



**HAL**  
open science

**Nouvelles combinaisons de  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs  
de  $\beta$ -lactamase : vers un nouveau traitement des  
infections à *Mycobacterium abscessus* chez les patients  
atteints de mucoviscidose**

Eva Le Run

► **To cite this version:**

Eva Le Run. Nouvelles combinaisons de  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase : vers un nouveau traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose. Microbiologie et Parasitologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS640 . tel-03371233

**HAL Id: tel-03371233**

**<https://theses.hal.science/tel-03371233>**

Submitted on 8 Oct 2021

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

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

# Nouvelles combinaisons de $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de $\beta$ -lactamase : vers un nouveau traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose

Thèse de doctorat en microbiologie

Présentée par Eva LE RUN

Dirigée par Jean-Luc MAINARDI

Soutenue publiquement le 18 Décembre 2019

Devant un jury composé de :

HERY-ARNAUD Geneviève, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Rapporteuse
CANAAN Stéphane, Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
ROBERT Jérôme, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Examineur
BURGEL Pierre-Régis, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Examineur
MAINARDI Jean-Luc, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Directeur de Thèse



# Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Pr. HERY-ARNAUD et le Dr. CANAAN d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Ainsi que le Pr. BURGEL et le Pr. ROBERT d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie le Dr Michel ARTHUR de m'avoir accueillie dans son équipe pour ces 3 années de doctorat.

Je souhaiterais ensuite remercier très sincèrement le Pr. MAINARDI d'avoir dirigé ma thèse. Merci de m'avoir guidée et accompagnée dans ce travail.

Un grand merci à l'équipe 12 passée et présente : Manu, Matthieu, David, Guennadi, Grazyna, Zainab, Henri, Heiner, Antoine, Céline, Marie, Fabrice, Robin ! Passer ces années à vos côtés aura été une super expérience, et un plaisir. Avec une pensée particulière pour Nico et Delphine, mes acolytes du quotidien !

En ce jour, je pense au Dr. GOLINELLI, c'est grâce à toi que tout a commencé, tu m'as donné le goût de la recherche, merci.

Bien sûr je remercie ma famille de m'avoir soutenue depuis le début de mes études, je vous en ai fait voir, je sais ! Combien de déménagements et d'universités différentes pour en arriver là ? Mais ça valait le coup !

Je remercie toutes les personnes qui m'ont suivie et côtoyée pendant ces années ! Une pensée à tous mes colocataires qui ont défilés pendant ces 3 années de folie : Colynou, Jérôme, Juju et Sahra ! La cohabitation c'est pas toujours facile mais heureusement que je vous retrouvais tous les soirs.

Mention spéciale au gang des ovaires, (j'vous aime putain), au SCED (je sais j'en ai raté beaucoup, mais j'y pense à vous quand même) et à la team Confess' parce qu'après une grosse journée, rien de mieux qu'un p'tit verre entre copains !

Enfin à tous, MERCI ! Je n'en serais jamais arrivée là sans vous !

## Résumé

*Mycobacterium abscessus*, une mycobactérie à croissance rapide, est responsable d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose. Le traitement recommandé comprend une phase initiale basée sur l'association d'un carbapénème (imipénème), d'un macrolide (azithromycine), d'un aminoside (amikacine) et d'une glycylicycline (tigécycline). L'équipe a étudié l'optimisation des traitements impliquant les  $\beta$ -lactamines et a démontré que l'avibactam, un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases de 2<sup>ème</sup> génération appartenant à la famille du diazabicyclooctane, inhibe le  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> produit par *M. abscessus* et augmente de manière significative l'efficacité de l'imipénème à la fois *in vitro*, dans les macrophages et dans le modèle de poisson zèbre. L'expression du gène de la  $\beta$ -lactamase s'est avérée être induite dans les macrophages infectés. L'objectif du projet de thèse était d'évaluer l'efficacité de nouvelles combinaisons comprenant des d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase et d'étudier la régulation de la  $\beta$ -lactamase dans les macrophages.

Dans la première partie de la thèse, de nouvelles combinaisons d'antibiotiques ont été évaluées *in vitro* et dans des macrophages infectés par *M. abscessus*. La rifabutine, habituellement utilisée dans le traitement d'infections dues à d'autres mycobactéries, a montré une activité synergique avec l'imipénème *in vitro*, mais l'association n'était pas bactéricide. Dans les macrophages infectés, la rifabutine a renforcé l'activité de l'imipénème et l'ajout d'avibactam a entraîné une diminution du nombre de bactérie intracellulaire. Le tédizolide, développé pour le traitement des infections à staphylocoques, a montré une faible synergie *in vitro* mais pas d'activité bactéricide contre *M. abscessus*. Dans les macrophages, le tédizolide augmentait l'activité de l'imipénème et la quadruple combinaison imipénème-tédizolide-rifabutine-avibactam permettait de diminuer le nombre de bactéries intracellulaires de 91%. Enfin, l'association de l'imipénème avec le relebactam, un nouvel inhibiteur de  $\beta$ -lactamases développé en association avec l'imipénème, s'est révélée aussi active que la combinaison imipénème-avibactam à la fois *in vitro* et dans les macrophages.

La deuxième partie de la thèse était focalisée sur l'identification du stress responsable de l'induction de la production de  $\beta$ -lactamase dans les macrophages. Dans ce but, *M. abscessus* a été cultivée *in vitro* dans différents milieux de culture mimant des conditions de stress aux quelles la bactérie est potentiellement confrontée dans les macrophages. L'activité spécifique de la  $\beta$ -lactamase a été déterminée en utilisant comme substrat une  $\beta$ -lactamine chromogène, la nitrocéfine. Aucune des conditions physicochimiques testées n'a conduit à une induction, incluant un pH acide, de fortes concentrations de métaux, un stress oxydatif ou la présence de  $\beta$ -lactamines.

Le dernier objectif était d'étudier l'impact du polymorphisme N *versus* G situé dans le motif conservé SDN des  $\beta$ -lactamases sur l'activité des combinaisons comprenant une  $\beta$ -lactamine et un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase. Bla<sub>Mab</sub> de *M. abscessus* contient le motif SDN alors que BlaC de *M. tuberculosis* contient le motif SDG, un polymorphisme qui détermine l'efficacité de l'inhibition de Bla<sub>Mab</sub> par l'avibactam de BlaC par le clavulanate *in vitro*. Deux souches isogéniques de *M. abscessus* ont été construites par échange allélique. Comparativement à la souche sauvage, la souche produisant Bla<sub>Mab</sub> avec la substitution N vers G était moins sensible aux combinaisons comprenant l'avibactam avec, en parallèle, un gain d'efficacité pour les combinaisons comprenant le clavulanate. Dans le contexte de BlaC, la substitution de G vers N a potentialisé l'inhibition par l'avibactam. Ces résultats établissent que le polymorphisme SDN/SDG détermine en partie l'efficacité des  $\beta$ -lactamines associées à l'avibactam ou au clavulanate, en accord avec les études cinétiques précédemment réalisées *in vitro* avec des  $\beta$ -lactamases purifiées. Les substitutions de N vers G et de G vers N pourraient donc être des mécanismes d'acquisition de la résistance chez *M. abscessus* et *M. tuberculosis*.



## Abstract

*Mycobacterium abscessus*, a rapidly growing mycobacteria, is responsible for pulmonary infections in cystic fibrosis patients. The recommended treatment consists in an initial phase with the combination of a carbapenem (imipenem), a macrolide (azithromycin), an aminoglycoside (amikacin), and a glycylicycline (tigecycline). The team has investigated the optimization of treatments involving  $\beta$ -lactams and have demonstrated that avibactam, a 2<sup>nd</sup> generation  $\beta$ -lactamase inhibitor belonging to the diazabicyclooctane (DBO) family, inhibits the  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> produced by *M. abscessus* and substantially increases the efficacy of imipenem both *in vitro*, intracellularly, and in a zebrafish model. Expression of the  $\beta$ -lactamase gene was found to be induced in infected macrophages. The aim of my PhD project was to evaluate the efficacy of new  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations and to investigate  $\beta$ -lactamase regulation in macrophages.

In the first part of the thesis, new antibiotic combinations were evaluated *in vitro* and in macrophages infected by *M. abscessus*. Rifabutin, usually used in the treatment of infections due to other mycobacteria, showed synergistic activity with imipenem *in vitro* but the combination was not bactericidal. In infected macrophages, rifabutin enhanced the activity of imipenem and the addition of avibactam led to increased killing. Tedizolid, developed for the treatment of staphylococcal infections, displayed weak synergy *in vitro* but no bactericidal activity against *M. abscessus*. In macrophages, tedizolid enhanced the activity of imipenem and the imipenem-tedizolid-rifabutin-avibactam quadruple combination afforded 91% intracellular killing. Finally, the association of imipenem with relebactam, a new  $\beta$ -lactamase inhibitor developed in combination with imipenem, was found to be as active as the imipenem-avibactam both *in vitro* and in macrophage model.

The second part of the thesis was focused on the identification of the stressor triggering the induction of  $\beta$ -lactamase production in macrophages. *M. abscessus* was grown *in vitro* in different culture media mimicking stress conditions thought to prevail in macrophages. The  $\beta$ -lactamase specific activity was determined using a chromogenic  $\beta$ -lactam (nitrocefin) as the substrate. None of the physicochemical conditions that were tested led to induction, including acidic pH, high concentrations of metals, oxidative stress or  $\beta$ -lactams.

The last objective was to study the impact of the N versus G polymorphism located in the conserved SDN motif of mycobacterial  $\beta$ -lactamases on activity of  $\beta$ -lactam- $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. Bla<sub>Mab</sub> from *M. abscessus* contains motif SDN whereas BlaC from *M. tuberculosis* contains motif SDG, a polymorphism that determines efficacious inhibition by either avibactam or clavulanate, respectively. Two isogenic strains of *M. abscessus* were constructed by allelic exchange. In comparison to the wild-type enzyme, the strain producing Bla<sub>Mab</sub> with the N to G substitution was less susceptible to the  $\beta$ -lactam-avibactam combinations but more efficaciously inhibited by combinations comprising clavulanate. In the context of BlaC, the G to N substitution potentiated inhibition by avibactam. These results establish that the SDN/SDG polymorphism determines the efficacy of combinations comprising a  $\beta$ -lactam and avibactam or clavulanate, as expected from previous kinetic studies performed with purified  $\beta$ -lactamases. N to G and G to N substitutions might be mechanisms of resistance acquisition in *M. abscessus* and *M. tuberculosis*, respectively.

# Table des matières

Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations.....	12
Introduction .....	14
Généralités sur <i>Mycobacterium abscessus</i> .....	16
I.    Taxonomie et caractéristiques.....	16
1)    Taxonomie.....	16
2)    Mycobactéries non tuberculeuses.....	16
3)    Deux morphotypes.....	18
4)    Structure de la paroi de <i>M. abscessus</i> .....	19
II.   Epidémiologie .....	23
1)    Les infections respiratoires.....	23
2)    Autres infections.....	24
3)    Cas particulier : les patients atteints de mucoviscidose.....	24
Les $\beta$ -lactamines .....	27
I.    Généralités.....	27
II.   Mécanisme d'action .....	27
III.  Activité sur <i>M. abscessus</i> .....	28
1) <i>In vitro</i> .....	28
2)    Modèle macrophage .....	29
3) <i>In vivo</i> .....	29
Les $\beta$ -lactamases .....	30
I.    Les classes d'Ambler .....	30
II.   Mode d'action .....	30
III.  Les $\beta$ -lactamases des mycobactéries.....	31
1)    La $\beta$ -lactamase BlaC de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	31
2)    La $\beta$ -lactamase Bla <sub>Mab</sub> de <i>M. abscessus</i> .....	31
3)    Autres $\beta$ -lactamases des mycobactéries .....	32
4)    Comparaison de l'efficacité d'hydrolyse de Bla <sub>Mab</sub> et BlaC .....	33
Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases .....	34
I.    Inhibiteurs de 1 <sup>ère</sup> génération.....	34
1)    Le clavulanate.....	34
2)    Le sulbactam.....	35
3)    Le tazobactam.....	36

II.	Inhibiteurs de 2 <sup>ème</sup> génération .....	36
1)	L'avibactam .....	37
2)	Le relebactam .....	37
3)	Le nacubactam.....	38
4)	Le zidébactam.....	38
5)	Le vaborbactam .....	39
	Thérapeutique .....	40
I.	Présentation des autres classes d'antibiotiques .....	41
1)	Les aminosides .....	41
2)	Les glycyyl cyclines .....	41
3)	Les macrolides.....	42
4)	Les diarylquinolines .....	43
5)	Les phénazines.....	43
6)	Les oxazolidinones: linézolide et tédizolide.....	43
7)	Les rifamycines.....	44
II.	Le traitement préconisé .....	45
	Objectifs.....	46
	<b>Matériel &amp; Méthodes</b> .....	48
I.	Souches bactériennes.....	50
II.	Milieux de culture .....	50
III.	Antibiotiques utilisés.....	51
IV.	Activité <i>in vitro</i> des antibiotiques .....	52
1)	Antibiogramme par diffusion .....	52
2)	Concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide.....	52
3)	Méthode en échiquier .....	52
4)	Détermination de l'activité bactéricide.....	53
5)	Modèle macrophage .....	54
V.	Manipulations génétiques.....	54
1)	Plasmides utilisés.....	54
2)	Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	55
3)	Purification de l'ADN plasmidique .....	56
4)	Ligation et clonage .....	56
5)	Recombinaison homologue .....	57
6)	Extraction d'ADN génomique.....	60
VI.	Evaluation de l'activité catalytique de Bla <sub>Mab</sub> .....	60
1)	Extraction de protéines totales.....	60

2) Mesure d'activité spécifique.....	61
3) Test d'induction de la production de Bla <sub>Mab</sub> .....	62
4) Caractérisation de l'inhibition de Bla <sub>Mab</sub> par le relebactam .....	62
VII. Statistiques.....	62
Résultats .....	64
Activités <i>in vitro</i> et intracellulaire de nouvelles combinaisons incluant une $\beta$ -lactamine et des inhibiteurs de $\beta$ -lactamases .....	66
I. La rifabutine .....	66
1) Evaluation de l'activité <i>in vitro</i> .....	66
2) Evaluation de l'activité intracellulaire.....	69
3) Effet de l'ajout de l'avibactam .....	70
II. Le tédizolide.....	73
1) Evaluation de l'activité <i>in vitro</i> .....	73
2) Evaluation de l'activité intracellulaire.....	75
3) Effet de l'ajout de l'avibactam .....	76
4) Effet de l'ajout de la rifabutine.....	77
5) Effet de la rifabutine et du tédizolide sur l'activité $\beta$ -lactamase .....	78
III. Nouvel inhibiteur de $\beta$ -lactamase : le relebactam .....	79
1) Activité <i>in vitro</i> de l'imipénème et de l'amoxicilline en association avec le relebactam .....	80
2) Activité bactéricide <i>in vitro</i> .....	80
3) Activité intracellulaire .....	81
4) Inhibition <i>in vitro</i> de Bla <sub>Mab</sub> par le relebactam .....	84
Régulation de la $\beta$ -lactamase Bla <sub>Mab</sub> .....	85
I. Activité spécifique de cultures planctoniques .....	85
II. Obtention de souches recombinantes fluorescentes .....	89
Effet du motif SDN/SDG dans des souches isogéniques.....	96
I. Obtention des souches .....	96
II. Analyse phénotypiques des souches isogéniques de <i>M. abscessus</i> .....	97
Discussion Perspectives.....	100
Références.....	108
Annexes .....	126

## Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des mycobactéries (Dai et al., 2011)..	18
Figure 2. Voie de synthèse du peptidoglycane de <i>M. tuberculosis</i> .....	20
Figure 3. Réaction de D,D-transpeptidation chez <i>M. abscessus</i> .....	21
Figure 4. Voie de synthèse du peptidoglycane médiée par les L,D-transpeptidases chez <i>Enterococcus faecium</i> (Mainardi et al., 2008).....	22
Figure 5. Structure de la paroi des mycobactéries..	23
Figure 6. Répartition des infections aux MNT en Europe chez les patients atteints de mucoviscidose. D'après le registre de l'ECFS 2017 .....	26
Figure 7. Structure du substrat naturel des PLP (D-Ala D-Ala), d'une pénicilline, d'une céphalosporine et d'un carbapénème.....	27
Figure 8. Inhibition d'une PLP par une $\beta$ -lactamine.....	27
Figure 9. Inhibition des L,D-transpeptidases par les carbapénèmes.....	28
Figure 10. Détoxification d'une $\beta$ -lactamine par une $\beta$ -lactamase.....	31
Figure 11. Evaluation de la production de Bla <sub>Mab</sub> <i>in vitro</i> et dans le modèle macrophage (Lefebvre et al., 2017). .....	32
Figure 12. Arbre phylogénique comparant les séquences de 13 $\beta$ -lactamases de mycobactéries d'après Soroka et al., 2015. ....	33
Figure 13. Spectre d'hydrolyse des $\beta$ -lactamines par Bla <sub>Mab</sub> et BlaC. ....	33
Figure 14. Principaux inhibiteurs de $\beta$ -lactamases de première génération. ....	34
Figure 15. Schéma réactionnel de l'hydrolyse du clavulanate par une $\beta$ -lactamase .....	35
Figure 16. Principaux inhibiteurs de seconde génération .....	36
Figure 17. Schéma réactionnel de l'inhibition d'une $\beta$ -lactamase par l'avibactam .....	37
Figure 18. Principales familles d'antibiotiques utilisées contre <i>M. abscessus</i> : cibles et mécanismes de résistance.....	40
Figure 20. Le linézolide et le tédizolide, deux principaux oxazolidinones actifs contre <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. abscessus</i> . ....	44
Figure 21. Traitement typique des infections pulmonaires à <i>M. abscessus</i> chez les patients atteints de mucoviscidose recommandé par l'ECFS et l'USCFF d'après (Floto et al., 2016).....	45
Figure 22. Détermination de l'index FIC par la méthode de CMI en échiquier.....	53
Figure 23. Schéma d'intégration d'un insert dans un vecteur par la méthode NEB Gibson. ....	57
Figure 24. Schéma des différentes recombinaisons homologues réalisées lors de ce travail. ....	60
Figure 25. Représentation schématique de la méthodologie appliquée aux cultures de <i>M. abscessus</i> pour l'extraction des protéines totales. ....	61
Figure 26. Suivi de l'hydrolyse de la nitrocéfine par spectrophotométrie à 486 nm.....	61
Figure 27. Représentation des FIC de l'association imipénème-rifabutine contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S et $\Delta$ bla <sub>Mab</sub> .....	67
Figure 28. Courbes de bactéricidie de l'imipénème et la rifabutine seuls ou en association contre les souches <i>M. abscessus</i> CIP104536S et $\Delta$ bla <sub>Mab</sub> .....	68
Figure 29. Activité intracellulaire de l'imipénème et de la rifabutine seuls ou en association contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S et $\Delta$ bla <sub>Mab</sub> .....	69

Figure 30. Effet de l'avibactam à 4 µg/ml sur l'activité bactéricide de l'imipénème seul ou en association avec la rifabutine contre <i>M. abscessus</i> CIP104536.....	71
Figure 31. Effet de l'ajout de l'avibactam sur l'activité intracellulaire de la combinaison imipénème – rifabutine contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S. ....	72
Figure 32. Activité bactéricide de l'imipénème et du tédizolide seul ou en association contre <i>M. abscessus</i> CIP104536 et $\Delta bla_{Mab}$ . ....	74
Figure 33. Activité intracellulaire de l'imipénème et du tédizolide seuls ou en association contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S et $\Delta bla_{Mab}$ . ....	75
Figure 34. Effet de l'avibactam sur l'activité intracellulaire de l'imipénème et de la combinaison imipénème-tédizolide contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S. ....	77
Figure 35. Impact de l'addition de la rifabutine à la triple combinaison imipénème-tédizolide-avibactam contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S cultivés en intracellulaire. ....	78
Figure 36. Activité spécifique d'extraits bruts de protéines de culture de <i>M. abscessus</i> CIP104536S dans du milieu 7H9sB contenant de la rifabutine ou du tédizolide. ....	79
Figure 37. Cinétique de bactéricidie de l'imipénème seul ou en association avec l'avibactam ou le relebactam contre <i>M. abscessus</i> CIP104536. ....	81
Figure 38. Activité intracellulaire de l'amoxicilline seule ou en association avec l'avibactam ou le relebactam contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S. ....	82
Figure 39. Activité intracellulaire de l'imipénème seul ou en association avec l'avibactam ou le relebactam contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S. ....	83
Figure 40. Détermination des paramètres d'inhibition de $Bla_{Mab}$ par les inhibiteurs. ....	84
Figure 41. Activité spécifique $\beta$ -lactamase dans des extraits bruts de <i>M. abscessus</i> cultivée en LB supplémenté par des cations divalents aux concentrations indiquées. ....	86
Figure 42. Activité spécifique $\beta$ -lactamase dans les extraits bruts de <i>M. abscessus</i> cultivée en milieu 7H9sB supplémenté en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou en NO aux concentrations ou en LB à différents pH. ....	87
Figure 43. Activité spécifique $\beta$ -lactamase dans les extraits bruts de <i>M. abscessus</i> cultivée dans différents milieux. ....	88
Figure 44. Activité spécifique d'extraits bruts protéiques de <i>M. abscessus</i> exposés à différentes conditions de stress pendant 3 heures. ....	89
Figure 45. Opéron MAB_2874 - $bla_{Mab}$ de <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	89
Figure 46. Représentation du locus « $bla_{Mab}$ » de la souche parentale <i>M. abscessus</i> CIP104536S et de la souche <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$ . ....	90
Figure 47. Représentation du locus « $bla_{Mab}$ » de la souche parentale <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ et de la souche finale <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$ R.....	91
Figure 48. Représentation du locus « $bla_{Mab}$ » de la souche parentale <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ et de la souche finale <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$ F.....	91
Figure 49. Antibiogrammes des souches <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ , <i>M. abscessus</i> CIP104536S, <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$ , <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$ R et <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$ F sur milieu 7H10sB.....	92
Figure 50. Analyse par PCR du locus « $bla_{Mab}$ ». ....	93
Figure 51. Test d'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine à partir de bactéries entières. ....	94
Figure 52. Test d'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine à partir de bactéries entières. ....	94
Figure 53. Observation de la fluorescence de l'EGFP produite par les différentes constructions. ....	95
Figure 54. Antibiogrammes des souches <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ , <i>M. abscessus</i> CIP104536S, <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::blaC$ G <sup>132</sup> N et <i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ N <sup>132</sup> G sur milieu 7H10sB.....	97
Figure 55. Analyse par PCR du locus « $bla_{Mab}$ ». ....	97

Figure 56. CMI en $\mu\text{g/ml}$ de différentes $\beta$ -lactamines seules ou en association avec l'avibactam et le clavulanate contre les souches <i>M. abscessus</i> CIP104536S, <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}::\text{bla}_{\text{Mab}} \text{N}^{132}\text{G}$ et <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}::\text{blaC} \text{G}^{132}\text{N}$ ..	98
Figure 57. Locus contenant les gènes <i>blaI</i> et <i>blaR</i> chez <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. abscessus</i> .	105
Figure 58. Locus du gène codant pour la $\beta$ -lactamase chez <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. abscessus</i> .....	105

## Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes classes de $\beta$ -lactamases d'Amber.....	30
Tableau 2. Activité des inhibiteurs de 2 <sup>ème</sup> génération en association avec une $\beta$ -lactamine partenaire sur <i>M. abscessus</i> .....	35
Tableau 3. Composition des différents milieux de culture utilisés lors de ce travail. ....	46
Tableau 4. Liste des antibiotiques utilisés. ....	46
Tableau 5. Vecteurs utilisés au cours du travail et leur provenance. ....	49
Tableau 6. PCR réalisées au cours de ce travail. ....	50
Tableau 7. Liste des amorces utilisées dans ce travail. ....	51
Tableau 8. Récapitulatif des souches recombinantes obtenues par la technique décrite ci-dessus. ....	53
Tableau 9. Tableau récapitulatif des différentes conditions de stress appliquées aux cultures de <i>M. abscessus</i> CIP104536S. ....	57
Tableau 10. Concentration minimale inhibitrice (CMI) en $\mu\text{g/ml}$ de l'imipénème et de la rifabutine contre les souches <i>M. abscessus</i> CIP104536S et <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ .....	62
Tableau 11. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\text{g/ml}$ et de la rifabutine (RFB) à 16 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	63
Tableau 12. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\text{g/ml}$ et de la rifabutine (RFB) à 16 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ .....	64
Tableau 13. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\text{g/ml}$ et de la rifabutine (RFB) à 1, 8 ou 16 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	65
Tableau 14. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\text{g/ml}$ et de la rifabutine (RFB) à 16 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ . ....	65
Tableau 15. CMI en $\mu\text{g/ml}$ de l'imipénème seul ou en combinaison avec l'avibactam à 4 $\mu\text{g/ml}$ contre <i>M. abscessus</i> CIP104536S en milieu 7h9sB.....	66
Tableau 16. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 $\mu\text{g/ml}$ et de la rifabutine (RFB) à 16 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 4 $\mu\text{g/ml}$ contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	67
Tableau 17. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 $\mu\text{g/ml}$ et de la rifabutine (RFB) à 1 ou 8 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 $\mu\text{g/ml}$ contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	68
Tableau 18. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 $\mu\text{g/ml}$ et du tédizolide (TZD) à 2 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S. ....	70
Tableau 19. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 $\mu\text{g/ml}$ et du tédizolide (TZD) à 2 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ . ....	70
Tableau 20. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\text{g/ml}$ et de la tédizolide (TZD) à 2 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.71	71
Tableau 21. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\text{g/ml}$ et de la tédizolide (TZD) à 2 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association contre la souche <i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ .....	72
Tableau 22. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 $\mu\text{g/ml}$ et du tédizolide (TZD) à 2 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 $\mu\text{g/ml}$ contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	73



Tableau 23. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 µg/ml et du tédizolide (TZD) à 2 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml et la rifabutine (RFB) à 1 ou 8 g/ml contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	74
Tableau 24. Analyse statistique des activités spécifiques des extraits bruts de protéines à partir de culture de <i>M. abscessus</i> cultivé en présence ou absence d'antibiotique.....	75
Tableau 25. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'amoxicilline et de l'imipénème en présence de relebactam (4 µg/ml) ou d'avibactam (4 µg/ml).....	76
Tableau 26. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 4 µg/ml ou le relebactam (REL) à 4 µg/ml contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	77
Tableau 27. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'amoxicilline (AMOX) à 8, 32 ou 128 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml ou le relebactam (REL) à 16 µg/ml contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	79
Tableau 28. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml ou le relebactam (REL) à 16 µg/ml contre la souche <i>M. abscessus</i> CIP104536S.....	80
Tableau 29. CMI de l'amoxicilline et de l'imipénème seuls ou en association avec l'avibactam contre les souches recombinantes de <i>M. abscessus</i> . ....	91

## Liste des abréviations

*M. abscessus*: *Mycobacterium abscessus*  
*M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*  
MNT: mycobactérie non tuberculeuse  
MAC: *Mycobacterium avium* complex  
MCL: mycobactérie à croissance lente  
MCR: mycobactérie à croissance rapide  
SGM: slowly growing mycobacteria  
RGM: rapidly growing mycobacteria  
GPL: glycopeptidolipides  
UDP-murNAC: UDP-*N*-acétylmuramique  
GlcNac: *N*-acétylglucosamine  
m-DAP: acide diaminopimélique  
PLP: protéine de liaison à la pénicilline  
D-Ala: D-alanine  
Ldt: L,D-transpeptidase  
L-Ala: L-alanine  
D-iso-Gln: D-iso glutamine  
VEMS: volume expiratoire maximal seconde  
CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
CMI: concentration minimale inhibitrice  
CaMH: Cation adjusted Müller Hinton  
UFC: unité formant des colonies  
RT Q PCR: PCR quantitative en temps réel  
XDR-TB: Extensively Drug Resistant Tuberculosis  
DBO: diazabicyclooctane  
FDA: Food and Drug Agency  
MDR-tuberculosis: multi-resistant tuberculosis

ECFS: European cystic fibrosis society  
USCF: United States Cystic Fibrosis Foundation  
LB: Lysogeny Broth  
BHI: Brain Heart Infusion  
OADC: Oleic Acid Dextrose Catalase  
RPMI: Roswell Park memorial institute medium  
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid  
DO<sub>600</sub>: densité optique à 600 nm  
CLSI: clinical and laboratory standard institute  
FIC: fractional inhibitory concentration  
PMA: phorbol 12-myristate 13-acétate  
PBS: phosphate buffered salin  
MOI: mutiplicité d'infection  
PCR: polymerase chain reaction  
EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique  
PIPES: acide pipérazine-*N,N'*-bis(2-éthanesulfonique)  
IPM: imipénème  
RFB: rifabutine  
Atb: antibiotique  
FC: fold change  
AVI: avibactam  
TZD: tédizolide  
REL: relebactam  
AMOX: amoxicilline  
SCFM: synthetic cystic fibrosis sputum  
DETA-NO: Diethylenetriamine/nitric oxide  
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

# Introduction



# Généralités sur *Mycobacterium abscessus*

## I. Taxonomie et caractéristiques

### 1) Taxonomie

La première description d'infection à *Mycobacterium abscessus* date de 1953 chez une patiente ayant présenté une infection articulaire du genou suite à un traumatisme survenu 48 ans plus tôt (Moore and Frerichs, 1953). La souche est appelée *Mycobacterium abscessus* pour sa capacité à former des abcès.

En 1972, une taxonomie des mycobactéries a été proposée. A partir de différents tests phénotypiques comme la capacité à produire de l'acide à partir de sucre ou leur pathogénicité chez la souris, la souche décrite par Moore est devenue *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (ATCC 19977) (Kubica, 1972).

En 1992 par séquençage de génome, Kusunoki et son équipe ont proposé que *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* soit renommée *Mycobacterium abscessus* puisque les génomes de *Mycobacterium chelonae* et de *Mycobacterium abscessus* ne présentent que 31% d'identité (Kusunoki' and Ezak, 1992).

Dans les années 2000, l'espèce *M. abscessus* a été divisée en trois sous espèces. En effet par séquençage des gènes *rpoB* et *hsp65* qui est utilisé pour l'identification des souches, il a été montré que les souches dites de *M. abscessus* avaient trois génotypes différents. Il est donc maintenant couramment admis que le complexe *M. abscessus* se compose de *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *boletii* et *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Adekambi, 2006; Adekambi et al., 2004, 2017).

### 2) Mycobactéries non tuberculeuses

*M. abscessus* est une mycobactérie non tuberculeuse (MNT). Les MNT sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement, retrouvées principalement dans le sol et les réservoirs d'eau (Thomson et al., 2013). Aussi appelées mycobactéries atypiques, 178 espèces de MNT ont été identifiées et différenciées par les variations dans leur séquence d'ARN 16S (Forbes, 2017). Peu de ces espèces sont considérées comme pathogènes, les trois plus communes sont les bactéries du complexe *M. avium* (MAC), *M. kansasii* et *M. abscessus*.

Les mycobactéries sont aussi divisées en deux catégories selon leur temps de croissance (World Health Organization et World Health Organization 2014) (Runyo, 1959): les mycobactéries à croissance lente (MCL) et les mycobactéries à croissance rapide (MCR) (Figure 1). *Mycobacterium tuberculosis*, la MCL la plus pathogène, est responsable de 10 millions de nouvelles infections dans le monde (World Health Organization and World Health Organization, 2014). Les bactéries du complexe *M. avium* et *M. kansasii* sont aussi des MCL. En revanche, *M. abscessus*, *M. chelonae* et *M. fortuitum* sont les MCR les plus souvent isolées en situation pathologique chez l'homme (Brown-Elliott and Wallace, 2017).

