**, *78* (4), 1495–1508.

Verkman, A. S.; Song, Y.; Thiagarajah, J. R. "Role of Airway Surface Liquid and Submucosal Glands in Cystic Fibrosis Lung Disease.". *American journal of physiology. Cell physiology* **2003**, *284* (1), C2-15.

Vij, N.; Mazur, S.; Zeitlin, P. L. "CFTR Is a Negative Regulator of NF κ B Mediated Innate Immune Response.". *PloS one* **2009**, *4* (2), e4664.

Vilchèze, C.; Morbidoni, H. R.; Weisbrod, T. R.; Iwamoto, H.; Kuo, M.; Sacchetti, J. C.; Jacobs, W. R. "Inactivation of the inhA-Encoded Fatty Acid Synthase II (FASII) Enoyl- Acyl Carrier Protein

Reductase Induces Accumulation of the FASI End Products and Cell Lysis of *Mycobacterium smegmatis*". *Journal of Bacteriology* **2000**, *182* (14), 4059–4067.

Vilchèze, C.; Molle, V.; Carrère-Kremer, S.; Leiba, J.; Mourey, L.; Shenai, S.; Baronian, G.; Tufariello, J.; Hartman, T.; Veyron-Churlet, R.; et al. "Phosphorylation of KasB Regulates Virulence and Acid-Fastness in *Mycobacterium tuberculosis*". *PLoS Pathogens* **2014**, *10* (5).

Villanueva, a; Calderon, R. V; Vargas, B. a; Ruiz, F.; Agüero, S.; Zhang, Y.; Brown, B. a; Wallace, R. J. "Report on an Outbreak of Postinjection Abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, Including Management with Surgery and Clarithromycin Therapy and Comparison of Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction.". *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **1997**, *24* (6), 1147–1153.

Villeneuve, C.; Gilleron, M.; Maridonneau-Parini, I.; Daffé, M.; Astarie-Dequeker, C.; Etienne, G. "Mycobacteria Use Their Surface-Exposed Glycolipids to Infect Human Macrophages through a Receptor-Dependent Process.". *Journal of lipid research* **2005**, *46* (3), 475–483.

Wallace, R. J.; Meier, A.; Brown, B. A.; Zhang, Y.; Sander, P.; Onyi, G. O.; Wallace, R. J.; Meier, A.; Brown, B. A.; Zhang, Y.; et al. "Genetic Basis for Clarithromycin Resistance among Isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* . These Include: Genetic Basis for Clarithromycin Resistance among Isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, *40* (7), 1676–1681.

Wallace, R. J.; Brown, B. A.; Griffith, D. E. "Nosocomial Outbreaks/Pseudo- Outbreaks Caused By Nontuberculous Mycobacteria". *Annual Review of Microbiology* **1998**, *52*, 453–490.

Watanabe, M.; Aoyagi, Y.; Mitome, H.; Fujita, T.; Naoki, H.; Ridell, M.; Minnikin, D. E. "Location of Functional Groups in Mycobacterial Meromycolate Chains; the Recognition of New Structural Principles in Mycolic Acids". *Microbiology* **2002**, *148* (6), 1881–1902.

Wells, R. M.; Jones, C. M.; Xi, Z.; Speer, A.; Danilchanka, O.; Doornbos, K. S.; Sun, P.; Wu, F.; Tian, C.; Niederweis, M. "Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*". *PLoS Pathogens* **2013**, *9* (1).

White, R.; Rose, K.; Zon, L. "Zebrafish Cancer: The State of the Art and the Path Forward.". *Nature reviews. Cancer* **2013**, *13* (9), 624–636.

WHO. "WHO Global Tuberculosis Report 2015". *CEUR Workshop Proceedings* **2015**, *1542*, 33–36.

Wilkinson, R. N.; Jopling, C.; Van Eeden, F. J. M. *Zebrafish as a Model of Cardiac Disease*, 1st ed.;

Elsevier Inc., *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **2014**; Vol. 124.