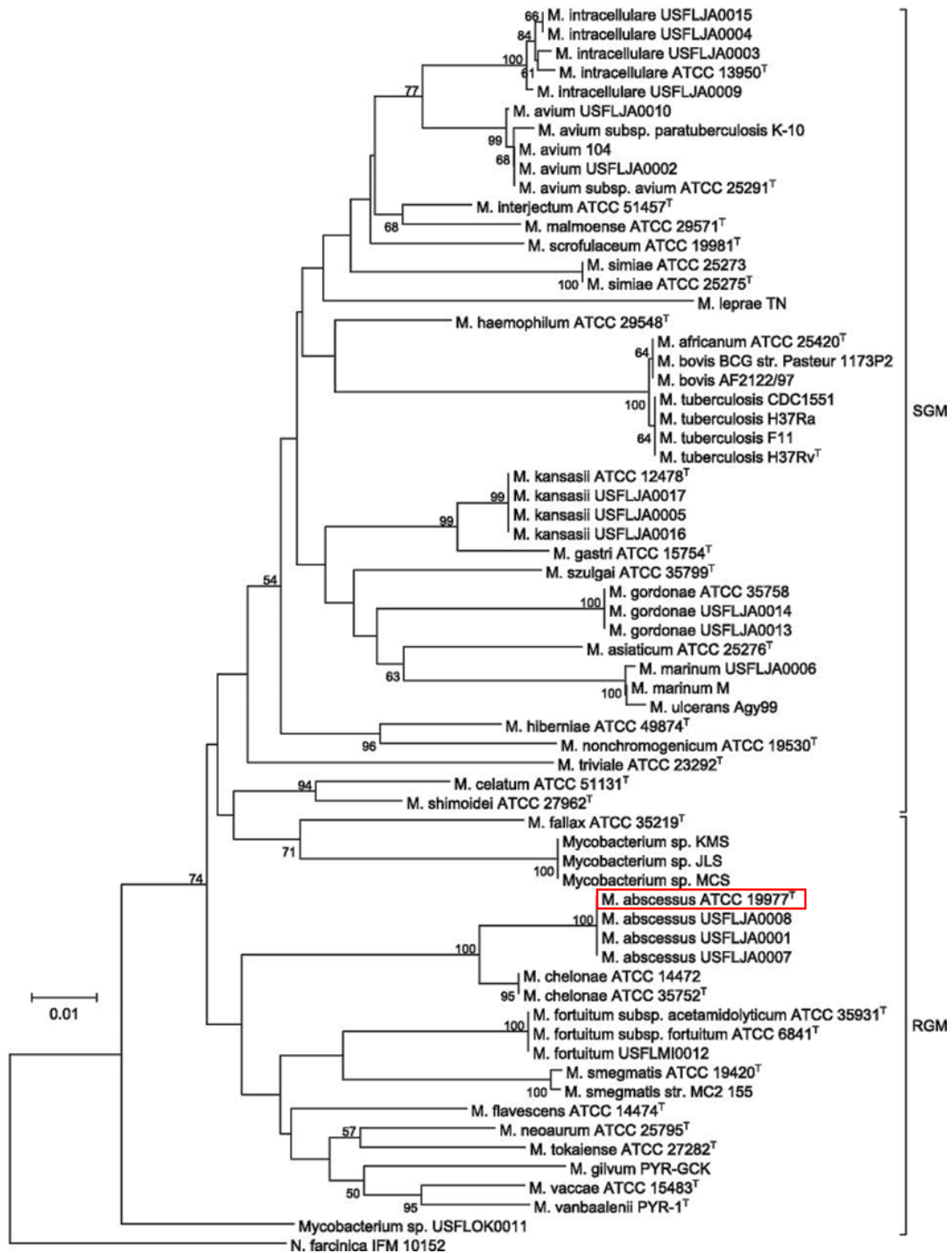


Figure 1. Arbre phylogénétique des mycobactéries (Dai et al., 2011). Les pourcentages des bootstraps sont indiqués à côté de chaque nœud. SGM (slowly growing mycobacteria) regroupe les mycobactéries à croissance lente ; RGM (Rapidly Growing Mycobacteria) regroupe les mycobactéries à croissance rapide. La souche *M. abscessus* ATCC19977, utilisée au cours de ces travaux, est encadrée en rouge.

### 3) Deux morphotypes

*M. abscessus* existe sous deux morphotypes à l'état naturel, un dit « smooth » ou S et l'autre « rough » ou R. Le morphotype S est le plus utilisé au laboratoire car les cultures croient de façon



homogène et la souche est plus facile à manipuler. Son phénotype est dû à une forte production de glycopeptidolipides (GPLs) responsable de la formation de biofilms (Williams et al., 2009). Des mutations dans le génome, notamment au niveau du gène *mmpl4b* (transporteur de GPL) et *mmpl8* (impliqué dans la biosynthèse de GPL) entraînant la perte de ces GPLs permettent le passage de la forme S à la forme R (Dubois et al., 2018; Howard, 2006; Viljoen et al., 2017). Le morphotype R a été décrit comme la forme virulente de *M. abscessus*, qui forme des cordes lorsque cultivées en milieu liquide (Sánchez-Chardi et al., 2011). Dans un modèle d'infection de poisson-zèbre, l'équipe de L. Kremer a montré que la forme S est phagocytée par les macrophages ce qui permet sa dissémination et son transport dans les tissus. Après apoptose et libération des bactéries dans la matrice extracellulaire, les bactéries peuvent basculer vers le morphotype R ce qui entraîne la formation de cordes qui ne sont plus phagocytées par les macrophages et provoquent donc l'inflammation des tissus (Bernut et al., 2014).

#### 4) Structure de la paroi de *M. abscessus*

Comme pour la très grande majorité des bactéries, un peptidoglycane est présent dans la paroi des mycobactéries.

##### a. Les étapes de synthèse du peptidoglycane :

La synthèse du peptidoglycane est complexe et consiste en 3 grandes étapes, d'abord cytoplasmique puis membranaire et extra-membranaire (Figure 2). Dans le cytoplasme, une suite de réactions catalysées par les Mur ligases aboutit à la formation d'UDP-*N*-acétylmuramique(murNAc)-pentapeptide (Munshi et al., 2013). Ce pentapeptide est lié sur un précurseur lipidique (C<sub>50</sub>-decaprenyl phosphate) pour former le lipide I. L'ajout du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le lipide I forme le lipide II. Le lipide II est ainsi l'unité de base du peptidoglycane. Cette molécule est ensuite transloquée dans l'espace périplasmique par la flippase MurJ ou FtsW (Mengin-Lecreulx et al., 1991).

A l'étape extra-membranaire afin de rattacher la molécule nouvellement formée au peptidoglycane préexistant, plusieurs réactions ont lieu médiées par différentes familles d'enzymes. Des glycosyltransférases lient le GlcNAc du lipide II au MurNAc de la chaîne glycane voisine (Figure 2) aboutissant à l'élongation des chaînes glycanes. Les chaînes peptidiques sont reliées entre elles par des transpeptidases. Chez les mycobactéries, il existe deux familles de transpeptidases : les D,D-transpeptidases et les L,D-transpeptidases (Figure 2).

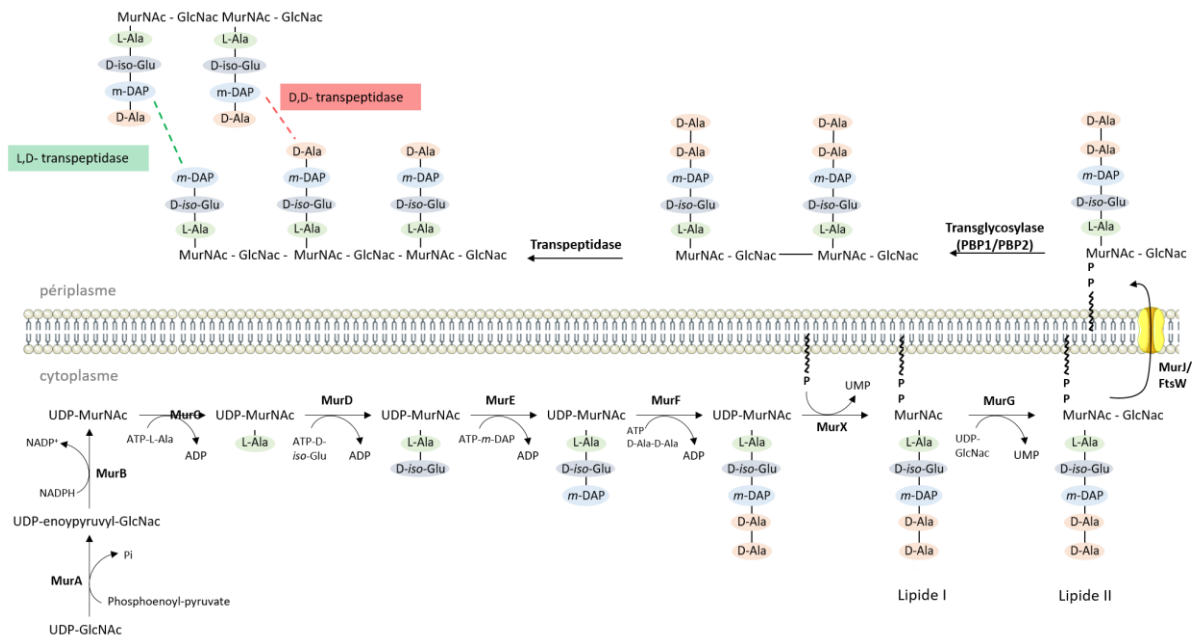


Figure 2. Voie de synthèse du peptidoglycane de *M. tuberculosis*.

#### b. Les D,D-transpeptidases :

Les D,D-transpeptidases sont des enzymes à sérine active qui catalysent les liaisons 4→3 entre le résidu D-Alanine du donneur et le m-DAP en position 3 de la chaîne précédente (accepteur) (Figure 3). Appelées aussi Protéines de Liaison à la Pénicilline (PLP), elles sont les principales cibles des β-lactamines qui se lient d'une manière covalente à la sérine du site actif des PLP. Le cycle β-lactame est un analogue de l'extrémité C-terminale D-Ala-D-Ala du pentapeptide substrat des D,D-transpeptidases (cf infra). Les PLP sont divisées en 3 classes (classe A, B et C). Les PLP de classe A sont constituées de deux domaines, un domaine N-terminal glycosyltransférase qui catalyse la liaison entre le GlucNAc et le MurNAc de la chaîne glycane voisine et un domaine C-terminal transpeptidase formant les ponts interpeptidiques entre les chaînes du peptidoglycane. Les PLP de classe B possèdent aussi deux domaines, le domaine N-terminal qui ne confère aucune activité catalytique connue, et le domaine C-terminal qui est un domaine transpeptidase. Enfin, les PLP de classe C sont des D,D-carboxypeptidases qui clivent la liaison entre le D-Ala 4 et le D-Ala 5 de la chaîne pentapeptidique sans formation de liaison interpeptidique. Ceci conduit à la formation de tétrapeptides.

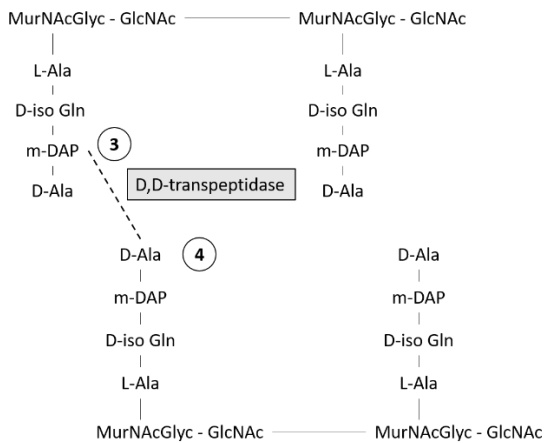


Figure 3. Réaction de D,D-transpeptidation chez *M. abscessus*.

c. L,D-transpeptidase :

L'existence de ces enzymes a été mise en évidence au laboratoire initialement chez *Enterococcus faecium* (Mainardi et al., 2000). Après cinq étapes de sélections sur ampicilline, le mutant obtenu avait une CMI de l'ampicilline supérieure à 2 mg/ml. Par l'analyse du peptidoglycane, l'équipe a montré que la majorité des liaisons inter-peptidiques étaient des ponts de type 3→3, catalysées par une nouvelle famille d'enzymes, les L,D-transpeptidases, ( $Ldt_{fm}$ ) chez *E. faecium* (Mainardi et al., 2000).

Sous pression de sélection par les  $\beta$ -lactamines, une D,D-carboxypeptidase hydrolyse la liaison entre le D-Ala<sub>4</sub> et le D-Ala<sub>5</sub> de l'UDP-MurNAc-pentapeptide (Figure 4). Ceci conduit à la formation de térapeptide. Ces térapeptides servent alors de substrat aux L,D-transpeptidases lors de la dernière étape de synthèse du peptidoglycane. En effet, la L,D-transpeptidase  $Ldt_{fm}$  clive la liaison entre la L-Lysine et le D-Ala du donneur, pour ensuite lier la L-Lysine en position 3 avec la chaîne latérale de l'accepteur aboutissant à la formation de ponts de type 3→3 (Figure 4) (Mainardi et al., 2002)

Chez *M. abscessus*, les chaînes pentapeptidiques sont constituées de L-alanine (L-Ala), D-iso glutamine (D-iso-Glm), d'un acide diaminopimélique (DAP), et de deux résidus D-alanine (D-Ala)

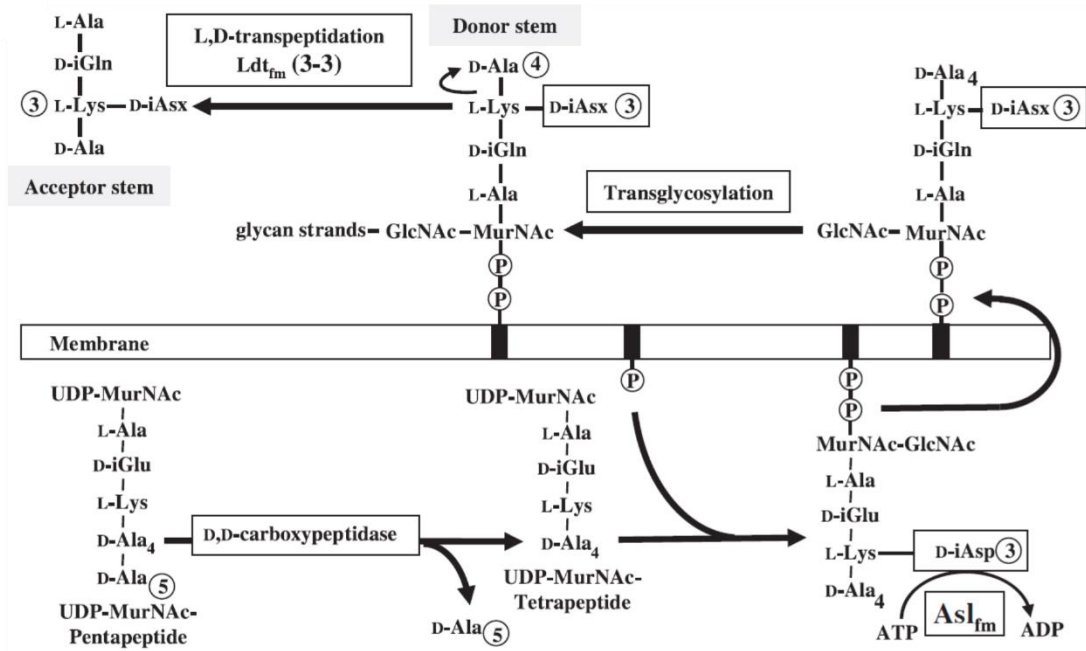


Figure 4. Voie de synthèse du peptidoglycane médiée par les L,D-transpeptidases chez *Enterococcus faecium*. Après conversion du pentapeptide en tétrapeptide dans le cytoplasme, les L,D-transpeptidases catalysent la liaison entre la L-Lysine 3 du donneur et la chaîne latérale de l'accepteur (Mainardi et al., 2008).

#### d. Contribution des D,D et L,D-transpeptidases chez *M. abscessus*

Le laboratoire d'accueil a montré que chez *M. tuberculosis*, la majorité des ponts sont des ponts de type 3→3 (Gupta et al., 2010; Lavollay et al., 2008). Chez *M. tuberculosis*, il existe cinq L,D-transpeptidases permettant la formation de 80% des ponts interpeptidiques du peptidoglycane ; les 20% restant étant formés par les PLP. Les L,D-transpeptidases sont inhibées par les carbapénèmes tels que l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème (Cf infra). Comme chez *M. tuberculosis*, les L,D-transpeptidases sont responsables de la formation de 75% des ponts interpeptidiques chez *M. abscessus*. (Lavollay et al., 2011). Dans le génome de *M. abscessus*, on compte cinq orthologues des L,D-transpeptidases de *M. tuberculosis* (Lavollay et al., 2011).

#### e. Comparaison entre D,D et L,D-transpeptidases

Malgré leur rôle proche dans la synthèse du peptidoglycane, les L,D-transpeptidases et les D,D-transpeptidases ne sont pas apparentées. Les Ldts sont des enzymes à cystéine-active (Biarrotte-Sorin et al., 2006) qui ont comme substrats donneurs des tétrapeptides formés par des enzymes ayant une activité D,D-carboxypeptidase (Mainardi et al., 2002). Les D,D-transpeptidases, elles, ont comme substrats donneurs un pentapeptide et la réaction a lieu grâce à une sérine dans leur site actif (Goffin and Ghuyssen, 2002). Les études structurales ont montré que les D,D-transpeptidases et les L,D-transpeptidases ne sont pas apparentées (Biarrotte-Sorin et al., 2006). Enfin, les D,D-transpeptidases,

qui sont des PLP, sont inhibées par une grande majorité de  $\beta$ -lactamines (Zapun et al., 2008) alors que les Ldts ne sont inhibées efficacement que par une seule classe de  $\beta$ -lactamines, les carbapénèmes (Mainardi et al., 2007).

#### f. Particularité des mycobactéries : acides mycoliques et arabinogalactane

La paroi des mycobactéries se différencie par la présence d'acides mycoliques liés à des chaînes arabinogalactanes elles-mêmes liées directement au peptidoglycane. L'arabinogalactane est constitué d'une chaîne d'une trentaine de galactofuranoses, sur laquelle sont ramifiées des chaînes d'arabinofuranose (Jankute et al., 2015). Sur ces dernières peuvent être greffés des acides mycoliques (Figure 5). Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de ces composés ont été identifiées comme cibles intéressantes dans le développement d'antibiotiques, notamment les antituberculeux, par exemple l'éthambutol (Belanger et al., 1996).

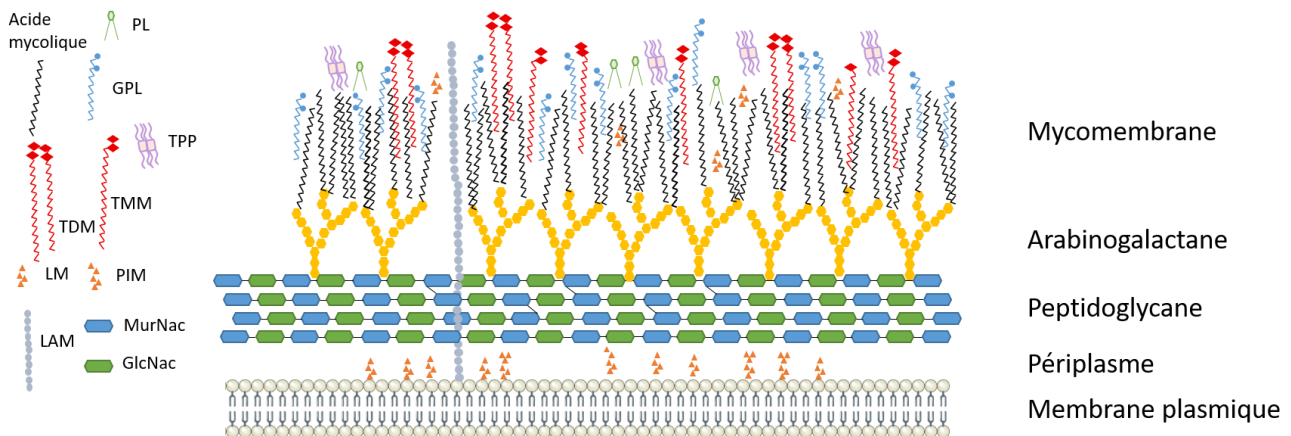


Figure 5. Structure de la paroi des mycobactéries. Attaché à la membrane plasmique se trouve les LM, PIM et LAM. Le peptidoglycane est constitué d'un assemblage de MurNac et GlcNac sur lequel est fixé l'arabinogalactane. Les acides mycoliques formant la mycomembrane sont greffés directement sur l'arabinogalactane. Enfin, des acyl-lipides sont insérés dans la mycomembrane. PL, phospholipide ; GPL, glycopeptidolipide ; TPP, tréhalose polyphléate ; TMM, tréhalose monomycolate ; TDM, tréhalose dimycolate ; LM, lipomannane ; PIM, phosphatidyl-myo-inositol mannoside ; LAM, lipoarabinomannane ; GlcNac, N-acétylglucosamine ; MurNac, N-acétylmuramique.

## II. Épidémiologie

### 1) Les infections respiratoires

*M. abscessus* est responsable d'infections respiratoires en majorité chez des patients atteints de pathologies pulmonaires chroniques (bronchiectasie, dilatation des bronches et mucoviscidose) (Griffith et al., 1993). Ces infections sont accompagnées d'une altération des fonctions respiratoires,

observée par une diminution du volume expiratoire maximal seconde (VEMS) (Kim et al 2017) (Park et al. 2016).

En Corée, la proportion de patients atteints d'infections aux MNT est en constante augmentation et a plus que doublé en 6 ans : de 23.9% en 2009 à 48.2% en 2015 et 93% de ces infections sont pulmonaires (Kim et al., 2017). Parmi les espèces identifiées, *M. abscessus* représente 8.4% des infections pulmonaires dues aux MNT. Une hypothèse expliquant la forte incidence des MNT en Corée du Sud serait que la tuberculose a touché beaucoup de personne dans ce pays. Les lésions causées par le passé tuberculeux des patients seraient propices à l'installation et la prolifération des MNT (Simons, 2011).

## 2) Autres infections

*M. abscessus* peut aussi être responsable d'infections diverses comme des infections osseuses ou cutanées (Chiu et al., 2017; Kishida et al., 2017). En effet, *M. abscessus* a été décrit comme responsable d'infections de piercings ou de tatouages (Falsey et al., 2013; Griffin et al., 2019; Sousa et al., 2015). Des cas d'infections à *M. abscessus* ont également été décrits lors de chirurgie esthétique (mammoplastie, liposuccion) ou au niveau de cathéters et autres dispositifs médicaux intrusif (Eustace et al., 2016; Levy et al., 2016; Wang and Pancholi, 2014).

## 3) Cas particulier : les patients atteints de mucoviscidose

### a. La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomale récessive. Une mutation dans le gène codant pour le canal chlorique CFTR est responsable de la perte de fonction de cette protéine (Riordan et al, 1989). Le déséquilibre ionique qui en résulte entraîne un épaissement et un changement du mucus dans différents organes et en particulier dans les poumons et le système digestif. Au niveau respiratoire, le mucus s'accumule créant une altération de la fonction muco-ciliaire entraînant des difficultés respiratoires chez les patients. La mucoviscidose touche aujourd'hui plus de 70 000 personnes dans le monde.

### b. Physiopathologie des infections

La déficience en CFTR a plusieurs conséquences sur l'établissement d'infection. L'accumulation du mucus dans le poumon due à son épaissement entraîne une stagnation permettant la formation de biofilm dans les bronches ce qui augmente le risque d'infection pulmonaire chronique. De plus, la quantité de médiateurs inflammatoires et de cellules du système immunitaire est plus importante

chez les patients atteints de mucoviscidose : la présence de molécules pro-inflammatoires et l'absence de cytokines anti-inflammatoires est accompagnée de la prolifération de l'infection bactérienne (Roesch et al., 2018).

Enfin, il a été montré que le canal CFTR est impliqué dans le processus d'élimination des bactéries phagocytées par les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (Di et al., 2006; Zhou et al., 2013). Après reconnaissance de la bactérie par la cellule, la bactérie est internalisée par la formation d'un phagosome. Ce phagosome va ensuite fusionner avec un lysosome mature contenant des enzymes protéolytiques, des ions et des enzymes permettant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La fusion des vésicules entraîne la formation du phagolysosome dans lequel va être tuée la bactérie internalisée (Vieira et al., 2002). A la membrane de cette vésicule est retrouvé la NADPH oxydase qui produit de l' $O_2^-$ . L'ATPase de type V est la pompe responsable principalement de l'entrée de proton dans le lumen, entraînant une forte acidification du pH du phagolysosome. Ce pH est d'environ 4,5 et est optimal pour le bon fonctionnement des protéases libérées dans le lumen lors de la fusion des deux vésicules. Ces enzymes vont aller dégrader le pathogène. Le canal CFTR est nécessaire à l'acidification du phagolysosome en permettant l'entrée d'ions chlorure, cette entrée est concertée avec l'influx de proton par l'ATPase de type V (Sun-Wada et al., 2009)

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'entrée d'ions chlorure est fortement diminuée, voire nulle, ce qui empêche l'acidification du lumen. Le pH d'un phagolysosome *cftr*<sup>-/-</sup> est de 6. Les enzymes protéolytiques ne fonctionnent donc plus de manière optimale et le pathogène est éliminé plus difficilement (Di et al., 2006).

### c. Mucoviscidose et infection aux MNTs

Aux Etats-Unis, 30 000 patients sont atteints de cette maladie, et les MNTs sont responsables de 6.4% des infections détectées. Parmi les MNTs, *M. abscessus* représente 42% de ces infections. Ce pourcentage est en constante augmentation depuis une dizaine d'années (2016).

En Europe, le nombre de cas d'infections par les MNTs chez les patients atteints de mucoviscidose varie beaucoup selon les pays. De 0.6% en Turquie à 8.3% au Luxembourg (2017).

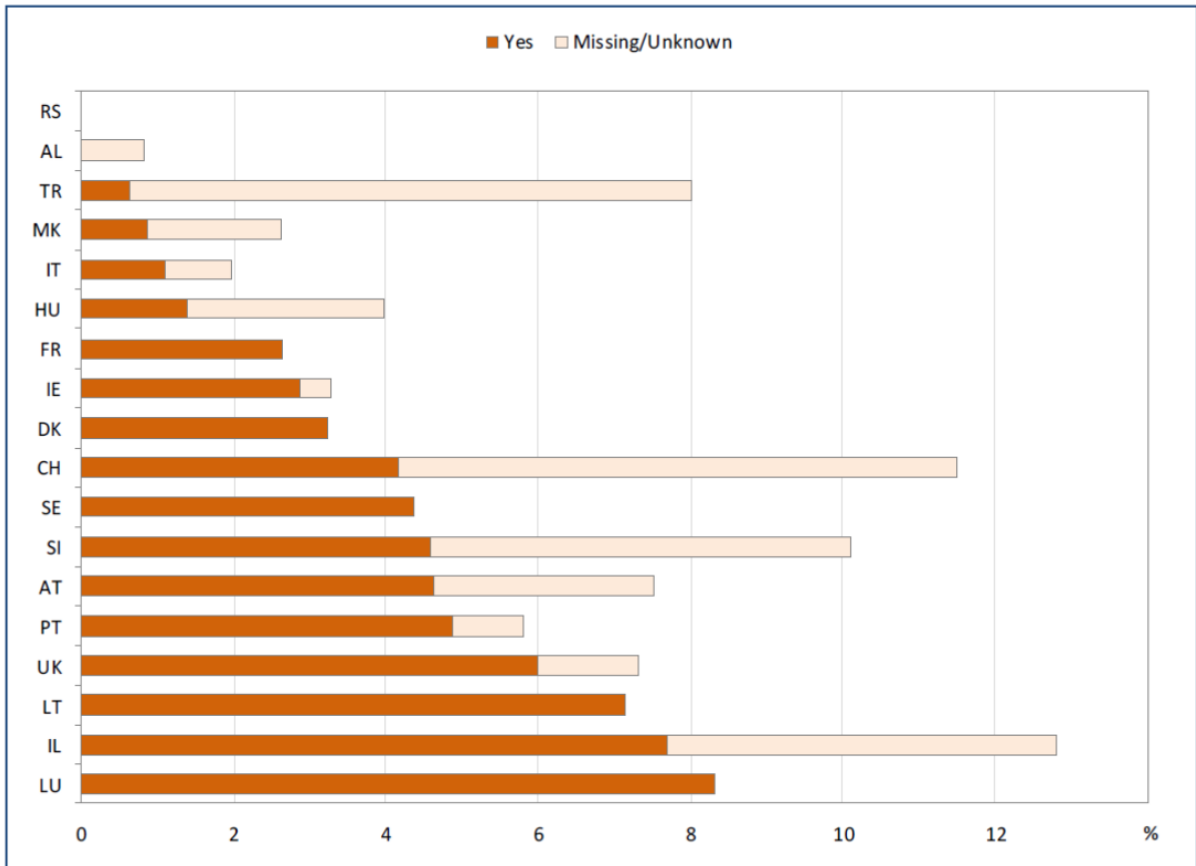


Figure 6. Répartition des infections aux MNT en Europe chez les patients atteints de mucoviscidose. D'après le registre de l'ECFS 2017. Pourcentage par pays en orange foncé.

En France, à partir des données récentes du registre de Vaincre la Mucoviscidose, les MNTs sont responsable de 2.6 % des infections pulmonaires chez les patients (registre patient Vaincre la Mucoviscidose 2017). Ces infections sont très difficiles à traiter et sont accompagnées d'une diminution des capacités pulmonaires des patients (Qvist et al., 2016).



# Les $\beta$ -lactamines

## I. Généralités

Les  $\beta$ -lactamines sont une large classe d'antibiotiques regroupant les céphalosporines, les pénicillines, les carbapénèmes et les monobactames. Depuis la découverte de la pénicilline par Fleming en 1940, les différentes familles ont été développées en modifiant l'environnement du noyau  $\beta$ -lactame qui les caractérise (Figure 7) (Zapun et al., 2008).

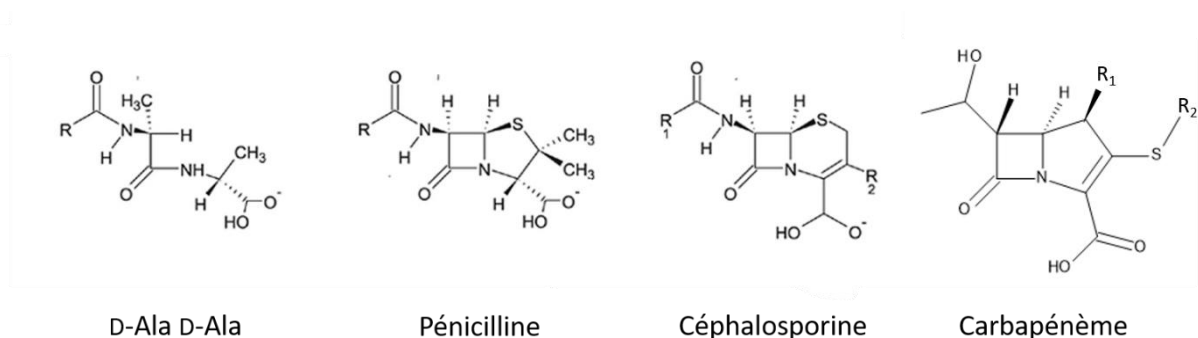


Figure 7. Structure du substrat naturel des PLP (D-Ala D-Ala), d'une pénicilline, d'une céphalosporine et d'un carbapénème. Les similarités de structures de ces trois molécules permettent aux  $\beta$ -lactamines de réagir avec les D,D-transpeptidases et de les inhiber.

## II. Mécanisme d'action

Les  $\beta$ -lactamines se lient aux D,D-transpeptidases (PLP), enzymes essentielles à la synthèse du peptidoglycane. Le cycle  $\beta$ -lactame mime stériquement l'encombrement d'un D-Ala D-Ala du pentapeptide utilisé pour la synthèse du peptidoglycane. Les PLP se retrouvent alors acylées et ne peuvent plus synthétiser le peptidoglycane. Les  $\beta$ -lactamines réagissent de manière covalente avec la sérine active des PLP (Figure 8).

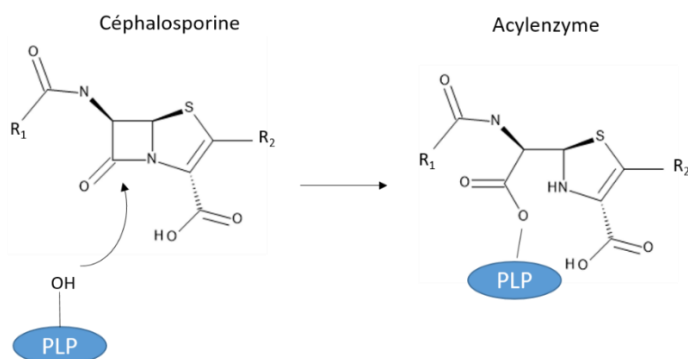


Figure 8. Inhibition d'une PLP par une  $\beta$ -lactamine (ici une céphalosporine). La sérine active de la PLP réagit avec le cycle  $\beta$ -lactame de l'antibiotique entraînant l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame et conduisant à la formation d'une acylzyme inactive.

En ce qui concerne les L,D-transpeptidases (Ldts), il a été montré par le laboratoire d'accueil que les  $\beta$ -lactamines appartenant aux carbapénèmes sont capable d'inhiber les L,D-transpeptidases de *Enterococcus faecium* par formation d'un acylenzyme stable entre la cystéine catalytique de la Ldt et les carbapénèmes (Mainardi et al., 2007; Triboulet et al., 2013). Un même mécanisme d'inhibition a été montré pour les Ldts de *M. tuberculosis* (Cordillot et al., 2013; Dubée et al., 2012; Lavollay et al., 2008) et de *M. abscessus* (résultats non publiés) (Figure 8).

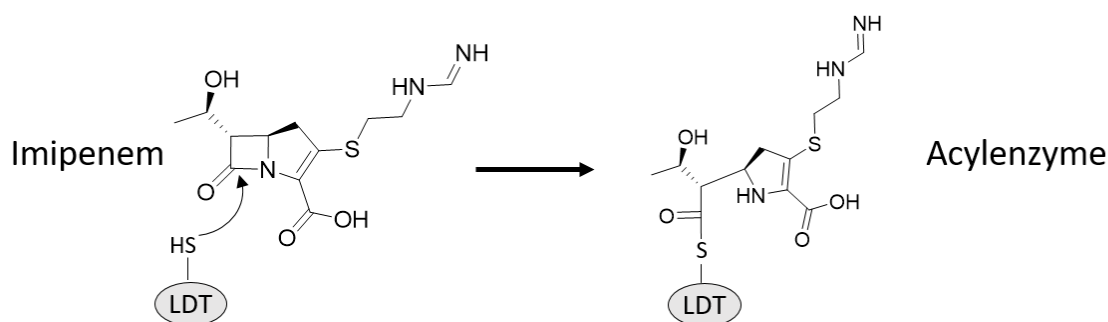


Figure 9. Inhibition des L,D-transpeptidases par les carbapénèmes (ici imipénème). L'attaque du cycle  $\beta$ -lactame par la cystéine active de la Ldt entraîne la formation d'un complexe covalent.

Deux Ldts de *M. abscessus* (Ldt<sub>Mab1</sub> et Ldt<sub>Mab2</sub>) ont été étudiées par Kumar *et al.*, (Kumar et al., 2017). Ldt<sub>Mab1</sub> n'est pas inhibée ni par le méropénème ni par l'imipénème contrairement à Ldt<sub>Mt1</sub> de *M. tuberculosis*. Ldt<sub>Mab2</sub>, qui partage 80% d'identité de séquence en acides aminés avec Ldt<sub>Mt2</sub> de *M. tuberculosis*, est inactivée par les carbapénèmes tel que le doripénème, l'ertapénème, le biapénème, le faropénème, le tébipénème et le méropénème mais pas par l'imipénème (Kumar et al., 2017).

### III. Activité sur *M. abscessus*

*M. abscessus* est naturellement résistant aux  $\beta$ -lactamines par la production d'une  $\beta$ -lactamase à large spectre, Bla<sub>Mab</sub>, hydrolysant la plupart des  $\beta$ -lactamines (cf infra). Seuls l'imipénème et la céfoxitine sont actifs (Dubée et al., 2015; Lavollay et al., 2014; Lefebvre et al., 2016; Soroka et al., 2016).

#### 1) *In vitro*

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'imipénème contre *M. abscessus* est de 16  $\mu\text{g/ml}$ , celle de la céfoxitine de 32  $\mu\text{g/ml}$  lorsque déterminer en milieu CaMH (Cation adjusted Mueller Hinton) (Lavollay et al., 2014). En revanche, ces deux  $\beta$ -lactamines ne présentent pas d'activité bactéricide (Lefebvre et al., 2016), même testés à des concentrations très élevées (6 fois la CMI de la céfoxitine, (Ferro et al., 2015).

## 2) Modèle macrophage

L'activité de l'imipénème a été étudiée dans différents modèles d'infections : dans un modèle de macrophages infectés, l'imipénème permet une diminution de la croissance intracellulaire (avec un fold change de 4,5 vs 100 sans traitement) contre *M. abscessus* à des doses proches de la CMI (Lefebvre et al., 2016, 2017). En combinaison avec l'amikacine, l'imipénème permet d'arrêter la croissance des bactéries intracellulaires ; ainsi les macrophages traités par cette combinaison contiennent 33 fois moins de bactéries que les macrophages non traités (Lefebvre et al., 2016). La céfoxitine a un effet plus limité sur la population intracellulaire. En effet, après deux jours de traitement, la population intracellulaire est seulement 2,5 fois plus faible que dans les macrophages non traités (Lefebvre et al., 2016).

## 3) In vivo

Dans le modèle du poisson zèbre, pour des doses intermédiaires ou élevées d'imipénème (5 ou 26 fois la CMI), une diminution de la charge bactérienne a pu être observée, ainsi qu'une augmentation du taux de survie des poissons infectés (Bernut et al., 2014). Pour les modèles murins, les infections chroniques à *M. abscessus* ne se développent pas dans le modèle de souris BALB/c couramment utilisées pour l'étude d'infections. En effet, lors de l'infection de l'animal par nébulisation, les bactéries se développent dans les poumons mais sont éliminées 27 jours après l'infection (Bernut et al., 2014). En revanche, dans le modèle murin C3HeB/FeJ les infections pulmonaires à *M. tuberculosis* et à *M. abscessus* se développent de façon chronique (Driver et al., 2012; Story-Roller et al., 2019). L'imipénème permet une diminution du nombre d'unités formant des colonies (UFC) de *M. abscessus* supérieure à 5 log<sub>10</sub> dans les poumons lorsqu'administré à 200 mg/kg (Story-Roller et al., 2019).

Dans une autre étude utilisant un autre modèle de souris infectées par *M. abscessus*, la céfoxitine présentait une activité importante permettant la diminution de la charge bactérienne dans les poumons et la rate après 3 mois de traitements (Lerat et al., 2014).

# Les $\beta$ -lactamases

L'un des mécanismes majeurs de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les mycobactéries est la production de  $\beta$ -lactamase(s) hydrolysant les  $\beta$ -lactamines. Ces enzymes hydrolysent les  $\beta$ -lactamines en ouvrant le cycle  $\beta$ -lactame et libère donc une  $\beta$ -lactamine dite « détoxifiée » qui ne peut plus inhiber les PLP.

## I. Les classes d'Ambller

Ambller a défini un classement des  $\beta$ -lactamases selon leur séquence en acides aminés. (Tableau 1).

Classe d'Ambller	Nature de l'acide aminé catalytique	Exemple
A	Sérine active	Bla <sub>Mab</sub> ; BlaC ; CTXM ; KPC
B	Métallo-enzyme	NDM-1
C	Sérine active	AmpC
D	Sérine active	OXA

*Tableau 1. Les différentes classes de  $\beta$ -lactamases d'Ambller. Les  $\beta$ -lactamases de classe A, C et D possèdent une sérine dans leur site actif, responsable de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines. Les  $\beta$ -lactamases de classe B agissent en présence d'un co-enzyme métallique.*

## II. Mode d'action

Les  $\beta$ -lactamases de classe A, C et D ont toutes dans leur site actif une sérine responsable de leur activité hydrolytique. En effet, le groupement hydroxyle (OH) de la sérine attaque le cycle  $\beta$ -lactame de l'antibiotique formant un acyl-enzyme ; l'attaque d'une molécule d'eau permet la libération de l'enzyme (Figure 10). La présence d'un co-enzyme métallique est nécessaire à l'activité des  $\beta$ -lactamases de classe B.

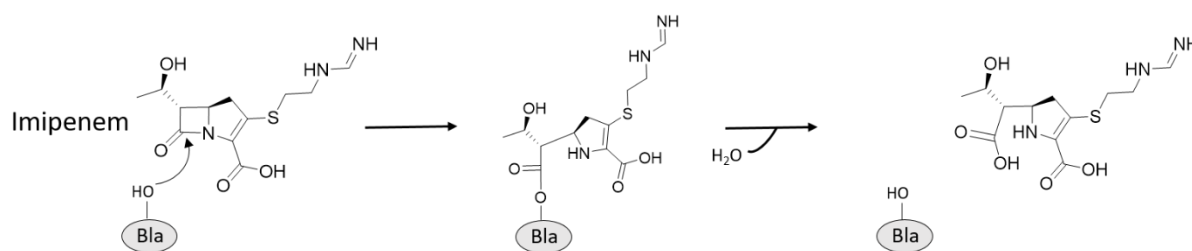


Figure 10. Détoxification d'une  $\beta$ -lactamine par une  $\beta$ -lactamase. La  $\beta$ -lactamase Bla attaque le cycle  $\beta$ -lactame de l'imipénème, après formation d'une acyloenzyme, l'hydrolyse de la liaison permet la libération de l'enzyme et de la  $\beta$ -lactamine dite détoxifiée.

### III. Les $\beta$ -lactamases des mycobactéries

#### 1) La $\beta$ -lactamase BlaC de *Mycobacterium tuberculosis*.

*M. tuberculosis* est résistant à la majorité des  $\beta$ -lactamines par la production d'une  $\beta$ -lactamase de classe A à large spectre, BlaC. Cette protéine, codée par le gène *blaC* (R2068c) dans *M. tuberculosis* H37Rv, est constituée de 307 résidus.

La régulation de la production de BlaC est bien décrite (Filée et al., 2002; Sala et al., 2009). En absence de stress, la bactérie produit BlaI, qui se fixe sur le promoteur de *blaC*. Lors d'un traitement par une  $\beta$ -lactamine, les enzymes de synthèse du peptidoglycane sont inhibées par l'antibiotique. Il y a alors un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des chaînes glycanes, ce qui résulte en une accumulation de fragments de peptidoglycane. Cette accumulation déclenche le recrutement de BlaI qui libère alors le promoteur de *blaC* et permet ainsi la production de la  $\beta$ -lactamase. Cette enzyme va hydrolyser les  $\beta$ -lactamines permettant la reprise de la synthèse du peptidoglycane. Lorsque l'équilibre est rétabli, le répresseur BlaI va à nouveau se fixer sur le promoteur de *blaC* entraînant un arrêt de la production de BlaC.

#### 2) La $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> de *M. abscessus*

*M. abscessus* produit une  $\beta$ -lactamase de classe A à large spectre d'hydrolyse, la protéine Bla<sub>Mab</sub>. Cette enzyme codée par *bla<sub>Mab</sub>* (MAB\_2875 ; 64% d'identité avec *blaC* de *M. tuberculosis*) de *M. abscessus* CIP104536 contient 289 acides aminés, cette protéine présente 47% d'identité avec BlaC. Le mode de régulation de cette  $\beta$ -lactamase n'est pas connu, mais il a été montré récemment au laboratoire en coopération avec l'équipe du Pr Herrmann que dans le modèle de macrophages infectés, Bla<sub>Mab</sub> est surproduite dans les bactéries intracellulaire par rapport à une culture en croissance planctonique (Lefebvre et al., 2017). Par RT Q PCR, la proportion relative d'ARNm codant pour Bla<sub>Mab</sub> par rapport à *sigA* (utilisé comme référence) a été déterminée après 24, 48, 72 ou

96 h de culture intra-macrophagique ou après 48 h de culture planctonique. Le rapport de la proportion relative proportion relative d'ARNm codant pour  $Bla_{Mab}$  en macrophage par rapport à la proportion relative d'ARNm codant pour  $Bla_{Mab}$  en planctonique est représenté sur la figure 11a. Dès 24 h, la proportion relative dans les bactéries intracellulaires est 25 fois plus élevée que dans les bactéries planctoniques. Ce ratio est maintenu dans le temps jusque 96 h. En parallèle, la quantité de  $Bla_{Mab}$  a été évaluée par western blot (Figure 11b). La bande de détection est beaucoup plus intense à 48 h pour les extraits protéiques de *M. abscessus* cultivés dans les macrophages que pour les extraits provenant de cultures planctoniques. Il y a donc une augmentation de l'expression de *bla<sub>Mab</sub>* au niveau transcriptionnel et traductionnel.

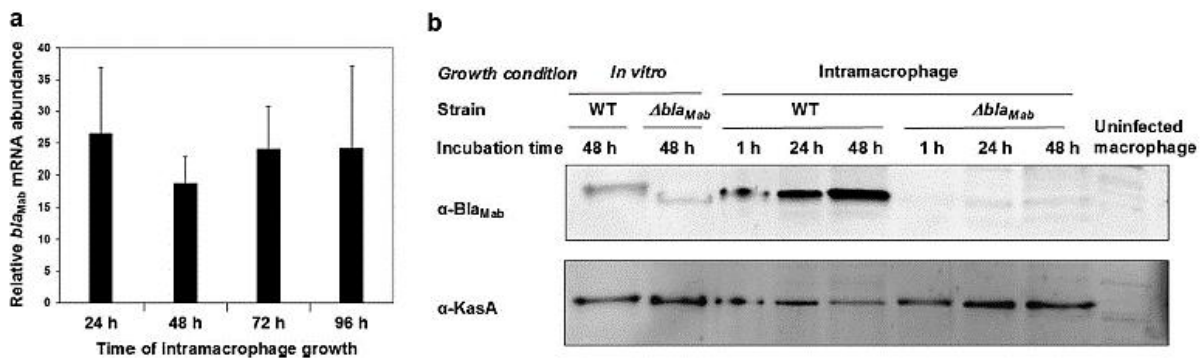


Figure 11. Evaluation de la production de  $Bla_{Mab}$  in vitro et dans le modèle macrophage. a) quantification de l'ARNm *bla<sub>Mab</sub>* par RT Q PCR. b) détection de  $Bla_{Mab}$  par western blot. D'après (Lefebvre et al., 2017).

### 3) Autres $\beta$ -lactamases des mycobactéries

Toutes les mycobactéries possèdent un gène codant pour une  $\beta$ -lactamase de classe A. Les  $\beta$ -lactamases présentent 3 motifs conservés entre les espèces : le motif SXXK, le motif SDN/G et le motif KTG. Le motif SXXK correspond au site actif de l'enzyme. Les  $\beta$ -lactamases des mycobactéries à croissance lente comme *M. tuberculosis* portent toutes le motif SDG<sup>132</sup> alors que les mycobactéries à croissance rapide portent un motif SDN<sup>132</sup> (Soroka et al., 2015, 2016) (Figure 12).

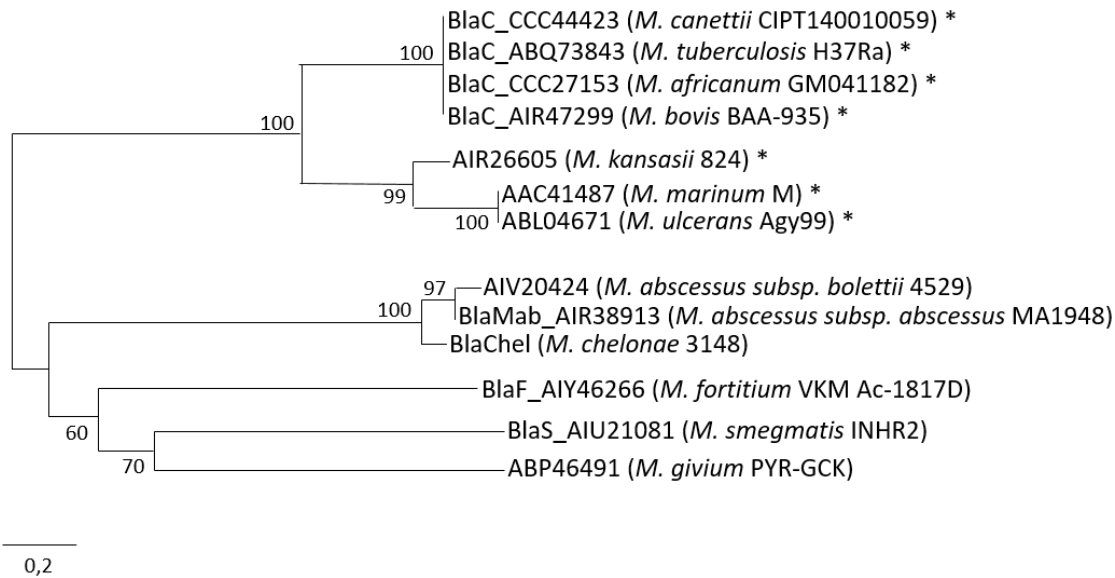


Figure 12. Arbre phylogénique comparant les séquences de 13  $\beta$ -lactamases de mycobactéries d'après Soroka et al., 2015. Celles suivies d'un astérisque porte le motif SDG, les autres le motif SDN.

#### 4) Comparaison de l'efficacité d'hydrolyse de Bla<sub>Mab</sub> et BlaC

Bla<sub>Mab</sub>, comme BlaC, est capable d'hydrolyser la majorité des pénames, la plupart des céphèmes à l'exception de la céfoxitine (Soroka et al., 2014). Bla<sub>Mab</sub> et BlaC hydrolysent également les carbapénèmes, comme l'imipénème mais à avec une efficacité moindre comparativement aux pénames, en particulier pour BlaC (Figure 13).

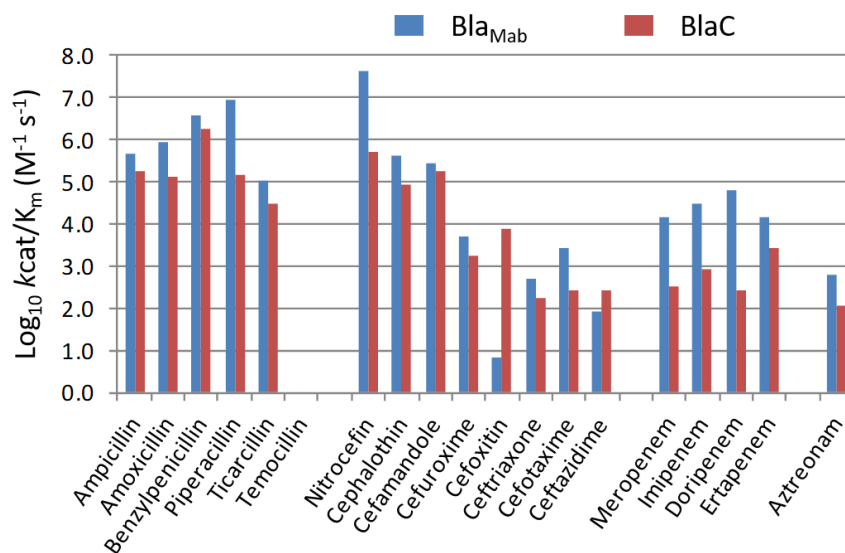


Figure 13. Spectre d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines par Bla<sub>Mab</sub> (en bleu) et BlaC (en rouge). Le  $\log_{10} kcat/K_m$  reflète l'efficacité catalytique de l'enzyme.

## Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

### I. Inhibiteurs de 1<sup>ère</sup> génération

Les inhibiteurs de première génération sont dérivés des pénicillines. Ils se caractérisent par leur noyau  $\beta$ -lactame qui leur confère une similitude avec les  $\beta$ -lactamines et permet donc leur reconnaissance par les  $\beta$ -lactamases.

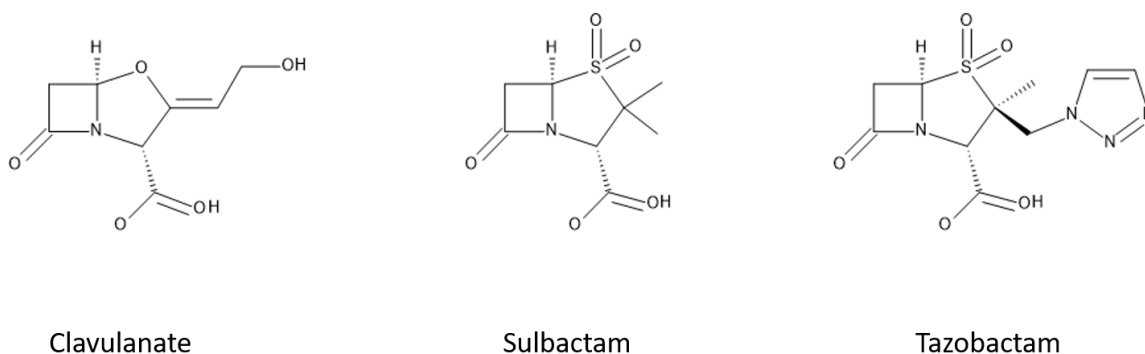


Figure 14. Principaux inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases de première génération. Leur noyau  $\beta$ -lactame leur permet de réagir avec la Serine active des  $\beta$ -lactamases entraînant leur inactivation.

#### 1) Le clavulanate

##### a. Généralités

L'acide clavulanique a été isolé de *Streptomyces clavuligerus* dans les années 70 et a montré une activité inhibitrice importante sur différentes  $\beta$ -lactamases de classe A. Elles ne sont pas actives sur les  $\beta$ -lactamase de classe B et de classe C

##### b. Activités sur les mycobactéries

Le clavulanate est capable d'inhiber BlaC, la  $\beta$ -lactamase de *M. tuberculosis*. C'est un inhibiteur suicide qui forme un acyl-enzyme stable avec BlaC et permet l'activité des  $\beta$ -lactamines lorsqu'administré en association. L'association amoxicilline-clavulanate a été développée et est maintenant proposé en clinique dans le traitement des tuberculoses dues à des souches extra-résistantes de *M. tuberculosis*(XDR-TB) (World Health Organization and World Health Organization, 2014). En effet, il a été montré que le clavulanate diminue la CMI du méropénème sur des souches XDR-TB (Hugonnet et al., 2009). L'équipe a aussi décrit la combinaison ceftaroline-clavulanate comme efficace contre *M. tuberculosis in vitro* ; l'ajout du clavulanate permettant d'obtenir une CMI de 32 au lieu de 256  $\mu\text{g/ml}$  pour la ceftaroline seule (Dubée et al., 2015). L'activité du clavulanate



est déterminée par la capacité de l'enzyme à l'hydrolyser plus ou moins rapidement. Le coefficient  $k_{cat}/k_m$  permet de décrire l'efficacité d'hydrolyse du clavulanate par la  $\beta$ -lactamase (Figure 15).

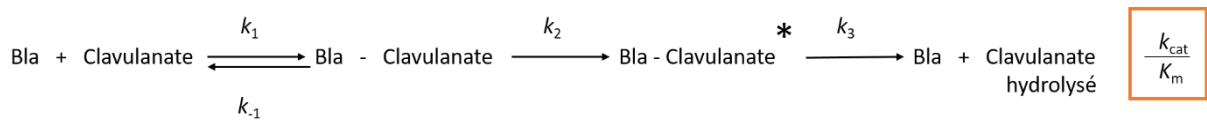


Figure 15. Schéma réactionnel de l'hydrolyse du clavulanate par une  $\beta$ -lactamase.  $k_{-1}/k_1$  est la constante d'affinité,  $k_2$  est la constante catalytique (aussi appelé  $k_{cat}$ ) et  $k_3$  constante d'hydrolyse.  $K_m$  est la constante de Mickaelis et est inversement proportionnelle à l'affinité d'une enzyme pour un ligand.

En revanche, l'acide clavulanique est inefficace contre *M. abscessus* puisque  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  l'hydrolyse avec un  $k_{cat}/k_m = 2,1 \pm 0,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Soroka et al., 2016). Cette différence de comportement vis-à-vis du clavulanate entre  $\text{Bla}_C$  et  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  est due au motif SDN/SDG présent chez  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  ou  $\text{Bla}_C$ . En effet, l'équipe a récemment montré qu'*in vitro*, si l'on remplace le motif SDG de  $\text{Bla}_C$  par un motif SDN, l'inhibition par le clavulanate est fortement diminuée ( $k_{cat}/K_m = 6,9 \pm 1,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Soroka et al., 2015). La protéine  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  portant la substitution  $\text{N}^{132}\text{G}$  perd sa capacité d'hydrolyse avec une  $k_{cat}/K_m$  chutant à  $8,3 \pm 2,1 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . (Soroka et al., 2016).

## 2) Le sulbactam

### a. Généralités

A la suite de la découverte du clavulanate, les industries pharmaceutiques ont développé d'autres inhibiteurs synthétiques dont le sulbactam en 1978 (English et al., 1978). Le sulbactam, un dérivé pénicillinate sulfoné, est surtout efficace contre les  $\beta$ -lactamases de classe A.

### b. Activité sur les mycobactéries

L'association ampicilline-sulbactam a été montrée comme active *in vitro* contre plusieurs souches de mycobactéries pathogènes telles que *M. leprae* (Randhawa, 1994), *M. microti*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. haemophilum*, *M. scrofulaceum* et *M. simiae* (Prabhakaran et al., 1999; Prammananan et al., 1998). Cette combinaison est aussi active contre *M. tuberculosis* (Randhawa, 1994; Zhang et al., 2016).

### 3) Le tazobactam

#### a. Généralités

Développée en 1980, sa structure est proche de celle du sulbactam (Aronoff et al.). Il est principalement utilisé dans les infections à entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* en combinaison avec la piperacilline ou le ceftolozane (Cluck et al., 2015).

#### b. Activité sur les mycobactéries

Le tazobactam a été montré comme diminuant d'un ou deux facteurs de dilutions les CMI de plusieurs  $\beta$ -lactamines *in vitro* contre des isolats cliniques de *M. tuberculosis* (Zhang et al., 2016).

## II. Inhibiteurs de 2<sup>ème</sup> génération

Les inhibiteurs de 2<sup>ème</sup> génération se différencient de ceux de 1<sup>ère</sup> génération par l'absence de cycle  $\beta$ -lactame. Plusieurs types de molécules ont été développés, les diazabicyclooctanes (DBO) comme l'avibactam, le relebactam, le nacubactam ou le zidébactam et les acides boroniques comme le vaborbactam (Figure 16).

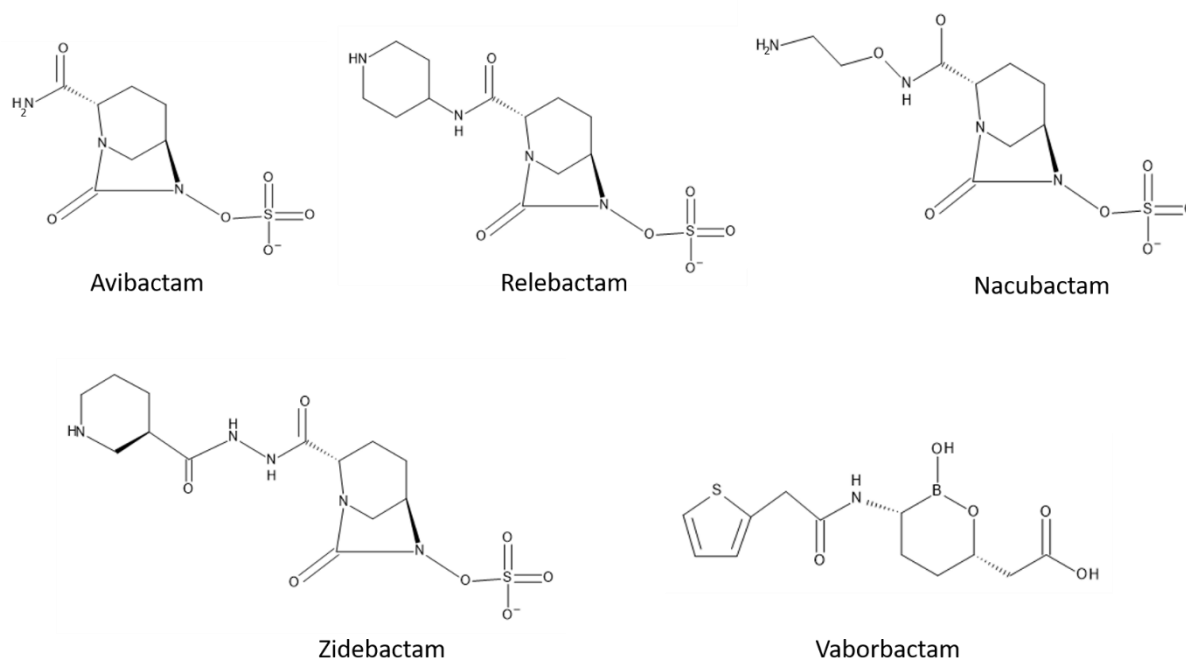


Figure 16. Principaux inhibiteurs de seconde génération. L'avibactam, le relebactam, la nacubactam et le zidébactam sont des dérivés diazabicyclooctane (DBO). Le vaborbactam est un acide boronique.

## 1) L'avibactam

### a. Généralités

L'avibactam, est commercialisé en association avec la céftazidime, une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération. Cette association est utilisée en clinique dans le traitement des infections intraabdominales et urinaires compliquées dont les pyélonéphrites aiguës, les pneumonies nosocomiales dont les pneumonies acquises sous ventilation mécanique dues à des entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux antibiotiques (Livermore et al., 2011; Walkty et al., 2011).

### b. Activité sur les mycobactéries

Le laboratoire d'accueil a montré que l'avibactam inhibait *in vitro* la  $\beta$ -lactamase de *M. abscessus*, Bla<sub>Mab</sub>, mais pas celle de *M. tuberculosis* (Soroka et al., 2016).

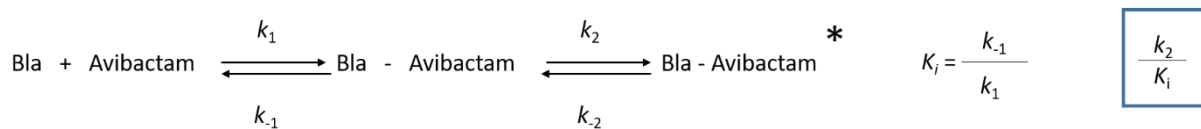


Figure 17. Schéma réactionnel de l'inhibition d'une  $\beta$ -lactamase par l'avibactam.  $k_{-1}/k_1$  est la constante d'inhibition ( $K_i$ ),  $k_2$  est la constante catalytique (aussi appelé  $k_{cat}$ ).

L'efficacité d'inhibition des  $\beta$ -lactamases par l'avibactam est définie par le rapport  $k_2/K_i$  (Figure 17). Pour Bla<sub>Mab</sub>, le  $k_2/K_i$  est de  $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Lorsque le motif SDN est modifié en SDG, cette efficacité diminue et se traduit par un  $k_2/K_i = 1,8 \pm 0,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Sur BlaC, l'action de l'avibactam est limitée ( $k_2/K_i = 6,3 \pm 0,2 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). La mutation G<sup>132</sup>N permet une augmentation de cette activité ( $k_2/K_i = 8,9 \pm 0,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

*In vitro*, l'ajout de l'avibactam permet la diminution des CMI de la plupart des  $\beta$ -lactamines testées au laboratoire contre la souche *M. abscessus* CIP104536 (Dubée et al., 2015). Pour l'imipénème, l'ajout de l'avibactam permet de diminuer la CMI de 4  $\mu\text{g/ml}$  à 2  $\mu\text{g/ml}$  *in vitro*. Cette CMI est alors égale à la CMI de l'imipénème contre la souche mutante de *M. abscessus* ne produisant pas de  $\beta$ -lactamase (*M. abscessus*  $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ ). En revanche la combinaison n'a pas d'effet bactéricide sur *M. abscessus* CIP104536S. En modèle de macrophages infectés, la combinaison imipénème-avibactam permet une réduction de la charge bactérienne de 90% (Lefebvre et al., 2017).

## 2) Le relebactam

### a. Généralités

Le relebactam, un nouveau DBO proche de l'avibactam, est développé en association avec l'imipénème-cilastatine. Cette combinaison a été évaluée en phase III d'essai clinique pour les

infections complexes intra-abdominales et des voies urinaires, les pneumonies bactériennes et les infections aux bactéries résistantes à l'imipénème (ClinicalTrials.gov NCT03293485 ; NCT02493764 ; NCT02452047).

Très récemment, la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis a approuvé l'association d'imipénème, de cilastatine et de relebactam pour le traitement des infections compliquées des voies urinaires ou aucune option alternative n'est disponible.

b. Activité sur les mycobactéries

*In vitro*, il a récemment été montré que le relebactam améliore l'activité de plusieurs  $\beta$ -lactamines (l'imipénème, le biapénème, le méropénème, la ceftaroline) sur des isolats cliniques de bactéries du complexe *M. abscessus* (Kaushik et al., 2019a).

3) Le nacubactam

a. Généralités

Le nacubactam inhibe les métallo- $\beta$ -lactamases, ainsi que les  $\beta$ -lactamases de classe A et C des bactéries à Gram négatif. Il a aussi été montré qu'il possède une activité seul en tant qu'antibiotique en inhibant la PLP2 (Morinaka et al., 2015). Le nacubactam a ensuite été montré comme actif *in vitro* et *in vivo* (modèle souris) contre des isolats cliniques d'entérobactéries seul et en combinaison avec le méropénème (Monogue et al., 2018).

b. Activité sur les mycobactéries

Contre *M. abscessus*, le nacubactam seul ne possède pas d'activité antibiotique. Il améliore l'activité des carbapénèmes et de plusieurs céphalosporines (céfépime, cefnidir, céfotaxime, ceftaroline et cefpodoxime) sur des souches cliniques de *M. abscessus* (Kaushik et al., 2019b).

4) Le zidébactam

a. Généralités

Le zidébactam, en combinaison avec le céfépime a passé la phase II d'essai clinique en 2016 pour son développement contre les infections sévères due à des bactéries à Gram négatif (NCT02707107). Il a été montré que le zidébactam améliore l'activité du céfépime sur des isolats cliniques de *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (Khan et al., 2019).

b. Activité sur les mycobactéries

Contre *M. abscessus*, le zidébactam a été testé en combinaison avec plusieurs  $\beta$ -lactamines (Kaushik et al., 2019b). Il améliore légèrement l'activité des carbapénèmes et de quelques

céphalosporines (céfuroxime et céfépime) contre des isolats cliniques. La combinaison céfépime-zidébactam n'a qu'un effet très limité, avec une CMI du céfépime de 32 µg/ml seul et de 16 µg/ml en présence de zidébactam à 4 µg/ml.

### 5) Le vaborbactam

#### a. Généralités

Le vaborbactam est un boronate développé comme inhibiteur de β-lactamase de classe A et C. Il est actif contre les entérobactéries responsables d'infections complexes des voies urinaires en association avec le méropénème (Lee et al.).

#### b. Activité sur les mycobactéries

Kaushik *et al*, ont montré que l'ajout du vaborbactam permettait la diminution des CMI des carbapénèmes, de quelques céphalosporines tels que le céfuroxime, la ceftaroline et le ceftriaxone par exemple, mais pas des pénicillines contre des isolats cliniques de *M. abscessus* (Kaushik et al., 2019a).

Inhibiteur	β-lactamine en association	Activité de l'association sur <i>M. abscessus</i>	Références
Avibactam	ceftazidime	Pas d'activité sur <i>M. abscessus</i>	Dubée, 2015
	Imipénème	Diminution de la CMI d'une dilution (4 vs 2 µg/ml), pas d'activité bactéricide. Modèle macrophage: 90% de mort des bactéries intracellulaires après 48h de traitement.	Dubée, 2014 Soroka, 2016 Lefebvre, 2017
Relebactam	Imipénème	Diminution de la CMI d'une dilution (8 vs 4 µg/ml)	Kaushik, 2019a
Nacubactam	Méropénème	Diminution de la CMI de 2 dilutions (16 à 4 µg/ml)	Kaushik, 2019b
Zidebactam	céfépime	Diminution de la CMI d'un dilution (32 à 16 µg/ml)	Kaushik, 2019b
Vaborbactam	méropénème	Diminution de la CMI de 2 dilutions (16 vs 4 µg/ml)	Kaushik, 2019a

Tableau 2. Activité des inhibiteurs de 2<sup>ème</sup> génération en association avec une β-lactamine partenaire sur *M. abscessus*.