Wolinsky, E. "Mycobacterial Lymphadenitis in Children: A Prospective Study of 105 Nontuberculous Cases with Long-Term Follow-Up". *Clinical Infectious Diseases* **1995**, *20* (4), 954–963.

Wongkitisophon, P.; Rattanakaemakorn, P.; Tanrattanakorn, S.; Vachiramom, V. "Cutaneous *Mycobacterium abscessus* Infection Associated with Mesotherapy Injection". *Case Reports in Dermatology* **2011**, *3* (1), 37–41.

Yamada, H.; Bhatt, A.; Danev, R.; Fujiwara, N.; Maeda, S.; Mitarai, S.; Chikamatsu, K.; Aono, A.; Nitta, K.; Jacobs, W. R.; et al. "Non-Acid-Fastness in *Mycobacterium tuberculosis* deltakasB Mutant Correlates with the Cell Envelope Electron Density". *Tuberculosis* **2012**, *92* (4), 351–357.

Yamaguchi, A.; Nakashima, R.; Sakurai, K. "Structural Basis of RND-Type Multidrug Exporters". *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6* (APR), 1–19.

Yang, L.; Lu, S.; Belardinelli, J.; Huc-Claustre, E.; Jones, V.; Jackson, M.; Zgurskaya, H. I. "RND Transporters Protect *Corynebacterium glutamicum* from Antibiotics by Assembling the Outer Membrane". *MicrobiologyOpen* **2014**, *3* (4), 484–496.

Young, D. B.; Gideon, H. P.; Wilkinson, R. J. "Eliminating Latent *Tuberculosis*". *Trends in Microbiology* **2009**, *17* (5), 183–188.

Zhang, Y.; Yakrus, M. a; Graviss, E. a; Williams-bouyer, N.; Turenne, C.; Kabani, A.; Jr, R. J. W.; Wallace, R. J. "Pulsed-Field Gel Electrophoresis Study of *Mycobacterium abscessus* Isolates Previously Affected by DNA Degradation Pulsed-Field Gel Electrophoresis Study of *Mycobacterium abscessus* Isolates Previously Affected by DNA Degradation". *Journal of Clinical Microbiology* **2004**, *42* (12), 5582–5587.

Zhang, Y. J.; loerger, T. R.; Huttenhower, C.; Long, J. E.; Sasseti, C. M.; Sacchetti, J. C.; Rubin, E. J. "Global Assessment of Genomic Regions Required for Growth in *Mycobacterium tuberculosis*". *PLoS Pathogens* **2012**, *8* (9).

Zimhony, O.; Vilchèze, C.; Jacobs, W. R. "Characterization of *Mycobacterium smegmatis* Expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Fatty Acid Synthase I (fas1) Gene". *Journal of Bacteriology* **2004**, *186* (13), 4051–4055.

Zimhony, O.; Schwarz, A.; Raites-Gurevich, M.; Peleg, Y.; Dym, O.; Albeck, S.; Burstein, Y.; Shakked, Z. *AcpM, the Meromycolate Extension Acyl Carrier Protein of Mycobacterium tuberculosis, Is Activated by the 4'-Phosphopantetheinyl Transferase PptT, a Potential Target of the Multistep*

Mycolic Acid Biosynthesis; Biochemistry **2015**; Vol. 54.

Zon, L. I.; Peterson, R. T. "In vivo Drug Discovery in the Zebrafish". Nature reviews. Drug discovery **2005**, 4 (1), 35–44.

Zuber, B.; Chami, M.; Houssin, C.; Dubochet, J.; Griffiths, G.; Daffé, M. "Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State". Journal of Bacteriology **2008**, 190 (16), 5672–5680.

Zwick, M.; Esposito, C.; Hellstern, M.; Seelig, A. "Interplay between CFTR Phosphorylation, CFTR-ATPase Activity, and Anion Flux". Journal of Biological Chemistry **2016**, No. 7, jbc.M116.721415.