# Thérapeutique

Le traitement des infections à mycobactéries est souvent long et complexe. Une antibiothérapie constituée d'une combinaison de plusieurs antibiotiques est généralement préconisée. Ici nous aborderons les différents antibiotiques actifs sur *M. abscessus* et les principaux mécanismes de résistance à ces antibiotiques (Figure 18).

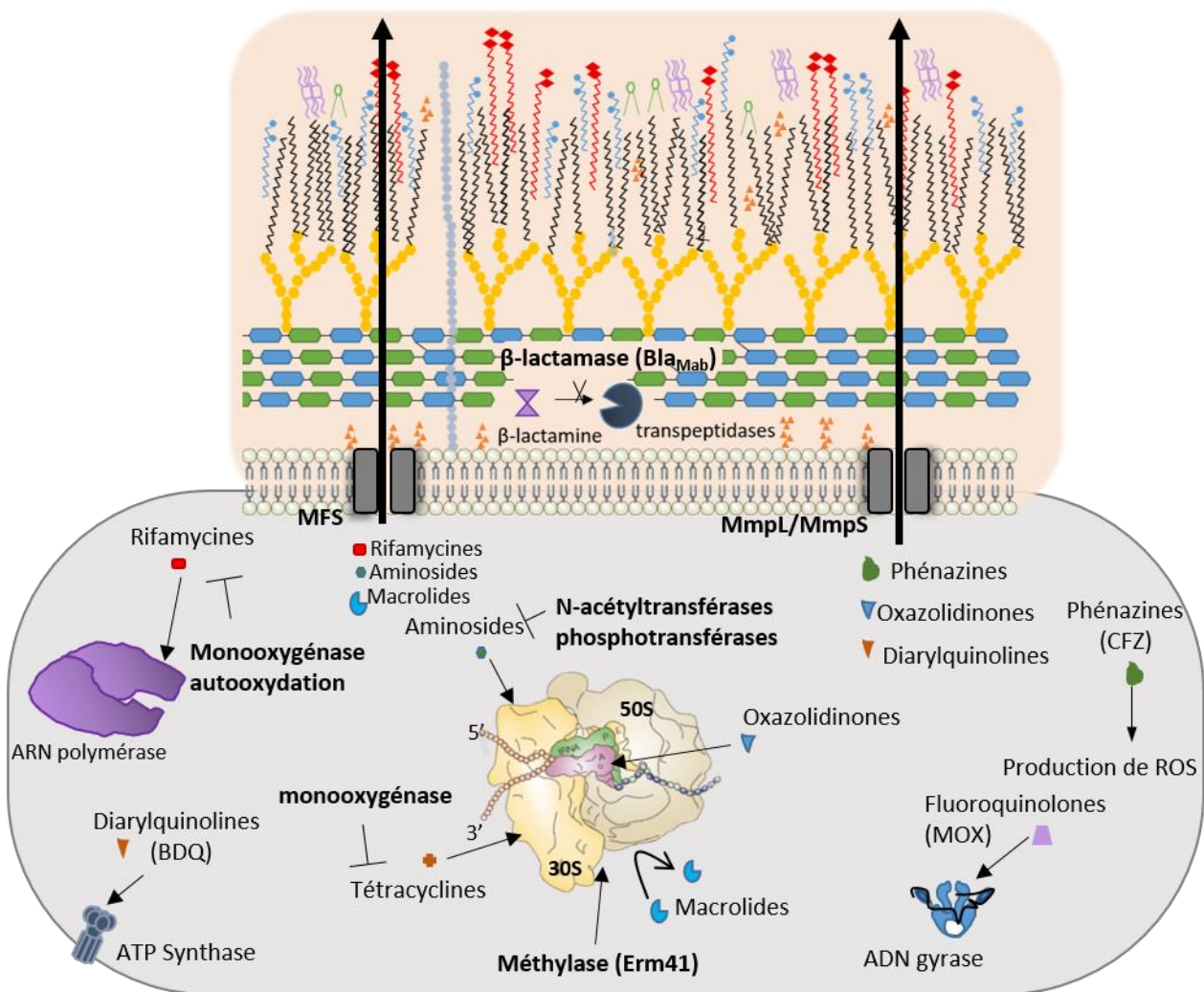


Figure 18. Principales familles d'antibiotiques utilisées contre *M. abscessus* : cibles et mécanismes de résistance. Des antibiotiques appartenant à plusieurs familles sont utilisés dans le traitement des infections dues à *M. abscessus*. Les aminosides, les tétracyclines, les oxazolidinones et les macrolides ciblent le ribosome. Les rifamycines se lient à l'ARN polymérase pour interférer avec la transcription. Les diarylquinolines, comme la bédaquilline vont inhiber l'ATP synthase présente dans la membrane. Les phénazines, elles, entraînent une augmentation de la production de ROS ce qui provoque un stress oxydatif. Les fluoroquinolones se fixent à l'ADN gyrase. Enfin, les β-lactamines, présentes dans le périplasme, vont aller interagir avec les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) et inhiber la synthèse du peptidoglycane. Différents mécanismes de résistance naturel et acquis sont responsables de la difficulté d'élimination de cette bactérie. La présence de pompe d'efflux tel que MmpL/MmpS et MFS permettent l'externalisation des

rifamycines, aminosides, macrolides, phénazines, oxazolidinons et diarylquinolines. La bactérie peut aussi produire des enzymes allant modifier l'antibiotique, c'est le cas de la résistance aux rifamycines et aux tétracyclines qui seront oxydées. Des N-acétyltransférases et des phosphotransférases vont aller modifier les aminosides qui perdront ainsi leur capacité de liaison au ribosome. Enfin, le traitement par les macrolides entraîne l'induction de gène *erm41* codant pour une méthylase qui va méthyler l'ARN23S de la grosse sous unité du ribosome, empêchant ainsi l'action des macrolides. Dans le périplasme, la  $\beta$ -lactamase peut hydrolyser les  $\beta$ -lactamines qui ne pourront plus réagir avec les PLP. BDQ, bédaquilline ; MOX, moxifloxacin ; CFZ, clofazimine.

## I. Présentation des autres classes d'antibiotiques

### 1) Les aminosides

Les aminosides sont des oligosaccharides qui se lient à l'ARN30S du ribosome. En interférant avec le site A du ribosome, ces antibiotiques entraînent des erreurs de traduction et donc la production de protéines erronées (Wirmer and Westhof, 2006).

L'aminoside recommandé dans le traitement des infections à *M. abscessus* est l'amikacine (Floto et al., 2016). *In vitro*, l'amikacine a une CMI de 8  $\mu$ g/ml sur la souche *M. abscessus* CIP104536S (Lefebvre et al., 2016). Seule, en concentrations élevées (64 ou 128 fois la CMI), elle a un effet bactéricide observable après 120 heures de traitement (Ferro et al., 2015). Pour une concentration plus faible (4 fois la CMI) elle n'a qu'un effet bactériostatique même après 48 heures de traitement (Lefebvre et al., 2016). En revanche, l'amikacine a été montrée comme améliorant l'activité de l'imipénème *in vitro* et dans un modèle d'infection de macrophages à des concentrations atteignables dans le sérum des patients (Lam and Bauer, 2013; Lefebvre et al., 2016).

Chez les mycobactéries, le mécanisme de résistance principal est la production d'acétyltransférases et de phospho-transférases qui modifie l'aminoside en lui greffant un groupement acétyle ou phosphate (Ainsa, 1997; Nurizzo et al. 2003; Maurer et al. 2015). Chez *M. abscessus*, la protéine codée par *eis2* réagit avec les aminosides pour les acétyler à partir de l'acétyl CoA (Ung et al., 2019).

Il existe aussi un mécanisme de résistance acquise, médiée par les mutations dans l'ARN16S. Chez *M. abscessus*, différentes mutations ont été observées (Nessar et al., 2011; Prammananan et al., 1998).

### 2) Les glycylicyclines

Les glycylicyclines sont des dérivés de la tétracycline. Leur action antibiotique est due à leur capacité à lier l'ARN30S au niveau du site A du ribosome et donc à empêcher la synthèse protéique

(Olson et al., 2006). La seule glycylicycline utilisée en clinique contre les mycobactéries est la tigécycline (Brown-Elliott et al., 2012). En effet, *M. abscessus* possède une FAD-dépendante monooxygénase TetX qui hydroxyle les tétracyclines, rendant la souche résistante, mais la structure particulière de la tigécycline empêche l'hydroxylation (Rudra et al., 2018). De plus, un système d'efflux est fortement responsable de la faible activité des tétracyclines (Richard et al., 2018a). Contre *M. abscessus*, la CMI de la tigécycline est de 0,06 µg/ml (Zhang et al., 2017). Dans un modèle murin, Lerat *et al.* ont montré que la tigécycline empêchait la mort des souris et réduisait la charge bactérienne dans les poumons et la rate (au moins 2 log<sub>10</sub> UFC par rapport aux souris non traitées) (Lerat et al., 2014).

### 3) Les macrolides

Les macrolides bloquent le site de sortie du peptide en cours de synthèse en se liant à l'ARN50S du ribosome. Plusieurs mécanismes de résistance existent chez les bactéries. Chez les mycobactéries, la famille des gènes « *erm* » a été décrite comme responsable de la résistance à l'azithromycine et la clarithromycine notamment. Les gènes *erm* codent pour une méthylase Erm41 qui, en ajoutant un groupement méthyle à l'ARN23S (situé dans la région de liaison des macrolides au ribosome), diminue fortement l'affinité des macrolides pour le ribosome.

Toutes les sous-espèces de *M. abscessus* portent une copie du gène *erm41* mais elles n'ont pas toute la même version du gène. En effet, chez *M. abscessus subsp. massiliense*, la copie de *erm41* contient une mutation créant un décalage du cadre de lecture et la production d'une protéine extrêmement tronquée, ce qui la rend inactive (Kim et al., 2010). *M. abscessus subsp. abscessus* et *subsp. boletii* possèdent une copie inductible du gène *erm41* génétiquement proche du gène *erm37* présent chez *M. tuberculosis* (Madsen et al., 2005).

En plus de ces gènes, les mycobactéries peuvent acquérir une résistance supplémentaire aux macrolides. En effet, *M. abscessus* ne possède qu'une copie de l'opéron ARNr qui code pour les différents ARN du ribosome. Certaines mutations ponctuelles dans ces gènes modifient l'interaction des macrolides avec l'ARN23S ce qui permet une résistance accrue de ces souches (Wallace et al., 1996).

Contre *M. abscessus* CIP104536S, la CMI de la clarithromycine est de 0,5 µg/ml, celle de l'azithromycine est de 2 µg/ml. En revanche, après 14 jours d'exposition, l'induction de la résistance entraîne une augmentation des CMI jusque 64 µg/ml pour la clarithromycine et 4 µg/ml pour l'azithromycine (Choi et al., 2012). Ces conclusions sont cependant controversées, Maurer *et al.*, ont



montré que l'usage des deux antibiotiques entraînerait une résistance similaire avec des CMI allant jusque 256 µg/ml (Maurer et al., 2014).

#### 4) Les diarylquinolines

La bédaquiline, une diarylquinoline a été récemment approuvé par la Food and Drugs Administration et l'European Medicine Agency pour le traitement des infections à *M. tuberculosis* multi-résistante. Cet inhibiteur d'ATP synthase est actif contre *M. abscessus* CIP104536S avec une CMI de 0,06 µg/ml (Dupont et al., 2017). Dans le modèle du poisson-zèbre, la bédaquiline empêche le développement d'abcès et après trois jours de traitement, 80% des embryons ont survécu (Dupont et al., 2017). En revanche, la bédaquiline présente une activité antagoniste *in vitro* avec les β-lactamines (imipénème et céfoxitine) (Lindman and Dick, 2019). Très récemment chez *M. abscessus*, des mutations d'un régulateur tetR (MAB\_2299c) de pompes d'efflux de type MmmS/MmpL ont conféré un bas niveau de résistance à la bédaquiline et la clofazimine (Richard et al., 2018b).

#### 5) Les phénazines

La clofazimine développée initialement pour le traitement des infections à *M. leprae* (Noordeen, 2016), est utilisé dans le traitement d'infections dues aux MNT (McGuffin et al., 2017) et à *M. tuberculosis* multi-résistante (MDR-TB) (Mirnejad et al., 2018). Chez *M. tuberculosis*, la clofazimine est réduite par une NADH-déshydrogénase et sa ré-oxydation libère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Yano et al., 2011). La CMI de la clofazimine sur des souches cliniques de *M. abscessus* est de 0,5 µg/ml. Une synergie avec l'amikacine a été démontrée par Shen et al. (Shen et al., 2010).

#### 6) Les oxazolidinones: linézolide et tédizolide

Le linézolide est un oxazolidinone découvert au début des années 1990, il a d'abord été utilisé pour le traitement des infections aux bactéries Gram-positif multi-résistantes avant d'être démontré comme actif contre *M. tuberculosis* (Brickner et al., 1996) et *M. abscessus* (Wallace et al., 2001). Il inhibe la synthèse des protéines en se liant au site A du ribosome (Wilson et al.). Etant utilisé en clinique depuis plusieurs années dans le traitement des infections dues à des bactéries à Gram positif, le linézolide a été montré comme efficace surtout dans les cas d'infections par des formes multi-résistantes (MDR) ou extrarésistantes (XDR) de *M. tuberculosis*. Cependant le traitement s'accompagne d'effets secondaires importants tel que des thrombopénies, des neuropathies ou des myélosuppressions (Agyeman and Ofori-Asenso, 2016; Prokocimer et al., 2011). Un nouvel oxazolidinone, le tédizolide, se rapprochant du linézolide, a été découvert en 2011 (Im et al., 2011).

Développé sous forme de pro-drogue (tédizolide phosphate), le traitement comporterait moins d'effets secondaires sévères (Kisgen et al., 2014). Le tédizolide a été montré comme actif contre *M. tuberculosis in vitro* et *in vivo* en modèle murin (Molina-Torres et al., 2014; Tasneen et al., 2016). Plus récemment, Compain *et al.* ont évalué l'activité du tédizolide *in vitro* sur des souches cliniques du complexe *M. abscessus* (Compain et al., 2018) et ont montré que le tédizolide est plus actif que le linézolide avec une CMI<sub>90</sub> de 8 µg/ml contre 64 µg/ml.

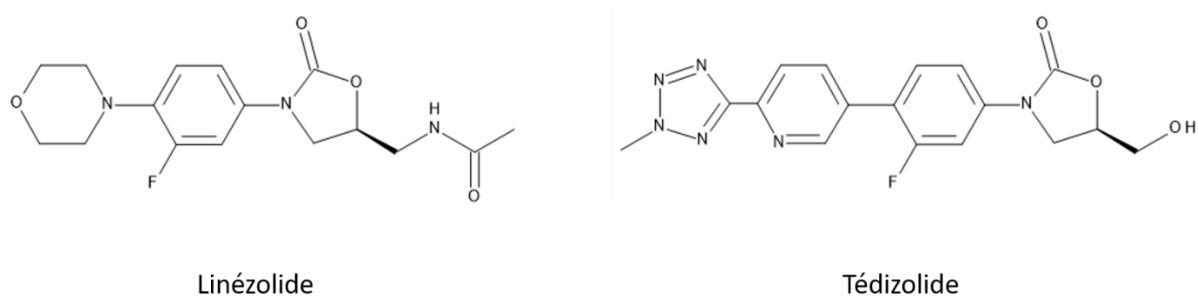


Figure 19. Le linézolide et le tédizolide, deux principaux oxazolidinones actifs contre *M. tuberculosis* et *M. abscessus*.

## 7) Les rifamycines

La rifampicine est une rifamycine couramment utilisée dans les traitements des infections à *M. tuberculosis*. Elle vise la sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase et inhibe ainsi l'élongation de la transcription (Levin and Hatfull, 1993). Elle fait partie des antibiotiques de premier recours, recommandée en combinaison avec l'isoniazide, (Nahid et al., 2016). En revanche, la résistance à la rifampicine est acquise rapidement chez les patients traités médiée par des mutations dans le gène *rpoB* (Telenti et al., 1993). Des effets secondaires ont été reportés après l'utilisation de cette combinaison (Steele et al., 1991).

La rifabutine, une autre rifamycine, a été montrée comme active contre les mycobactéries. La rifabutine est une alternative à la rifampicine dans les cas de résistance acquise par certaines mutations dans *rpoB*. L'utilisation de la rifabutine est limitée aux traitements des infections par les mycobactéries. Récemment il a été montré que la rifabutine est active contre *M. abscessus* avec une CMI de 3 µM (Aziz et al., 2017). L'activité de la rifabutine sur *M. abscessus* s'explique par une différence de structure qui empêche l'auto-oxydation de la molécule, qui conserve donc son activité contrairement à la rifampicine. Une monooxygénase est aussi responsable de l'oxydation de la rifampicine dans le cytoplasme de *M. abscessus*, qui n'a pas lieu pour la rifabutine (Koteva et al., 2018).



## Objectifs

Depuis plusieurs années, le laboratoire évalue tant *in vitro* qu'en intracellulaire, la place des  $\beta$ -lactamines dans le traitement des infections dues aux mycobactéries. Les travaux ont permis de montrer qu'un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases de seconde génération appartenant à la famille des diazabicyclooctanes, l'avibactam, inhibe efficacement la  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> produite naturellement par *M. abscessus*. Cet inhibiteur améliore l'activité de l'imipénème et élargit le spectre des  $\beta$ -lactamines actives sur *M. abscessus*.

Dans la continuité de ces travaux, le premier objectif du travail de thèse a été d'évaluer de nouvelles combinaisons d'antibiotiques qui pourraient améliorer le traitement des infections à *M. abscessus*. Deux antibiotiques (la rifabutine et le tédizolide) utilisés pour le traitement d'infections dues à d'autres bactéries ont été évalués en combinaison avec l'imipénème tant *in vitro* qu'en intracellulaire. L'intérêt de l'ajout de l'avibactam a également été évalué. Enfin, l'efficacité du relebactam, un nouvel inhibiteur de la famille des diazabicyclooctanes a été évaluée en combinaison avec l'imipénème et comparée à celui de l'avibactam.

Dans la mesure où il avait été montré que le gène *bla*<sub>Mab</sub> est induit 20 fois en intracellulaire, le deuxième objectif a été l'étude de la régulation de *bla*<sub>Mab</sub>. Les facteurs pouvant être responsable de cette induction ont été recherchés par deux approches (i) en comparant l'activité spécifique  $\beta$ -lactamase de cultures de *M. abscessus* effectuées dans différentes conditions de stress, (ii) et en construisant des souches de *M. abscessus* recombinantes produisant la EGFP comme protéine fluorescente rapporteuse.

Enfin, le dernier objectif de ma thèse a été d'évaluer le rôle du polymorphisme du motif SDN/G des  $\beta$ -lactamases des mycobactéries. Pour cela, plusieurs souches isogéniques de *M. abscessus* produisant des  $\beta$ -lactamases recombinantes ont été construites par recombinaison homologue. Le comportement de ces souches vis-à-vis des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases a été évalué en déterminant leur sensibilité *in vitro* sur un large panel de  $\beta$ -lactamines seules ou en association avec le clavulanate et l'avibactam.



## Matériel & Méthodes



## I. Souches bactériennes

Les souches utilisées dans ce travail sont *M. abscessus* CIP104536 de morphotype S et son dérivé, *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::z eo$ , qui est délété du gène codant la  $\beta$ -lactamase  $Bla_{Mab}$ . Cette souche a été construite au laboratoire (Dubée et al., 2014) et sera nommée *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  dans la suite du travail. Au cours de ce travail, cinq souches recombinantes de *M. abscessus* ont été construites (cf infra) : *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::egfp-z eo$ , *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  R, *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  F, *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}N^{132}G$  et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::blaC G^{132}N$ .

## II. Milieux de culture

Selon les expériences, les souches de *M. abscessus* ont été cultivées en milieu Lysogeny Broth (LB) (BD, bacto) ou en Middlebrook 7H9 (BD, Difco) complémenté avec 0,2 % de glycérol (Sigma-Aldrich) et 10 % d'OADC (BD), appelé 7H9sB. La composition des différents milieux de culture utilisés sont reportés dans le Tableau 3.

Les cultures de *E. coli* ont été effectuées dans du milieu BHI (Brain Heart Infusion, BD, bacto) liquide ou solide.

Les cultures solides ont été effectuées sur milieu LB agar ou sur milieu Middlebrook 7H10 (BD, Difco) complémenté avec 0,2 % de glycérol (Sigma-Aldrich), 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich) et 10 % d'OADC (BD), appelé 7H10sB.

Pour l'étude de l'activité intra-intracellulaire des antibiotiques, les cellules THP1 ont été cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, Gibco) complémenté avec 2,5 g/l de glucose (Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, Gibco), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (v/v, sigma-aldrich). Ce milieu est appelé RPMIc. Lors de la culture des cellules monocytaires THP1, 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoéthanol était ajouté au milieu RPMIc.



	RPMI		SCFM	
	Source	Concentration g/L	Source	Concentration g/L
Sucre	-	-	glucose	0,9
Lipide	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-
Acide Aminé	Glycine	0,01	Glycine	0,09
	L-Arginine	0,241	L-Arginine	0,052
	L-Asparagine	0,05	Acide L-Aspartique	0,1
	Acide L-Aspartique	0,02	L-Cystéine	0,024
	L-Cystéine	0,065	acide L-Glutamique	0,22
	acide L-Glutamique	0,02	L-Histidine	0,078
	L-Glutamine	0,3	L-Hydroxyproline	0,196
	L-Histidine	0,021	L-Isoleucine	0,144
	L-Hydroxyproline	0,02	L-Leucine	0,21
	L-Isoleucine	0,05	L-Lysine	0,307
	L-Leucine	0,05	L-Méthionine	0,089
	L-Lysine	0,04	L-Phénylalanine	0,083
	L-Méthionine	0,015	L-Sérine	0,147
	L-Phénylalanine	0,015	L-Thréonine	0,119
	L-Proline	0,02	L-Tryptophane	0,002
	L-Sérine	0,03	L-Tyrosine	0,145
	L-Thréonine	0,02	L-Valine	0,129
	L-Tryptophane	0,005		
L-Tyrosine	0,029			
L-Valine	0,02			
Ions	NaCl	6	KNO <sub>3</sub>	0,1
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4
	MgSO <sub>4</sub>	0,5	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
	KCl	0,4	CaCl <sub>2</sub>	0,555
	CaNa <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,1	MgCl <sub>2</sub>	0,475
	Biotine	0,0002	Lactate	1,68
Pyridoxine	0,001	MOPS	5,3	
Autres	Glutathione réduit	0,001		
	Sodium rouge de Phénol	0,005		
	Choline chlorure	0,003		
	Acide folique	0,001		
	Riboflavine	0,0002		
	Hydrochlorure de thiamine	0,001		
	Vitamine B12	0,000005		
	i-inositol	0,035		
	Acide p-amino benzoïque	0,001		

	7H9		7H9sB	
	Source	Concentration g/L	Source	Concentration g/L
Sucre	-	-	dextrose	1
Lipide	-	-	acide oléique	0,025
Glycérol	-	-	-	0,20%
Acide Aminé	-	-	albumine bovine	2,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	NaCl	0,425
Ions	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
	KHPO <sub>4</sub>	1	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5
	Na Citrate	0,1	KHPO <sub>4</sub>	1
	MgSO <sub>4</sub>	0,5	Na Citrate	0,1
	CaCl <sub>2</sub>	0,0005	MgSO <sub>4</sub>	0,5
	ZnSO <sub>4</sub>	0,001	CaCl <sub>2</sub>	0,0005
	CuSO <sub>4</sub>	0,001	ZnSO <sub>4</sub>	0,001
	Fe NO citrate	0,04	CuSO <sub>4</sub>	0,001
			Fe NO citrate	0,04
Autres	Biotine	0,0005	Biotine	0,0005
	Acide L-glutamique	0,5	Acide L-glutamique	0,5
	Pyridoxine	0,001	Pyridoxine	0,001
	Catalase	0,002	Catalase	0,002
<b>Sauton + Mg2+</b>		<b>Sauton</b>		
	Source	Concentration g/L	Source	Concentration g/L
Sucre	-	-	-	-
Lipide	-	-	-	-
Glycérol	-	6%	-	6%
Acide Aminé	Asparagine	4	Asparagine	4
	KHPO <sub>4</sub>	0,5	KHPO <sub>4</sub>	0,5
Ions	Na Citrate	2	Na Citrate	2
	MgSO <sub>4</sub>	0,5	MgSO <sub>4</sub>	-
	ZnSO <sub>4</sub>	0,001	ZnSO <sub>4</sub>	0,001
	Fe NO citrate	0,05	Fe NO citrate	0,05
<b>LB</b>				
	Source	Concentration g/L		
Sucre	extrait de levure	10		
Lipide	-	-		
Glycérol	-	-		
Acide Aminé	tryptone	5		
Ions	NaCl	5		

Tableau 3. Composition des différents milieux de culture utilisés lors de ce travail.

### III. Antibiotiques utilisés

Antibiotique	Fournisseur	Solubilisé dans	Concentration stock mg/ml
<b>Imipénème</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	1
<b>Amikacine</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	1
<b>Avibactam</b>	Advanced ChemBlocks Inc (Burlingame, CA)	H <sub>2</sub> O	1
<b>Clavulanate</b>	USP standard (USA)	H <sub>2</sub> O	1
<b>Amoxicilline</b>	Panpharma S.A.(Luitré,FR)	H <sub>2</sub> O	10
<b>Rifabutine</b>	Laboratoires Serb (Paris, FR)	Ethanol 96%	15
<b>tédizolide</b>	MSD (Kenilworth, USA)	DMSO	3,2
<b>Relebactam</b>	MSD (Kenilworth, USA)	H <sub>2</sub> O	1
<b>Céfoxitine</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Ceftaroline</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Céfuroxime</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Ceftazidime</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Méropénème</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Ertapénème</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Céfamandole</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5
<b>Aztréonam</b>	Mylan (Saint-Priest, FR)	H <sub>2</sub> O	5

Tableau 4. Liste des antibiotiques utilisés.

#### IV. Activité *in vitro* des antibiotiques

##### 1) Antibiogramme par diffusion

A partir d'une culture en phase exponentielle de croissance, la  $DO_{600}$  (densité optique à 600 nm) a été mesurée et la culture a été diluée à  $DO_{600}=0,2$  dans 5 ml d'eau stérile. Une gélose LB agar ou 7H10sB a ensuite été inoculée par inondation. Une fois la gélose séchée, des disques d'antibiotiques commerciaux ou réalisés extemporanément ont été déposés sur la gélose. La boîte a été incubée à 30°C pendant 4 jours.

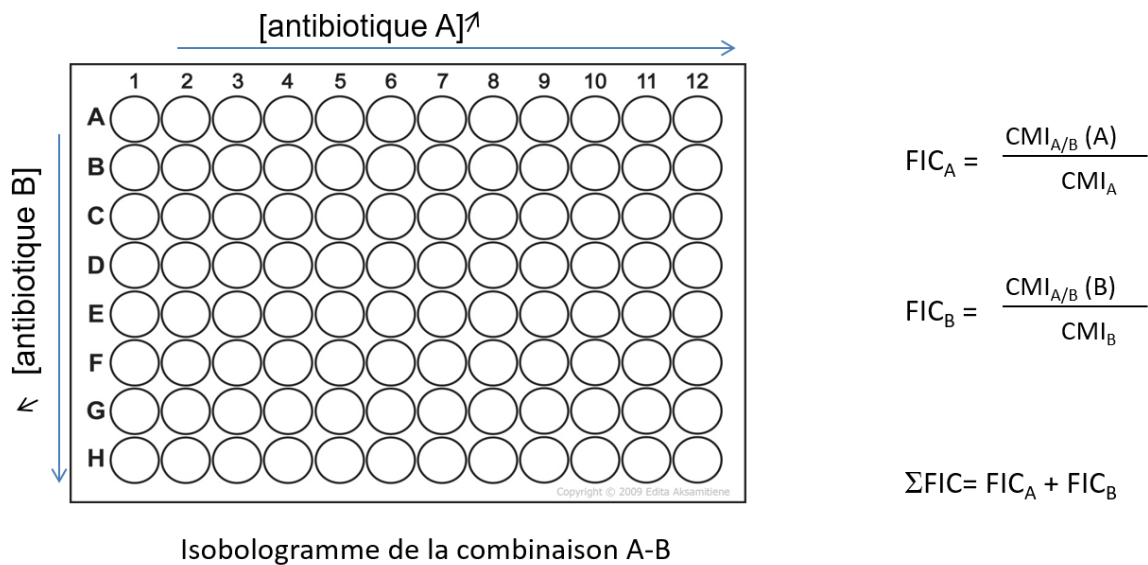
##### 2) Concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide

La CMI a été déterminée par la méthode de microdilution en suivant les recommandations du CLSI (CLSI document M24 A2, 2011). Une culture en phase exponentielle a été diluée pour atteindre une  $DO_{600}$  de 0,0015 dans du 7H9sB correspondant à un inoculum de  $5.10^5$  UFC/ml. Dans une plaque 96 puits, les antibiotiques à tester ont été dilués en série dans du 7H9sB. Des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase ont été ajoutés si nécessaire. Enfin, les puits ont été inoculés par la dilution de bactéries appropriée. Une première lecture des plaques a été effectuée après 2 jours d'incubation à 30°C. La CMI est définie comme le premier puits dans lequel la croissance bactérienne est inhibée. Si la lecture n'était pas franche, la résazurine à 0,025% a été ajoutée aux plaques et incubée 24h à 30°C; une deuxième lecture a alors été effectuée. La résazurine est un réactif coloré bleu qui, en présence de croissance bactérienne devient rose violet. Lors de la lecture par la résazurine, la CMI a donc été définie comme le premier puits restant bleu. Pour chaque condition, l'expérience a été réalisée cinq fois à partir de cultures indépendantes ; les résultats présentés sont les médianes des cinq expériences.

##### 3) Méthode en échiquier

Pour déterminer l'activité *in vitro* d'une combinaison de deux antibiotiques, la technique des CMI en échiquier a été utilisée. L'antibiotique A est distribué en concentration variable dans chaque ligne, l'antibiotique B en concentration variable dans chaque colonne (Figure 21). Chaque puits contient donc une combinaison unique d'une concentration en antibiotique A et B. Chaque puits est ensuite inoculé avec  $5.10^5$  UFC/ml. Après deux jours d'incubation à 30°C, les résultats sont lus. Pour chaque concentration en antibiotique A, la concentration en antibiotique B suffisante pour inhiber la croissance bactérienne est notée. Afin d'analyser les résultats plus simplement, l'index de concentration inhibitrice fractionnaire (index FIC) est déterminé selon l'équation présentée dans la

figure. Pour chaque combinaison de A et B inhibant la croissance bactérienne, le FIC A et le FIC B sont calculés. L'index FIC est défini comme la somme de FICA et FICB la plus faible.



Isobogramme de la combinaison A-B

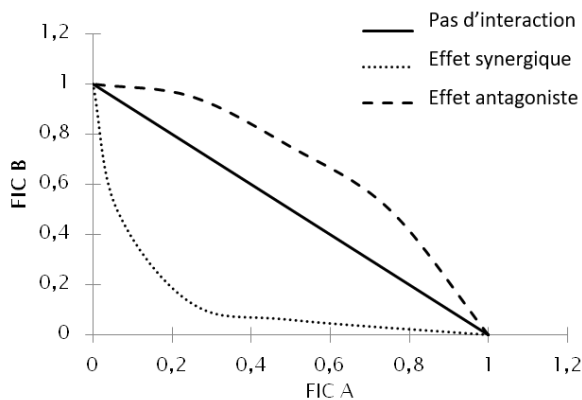


Figure 21. Détermination de l'index FIC par la méthode de CMI en échiquier. Schéma de la répartition des antibiotiques A et B sur une plaque 96 puits et équations permettant le calcul de  $FIC_A$  et  $FIC_B$ . La somme des FIC pour chaque puits est déterminée et la somme la plus basse correspond à l'index FIC de la combinaison. Les FIC peuvent être représentés sous forme d'isobogramme, la forme de la courbe ainsi tracée reflète le type d'interaction des deux antibiotiques.

Une combinaison dont l'index FIC est inférieur ou égal à 0,5 est considérée comme synergique. Si l'index FIC est supérieur à 4, les antibiotiques sont dits antagonistes. Enfin, si l'index FIC est compris entre 0,5 et 4 la combinaison est indifférente (Odds, 2003).

#### 4) Détermination de l'activité bactéricide

A partir d'une pré-culture, 20ml de 7H9sB ont été inoculés avec  $5.10^6$  UFC/ml en phase exponentielle de croissance. Différents antibiotiques seuls ou en association ont été ajoutés aux cultures. Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation pendant 3 jours. L'imipénème a été ajouté toutes les 24 heures pour palier à son hydrolyse spontanée. Le nombre de UFC a été déterminé

à J0, J2 et J3 pour chaque condition par étalement de différentes dilutions sur gélose LB agar. Les bactéries ont été dénombrées après incubation des géloses à 30°C pendant 4 jours. Les expériences ont été réalisées en triplicat indépendants, les résultats présentés sont les moyennes.

### 5) Modèle macrophage

Les cellules THP-1 en culture ont été centrifugées (20°C, 1500 rpm, 20 minutes) et lavées au tampon phosphate (PBS pH 7,5, BD-Difco) afin d'éliminer le  $\beta$ -mercaptoéthanol. Puis,  $5 \cdot 10^5$  cellules monocytaires THP-1 ont été différenciées dans des plaques 24 puits (capacité 1ml) dans du RPMIc contenant 60 ng/ml de phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, Sigma-Aldrich) pendant 24 heures à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Après lavage des puits au PBS pH7,5, les macrophages ont été infectés par *M. abscessus* CIP104536 ou *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  à une MOI (Multiplicity of Infection) 10:1 pendant 3 heures à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Les puits ont ensuite été lavés 3 fois au PBS pH 7.5. 10  $\mu$ l de chaque lavage ont été étalés sur LB agar pour vérifier l'élimination des bactéries extracellulaires. 1 ml de RPMIc contenant différents antibiotiques seuls ou en association a été ajouté dans chaque puits et la plaque a été incubée 48 heures à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu RPMIc avec ou sans antibiotiques a été renouvelé au bout de 24 heures. Après les 48 heures de traitement, les puits ont été lavés 3 fois avec du PBS pH 7,5 puis les cellules ont été lysées dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O stérile froide pendant 20 minutes à 4°C. Le contenu des puits a ensuite été dilué et étalé sur LB agar afin de dénombrer les bactéries intracellulaires. Chaque condition a été testée en triplicats indépendants et les résultats présentés sont les moyennes.

## V. Manipulations génétiques

### 1) Plasmides utilisés

Les vecteurs construits et utilisés au cours de ce travail sont reportés dans le tableau 4 ci-dessous.

vecteur	description	gène de sélection	source
pJV53Kn	vecteur portant le gène de la recombinaise sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'acétamide	KmR	Mejaded, 2010
pVV16-egfp	vecteur portant le gène <i>egfp</i>	KmR	Don de L. Kremer
pJet1.2	vecteur de clonage	AmpR	thermofisher scientific
pJet1.2 $\Omega$ zeo	gène de résistance à la zéocine cloné dans pJet1.2	AmpR	ce travail
pJet1.2 $\Omega$ egfp	gène <i>egfp</i> cloné dans pJet1.2	AmpR	ce travail
pMC11	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi de <i>zeo</i> et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	Dubée, 2015
pMC11 $\Omega$ egfp-zeo	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi de <i>egfp</i> , <i>zeo</i> et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	ce travail
pMC11 $\Omega$ <i>bla</i> <sub>Mab</sub> - <i>egfp</i> R	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> , <i>egfp</i> et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	ce travail
pMC11 $\Omega$ <i>bla</i> <sub>Mab</sub> - <i>egfp</i> F	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi du gène fusion <i>bla</i> <sub>Mab</sub> - <i>egfp</i> et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	ce travail
pMC11 $\Omega$ <i>bla</i> <sub>Mab</sub> N132G	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> N132G et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	ce travail
pMC11 $\Omega$ <i>bla</i> C G132N	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi de <i>bla</i> C G132N et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	ce travail
pMC11 $\Omega$ <i>bla</i> C	vecteur portant <i>MAB_2874</i> suivi de <i>bla</i> C et <i>MAB_2876 c</i>	AmpR	ce travail

Tableau 5. Vecteurs utilisés au cours du travail et leur provenance.

## 2) Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir d'une matrice d'ADN purifiée, les gènes d'intérêt ont été amplifiés par PCR (Tableau 6) en utilisant la Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermofisher Scientific). Dans le tableau 6 sont répertoriées les amorces et les matrices utilisées pour chaque étape des constructions. Les amorces étaient ajoutées à 200 µM en concentration finale, la matrice à 10 ng si plasmidique et 50 ng si linéaire ou ADN génomique. Chaque réaction de PCR était constituée d'une étape de dénaturation à 98°C pendant 1 minute, suivie de 30 cycles de dénaturation à 98°C pendant 30s, hybridation à 55°C pendant 20s et de polymérisation à 72°C pendant 30s à 1,5 minute (30s/kb). En fin, une étape de polymérisation finale était programmée pendant 5 minutes à 72°C.

Construction finale	gène amplifié	amorce FOR	amorce REV	Matrice
pJet1.2Ωzeo	zeo	zeo1	zeo2	pMC11
pJet1.2Ωegfp	egfp	egfp1	egfp2	pVV16-egfp
pMC11ΩblaMab-egfp R	blaMab R	blaMabFOR	blaMabEGFPcomp REV	ADNg <i>M. abscessus</i> CIP104536S
	egfp R	blaMabEGFPcomp FOR	egfp2	pJet1.2Ωegfp
	fragment blaMab-egfp R	blaMabFOR	egfp2	blaMab R + egfp R
	blaMab-egfp R - gibson	blaEGFP FP1	blaEGFP RP1	fragment blaMab-egfp R
pMC11ΩblaMab-egfp F	pMC11-gibson	blaEGFP FP2	blaEGFP RP2	pMC11
	blaMab F	blaMabFOR	blaMabEGFP REV	ADNg <i>M. abscessus</i> CIP104536S
	egfp F	blaMabEGFP FOR	egfp2	pJet1.2Ωegfp
	fragment blaMab-egfp F	blaMabFOR	egfp2	blaMab F + egfp F
pMC11ΩblaMab N132G	blaMab-egfp F - gibson	blaEGFP FP1	blaEGFP RP1	fragment blaMab-egfp F
	pMC11-gibson	blaEGFP FP2	blaEGFP RP2	pMC11
	blaMab N132G P1	MC105	blaMabN132G REV	pMC11ΩblaMab-egfp R
	blaMab N132G P2	blaMabN132G FOR	blaMabEcoRI REV	pMC11ΩblaMab-egfp R
pMC11ΩblaC	blaMab N132G	MC105	blaMabEcoRI REV	blaMab N132G P1 + P2
	blaMab N132G - gibson	blaMabN132G FP1	blaMabN132G RP1	blaMab N132G
	pMC11-gibson	blaEGFP FP2	blaEGFP RP2	pMC11
	blaC	blaC FOR	blaC REV	ADNg <i>M. tuberculosis</i>
pMC11ΩblaC G132N	blaC G132N P1	MC105	blaC G132N REV	pMC11ΩblaC
	blaC G132N P2	blaC G132N FOR	blaC REV	pMC11ΩblaC
	blaC G132N	MC105	blaC REV	blaC G132N P1 + P2

Tableau 6. PCR réalisées au cours de ce travail. Pour chaque construction sont indiquées les matrices et les amorces nécessaires à chaque étape de PCR.

amorce	sens	séquence	description
zeo1	S	ATGGATCCGAGCACGTGTGACAATTA	début du gène <i>zeo</i> (pMC11)
zeo2	AS	aagaattcTCAGTCTGCTCCT	fin du gène <i>zeo</i> (pMC11)
EGFP1	S	tctctagaattcGAGGAGGAGATCGCCACCATGGTGAGCAA	début du gène <i>egfp</i> (pV16)
EGFP2	AS	taaGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	fin du gène <i>egfp</i> (pV16)
blaMabFOR	S	CatgATCTCTCGTCGCGCAC	début de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> (génomique)
blaMabEGFPcompREV	AS	CATGTGGCGATCTCCTCCTcTcaAGCGCCGAAGGCCCGCA	fin de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> -Shinedelgarno-EGFP
blaMabEGFPcompFOR	S	TGCGGCCCTTCGGCGCTtgaGAGGAGGAGATCGCCACATG	fin de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> -Shinedelgarno-EGFP
blaMabEGFPREV	AS	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACAGCGCCGAAGGCCCGCAGCA	fin de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> fusionné au début d' <i>egfp</i>
blaMabEGFPFOR	S	TGCTGCGGCCCTTCGGCGCTGTGAGCAAGGCGGAGGAGCT	fin de <i>bla</i> <sub>Mab</sub> fusionné au début d' <i>egfp</i>
blaEGFP- <sub>FP1</sub>	S	gacctgcagctcgactgacgAATTCatgATCTCTCGTCGC	fin du gène <i>MAB_2874</i> suivi du début du gène <i>bla</i> <sub>Mab</sub>
blaEGFP- <sub>RP1</sub>	AS	atctcgcgagcccgctcaggAATTCCTTACTTGTACAGCTCGTCCA	fin du gène <i>egfp</i> suivi de la fin du gène <i>MAB_2876c</i>
blaEGFP- <sub>RP2</sub>	AS	GAATTCgctcagctcgactgacgctcaggtc	début du gène <i>MAB_2874</i>
blaEGFP- <sub>FP2</sub>	S	GAATTCctgacgctcgctcgcgagat	fin du gène <i>MAB_2876c</i>
MC105	S	gcagccaattcttcatggtc	fin du gène <i>MAB_2874</i>
blaMabN132G REV	AS	CAGGTTGGCACCGGTCGCCCTATAGCGGAG	insertion de la mutation N132G
blaMabN132G FOR	S	CTCCGCTATAGCGACCGCCGCTGCCAACCTG	insertion de la mutation N132G
blaMabN132G- <sub>FP1</sub>	S	gacctgcagctcgactgacg	fin du gène <i>MAB_2874</i> suivi du début du gène <i>bla</i> <sub>Mab</sub>
blaMabN132G- <sub>RP1</sub>	AS	atctcgcgagcccgctcaggAATTCtcaAGCGCCGAAGGCCCGCA	fin du gène <i>bla</i> <sub>Mab</sub> suivi de la fin du gène <i>MAB_2876c</i>
blaCFOR	S	AAAAAAGAATTCatgCGCAACAGAGGATTCGG	début de <i>blaC</i> (génomique)
blaCREV	AS	TTTTTTTTGAATTCctatGCAAGCACACCGGCAA	fin de <i>blaC</i> (génomique)
blaCG132N REV	AS	CAGGTTGGCGCGGTTGTCTCGCTATAGCGTAT	insertion de la mutation G132N
blaCG132N FOR	S	ATACGCTATAGCGACAACACCGCCGCAACCTG	insertion de la mutation G132N

Tableau 7. Liste des amorces utilisées dans ce travail. Pour chaque amorce est indiquée le sens (S= sens ; AS = antisens), la séquence de 5' vers 3' et une brève description.

Chaque réaction de PCR a été déposée sur gel d'agarose 1% et a migré par électrophorèse pendant 30 à 40 minutes à 90 V avant d'être visualisée sur plaque UV.

La bande voulue a été purifiée par « GeneJET gel extraction kit » de Thermofisher Scientific, le fragment a été élué avec 25 µl d'H<sub>2</sub>O chaude.

### 3) Purification de l'ADN plasmidique

Les plasmides ont tous été électroporés dans *E. coli* TOP10 électrocompétentes afin d'être stockés et produits en quantité importante. A partir de 2 ml de culture sur la nuit, le kit « GeneJET plasmid miniprep » de thermofisher Scientific a été utilisé afin d'obtenir la purification du plasmide. L'élué a été effectué avec 50 µl d'H<sub>2</sub>O chaude. Le plasmide a été vérifié par digestion par des enzymes de restriction de la collection « fast digest » de thermofisher Scientific pendant 30 minutes à 37°C puis migration de la digestion sur gel d'agarose 1%.

### 4) Ligation et clonage

Les fragments *egfp* et *zeo* amplifiés par PCR ont été ligués dans le vecteur pJet1.2 par l'utilisation de la T4 DNA ligase (Thermofisher Scientific). Un ratio 1 de matrice pour 5 d'insert a été incubé avec 1 µl de T4 DNA ligase à 16°C sur la nuit, puis le mélange est dialysé (membrane 0,22 µm Millipore) pendant 30 minutes. Cinq µl de mélange dialysé sont ensuite électroporés dans *E. coli* TOP10 électrocompétente. De la même façon, les fragments *blaC* et *blaC* G132N ont été ligués

dans pMC11. Les transformants ont été sélectionnés sur BHI agar contenant de l'ampicilline (100 µg/ml)

Le système de Gibson a été utilisé pour obtenir les plasmides pMC11 $\Omega$ bla<sub>Mab</sub>-*egfp* R, pMC11 $\Omega$ bla<sub>Mab</sub>-*egfp* F et pMC11 $\Omega$ bla<sub>Mab</sub> N132G. Selon les recommandations du fabricant, les amorces RP1, FP1, RP2 et FP2 ont été dessinées (Figure 22) pour favoriser la réaction de ligation des différents fragments.

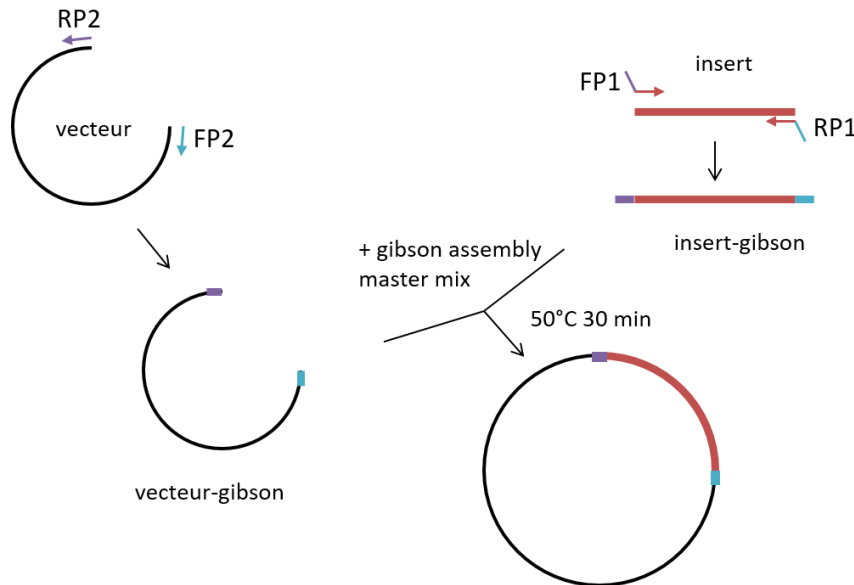


Figure 22. Schéma d'intégration d'un insert dans un vecteur par la méthode NEB Gibson. Les amorces FP1 et RP1 sont dessinées afin de créer des extrémités ayant la même séquence que les extrémités du vecteur. Le vecteur est linéarisé par PCR à partir des amorces FP2 et RP2. L'incubation des deux fragments en présence du Gibson assembly master mix permet la ligation et la création du plasmide final.

Brièvement, le système Gibson permet de joindre plusieurs fragments d'ADN rapidement en une seule étape. Le kit comprend un mélange de trois enzymes : une exonucléase, une ADN polymérase et une ADN ligase. 50 ng d'insert et 50 ng de pMC11-gibson sont mélangés avec 10 µl de Gibson assembly master mix (contenant le mélange d'enzymes) et incubés à 50°C pendant 30 minutes. La réaction est ensuite dialysée et 5 µl ont été électroporés dans *E. coli* TOP10 électrocompétentes. Les transformants ont été sélectionnés sur BHI agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

##### 5) Recombinaison homologue

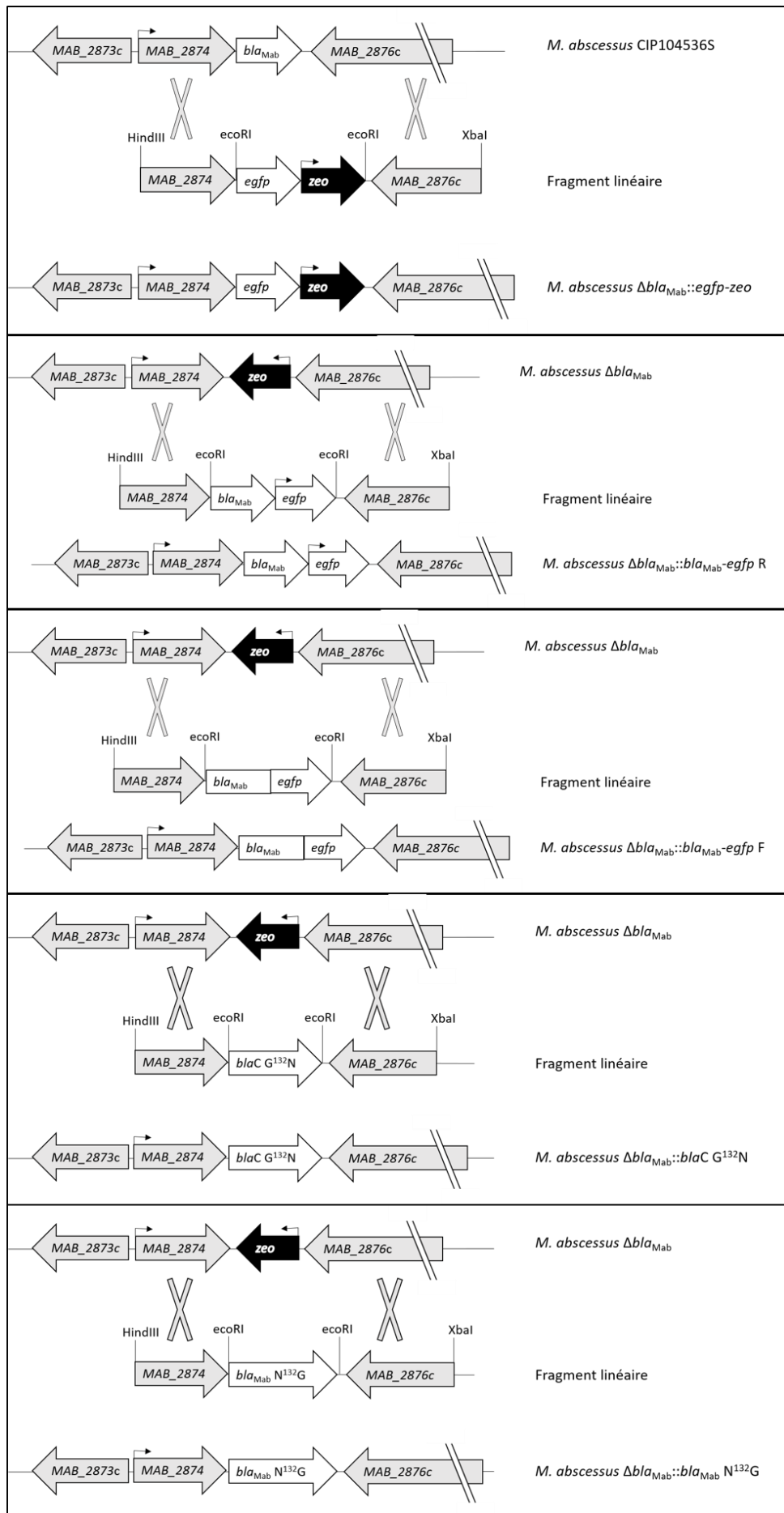
Les différents mutants *M. abscessus* ont été obtenus par recombinaison homologue (Tableau 8, Figure 23). La souche *M. abscessus* parentale (CIP104536S ou  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub>) a été transformée avec le plasmide pJV53Kn portant un gène codant pour la recombinase de phage lambda inducible par

l'acétamide. Après avoir été rendues compétentes, les bactéries ont été électroporées avec 300 ng de l'insert correspondant à la construction voulue, et laissées la nuit à 37°C avant d'être étalées sur LB agar contenant les antibiotiques permettant la sélection des transformants. Les colonies ont ensuite été patchées sur LB agar contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) ou de la zéocine (50 µg/ml) permettant de déterminer rapidement le phénotype de résistance à ces deux antibiotiques. Enfin, l'ADN génomique de chaque clone présentant le bon phénotype a été extrait, le locus « *bla<sub>Mab</sub>* » a été amplifié par PCR et envoyé à séquencer. Un clone pour chaque construction a ainsi été souché et envoyé pour un séquençage total de son génome.

	<b>Souche parentale</b>	<b>Souche Finale</b>
<b>Nom</b>	<i>M. abscessus</i> CIP104536S pJV53Kn	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: egfp$ -zeo
<b>Phénotype de résistance</b>	AmpR KanR ZeoS	AmpS KanS ZeoR
<b>Nom</b>	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ pJV53Kn	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}$ -egfp R
<b>Phénotype de résistance</b>	AmpS KanR ZeoR	AmpR KanS ZeoS
<b>Nom</b>	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ pJV53Kn	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}$ -egfp F
<b>Phénotype de résistance</b>	AmpS KanR ZeoR	AmpR KanS ZeoS
<b>Nom</b>	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ pJV53Kn	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}$ N <sup>132</sup> G
<b>Phénotype de résistance</b>	AmpS KanR ZeoR	AmpR KanS ZeoS
<b>Nom</b>	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$ pJV53Kn	<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: blaC$ G <sup>132</sup> N
<b>Phénotype de résistance</b>	AmpS KanR ZeoR	AmpR KanS ZeoS

Tableau 8. Récapitulatif des souches recombinantes obtenues par la technique décrite ci-dessus. Le phénotype de résistance est renseigné pour les principaux antibiotiques utilisés lors des étapes de sélection. La résistance à la kanamycine est médiée par le gène porté par le plasmide pJV53Kn.





*Figure 23. Schéma des différentes recombinaisons homologues réalisées lors de ce travail. Le fragment linéaire portant le gène à intégrer entouré de séquences d'homologie est recombiné dans la souche parentale par l'action de la recombinaison de phage lambda (symbolisée par les croix) afin d'obtenir le locus de la souche finale.*

#### 6) Extraction d'ADN génomique

A partir d'un isolement sur LB agar, la boîte a été grattée pour récupérer le maximum de bactéries qui ont été resuspendues dans 1 ml de tampon Tris HCl 0,05 M EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 10 mM pH 8. Après ajout de 12,5mg de lysozyme, le tube a été incubé à 37°C pendant 1h30. Le tube a été agité par Vortex (Bioblock Scientific) régulièrement pendant ce temps d'incubation. Après centrifugation (20°C, 13 000 rpm, 5 minutes) le culot a été resuspendu délicatement dans 600 µl de « nuclei lysis solution » du kit Wizard genomic DNA (proméga) et le microtube a été placé à 80°C pendant 5 minutes. Après refroidissement à température ambiante, 200 µl de « protein precipitation solution » ont été ajoutés et le mélange a été agité par Vortex 30 secondes, puis placé sur glace pendant 5 minutes. Le tube a ensuite été centrifugé (20°C, 13 000 rpm, 5 minutes). Le surnageant a été délicatement prélevé et transféré dans un microtube contenant 600 µl d'isopropanol. Par inversement, le tube a été mélangé jusqu'à apparition d'un précipité blanc. Le tube a été centrifugé (20°C, 13 000 rpm, 5 minutes), l'ADN se trouvant alors au fond du tube a été lavé deux fois à l'éthanol 70%. Le culot a ensuite été séché au Speedvac (Savant™) pendant 10 minutes ou à l'air libre sur la paillasse pendant 1 heure, et repris dans 50 µl de solution RNase I, H<sub>2</sub>O, trisHCl 20 mM pH 7,4 et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Enfin, le tube a été placé à 60°C afin d'aider à la solubilisation de l'ADNg.

### **VI. Evaluation de l'activité catalytique de Bla<sub>Mab</sub>**

#### 1) Extraction de protéines totales

Une culture de bactéries à DO600 connue est centrifugée (4°C, 5 000 rpm, 20 minutes) (Figure 24) ; le culot est repris dans 1 mL de tampon PIPES 2mM pH 6,8 et transféré dans un tube à vis. A partir de cette étape, le tube est maintenu dans la glace. Les cellules sont lysées en utilisant le Fast Prep® deux cycles de 45 secondes à vitesse 6 / 5 minutes sur glace. Le tube est ensuite centrifugé (4°C, 5 000rpm, 20 minutes), l'extrait brut de protéines ainsi récolté est dosé par méthode de Bradford.

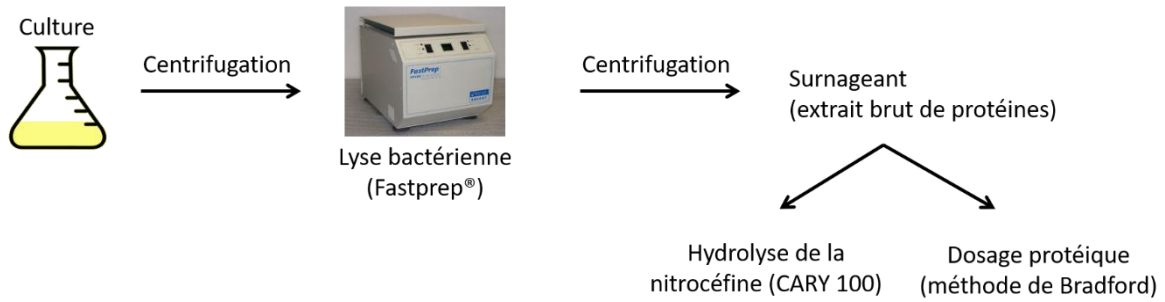


Figure 24. Représentation schématique de la méthodologie appliquée aux cultures de *M. abscessus* pour l'extraction des protéines totales. A partir d'un culot d'une culture de 10 ml, les cellules sont lysées par Fast Prep, le surnageant ainsi obtenu contient les protéines totales solubles. Cet extrait est ensuite dosé par méthode de Bradford et son activité enzymatique est mesurée par suivi de l'hydrolyse de la nitrocéfine au spectrophotomètre.

## 2) Mesure d'activité spécifique

Dans une cuve de spectrophotomètre, 10  $\mu\text{l}$  d'extrait brut de protéines sont incubés en présence de 50 ou 100  $\mu\text{M}$  de nitrocéfine dans un volume final de 200  $\mu\text{L}$ . L'hydrolyse de la nitrocéfine est suivie par spectrophotométrie (CARY 100, Agilent) à 486 nm, 20°C.

A partir de la courbe absorbance à 486 nm en fonction du temps, il est possible de revenir à la concentration en nitrocéfine hydrolysée en fonction du temps grâce à la loi de Beer-Lambert (Figure 25). Nous nous intéressons à la vitesse initiale de la réaction (« a ») qui est obtenue par l'équation de droite de la partie linéaire de la courbe. La vitesse initiale ainsi déterminée est rapportée à la quantité de protéines totales utilisée pour le test ce qui permet d'obtenir l'activité spécifique de l'échantillon en nmol/min/mg.

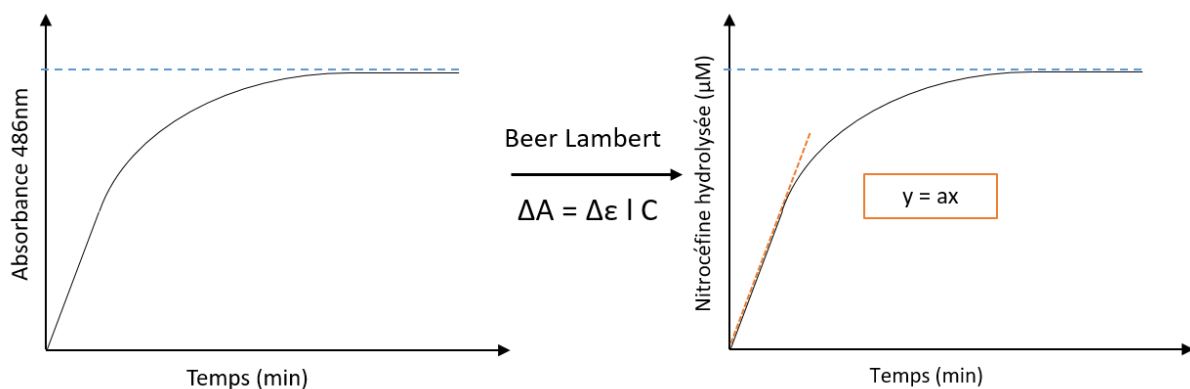


Figure 25. Suivi de l'hydrolyse de la nitrocéfine par spectrophotométrie à 486 nm. Après acquisition des données, la loi de Beer-Lambert permet de tracer la concentration en nitrocéfine hydrolysée en fonction du temps. La vitesse initiale (« a ») est déterminée et rapportée à la quantité de protéines totales utilisée pour obtenir l'activité spécifique de l'échantillon.

### 3) Test d'induction de la production de Bla<sub>Mab</sub>

Pour étudier l'induction de la  $\beta$ -lactamase de *M. abscessus*, 10 ml de culture de *M. abscessus* CIP104536S à DO=0,5 ont été mis en présence de différentes conditions de stress à 37°C sous agitation (Tableau 9). La culture est ensuite centrifugée et l'extrait brut de protéines est obtenu tel qu'expliqué au-dessus et l'activité spécifique déterminée.

Stress	Concentration	Temps d'incubation	Stress	Concentration	Temps d'incubation	Stress	Concentration	Temps d'incubation			
LB + Imipénème	1 µg/ml	48 h	7H9sB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µM	48 h	7H9sB + AMPc	17 mM	3 h			
				30 µM	48 h						
7H9sB + NO	10 µM	48 h		100 µM	48 h	7H9sB + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7 mM	3 h			
	50 µM	48 h		300 µM	48 h						
	100 µM	48 h		1 mM	48 h	7H9 + Glucose	1 g/l	48 h			
LB + ZnSO <sub>4</sub>	10 µM	48 h		7H9sB	-		48 h	3 g/l	48 h		
	30 µM	48 h	LB		-		48 h	5 g/l	48 h		
	100 µM	48 h		7H9sB + pH	6		48 h	10 g/l	48 h		
	300 µM	48 h			6,5	48 h	4,5	3 h			
	1 mM	48 h	LB + CuSO <sub>4</sub>	LB pH	6	48 h	5	3 h			
LB + CuSO <sub>4</sub>	10 µM	48 h					7H9sB + NO	1 mM	3 h	50 µM	48 h
	30 µM	48 h		SCFM	-	48 h				100 µM	48 h
	100 µM	48 h					RPM1c	-	48 h	300 µM	48 h
	300 µM	48 h								1 mM	48 h
	1 mM	48 h		3 mM	48 h	3 mM	48 h				

Tableau 9. Tableau récapitulatif des différentes conditions de stress appliquées aux cultures de *M. abscessus* CIP104536S.

### 4) Caractérisation de l'inhibition de Bla<sub>Mab</sub> par le relebactam

A partir d'une forme soluble de la  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> produite par *E. coli* disponible au laboratoire, l'efficacité d'inhibition du relebactam a été déterminée par le suivi de l'hydrolyse de la nitrocéfine au spectrophotomètre ( $\lambda = 486 \text{ nm}$  ;  $\Delta\epsilon = 15,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). 0,25 nM de Bla<sub>Mab</sub> purifiée a été mis en présence de 100 µM de nitrocéfine et de concentrations croissantes en relebactam (7, 9, 11, 20, 30 et 50 µM) dans du tampon acide 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique 100 mM, pH 6.4. Les paramètres cinétiques ont été déterminés pour une cinétique de réaction réversible en deux étapes. Les paramètres cinétiques obtenus ( $k_2$  et  $k_2/K_i$ ) ont été comparés à ceux de l'avibactam (Ehmann et al., 2012; Soroka et al., 2016).

## VII. Statistiques

Les données ont été analysées par le test statistique de Mann-Withney en utilisant le logiciel EPI info<sup>TM</sup> 7.1.3 (Center of Disease Control and Prevention, Atlanta). La différence entre deux résultats est considérée comme significative lorsque le *P* est inférieur ou égal à 0,05.



## Résultats



# Activités *in vitro* et intracellulaire de nouvelles combinaisons incluant une $\beta$ -lactamine et des inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Le traitement des infections à *M. abscessus* est particulièrement long et peu efficace rendant nécessaire la recherche de traitement optimal. Un des objectifs de mon travail a été d'évaluer *in vitro* et dans un modèle de macrophages infectés de nouvelles combinaisons d'antibiotiques incluant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases.

## I. La rifabutine

Récemment, il a été montré que la rifabutine est active *in vitro* contre *M. abscessus* (Aziz et al., 2017). Lors d'un screening d'une banque de molécules, la CMI de la rifabutine était de 3  $\mu$ M (soit, 2,5  $\mu$ g/ml) contre *M. abscessus* CIP104536. La rifabutine était également active sur des souches cliniques.

Dans ce contexte, j'ai évalué l'intérêt de la combinaison imipénème-rifabutine ainsi que de l'ajout de l'avibactam pour le traitement des infections à *M. abscessus*. Ce travail a été publié dans le journal *Agents and Antimicrobial Chemotherapy* (Le Run et al., 2018) en annexe I.

### 1) Evaluation de l'activité *in vitro*

#### a. Evaluation de l'activité bactériostatique *in vitro*

La CMI de la rifabutine était de 4  $\mu$ g/ml en milieu 7H9sB contre la souche *M. abscessus* CIP104536 S et le mutant  $\Delta bla_{Mab}$  délété du gène codant pour  $Bla_{Mab}$  (Tableau 10). Une recherche de synergie entre l'imipénème et la rifabutine a été effectuée par la technique de l'échiquier. L'imipénème à des concentrations variant de 0,12 à 8  $\mu$ g/ml a été mis en contact avec la rifabutine à des concentrations de 0,25 à 4  $\mu$ g/ml. L'indice FIC de la combinaison était de 0,38 contre *M. abscessus* CIP104536 correspondant à  $\frac{1}{4}$  de la CMI de la rifabutine et  $\frac{1}{8}$  de la CMI de l'imipénème. Contre la souche  $\Delta bla_{Mab}$ , l'indice FIC était de 0,37 correspondant à  $\frac{1}{4}$  de la CMI de la rifabutine et  $\frac{1}{8}$  de la CMI de l'imipénème. Ces indices étant inférieurs à 0,5, la combinaison imipénème-rifabutine a été considérée comme synergique (Figure 26).