Titre : Étude fonctionnelle et intérêt thérapeutique des MmpL chez *Mycobacterium abscessus*

Mots clés : *Mycobacterium abscessus*; Zebrafish ; MmpL ; Approches Thérapeutiques, Mécanisme de Résistance

Résumé: *Mycobacterium abscessus* est une mycobactérie pathogène émergente à croissance rapide capable d'induire des infections pulmonaires sévères, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Naturellement résistant à la plupart des antibiotiques disponibles, sa présence peut être une contre-indication à la greffe pulmonaire chez ces patients. De plus, l'efficacité des traitements actuellement préconisés est très fluctuante d'un individu à l'autre et s'accompagne souvent d'effets secondaires indésirables. Il apparaît donc urgent de développer des stratégies thérapeutiques innovantes et/ou d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques dans la lutte contre ce pathogène. Ce projet de thèse, focalisé sur *M. abscessus*, est centré sur l'étude mécanistique et fonctionnelle des transporteurs membranaires de la famille des MmpL (Mycobacterial Membrane Protein Large) en rapport avec leur rôle dans i) l'élaboration de l'enveloppe mycobactérienne, ii) la physiopathologie infectieuse et iii) leur validation en tant que cible d'intérêt thérapeutique.

Ainsi, mes travaux ont permis de mettre à jour le rôle clé de MmpL4a dans le transport des glycopeptidolipides (GPL) chez *Mycobacterium bolletii*, une sous-espèce du complexe *M. abscessus* et de démontrer sa participation dans la formation de biofilms, des cordes mycobactériennes et dans la virulence de *M. bolletii* chez l'embryon de zebrafish. De plus, ces résultats mettent en exergue l'importance de résidus critiques impliqués dans l'établissement de la force proto-motrice, conservés chez toutes les MmpL, et nécessaires à l'activité de ces transporteurs. Enfin, ces études ont abouti à l'identification d'une nouvelle entité chimique très active contre *M. abscessus* à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ce composé phare est capable de cibler le MmpL3, conduisant à une inhibition du transport des acides mycoliques, connus comme étant des composants essentiels chez les mycobactéries. Ces travaux représentent le premier exemple d'un inhibiteur ciblant spécifiquement le transport d'acides mycoliques chez *M. abscessus*, ouvrant la voie vers des applications thérapeutiques prometteuses.

Title : Functional studies and therapeutic significance of MmpL proteins in *Mycobacterium abscessus*

Keywords : *Mycobacterium abscessus*; Zebrafish ; MmpL ; Therapeutic Approaches; Mechanisms of Drug Resistance

Abstract: *Mycobacterium abscessus* is a rapid- growing mycobacterial species and an emerging pathogen, responsible for severe lung infections, particularly in cystic fibrosis patients. Naturally resistant to most currently available antibiotics, its presence can represent a contraindication to subsequent lung transplantation in these patients. That the currently recommended treatments present fluctuating results among patients and are often associated with important side effects, imposes to develop innovative therapeutic strategies and/or to identify new pharmacologically relevant targets in the fight against this pathogen. This project, focusing on *M. abscessus*, is intended to explore mechanistic and functional aspects of members of the MmpL (Mycobacterial Membrane Protein Large) family of membrane proteins with respect to i) their role in elaboration of the mycobacterial envelope, ii) their involvement in the physiopathology of the infection and iii) their validation as potentially attractive therapeutic drug targets.

In this context, my studies unraveled the key role of MmpL4a in the transport of glycopeptidolipids (GPL) in *Mycobacterium bolletii*, a sub-species of the *M. abscessus* complex and demonstrated its implication in the formation of biofilms, cording and virulence of *M. bolletii* in infected zebrafish. Moreover, these results put forward the importance of critical residues, conserved in all MmpL members, involved in the establishment of the proton-motive force required for the activity of these transporters. Finally, these studies succeeded in the identification of a new chemical entity exhibiting a potent activity against *M. abscessus* both *in vitro* and *in vivo*. This hit compounds targets MmpL3, leading to the inhibition of the transport of mycolic acids, known to represent essential components of the mycobacterial cell wall. These results emphasize the mode of action of the first specific inhibitor of mycolic acid transport in *M. abscessus*, paving the way to promising therapeutic applications.