	CMI en $\mu\text{g/ml}$	
	Imipénème	Rifabutine
<i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$	2	4
<i>M. abscessus</i> CIP104536	8	4

Tableau 10. Concentration minimale inhibitrice (CMI) en  $\mu\text{g/ml}$  de l'imipénème et de la rifabutine contre les souches *M. abscessus* CIP104536S et *M. abscessus*  $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ . Les CMI ont été déterminées par microdilution en 7H9sB. Les valeurs de CMI sont la médiane de cinq répliques biologiques indépendantes.

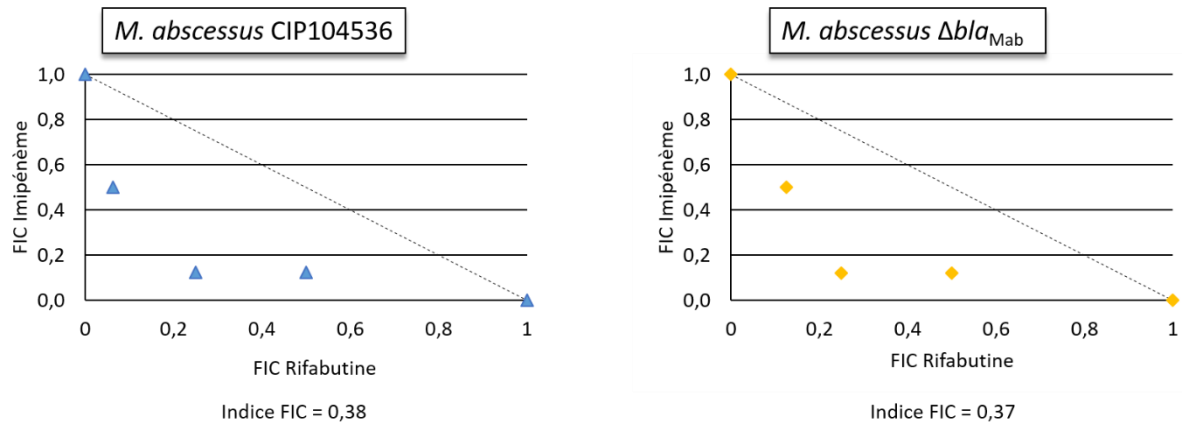


Figure 26. Représentation des FIC de l'association imipénème-rifabutine contre *M. abscessus* CIP104536S et  $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$ . La ligne pointillée représente l'allure d'une association dite non synergique non antagoniste. Chaque point représente le FIC moyen de 5 répliques biologiques indépendantes.

#### b. Evaluation de l'activité bactéricide *in vitro*

L'activité bactéricide de la combinaison imipénème-rifabutine a été évaluée pour deux concentrations en imipénème (8 et 32  $\mu\text{g/ml}$ ) et une concentration de rifabutine (16  $\mu\text{g/ml}$ ) contre les deux souches de *M. abscessus*.  $5.10^6$  UFC ont été mises en contact avec les différents antibiotiques seuls ou en association pendant trois jours. Le nombre d'UFC a été déterminé après 48 et 72 heures d'exposition. Les résultats présentés Figure 27 et Tableau 11 sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

Pour *M. abscessus* CIP104536, en absence de traitement antibiotique, la population bactérienne croît de 3  $\log_{10}$  après 72 heures. La rifabutine n'a qu'un effet bactériostatique. L'imipénème seul permet une diminution de 2 log de la population (4,3 log UFC à 8  $\mu\text{g/ml}$  et 4,5 log UFC à 32  $\mu\text{g/ml}$ ). L'ajout de la rifabutine améliore légèrement l'activité de l'imipénème pour la faible concentration en imipénème (3,7 log UFC vs 4,3 log UFC ;  $P=0.0253$ ). Un antibiotique est défini comme bactéricide lorsqu'il permet une diminution de 3 log de la population bactérienne. Ici, aucune des combinaisons testées n'était donc bactéricide.

Des résultats similaires ont été obtenus sur la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  (Figure 27 et Tableau 12).

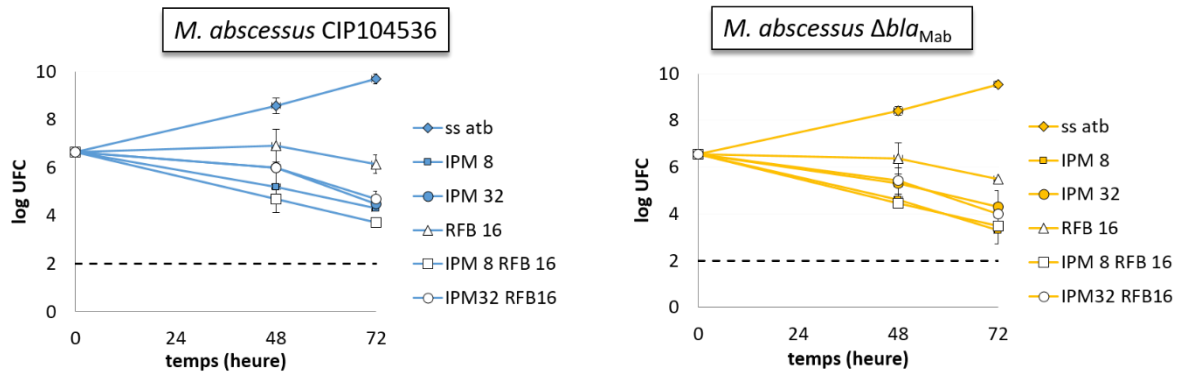


Figure 27. Courbes de bactéricidie de l'imipénème et la rifabutine seuls ou en association contre les souches *M. abscessus* CIP104536S et  $\Delta bla_{Mab}$ . L'imipénème a été testé à 8 et 32  $\mu\text{g/ml}$ , la rifabutine à 16  $\mu\text{g/ml}$ . L'imipénème a été rajouté tous les 24 heures pour compenser son hydrolyse spontanée. Sont représentés ici les log d'unités formant des colonies (UFC) énumérées à 48 et 72 heures. Les valeurs sont les moyennes de trois répliques indépendants, les barres représentent les écart-types. atb = antibiotique.

		<i>P</i> value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)					
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 16	IPM 8 RFB 16	IPM 32 RFB 16
		9,7	4,3	4,5	6,1	3,7	4,7
ss Atb	9,7	NA	0,0262	0,0262	0,0262	0,0262	0,0262
IPM 8	4,3		NA	0,0339	0,0262	0,0253	0,4867
IPM 32	4,5			NA	0,0308	0,0339	0,8248
RFB 16	6,1				NA	0,0262	0,0323
IPM 8 RFB 16	3,7					NA	0,0369
IPM 32 RFB 16	4,7						NA

Tableau 11. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32  $\text{g/ml}$  et de la rifabutine (RFB) à 16  $\mu\text{g/ml}$  seul ou en association contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les  $\text{Log}_{10}$  des UFC/mL après 72 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable.

Atb =  
antibiotique.

		<i>P</i> value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)					
		ss Atb	IPM 8	IPM32	RFB 16	IPM8 RFB16	IPM32 RFB16
		9,2	4,0	4,7	5,5	4,1	4,1
ss Atb	9,2	N.A	0,0025	0,016	0,0017	0,0025	0,0157
IPM 8	4,0		N.A	0,5962	0,0025	0,2539	0,4308
IPM 32	4,7			N.A	0,0384	0,7928	0,0463
RFB 16	5,5				N.A	0,0027	0,0157
IPM8 RFB16	4,1					N.A	0,4288
IPM32 RFB16	4,1						N.A

Tableau 12. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32  $\text{g/ml}$  et de la rifabutine (RFB) à 16  $\mu\text{g/ml}$  seul ou en association contre la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ . Les  $\text{Log}_{10}$  des UFC/mL après 72 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

## 2) Evaluation de l'activité intracellulaire

La concentration maximale sérique de la rifabutine peut atteindre 0,7 µg/ml pour une dose de 600 mg administrée par voie orale (van Ingen et al., 2012; Skinner et al., 1989). Cet antibiotique s'accumule 9 à 11 fois dans les macrophages (Van der Auwera et al., 1988) et jusqu'à 6,8 fois dans les tissus pulmonaires (Blaschke and Skinner, 1996). Nous avons donc décidé de tester trois concentrations en rifabutine (1, 8 et 16 µg/ml) correspondant à aux concentrations sériques, pulmonaires et intracellulaires.

Sans traitement, la population intracellulaire de *M. abscessus* CIP104536 augmente d'un facteur (défini par le fold change, FC) de 130 en 48 heures (Figure 28 et Tableau 13). La rifabutine ne permet qu'une légère diminution de cette population avec un effet dose dépendant. L'imipénème a une meilleure activité que la rifabutine. Lorsqu'on augmente la concentration en imipénème de 8 à 32 µg/ml, la population intracellulaire diminue de façon importante (FC de 1,8 à 0,71,  $P=0,01$ ). L'ajout de rifabutine à 8 ou à 16 µg/ml augmente l'efficacité de l'imipénème à 8 µg/ml. Pour de fortes concentrations en imipénème (32 µg/ml), seul l'ajout de 16 µg/ml de rifabutine permet d'améliorer l'activité (FC de 0,71 à 0,02,  $P=0,004$ ). La combinaison permettant la plus forte réduction de la population bactérienne est l'imipénème à 32 µg/ml combiné à la rifabutine 16 µg/ml pour laquelle on obtient 98% de réduction de la population bactérienne.

Ces différentes combinaisons ont aussi été testées sur des macrophages infectés par la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ . (Figure 28 et Tableau 14).

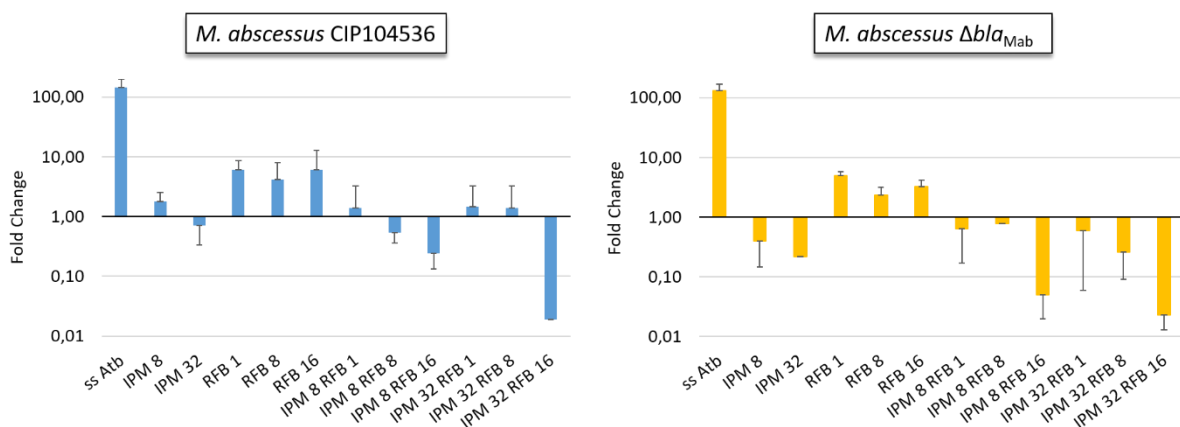


Figure 28. Activité intracellulaire de l'imipénème (8 ou 32 µg/ml) et de la rifabutine (1, 8 ou 16 µg/ml) seuls ou en association contre *M. abscessus* CIP104536S et  $\Delta bla_{Mab}$ . Des macrophages infectés ont été traités pendant 48 heures. Chaque 24 heures le milieu de culture avec ou sans antibiotiques a été renouvelé. Est représenté sur ce graphique le « fold change », c'est-à-dire le ratio de bactéries intracellulaires à J2 par

rapport au nombre de bactéries intracellulaires à J0. Les valeurs sont les moyennes de trois réplicas indépendants, les barres représentent les écart-types. Atb = antibiotique.

		P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)											
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 1	RFB 8	RFB 16	IPM 8 RFB 1	IPM 8 RFB 8	IPM 8 RFB 16	IPM 32 RFB 1	IPM 32 RFB 8	IPM 32 RFB 16
		134.00	1.7	0.44	6.12	4.23	6.1	1.39	0.54	0.22	1.45	1.38	0.01
ss Atb	134.00	N.A	0.0039	0.0039	0.0201	0.0196	0.0039	0.0201	0.0201	0.0039	0.0201	0.0201	0.0037
IPM 8	1.7		N.A	0.0104	0.0201	0.0196	0.025	0.4386	0.0201	0.0039	0.4386	0.4386	0.0037
IPM 32	0.44			N.A	0.0201	0.0196	0.0201	0.6056	0.6973	0.0081	1	1	0.0037
RFB 1	6.12				N.A	0.2683	0.8273	0.0495	0.0495	0.0201	0.0495	0.0495	0.0181
RFB 8	0.71					N.A	0.2997	0.2683	0.0463	0.0196	0.2683	0.2683	0.0176
RFB 16	6.1						N.A	0.1539	0.0201	0.0039	0.1539	0.1539	0.0037
IPM 8 RFB 1	1.39							N.A	0.5127	0.1182	1	1	0.0181
IPM 8 RFB 8	0.54								N.A	0.0201	0.6579	0.8273	0.0181
IPM 8 RFB 16	0.22									N.A	0.3017	0.4386	0.0037
IPM 32 RFB 1	1.45										N.A	0.6579	0.0181
IPM 32 RFB 8	1.38											N.A	0.0356
IPM 32 RFB 16	0.01												N.A

Tableau 13. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 g/ml et de la rifabutine (RFB) à 1, 8 ou 16 µg/ml seul ou en association contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les « fold change » après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique

		P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)											
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 1	RFB 8	RFB 16	IPM 8 RFB 1	IPM 8 RFB 8	IPM 8 RFB 16	IPM 32 RFB 1	IPM 32 RFB 8	IPM 32 RFB 16
		233.50	0.39	0.17	4.99	2.34	3.65	0.64	0.78	0.07	0.59	0.26	0.02
ss Atb	233.50	N.A	0.0039	0.0039	0.0196	0.0039	0.0019	0.0201	0.0201	0.0039	0.0201	0.0196	0.0039
IPM 8	0.39		N.A	0.1269	0.0196	0.0201	0.0019	0.5169	0.7963	0.005	0.6056	0.2935	0.0039
IPM 32	0.17			N.A	0.0191	0.0196	0.0019	0.0695	0.1948	0.0761	0.2997	0.4347	0.0061
RFB 1	4.99				N.A	0.5066	0.0244	0.0463	0.0463	0.0196	0.0463	0.0431	0.0196
RFB 8	2.34					N.A	0.1512	0.0495	0.1266	0.0201	0.0495	0.0463	0.0201
RFB 16	3.65						N.A	0.0143	0.0247	0.0019	0.0143	0.0141	0.0019
IPM 8 RFB 1	0.64							N.A	0.5127	0.0201	0.8273	0.1046	0.0201
IPM 8 RFB 8	0.78								N.A	0.0201	0.8273	0.8248	0.0201
IPM 8 RFB 16	0.07									N.A	0.0389	0.0198	0.335
IPM 32 RFB 1	0.59										N.A	0.2683	0.0201
IPM 32 RFB 8	0.26											N.A	0.0196
IPM 32 RFB 16	0.02												N.A

Tableau 14. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 g/ml et de la rifabutine (RFB) à 16 µg/ml seul ou en association contre la souche *M. abscessus*  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub>. Les « fold change » après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique

La rifabutine seule a le même effet sur les deux souches quelle que soit la concentration utilisée. L'imipénème à 8 µg/ml a une meilleure activité sur le FC du mutant  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub> par rapport à la souche sauvage (FC de 0,34 vs 1,7  $P=0,0495$ ) témoignant de l'impact de la production de la  $\beta$ -lactamase sur l'activité de l'imipénème. Contre *M. abscessus*  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub>, la combinaison la plus efficace est l'association d'imipénème à 32 µg/ml avec la rifabutine à 16 µg/ml qui entraîne une diminution de 98% de la population intracellulaire. Il est à noter que cette diminution est la même pour les deux souches de *M. abscessus*.

### 3) Effet de l'ajout de l'avibactam

Pour une concentration faible d'imipénème (8 µg/ml,) qui est facilement atteignable dans le sérum des patients (Bernabeu-Wittel et al., 2005) la production de Bla<sub>Mab</sub> a un impact sur la faible activité de l'antibiotique (cf supra). L'avibactam étant un inhibiteur de Bla<sub>Mab</sub>, nous avons évalué

l'intérêt d'ajouter l'avibactam à l'association imipénème-rifabutine sur la souche *M. abscessus* CIP104536.

*In vitro* l'avibactam diminuait la CMI de l'imipénème jusqu'à atteindre la CMI de l'imipénème sur la souche  $\Delta bla_{Mab}$  (Tableau 15).

	CMI en $\mu\text{g/ml}$	
	imipénème	
	seul	avibactam 4 $\mu\text{g/ml}$
<i>M. abscessus</i> CIP104536	8	2
<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$	2	-

Tableau 15. CMI en  $\mu\text{g/ml}$  de l'imipénème seul ou en combinaison avec l'avibactam à 4  $\mu\text{g/ml}$  contre *M. abscessus* CIP104536S en milieu 7h9sB. Les valeurs de CMI sont la médiane de cinq répliques biologiques indépendants.

L'activité bactéricide a été évaluée comme précédemment (Figure 29 et Tableau 16). L'ajout de l'avibactam à l'imipénème seul ne modifie pas le nombre de UFC après 72 heures de traitement. Il en est de même pour la combinaison imipénème-rifabutine. L'addition d'avibactam ne permet pas à l'association imipénème-rifabutine de devenir bactéricide.

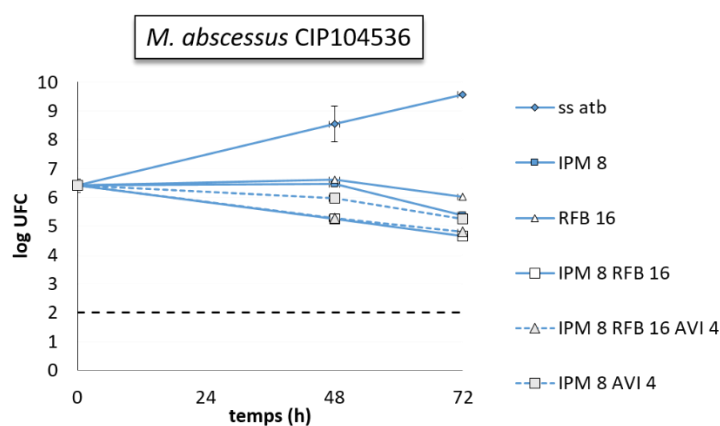


Figure 29. Effet de l'avibactam à 4  $\mu\text{g/ml}$  sur l'activité bactéricide de l'imipénème (8  $\mu\text{g/ml}$ ) seul ou en association avec la rifabutine (16  $\mu\text{g/ml}$ ) contre *M. abscessus* CIP104536. L'imipénème a été rajouté tous les 24 heures pour compenser son hydrolyse spontanée. Sont représentés ici les Log<sub>10</sub> d'unités formant des colonies énumérées à 48 et 72 heures. Les valeurs sont les moyennes de trois répliques indépendants, les barres représentent les écart-types. Atb = antibiotique.

		<i>P</i> value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)					
		ss Atb	IPM 8	RFB 16	IPM 8 RFB 16	IPM 8 AVI 4	IPM 8 RFB 16 AVI 4
		9,6	5,4	6,0	4,7	4,8	5,3
ss Atb	9,6	NA	0,0463	0,0463	0,0463	0,0463	0,0463
IPM 8	5,4		NA	0,0431	0,0431	0,0431	0,0431
RFB 16	6,0			NA	0,0431	0,0431	0,0431
IPM 8 RFB 16	4,7				NA	0,0431	0,0431
IPM 8 AVI 4	4,8					NA	0,0431
IPM 8 RFB 16 AVI 4	5,3						NA

Tableau 16. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 µg/ml et de la rifabutine (RFB) à 16 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 4 µg/ml contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les  $\text{Log}_{10}$  des UFC/mL après 72 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

Enfin, l'impact de l'addition de l'avibactam a été testé dans le modèle d'infection de macrophages. (Figure 30 et Tableau 17) En effet, il avait précédemment montré dans le laboratoire que l'ajout de l'avibactam améliorerait l'activité de l'imipénème sur les bactéries intracellulaires de *M. abscessus* (Lefebvre et al., 2017). Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec ces observations, puisque la combinaison imipénème (8 µg/ml)-avibactam (16 µg/ml) permet un FC de 0,59 contre 1,23 pour l'imipénème seul ( $P=0,011$ ). En revanche, l'ajout de l'avibactam à la combinaison imipénème (8 µg/ml)-rifabutine n'améliore pas significativement l'activité de la combinaison pour les deux concentrations de rifabutine testées (1 et 8 µg/ml). Toutefois, la combinaison la plus active était la triple combinaison Imipénème à 8 µg/ml plus rifabutine à 1 µg/ml et avibactam à 16 µg/ml qui permet une réduction de 78% de la population intracellulaire.

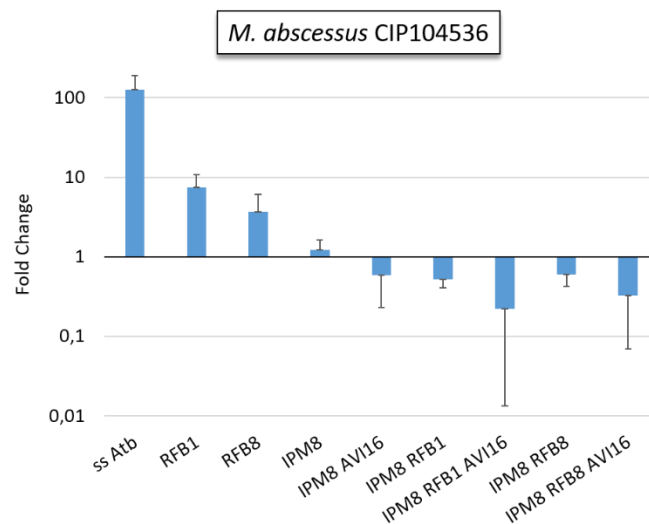


Figure 30. Effet de l'ajout de l'avibactam sur l'activité intracellulaire de la combinaison imipénème (8 µg/ml) – rifabutine (1 ou 8 µg/ml) contre *M. abscessus* CIP104536S. Les valeurs sont les moyennes de trois réplicas indépendants, les barres représentent les écart-types. Atb = antibiotique.

		<i>P value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)</i>								
		ss Atb	IPM 8	RFB 1	RFB 8	IPM 8 RFB 1	IPM8 RFB8	IPM 8 AVI 16	IPM 8 RFB 1 AVI 16	IPM 8 RFB 8 AVI 16
		125	1,23	7,48	3,65	0,52	0,6	0,59	0,22	0,33
ss Atb	125	NA	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
IPM 8	1,23		NA	0,0495	0,2752	0,0495	0,0495	0,011	0,0495	0,0495
RFB 1	7,48			NA	0,1266	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
RFB 8	3,65				NA	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
IPM 8 RFB 1	0,52					NA	0,6579	0,5127	0,1266	0,2752
IPM 8 RFB 8	0,6						NA	0,8273	0,0495	0,2752
IPM 8 AVI	0,59							NA	0,2752	0,2752
IPM 8 RFB 1 AVI 16	0,22								NA	0,5127
IPM 8 RFB 8 AVI 16	0,33									NA

Tableau 17. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 µg/ml et de la rifabutine (RFB) à 1 ou 8 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

## II. Le tédizolide

Récemment il a été montré que le tédizolide, un nouveau oxazolidinone, est actif *in vitro* contre des souches cliniques de *M. abscessus* (Compain et al., 2018). J'ai donc évalué l'intérêt d'associer le tédizolide à l'imipénème sur *M. abscessus*. Ce travail a été publié dans le journal *Agents and Antimicrobial Chemotherapy* (Le Run et al., 2019) en annexe II.

### 1) Evaluation de l'activité *in vitro*

#### a. Evaluation de l'activité bactériostatique *in vitro*

La CMI du tédizolide contre la souche *M. abscessus* CIP104536 et le mutant *M. abscessus*  $\Delta bla_{\text{Mab}}$  est de 4 µg/ml. L'imipénème et le tédizolide ont ensuite été testés par la technique de l'échiquier en faisant varier l'imipénème de 0,12 à 8 µg/ml et le tédizolide de 0,25 à 4 µg/ml. L'index FIC de la combinaison contre *M. abscessus* CIP104536 est de 0,41 obtenu pour ¼ de la CMI de l'imipénème et ⅛ de la CMI du tédizolide. Pour *M. abscessus*  $\Delta bla_{\text{Mab}}$  l'index FIC est de 0,38 en combinant ¼ de la CMI de l'imipénème avec ⅛ de la CMI du tédizolide. Ces indices étant inférieurs à 0,5, la combinaison imipénème-tédizolide a été considérée comme synergique sur les deux souches.

#### b. Evaluation de l'activité bactéricide *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet bactéricide *in vitro* de la combinaison imipénème-tédizolide, *M. abscessus* CIP104536 a été exposé à du tédizolide à 2 µg/ml correspondant à la concentration maximale atteignable dans le sang après une prise orale de 200 mg (Housman et al., 2012). A cette concentration, le tédizolide n'a qu'une activité bactériostatique (Figure 31 et Tableau 18). L'imipénème à 8 µg/ml permet une diminution de 0,7 Log<sub>10</sub> UFC de la population bactérienne après 72 heures de traitement. L'ajout du tédizolide n'améliore pas l'activité de l'imipénème (5,5 Log<sub>10</sub>



UFC vs 5,2 Log<sub>10</sub> UFC après 72h,  $P=0,0495$ ). L'absence de Bla<sub>Mab</sub> ne modifie pas l'activité de l'imipénème et du tédzolide. (Figure 31 et Tableau 19)

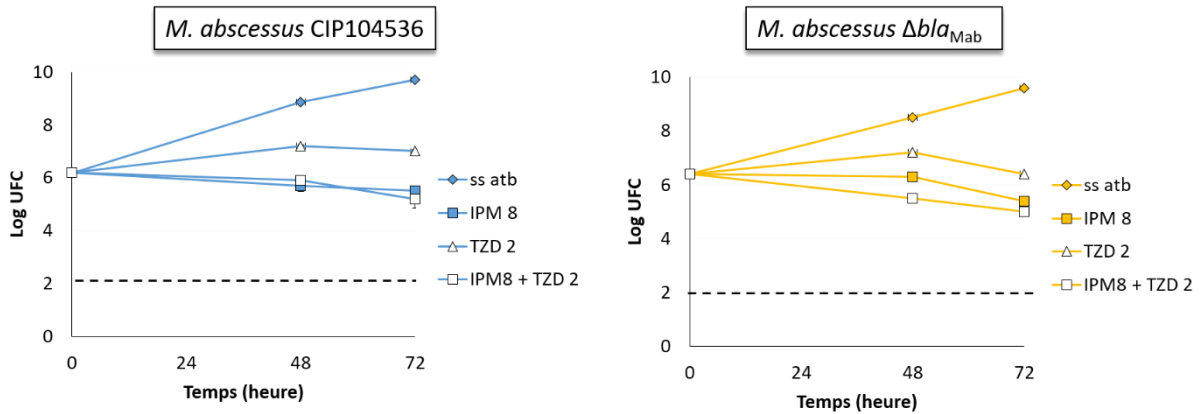


Figure 31. Activité bactéricide de l'imipénème et du tédzolide seul ou en association contre *M. abscessus* CIP104536 et  $\Delta bla_{Mab}$ . L'imipénème a été ajouté toutes les 24 heures. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres représentent les écart-types. atb = antibiotique.

		<i>P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)</i>			
		ss Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2
		9,7	7,0	5,5	5,2
ss Atb	9,7	NA	0,0495	0,0495	0,0495
TZD 2	7,0		NA	0,0495	0,0495
IPM 8	5,5			NA	0,0495
IPM 8 TZD 2	5,2				NA

Tableau 18. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 µg/ml et du tédzolide (TZD) à 2 µg/ml seul ou en association contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les Log<sub>10</sub> UFC/ml après 72 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

		<i>P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)</i>			
		ss Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2
		10	6,4	5,4	5,0
ss Atb	10	NA	0,0495	0,0495	0,0495
TZD 2	6,4		NA	0,0495	0,0495
IPM 8	5,4			NA	0,0495
IPM 8 TZD 2	5,0				NA

Tableau 19. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 µg/ml et du tédzolide (TZD) à 2 µg/ml seul ou en association contre la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ . Les Log<sub>10</sub> UFC/ml après 72 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.



## 2) Evaluation de l'activité intracellulaire

En l'absence de traitement antibiotique, la population bactérienne croît au sein des macrophages, d'un FC de 143 par rapport à la quantité de bactéries initialement présentes dans les cellules (J0) (Figure 32 et Tableau 20).

Le tédizolide ne permet qu'une faible diminution de la population bactérienne (FC de 6,85 vs 143,5 ;  $P=0,0495$ ). L'imipénème diminue la charge bactérienne d'une manière dose dépendante (imipénème à 8  $\mu\text{g/ml}$ , FC de 1,75,  $P=0,0495$  ; imipénème à 32  $\mu\text{g/ml}$ , FC de 0,74,  $P=0,0495$ ). L'imipénème à 32  $\mu\text{g/ml}$  entraîne donc la mort des bactéries. L'ajout du tédizolide améliore l'activité de l'imipénème pour une faible concentration d'imipénème (8  $\mu\text{g/ml}$ , FC de 0,1 vs 1,75,  $P=0,0495$ ). Pour l'imipénème à 32  $\mu\text{g/ml}$ , la combinaison avec le tédizolide diminue encore la population bactérienne, bien que la différence ne soit pas statistiquement significative (FC de 0,75 vs 0,21,  $P=0,0765$ ).

Sur la souche  $\Delta bla_{\text{Mab}}$ , l'absence de la  $\beta$ -lactamase ne modifie pas l'activité du tédizolide seul (FC de 6,85 vs 14,27,  $P=0,7237$ ). En revanche, on observe une nette différence pour l'imipénème aux deux concentrations testées (FC de 1,75 vs 0,17 ;  $P=0,0339$  et FC de 0,74 vs 0,14 ;  $P=0,0339$ ) confirmant l'impact de  $Bla_{\text{Mab}}$  sur l'activité de l'imipénème. Lorsque l'on combine l'imipénème à 8  $\mu\text{g/ml}$  et le tédizolide, la différence d'activité de l'association sur la souche *M. abscessus* CIP104536 et le mutant *M. abscessus*  $\Delta bla_{\text{Mab}}$  n'est plus significative (FC de 0,10 vs 0,05 ;  $P=0,3758$ ) (Figure 32 et Tableau 21).

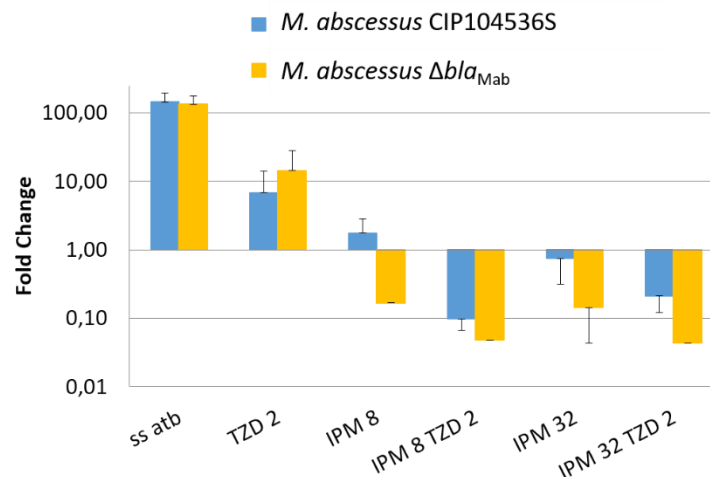


Figure 32. Activité intracellulaire de l'imipénème (8 ou 32  $\mu\text{g/ml}$ ) et du tédizolide (2  $\mu\text{g/ml}$ ) seuls ou en association contre *M. abscessus* CIP104536S et  $\Delta bla_{\text{Mab}}$ . Des macrophages infectés ont été traités pendant 48 heures. Chaque 24 heures le milieu de culture avec ou sans antibiotiques a été renouvelé. Les valeurs sont les moyennes de trois réplicas indépendants, les barres représentent les écart-types. atb = antibiotique.

		<i>P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)</i>					
		ss Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2	IPM 32	IPM 32 TZD 2
		143,48	6,85	1,75	0,10	0,74	0,21
ss Atb	143,48	NA	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
TZD 2	6,85		NA	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
IPM 8	1,75			NA	0,0495	0,1266	0,0495
IPM 8 TZD 2	0,10				NA	0,0495	0,1266
IPM 32	0,74					NA	0,0765
IPM 32 TZD 2	0,21						NA

Tableau 20. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 g/ml et de la tédizolide (TZD) à 2 µg/ml seul ou en association contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

		<i>P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)</i>					
		ss Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2	IPM 32	IPM 32 TZD 2
		134,10	14,27	0,17	0,05	0,14	0,04
ss Atb	134,10	NA	0,0209	0,0209	0,0339	0,0209	0,0209
TZD 2	14,27		NA	0,0209	0,0339	0,0209	0,0209
IPM 8	0,17			NA	0,2118	0,8845	0,1489
IPM 8 TZD 2	0,05				NA	0,1573	1
IPM 32	0,14					NA	0,1489
IPM 32 TZD 2	0,04						NA

Tableau 21. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 g/ml et de la tédizolide (TZD) à 2 µg/ml seul ou en association contre la souche *M. abscessus*  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub>. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

### 3) Effet de l'ajout de l'avibactam

Dans la mesure où la production de  $\beta$ -lactamase a un impact sur l'efficacité de l'imipénème, nous avons évalué l'apport de l'avibactam pour l'association imipénème-tédizolide (Figure 33 et Tableau 22). L'avibactam améliore l'activité de l'imipénème seul et de l'association imipénème-tédizolide. La triple combinaison imipénème-tédizolide-avibactam est la plus efficace, permettant une diminution de 97% de la population bactérienne intracellulaire.

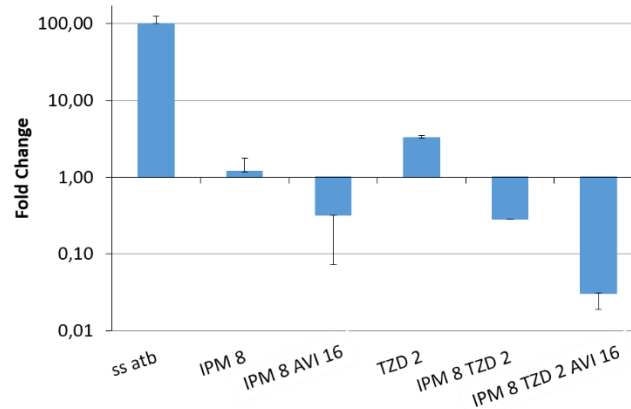


Figure 33. Effet de l'avibactam sur l'activité intracellulaire de l'imipénème et de la combinaison imipénème-tédizolide contre *M. abscessus* CIP104536S. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes. atb = antibiotique.

		P value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)								
		ss Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 AVI	IPM 8 TZD 2	IPM 8 TZD 2 AVI	IPM 32	IPM 32 TZD 2	IPM 32 TZD 2 AVI
		100,00	3,23	1,17	0,32	0,28	0,03	0,63	0,29	0,17
ss Atb	100	NA	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
TZD 2	3,23		NA	0,0495	0,1266	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
IPM 8	1,17			NA	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
IPM 8 AVI	0,32				NA	0,0495	0,0495	0,8273	0,1266	0,0495
IPM 8 TZD 2	0,28					NA	0,0495	0,5127	0,1266	0,0495
IPM 8 TZD 2 AVI	0,03						NA	0,1266	0,8273	0,3758
IPM 32	0,63							NA	0,1266	0,0495
IPM 32 TZD 2	0,29								NA	0,1266
IPM 32 TZD 2 AVI	0,17									NA

Tableau 22. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32  $\mu\text{g/ml}$  et du tédizolide (TZD) à 2  $\mu\text{g/ml}$  seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16  $\mu\text{g/ml}$  contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

#### 4) Effet de l'ajout de la rifabutine

Puisque nous avons montré dans le travail précédent que la rifabutine améliorait l'activité de l'association imipénème-avibactam, nous avons évalué l'impact de l'ajout de la rifabutine (1  $\mu\text{g/ml}$ ) à la combinaison imipénème 8  $\mu\text{g/ml}$ , tédizolide 2  $\mu\text{g/ml}$  et avibactam 16  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 34 et Tableau 23).

L'ajout de la rifabutine à 1  $\mu\text{g/ml}$  améliorait statistiquement l'activité de la combinaison imipénème-tédizolide-avibactam (diminution de la population d'un facteur 0,09 vs 0,39  $P=0,05$ ). En revanche, l'augmentation de la concentration en rifabutine à 8  $\mu\text{g/ml}$  n'améliorait pas l'activité de l'association (0,14 vs 0,39  $P=0,1266$ ).

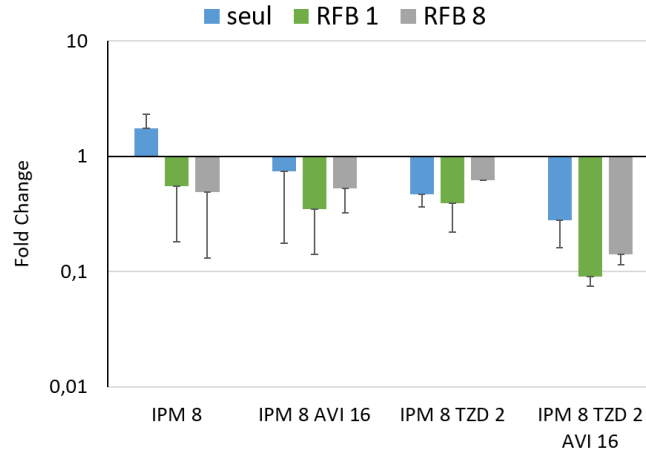


Figure 34. Impact de l'addition de la rifabutine à la triple combinaison imipénème-tédizolide-avibactam contre *M. abscessus* CIP104536S cultivés en intracellulaire. Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes. Les barres représentent les écart-types.

		P value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)															
		ss Atb	RFB 1	RFB 8	TZD 2	IPM 8	IPM 8 AVI	IPM 8 TZD 2	IPM 8 TZD 2 AVI	IPM 8 RFB 1	IPM 8 RFB 1 AVI	IPM 8 RFB 1 TZD 2	IPM 8 RFB 1 TZD 2 AVI	IPM 8 RFB 8	IPM 8 RFB 8 AVI	IPM 8 RFB 8 TZD 2	IPM 8 RFB 8 TZD 2 AVI
		92.95	5.19	5.30	5.43	1.75	0.74	0.47	0.28	0.55	0.35	0.39	0.09	0.49	0.53	0.62	0.14
ss Atb	92.95	NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
RFB 1	5.19		NA	0.8273	0.8273	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
RFB 8	5.30			NA	1	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TZD 2	5.43				NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8	1.75					NA	0.1266	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8 AVI	0.74						NA	0.5127	0.2752	0.5127	0.2752	0.0495	0.6579	0.8273	0.6579	0.0495	
IPM 8 TZD 2	0.47							NA	0.1266	0.8273	0.5127	0.0495	0.5127	0.5127	0.5127	0.0495	
IPM 8 TZD 2 AVI	0.28								NA	0.2752	0.5127	0.8273	0.0495	0.5127	0.5127	0.8273	0.1266
IPM 8 RFB 1	0.55									NA	0.2752	0.5127	0.0495	0.8273	0.8273	0.8273	0.0495
IPM 8 RFB 1 AVI	0.55										NA	0.8273	0.0495	0.5127	0.5127	0.8273	0.5127
IPM 8 RFB 1 TZD 2	0.39											NA	0.0495	0.8273	0.8273	0.5127	0.2752
IPM 8 RFB 1 TZD 2 AVI	0.09												NA	0.2752	0.5127	0.0495	0.0495
IPM 8 RFB 8	0.49													NA	0.8273	0.8273	0.5127
IPM 8 RFB 8 AVI	0.53														NA	0.8273	0.5127
IPM 8 RFB 8 TZD 2	0.62															NA	0.0495
IPM 8 RFB 8 TZD 2 AVI	0.14																NA

Tableau 23. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 µg/ml et du tédzolide (TZD) à 2 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml et la rifabutine (RFB) à 1 ou 8 g/ml contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

##### 5) Effet de la rifabutine et du tédzolide sur l'activité $\beta$ -lactamase

La rifabutine étant un inhibiteur de l'ARN polymérase, une diminution de la quantité de Bla<sub>Mab</sub> pourrait expliquer l'augmentation de l'activité de la combinaison imipénème-avibactam en présence de rifabutine. Le tédzolide agit en bloquant l'ARN 23S de la sous-unité 50S, empêchant ainsi la formation du ribosome (Burdette and Trotman, 2015). La diminution de la synthèse protéique globale pourrait aussi signifier la diminution de la synthèse de Bla<sub>Mab</sub> et donc expliquer une meilleure activité de l'imipénème et de la combinaison imipénème-avibactam en présence de tédzolide.

Afin de vérifier cette hypothèse, *M. abscessus* CIP104536 a été cultivé dans 10 ml de 7H9sB en présence de concentration sub-inhibitrice de tédzolide (1 ou 2 µg/ml) ou de rifabutine (1 ou 2

$\mu\text{g/ml}$ ). Après 48 heures de croissance, les protéines totales ont été extraites, dosées et l'activité  $\beta$ -lactamase de l'extrait a été testée en utilisant la nitrocéfine comme substrat. Sans traitement, l'extrait total de protéines hydrolyse 46 nmol de nitrocéfine par minute par mg d'extrait brut. La rifabutine ne modifie pas l'activité des extraits. En revanche, la présence de tédizolide lors de la croissance entraîne une diminution statistiquement significative de l'activité de l'extrait (de 46 à 26 ou 13 nmol/min/mg). Ce résultat suggère une baisse de la production de la  $\beta$ -lactamase active dans l'extrait en présence de tédizolide (Figure 35 et Tableau 24).

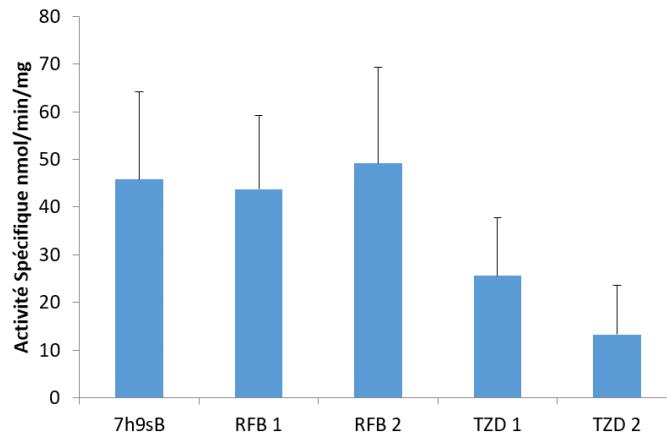


Figure 35. Activité spécifique d'extraits bruts de protéines de 10 ml de culture de *M. abscessus* CIP104536S dans du milieu 7H9sB contenant de la rifabutine (1 ou 2  $\mu\text{g/ml}$ ) ou du tédizolide (1 ou 2  $\mu\text{g/ml}$ ).

		<i>P</i> value des comparaisons indiquées (test de Mann-Withney)				
		ss Atb	RFB 1	RFB 2	TZD 1	TZD 2
		46	44	49	26	13
ss Atb	46	N.A	0.754	0.4647	0.0472	0.0283
RFB 1	44		N.A	0.9188	0.0472	0.0283
RFB 2	49			N.A	0.0283	0.009
TZD 1	26				N.A	0.1172
TZD 2	13					N.A

Tableau 24. Analyse statistique des activités spécifiques des extraits bruts de protéines à partir de culture de *M. abscessus* cultivé en présence ou absence d'antibiotique. *M. abscessus* est cultivé en 7h9sB en présence de rifabutine (RFB) à 1 ou 2  $\mu\text{g/ml}$  ou de tédizolide (TZD) à 1 ou 2  $\mu\text{g/ml}$ . Après 48 heures, les cultures sont lysées et les extraits bruts de protéines sont obtenus (cf matériel & méthodes). Les valeurs d'activités spécifiques sont les moyennes de cinq expériences indépendantes et sont données en nmol/min/mg. Atb = antibiotique.

### III. Nouvel inhibiteur de $\beta$ -lactamase : le relebactam

Jusqu'à présent, nos travaux ont montré que l'avibactam pourrait être considéré dans le traitement des infections à *M. abscessus* du fait de sa capacité à inhiber efficacement Bla<sub>Mab</sub> ainsi qu'à améliorer l'activité de toutes les combinaisons testées *in vitro* et en particulier dans le modèle

macrophage (Dubée et al., 2015; Le Run et al., 2018, 2019; Lefebvre et al., 2017). Cependant, l'avibactam n'est commercialisé qu'en association avec la ceftazidime qui n'a aucune activité sur *M. abscessus* (Dubée et al., 2014). Le relebactam, un nouvel inhibiteur de la famille des DBO, est commercialisé en association avec l'imipénème, qui est une des deux  $\beta$ -lactamines recommandées pour le traitement des infections à *M. abscessus*. Nous avons donc évalué l'activité de l'association imipénème-relebactam *in vitro* et dans le modèle macrophage et comparé cette activité à celle de l'association imipénème-avibactam. Ce travail fait l'objet d'un article accepté dans le Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Annexe III).

### 1) Activité *in vitro* de l'imipénème et de l'amoxicilline en association avec le relebactam

L'addition du relebactam à l'amoxicilline permet une diminution importante de la CMI (de > 256  $\mu\text{g/ml}$  à 4  $\mu\text{g/ml}$ ) sur *M. abscessus* CIP104536 (Tableau 25). L'effet du relebactam sur l'activité de l'imipénème est plus limité (diminution d'un facteur 2). Par comparaison avec l'avibactam, le relebactam permet une diminution de CMI d'une dilution inférieure pour les deux  $\beta$ -lactamines testées.

	CMI en $\mu\text{g/ml}$	
	<i>M. abscessus</i> CIP104536S	<i>M. abscessus</i> $\Delta\text{bla}_{\text{Mab}}$
seul	> 256	8
amoxicilline + relebactam	32	N.D
+ avibactam	16	N.D
seul	8	2
imipénème + relebactam	4	N.D
+ avibactam	2	N.D

Tableau 25. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'amoxicilline et de l'imipénème en présence de relebactam (4  $\mu\text{g/ml}$ ) ou d'avibactam (4  $\mu\text{g/ml}$ ). Les résultats présentés sont les médianes de cinq expériences indépendantes.

### 2) Activité bactéricide *in vitro*

L'activité bactéricide de l'imipénème à 8  $\mu\text{g/ml}$  et 32  $\mu\text{g/ml}$  seul ou en combinaison avec l'avibactam ou le relebactam a été évaluée (Figure 36 et Tableau 26). Comme trouvé dans les travaux antérieurs, l'imipénème à 8  $\mu\text{g/ml}$  n'a un effet que bactériostatique (diminution de 0,7  $\text{Log}_{10}$  du nombre de UFC). L'augmentation de la concentration en imipénème permet une augmentation modeste de son activité (réduction de 1,3  $\text{Log}_{10}$  ;  $P=0,27$  par rapport à imipénème à 8  $\mu\text{g/ml}$ ). L'ajout du relebactam ne permet pas d'améliorer significativement l'activité de l'imipénème (imipénème 8  $\mu\text{g/ml}$  : 5,56  $\text{Log}_{10}$  vs 5,05  $\text{Log}_{10}$ ,  $P=0,1840$  ; imipénème 32  $\mu\text{g/ml}$  : 4,98  $\text{Log}_{10}$  vs 4,55  $\text{Log}_{10}$ ,

$P=0,2752$ ). L'avibactam en association avec l'imipénème présente une activité similaire à celle de l'association imipénème-relebactam (imipénème 8  $\mu\text{g/ml}$ -relebactam : 5,05 vs 4,88  $\text{Log}_{10}$  pour imipénème-avibactam,  $P=0,5127$  ; imipénème 32  $\mu\text{g/ml}$ - relebactam : 4,55 vs 4,26  $\text{Log}_{10}$  pour imipénème-avibactam,  $P=0,5127$ ).

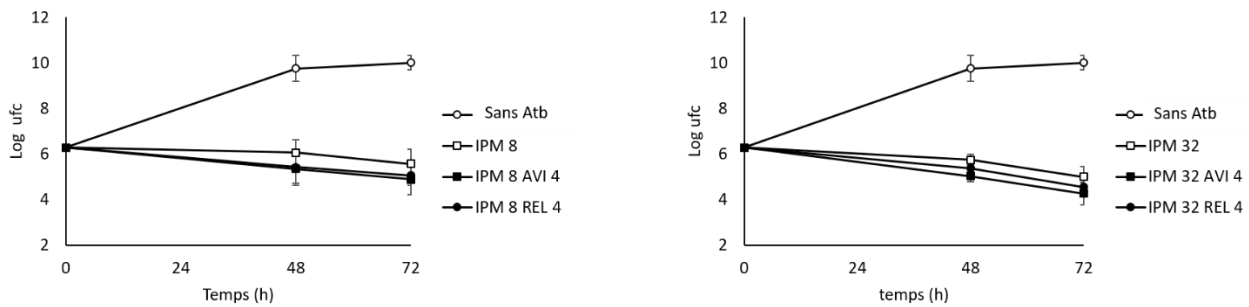


Figure 36. Cinétique de bactéricidie de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32  $\mu\text{g/ml}$  seul ou en association avec l'avibactam (AVI) ou le relebactam (REL) contre *M. abscessus* CIP104536. L'imipénème a été ajouté toutes les 24 heures. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes, les barres représentent les écart-types. Atb = antibiotique.

		<i>P</i> value des comparaisons indiquées (test de Mann-Whitney)						
		sans Atb	IPM 8	IPM 8 AVI 4	IPM 8 REL 4	IPM 32	IPM 32 AVI 4	IPM 32 REL 4
		10.01	5.56	4.88	5.05	4.98	4.26	4.55
sans Atb	10.01	N.A	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8	5.56		N.A	0.1266	0.1840	0.2752	0.0495	0.0495
IPM 8 AVI 4	4.88			N.A	0.5127	1.0000	0.2752	0.8273
IPM 8 REL 4	5.05				N.A	0.8273	0.0495	0.0495
IPM 32	4.98					N.A	0.1266	0.2752
IPM 32 AVI 4	4.26						N.A	0.5127
IPM 32 REL 4	4.55							N.A

Tableau 26. Analyse statistique de l'activité bactéricide de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32  $\mu\text{g/ml}$  seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 4  $\mu\text{g/ml}$  ou le relebactam (REL) à 4  $\mu\text{g/ml}$  contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les  $\text{Log}_{10}$  ufc/ml après 72 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

Puisque la bactéricidie est définie comme une diminution de 3  $\text{log}_{10}$  de la population bactérienne par rapport à la population initiale, aucune de ces combinaisons n'est bactéricide sur *M. abscessus* en 72 heures de traitement.

### 3) Activité intracellulaire

Comme précédemment, l'activité des différentes combinaisons a été évaluée en utilisant le modèle de macrophages THP 1 infectés par *M. abscessus* (Figure 37 et Tableau 27).



Sans traitement, les bactéries se multiplient dans les macrophages (FC de 148). L'amoxicilline a été testée à trois concentrations (8, 32 et 128 µg/ml) et a révélé une activité concentration dépendante mais qui n'empêche pas la croissance intracellulaire puisque le FC maximal est de 11 avec une concentration en amoxicilline de 128 µg/ml. L'ajout du relebactam améliore l'activité de l'amoxicilline à chaque concentration, mais cette différence n'est significative que pour l'amoxicilline à 32 µg/ml (FC de 29,87 vs 9,68  $P=0,0433$ ). L'avibactam améliore l'activité de l'amoxicilline dans les mêmes proportions que le relebactam. La combinaison la plus active est l'association d'amoxicilline à 128 µg/ml et de relebactam à 16 µg/ml avec un FC de 2,5.

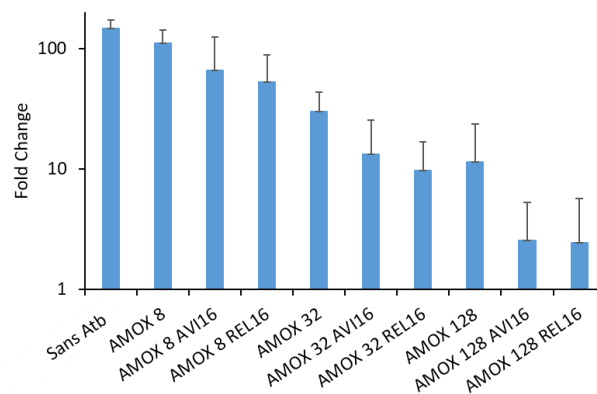


Figure 37. Activité intracellulaire de l'amoxicilline (AMOX) à 8, 32 et 128 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml ou le relebactam (REL) à 16 µg/ml contre *M. abscessus* CIP104536S. Des macrophages infectés ont été traités pendant 48 heures. Chaque 24 heures le milieu de culture avec ou sans antibiotiques a été renouvelé. Les valeurs sont les moyennes de trois répliques indépendants, les barres représentent les écart-types. Atb = antibiotique.

	P value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)									
	sans Atb	AMOX 8	AMOX 8 AVI16	AMOX 8 REL16	AMOX 32	AMOX 32 AVI16	AMOX 32 REL16	AMOX 128	AMOX 128 AVI16	AMOX 128 REL16
sans Atb	147.9	N.A	0.0814	0.0814	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0194
AMOX 8	110.76	N.A	0.1489	0.0833	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209	0.0209	0.0202
AMOX 8 AVI16	65.90		N.A	0.7728	0.7728	0.0833	0.0433	0.0833	0.0209	0.0202
AMOX 8 REL16	52.43			N.A	0.4678	0.0833	0.0209	0.0833	0.0209	0.0202
AMOX 32	29.97				N.A	0.1489	0.0433	0.1489	0.0209	0.0202
AMOX 32 AVI16	13.23					N.A	0.7728	0.3865	0.0833	0.0814
AMOX 32 REL16	9.68						N.A	1.0000	0.0833	0.0814
AMOX 128	11.37							N.A	0.0833	0.0814
AMOX 128 AVI16	2.54								N.A	0.5614
AMOX 128 REL16	2.45									N.A

Tableau 27. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'amoxicilline (AMOX) à 8, 32 ou 128 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml ou le relebactam (REL) à 16 µg/ml contre la souche *M. abscessus* CIP104536S. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

Concernant l'imipénème, cet antibiotique seul à 8 µg/ml a une meilleure activité que la combinaison amoxicilline-relebactam la plus efficace (amoxicilline (128 µg/ml)-relebactam (16 µg/ml)) bien que la différence ne soit pas significative (FC de 1,72 vs 2,5,  $P=0,25$ ). L'augmentation



de la concentration en imipénème à 32 µg/ml permet la mort des bactéries intracellulaires avec un FC de 0,9. L'addition du relebactam améliore statistiquement l'activité de l'imipénème aux deux concentrations testées (FC de 0,7 vs 1,7,  $P=0,02$  ; FC de 0,3 vs 0,9,  $P=0,04$ ). Ce gain d'activité de l'association imipénème-relebactam est similaire à celui de l'association imipénème-avibactam (FC de 0,7 vs 0,7  $P=1$  ; FC de 0,1 vs 0,3,  $P=0,08$ ).

Enfin, l'intérêt du relebactam a été évalué en présence de la combinaison imipénème-rifabutine qui avait été montrée comme très active contre *M. abscessus* cultivé en intracellulaire. Comme trouvé précédemment, l'imipénème à 8 µg/ml en combinaison avec la rifabutine à 1 µg/ml permet une diminution de la population bactérienne de 0,8. L'ajout du relebactam améliore cette activité avec un FC de 0,12 ( $P=0,04$ ) similaire à celui de l'association imipénème-rifabutine-avibactam (FC de 0,12 vs 0,2,  $P=0,25$ ) (Figure 38 et Tableau 28).

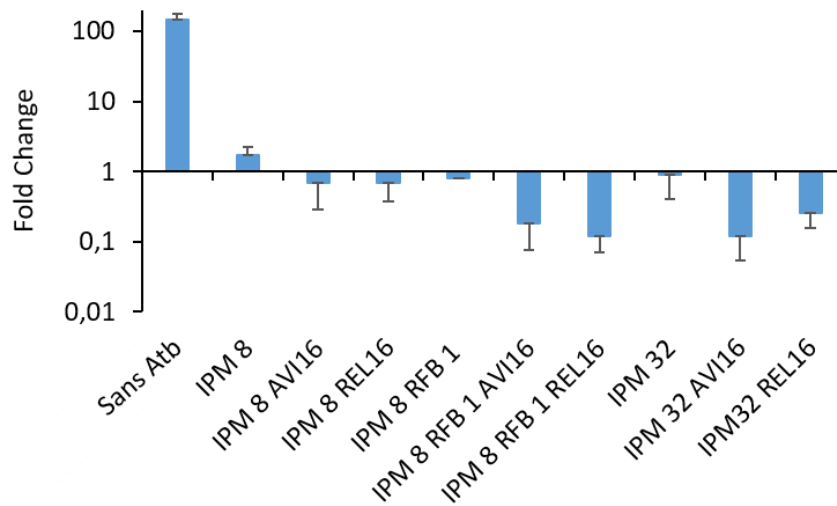


Figure 38. Activité intracellulaire de l'imipénème à 8 ou 32 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml ou le relebactam (REL) à 16 µg/ml contre *M. abscessus* CIP104536S. Des macrophages infectés ont été traités pendant 48 heures. Chaque 24 heures le milieu de culture avec ou sans antibiotiques a été renouvelé. Les valeurs sont les moyennes de trois répliques indépendantes, les barres représentent les écarts-types. Atb = antibiotique.

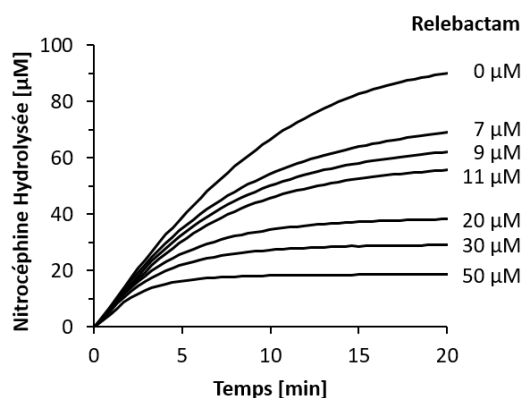
		P value pour les combinaisons indiquées (test de Mann-Whitney)									
		Sans Atb	IPM 8	IPM 8 AVI16	IPM 8 REL16	IPM 8 RFB 1	IPM 8 RFB 1 AVI16	IPM 8 RFB 1 REL16	IPM 32	IPM 32 AVI16	IPM 32 REL16
	Sans Atb	147.92	N.A	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202
	IPM 8	1.72	N.A	0.0209	0.0209	0.1489	0.0209	0.0209	0.0833	0.0209	0.0209
	IPM 8 AVI16	0.70		N.A	1	1	0.0294	0.0209	0.5637	0.0209	0.0433
	IPM 8 REL16	0.70			N.A	0.5637	0.0209	0.0209	0.5637	0.0209	0.0433
	IPM 8 RFB 1	0.80				N.A	0.0833	0.0433	0.5637	0.0833	0.2482
	IPM 8 RFB 1 AVI16	0.18					N.A	0.2482	0.0433	0.5637	0.1913
	IPM 8 RFB 1 REL16	0.12						N.A	0.0209	1	0.0433
	IPM 32	0.89							N.A	0.0209	0.0433
	IPM 32 AVI16	0.12								N.A	0.0833
	IPM32 REL16	0.25									N.A

Tableau 28. Analyse statistique de l'activité intracellulaire de l'imipénème (IPM) à 8 ou 32 µg/ml seul ou en association avec l'avibactam (AVI) à 16 µg/ml ou le relebactam (REL) à 16 µg/ml contre la souche *M.*

*abscessus CIP104536S*. Les fold change après 48 h d'incubation en présence ou non des antibiotiques sont indiqués. N.A = non applicable. Atb = antibiotique.

#### 4) Inhibition *in vitro* de Bla<sub>Mab</sub> par le relebactam

L'efficacité de l'inhibition du relebactam sur Bla<sub>Mab</sub> purifiée a été déterminée. 0,25nM d'enzyme ont été mélangés avec 100 µM de nitrocéfine et une concentration variable de relebactam (7, 9, 11, 20, 30 et 50 µM). A partir de ces courbes (Figure 39), le  $k_{obs}$  est ainsi obtenu pour chaque concentration en inhibiteur. Enfin, en traçant la droite  $k_{obs}$  en fonction de la concentration en relebactam, la constante  $k_2/K_i$  a été calculée et est de  $7,4 \pm 0,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . L'équipe a précédemment déterminé la constante  $k_2/K_i$  de l'avibactam sur Bla<sub>Mab</sub> qui est de  $1,1 \pm 1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Soroka et al., 2016). Le  $k_2/K_i$  du relebactam est donc 150 fois plus faible que celui de l'avibactam.



Paramètre	Relebactam	Avibactam
$k_2/K_i$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$(7.4 \pm 0.4) \times 10^2$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$
$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$(7.5 \pm 3.2) \times 10^{-4}$	$(2.1 \pm 0.7) \times 10^{-5}$

Figure 39. Détermination des paramètres d'inhibition de Bla<sub>Mab</sub> par les inhibiteurs.

Cependant, malgré cette inhibition 150 fois moins importante *in vitro*, le relebactam permet d'améliorer l'activité de l'amoxicilline et de l'imipénème dans les mêmes proportions que l'avibactam en CMI et en modèle de macrophages infectés.

# Régulation de la $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub>

Précédemment, le laboratoire d'accueil a montré que la  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> est surexprimée par *M. abscessus* dans les macrophages (Lefebvre et al., 2017). Cette surexpression pourrait limiter l'efficacité des  $\beta$ -lactamines contre les formes intracellulaires de *M. abscessus*. Un second axe de ma recherche a donc été d'étudier le mécanisme de régulation de Bla<sub>Mab</sub>. Pour cela, plusieurs approches ont été développées.

## I. Activité spécifique de cultures planctoniques

Une des manières d'étudier la production de Bla<sub>Mab</sub> est de regarder l'activité de l'enzyme avec un substrat rapporteur. La nitrocéfine a été choisie car son hydrolyse est facilement suivie par spectrophotométrie dans le visible.

La surproduction observée dans les macrophages (Lefebvre et al., 2017) pourrait être due à une réponse activée par un des composés du macrophage. *M. abscessus* a donc été cultivée pendant 48 heures dans différents milieux de culture qui, d'après la littérature, pourraient mimer les conditions auxquelles les bactéries sont confrontées dans les macrophages.

- La composition en ions dans les macrophages infectés est très variable. En effet, l'activité antibactérienne dans les phagosomes contenant des mycobactéries inclut une accumulation des cations  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Botella et al., 2012; Ward et al., 2008). Le fer joue un rôle important dans la virulence de *M. tuberculosis*. En effet, la production de transferrines et de sidérophores par la bactérie lui permet de réguler la concentration en fer dans la bactérie et à l'extérieur (Niederweis et al., 2015). La concentration en ions ferrique pourrait avoir un effet sur la régulation de certains gènes. Ainsi, le milieu de culture LB a donc été supplémenté en  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  et  $\text{ZnSO}_4$  à des concentrations variables (Figure 40). Par rapport au contrôle, aucune des conditions n'a montré une augmentation de l'activité spécifique de l'échantillon.

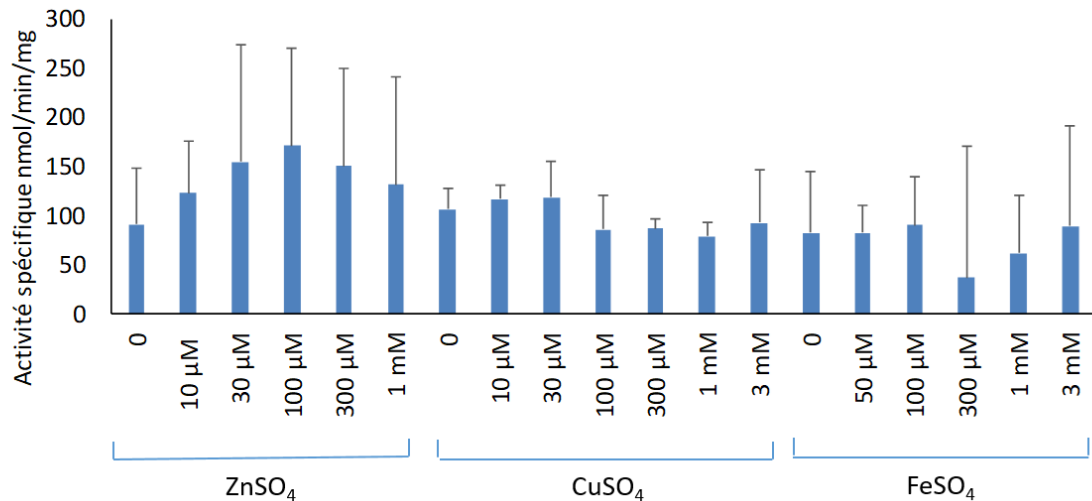


Figure 40. Activité spécifique  $\beta$ -lactamase dans des extraits bruts de *M. abscessus* cultivée en LB supplémenté par des cations divalents aux concentrations indiquées. L'activité spécifique correspond au nombre de nanomoles de nitrocéfine hydrolysée par minute et par mg de protéines solubles contenues dans l'extrait. Les résultats présentés sont les moyennes de cinq expériences indépendantes ; les barres représentent les écarts-type.

- Le stress oxydatif est un autre mécanisme utilisé par les macrophages pour éliminer les bactéries internalisées (Laochumroonvorapong et al., 1997; Slauch, 2011). *M. abscessus* a donc été cultivé en présence d'une gamme de concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce stress oxydatif n'a pas conduit à une augmentation de l'activité spécifique  $\beta$ -lactamase chez *M. abscessus* cultivée sous forme planctonique (Figure 41).
- Un autre type de stress est appliqué aux cellules internalisées, un stress nitrosatif dû à la production de NO (Lee et al., 2017). Pour mimer ce stress, les cultures ont été soumises à une gamme de concentrations de NO en utilisant du DETA-NO (Diethylenetriamine/nitric oxide ; un producteur de NO). Dans les concentrations testées, le NO n'était pas un inducteur de la production de la  $\beta$ -lactamase (Figure 41).
- Il a été montré que le pH dans le lysosome et le phagolysosome est différent (Weiss and Schaible, 2015). *M. abscessus* a donc été cultivé en milieu LB à pH acide. *M. abscessus* est capable de croître dans un milieu dont le pH est supérieur ou égal à 6. Au-delà, aucune croissance n'a pu être observée. Aucune variation significative de l'activité spécifique  $\beta$ -lactamase n'a été observée en fonction du pH (Figure 41).

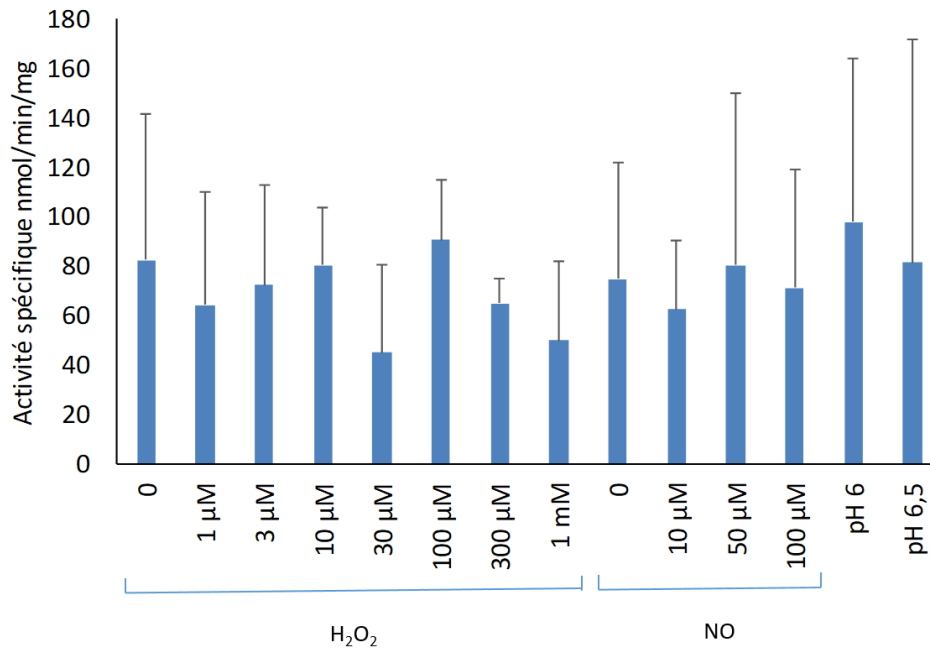


Figure 41. Activité spécifique  $\beta$ -lactamase dans les extraits bruts de *M. abscessus* cultivée en milieu 7H9sB supplémenté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou en NO aux concentrations ou en LB à différents pH. L'activité spécifique correspond au nombre de nanomoles de nitrocéfine hydrolysée par minute et par mg de protéines solubles contenues dans l'extrait. Les résultats présentés sont les moyennes de cinq expériences indépendantes, les barres représentent les écarts-type.

Pour vérifier que le milieu de culture utilisé n'influçait pas l'activité spécifique, plusieurs milieux ont été utilisés pour cultiver *M. abscessus* pendant 48 heures et l'activité spécifique des extraits a été mesurée. Le milieu SCFM est un milieu synthétique mimant la composition en ions du crachat des patients atteints de mucoviscidose (Palmer et al., 2007). Enfin, le glucose comme seule source de carbone a été testé en complétant le 7H9 avec différentes concentrations en glucose. Les résultats sont reportés dans la Figure 42, aucune augmentation significative de l'activité spécifique n'a été observée.

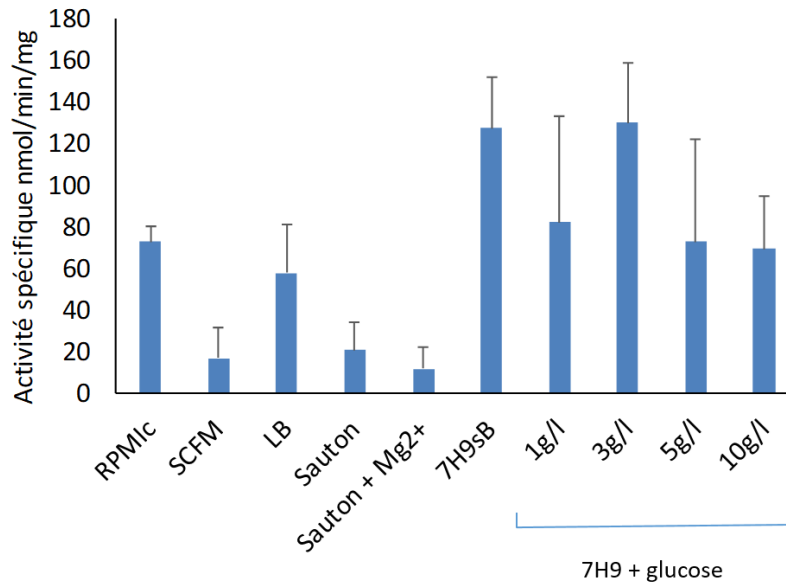


Figure 42. Activité spécifique  $\beta$ -lactamase ans les extraits bruts de *M. abscessus* cultivée dans différents milieux. L'activité spécifique correspond au nombre de nanomoles de nitrocéfine hydrolysée par minute et par mg de protéines solubles contenues dans l'extrait. Les résultats présentés sont les moyennes de cinq expériences indépendantes, les barres représentent les écarts-type. RPM1c = RPMI complémenté ; SCFM = synthetic cystic fibrosis medium

Afin de tester des stress plus intenses, l'exposition a été réduite à 3 heures, ce qui permet de soumettre *M. abscessus* à des conditions dans lesquelles la bactérie ne peut pas croître (Figure 43). Cette nouvelle configuration a permis d'abaisser le pH du milieu de culture jusque 4,5, et d'augmenter la concentration de NO jusque 1 mM et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 7 mM. L'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) a aussi été ajouté à la culture dans la mesure où L'AMPc est un messenger secondaire très utilisé par les mycobactéries. Chez *M. tuberculosis*, l'AMPc intervient notamment dans les voies de régulation de certains gènes en intramacrophagique (Knapp and McDonough, 2014). Aucun de ces stress intenses ni l'AMPc n'a entraîné l'augmentation de l'activité spécifique  $\beta$ -lactamase significative.

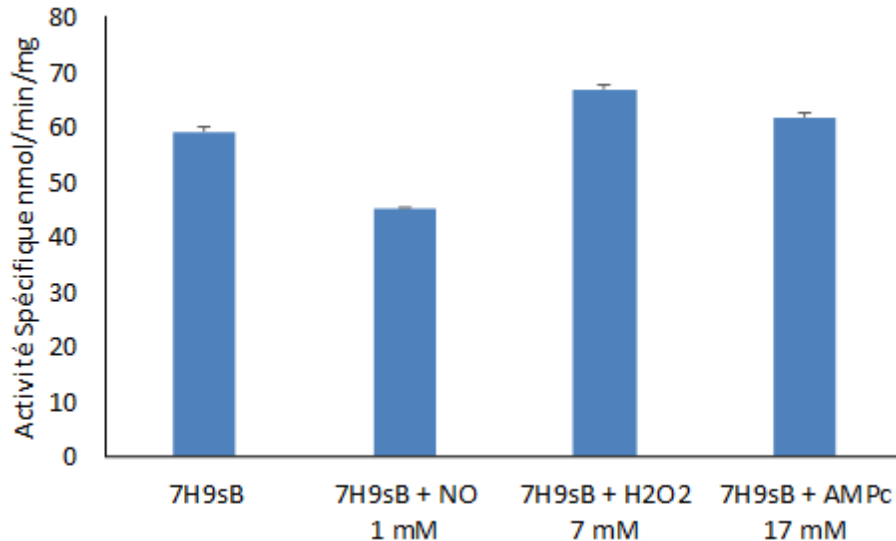


Figure 43. Activité spécifique d'extraits bruts protéiques de *M. abscessus* exposés à différentes conditions de stress pendant 3 heures. L'activité spécifique correspond au nombre de nanomoles de nitrocéfine hydrolysée par minute et par mg de protéines solubles contenues dans l'extrait. Les résultats présentés sont les moyennes de cinq expériences indépendantes, les barres représentent les écarts-type.

## II. Obtention de souches recombinantes fluorescentes

Dans une autre approche, la protéine fluorescente EGFP a été utilisée comme protéine rapporteuse de la production de  $Bla_{Mab}$ . Dans l'annotation du génome de *M. abscessus*, *MAB\_2874* et *bla<sub>Mab</sub>* forment un opéron, le promoteur régulant *bla<sub>Mab</sub>* est donc placé en amont de *MAB\_2874* (Figure 44). En insérant le gène codant pour la EGFP dans cet opéron, il est attendu que la EGFP et  $Bla_{Mab}$  seront régulées de la même manière si la régulation de *bla<sub>Mab</sub>* a lieu au niveau de l'initiation de la transcription. La fluorescence pourra être utilisée pour déterminer le niveau de transcription de l'opéron. Pour cela, la souche recombinante *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$  a été construite en remplaçant le gène *bla<sub>Mab</sub>* par une cassette comprenant le gène *egfp* et un gène de résistance à la zéocine (*zeo*) (Figure 45).

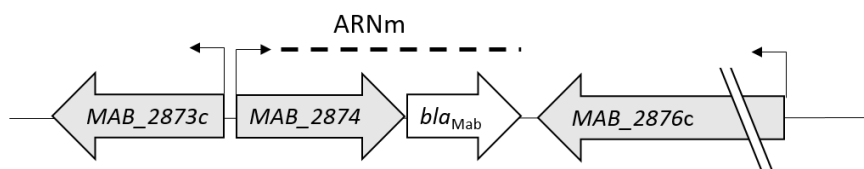


Figure 44. Opéron *MAB\_2874 - bla<sub>Mab</sub>* de *M. abscessus* CIP104536S.

Deux autres souches recombinantes contenant le gène *bla<sub>Mab</sub>* ont été construites par recombinaison homologue : *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  R et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-$

*egfp* F. Dans la première, *egfp* est précédé par sa propre séquence Shine-Dalgarno permettant une traduction indépendante des phases de lecture des gènes *bla<sub>Mab</sub>* et *egfp* à partir du même ARN message. Dans la deuxième souche, l'ARNm code pour une protéine de fusion *Bla<sub>Mab</sub>-EGFP*.

La méthodologie est détaillée dans la partie Matériel et Méthodes de ce manuscrit. Brièvement, la souche *M. abscessus* CIP104536S contenant le plasmide pJV53Kn codant pour la recombinaise du phage lambda, a été transformée avec un fragment d'ADN linéaire portant les gènes *MAB\_2874* suivi du gène *egfp* puis du gène codant pour la résistance à la zéocine (*zeo*) et du gène *MAB\_2876c*. La recombinaise permet l'intégration de ce fragment au locus de *bla<sub>Mab</sub>* (Figure 45). Les transformants sont sélectionnés sur LB agar supplémenté par la zéocine (50 µg/ml). La perte de la résistance à l'ampicilline est vérifiée, ainsi que l'insertion du fragment par PCR. L'ADNg de la souche finale a aussi été entièrement séquencé pour vérifier l'absence de modification du reste du chromosome.

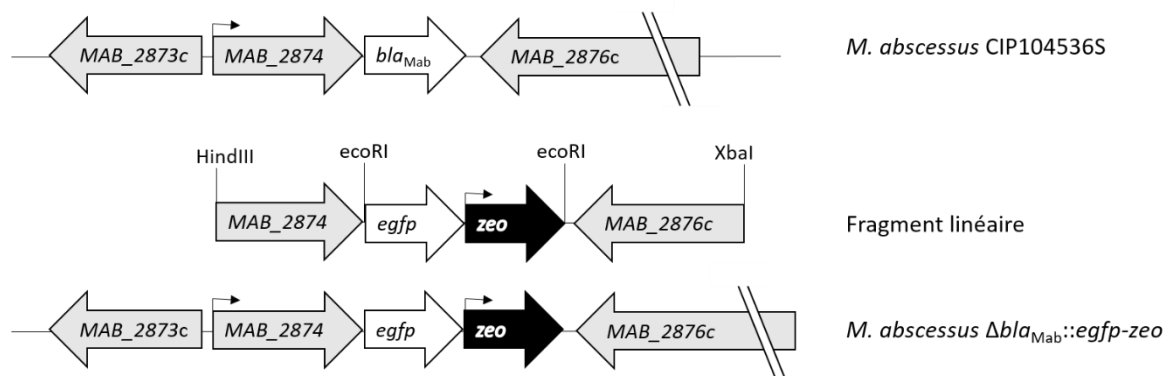


Figure 45. Représentation du locus « *bla<sub>Mab</sub>* » de la souche parentale *M. abscessus* CIP104536S et de la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$ . Le gène *bla<sub>Mab</sub>* a été remplacé par les gènes *egfp* et *zeo* par recombinaison homologique via le fragment linéaire représenté. Le gène *egfp* est sous le contrôle du promoteur putatif du gène *MAB\_2874*. Le gène *zeo* possède son propre promoteur.

Les souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  R et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  F ont été obtenues à partir d'une souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  contenant le plasmide pJV53Kn (Figure 46 et 47). Sur le même principe que précédemment, la souche parentale a été transformée avec un fragment linéaire portant le gène *MAB\_2874* suivi de *bla<sub>Mab</sub>* puis de *egfp* et du gène *MAB\_2876c*. Les transformants ont été sélectionnés sur LB agar supplémenté par l'ampicilline (100 µg/ml). La construction des souches recombinantes a été validée par PCR du locus « *bla<sub>Mab</sub>* » et séquençage de l'ADNg.



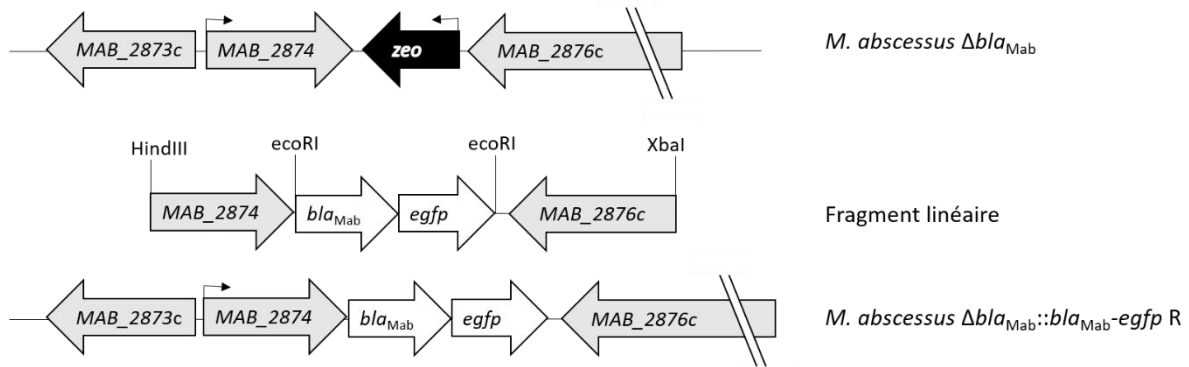


Figure 46. Représentation du locus «  $bla_{Mab}$  » de la souche parentale *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  et de la souche finale *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  R. Le gène  $bla_{Mab}$  a été remplacé par les gènes  $bla_{Mab}$  et  $egfp$  par recombinaison homologue via le fragment linéaire représenté. Le gène  $egfp$  possède sa propre séquence Shine-Dalgarno.

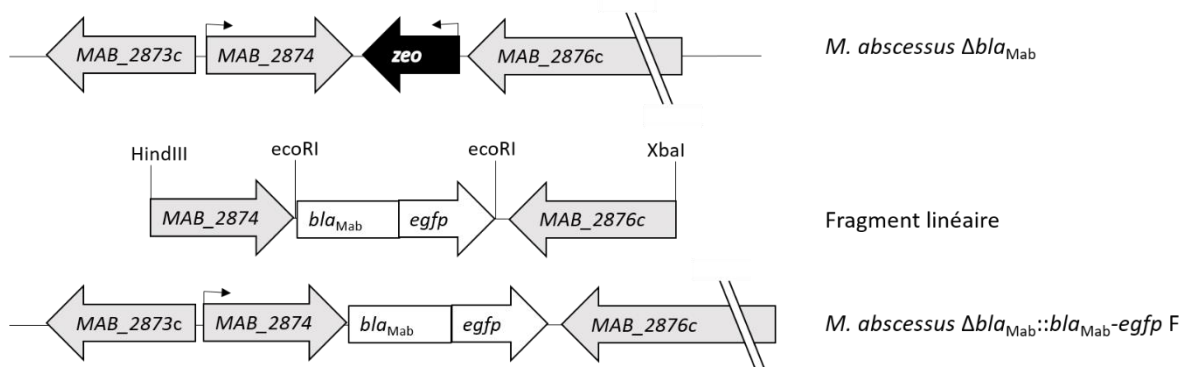


Figure 47. Représentation du locus «  $bla_{Mab}$  » de la souche parentale *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  et de la souche finale *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  F. Le gène  $bla_{Mab}$  a été remplacé par le gène  $bla_{Mab}-egfp$  par recombinaison homologue via le fragment linéaire représenté.

Les souches obtenues présentent le phénotype attendu (Figure 48) :  $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$  est sensible à l'ampicilline (disque 1) mais résistante à la zéocine (disque 5). Les souches  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}-egfp$  R et F sont résistantes à l'ampicilline (disque 1) et sensible à la zéocine (disque 5). Les trois souches ont perdu le plasmide codant pour la recombinaison puisqu'elles ne sont pas résistantes à la kanamycine (disque 6).

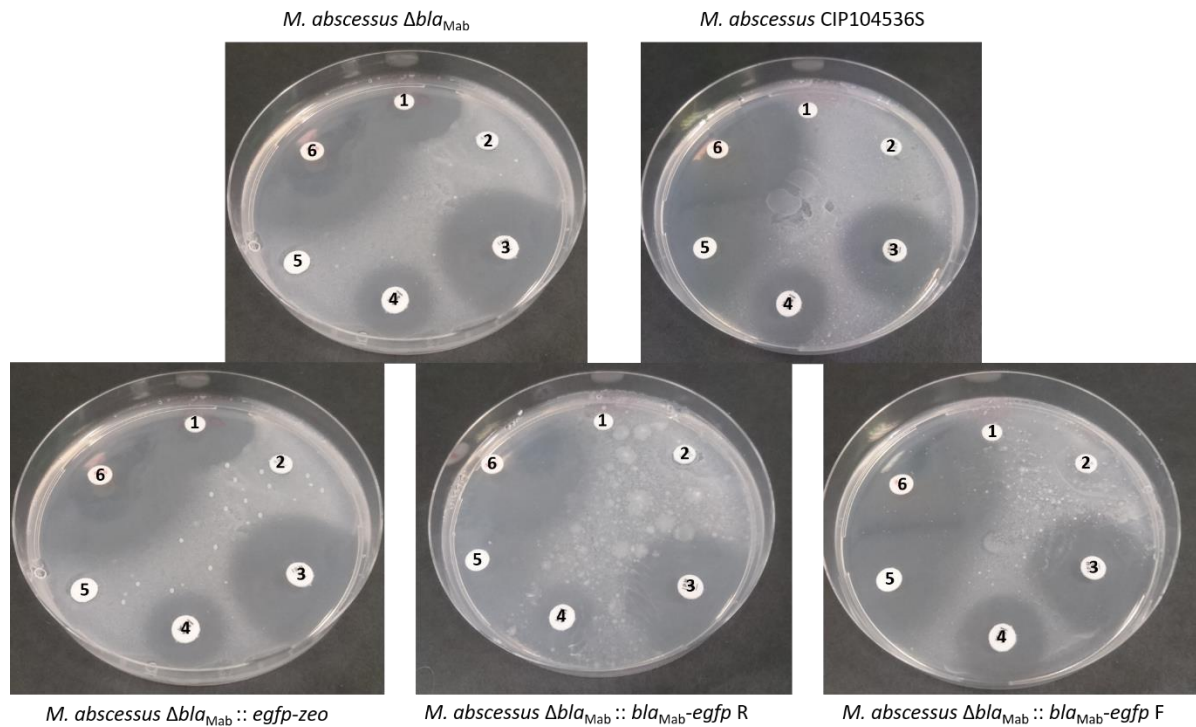


Figure 48. Antibiogrammes des souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ , *M. abscessus* CIP104536S, *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$ , *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab-egfp R}$  et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab-egfp F}$  sur milieu 7H10sB. 1 : ampicilline 100  $\mu g$ , 2 : amoxicilline 25  $\mu g$  + clavulanate 10 $\mu g$ , 3 : imipénème 10  $\mu g$ , 4 : amikacine 30  $\mu g$ , 5 : zéocine 50  $\mu g$  et 6 : kanamycine 1 mg.

Le locus «  $bla_{Mab}$  » a été amplifié par PCR à l'aide des amorces MC105 et MC106. Le gène de la zéocine est amplifié dans les souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  et  $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$  grâce aux amorces *zeo1* et *zeo2* (Figure 49). Comme attendu, l'ADN de la souche  $\Delta bla_{Mab}::egfp-zeo$  permet l'amplification d'un fragment d'ADN d'environ 500 paires de bases (pb) correspondant au gène *zeo* et de 1 500 pb correspondant à l'amplification du fragment inséré. Pour la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab-egfp R}$  le fragment d'environ 2 000 pb a la taille attendue pour l'insertion du fragment *bla\_{Mab-egfp R}*. Il en est de même pour la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab-egfp F}$ .

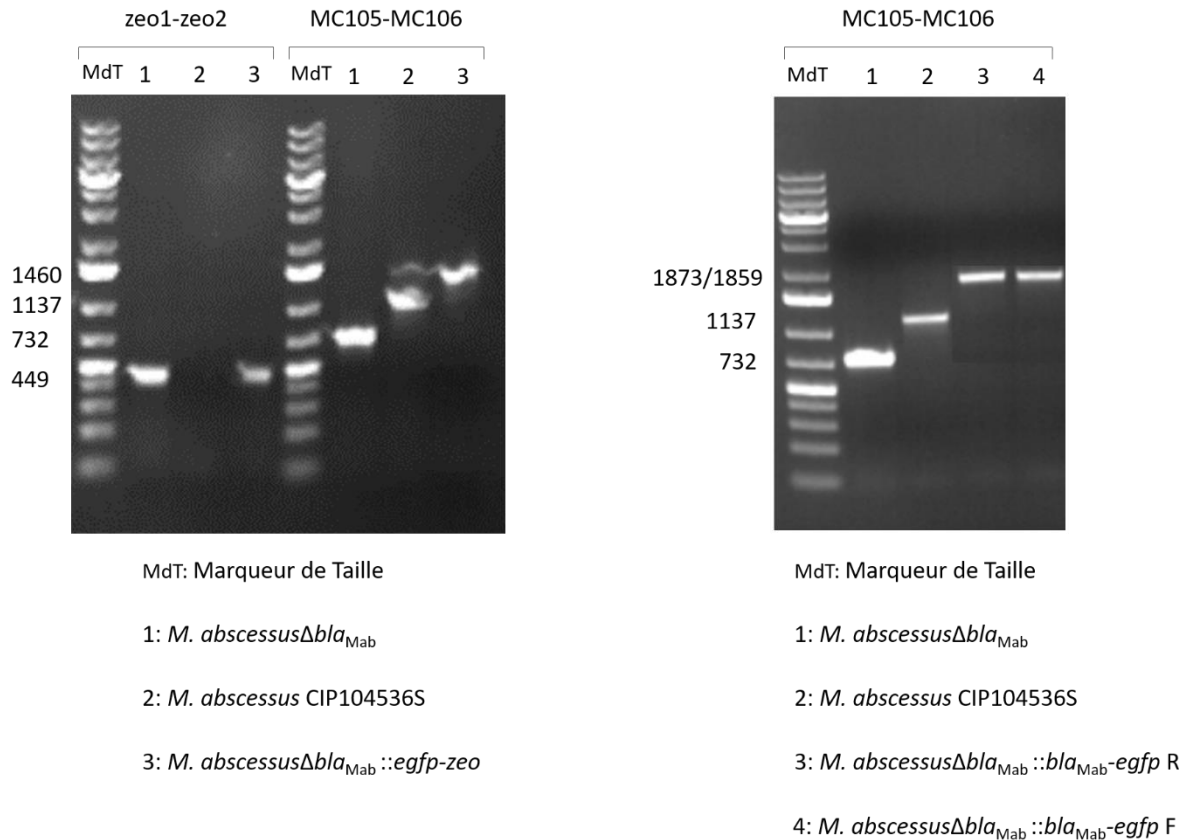


Figure 49. Analyse par PCR du locus « *bla*<sub>Mab</sub> ». L'ADN génomique des différents mutants a été extrait puis une PCR a été réalisée. Deux couples d'amorces ont été utilisés, *zeo1-zeo2* qui amplifie le gène de la zéocine, et *MC105-MC106* qui amplifie toute la région délimitée par *MAB\_2874* et *MAB-2876c*. La taille attendue des différentes bandes observées est reportée sur le côté du gel.

Après séquençage, les souches ont été soumises à plusieurs tests afin de vérifier la fonctionnalité de la β-lactamase. En utilisant un test colorimétrique qualitatif, 1 ml de culture à  $DO_{600} = 2$  a été resuspendu dans du tampon PIPES 2mM pH 6,8 contenant 50 μM de nitrocéfine. Le mélange a ensuite été observé pendant 3 heures (Figure 50 et 51). L'obtention d'une couleur rouge témoigne de l'hydrolyse de la nitrocéfine.

*M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$    *M. abscessus* CIP104536S   *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::egfp$ -zeo

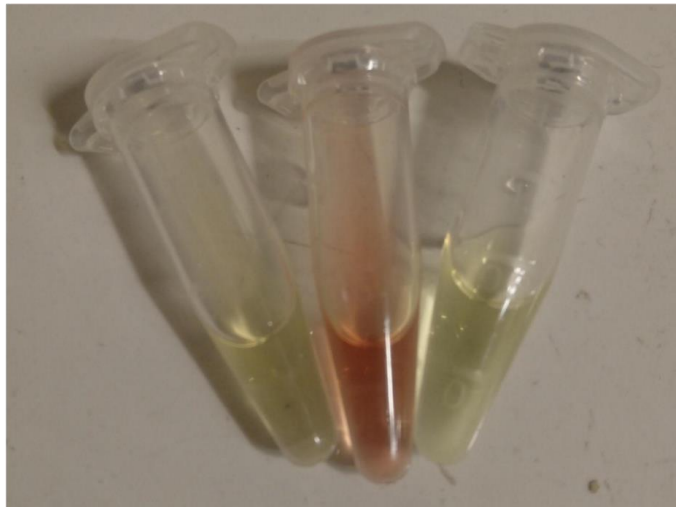


Figure 50. Test d'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine à partir de bactéries entières. Un culot de 10 ml culture à  $DO_{600} = 2$  de *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ , *M. abscessus* CIP102436S et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::egfp$ -zeo a été resuspendu dans 1 ml de tampon PIPES 2 mM pH 6,8 contenant 50  $\mu$ M de nitrocéfine. Après 3 heures d'incubation, les tubes sont pris en photo.

$\Delta bla_{Mab}$    CIP104536S    $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ -egfp R    $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ -egfp F



Figure 51. Test d'activité d'hydrolyse de la nitrocéfine à partir de bactéries entières. Un culot de 10 ml culture à  $DO_{600} = 2$  de *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ , *M. abscessus* CIP102436S et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ -egfp R et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ -egfp F a été resuspendu dans 1 ml de tampon PIPES 2 mM pH 6,8 contenant 50  $\mu$ M de nitrocéfine. Après 3 heures d'incubation, les tubes sont pris en photo.

L'insertion de  $bla_{Mab}$  ainsi que la production de  $Bla_{Mab}$  ont aussi été mise en évidence en testant le niveau de résistance des souches à l'amoxicilline et à l'imipénème. Pour cela, la CMI de l'amoxicilline et de l'imipénème seuls et en présence d'avibactam ont été déterminées sur chaque souche (Tableau 29). Les souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ -egfp R et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab}$ -egfp F présente le même niveau de résistance à l'amoxicilline que la souche *M. abscessus* CIP104536S (> 256  $\mu$ g/ml). En présence de 4  $\mu$ g/ml d'avibactam, les CMI de

l'amoxicilline diminuent de la même manière pour les trois souches (CMI = 16 µg/ml). La CMI de l'imipénème est identique pour les trois souches (CMI = 8 µg/ml), et l'avibactam a le même effet sur la CMI de l'imipénème (baisse de 8 à 2 µg/ml). La CMI de l'amoxicilline est de 8 µg/ml et celle de l'imipénème de 2 µg/ml pour les deux souches ne produisant pas de β-lactamase (*M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab} :: egfp-zeo$ ) (Tableau 29).

	amoxicilline		imipénème	
	seule	+ Avibactam 4 µg/ml	seule	+ Avibactam 4 µg/ml
<i>M. abscessus</i> CIP104536S	>256	16	8	2
<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}-egfp R$	>256	16	8	2
<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}-egfp F$	>256	16	8	2
<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab}$	8	-	2	-
<i>M. abscessus</i> $\Delta bla_{Mab} :: egfp-zeo$	8	-	2	-

Tableau 29. CMI de l'amoxicilline et de l'imipénème seuls ou en association avec l'avibactam contre les souches recombinantes de *M. abscessus*. La CMI a été déterminée par microdilution en milieu 7H9sB. Les résultats présentés sont la médiane de cinq expériences indépendantes.

La fluorescence de ces différentes souches a été étudiée par l'équipe de L. Kremer (IRIM, CNRS Montpellier) pour la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab} :: egfp-zeo$  et grâce à la plateforme CHIC (centre d'histologie et d'imagerie cellulaire) du centre de recherche des Cordeliers pour les souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}-egfp R$  et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab}-egfp F$  (Figure 52).

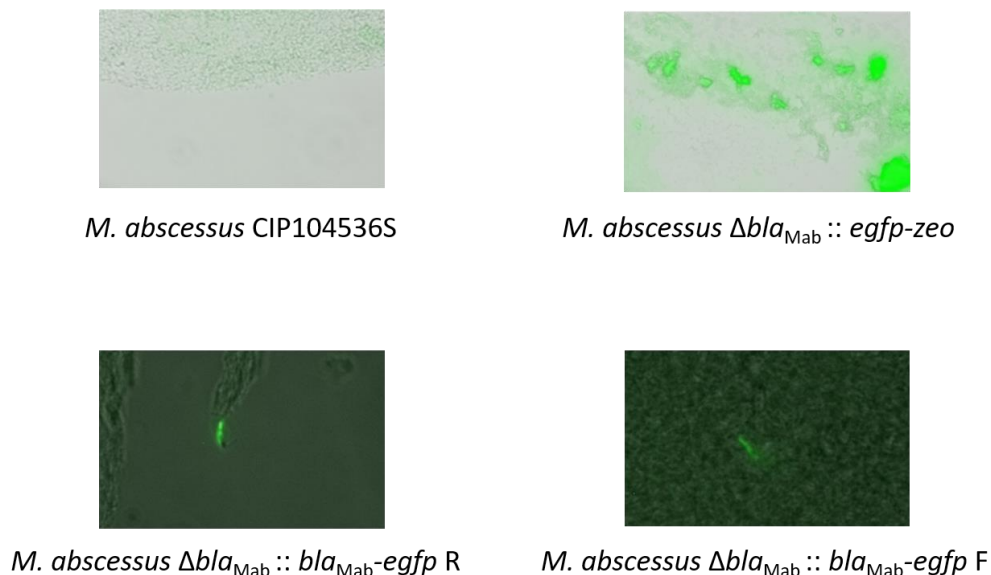


Figure 52. Observation de la fluorescence de l'EGFP produite par les différentes constructions. La superposition de la fluorescence et de l'observation photonique est montrée ici. *M. abscessus* CIP104536S a été observée à la fluorescence comme témoin du bruit de fond.

Les souches recombinantes semblent produire une fluorescence suffisante pour être observable bien qu'il soit nécessaire d'optimiser les techniques d'observations.

# Effet du motif SDN/SDG dans des souches isogéniques

La différence principale entre  $Bla_{Mab}$  et  $Bla_C$  est le motif conservé SDN/G qui varie selon la mycobactérie. Comme décrit précédemment, ce motif a été montré comme responsable de la différence de comportement envers les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase *in vitro* (Soroka et al., 2016). En effet,  $Bla_C$  portant le motif SDG est efficacement inhibée par le clavulanate mais pas par l'avibactam. La protéine recombinée  $Bla_C$  portant la substitution  $G^{132}N$  présente le comportement opposé.  $Bla_{Mab}$  qui possède le motif SDN hydrolyse le clavulanate, et est efficacement inhibée que par l'avibactam. La mutation  $N^{132}G$  abolit l'inhibition par l'avibactam et diminue l'efficacité d'hydrolyse du clavulanate *in vitro* (Dubée et al., 2014; Soroka et al., 2015, 2016).

Un des objectifs de ce travail a été de construire des souches isogéniques recombinantes de *M. abscessus* exprimant les différentes versions des  $\beta$ -lactamases afin d'étudier l'impact du polymorphisme SDN/SDG sur l'activité antibactérienne des combinaisons d'antibiotiques comprenant des  $\beta$ -lactamines et l'avibactam ou le clavulanate. Les gènes codant pour les différentes  $\beta$ -lactamases ont été insérés par recombinaison homologue au locus  $bla_{Mab}$  (cf Matériel et méthodes). Les gènes sont exprimés sous contrôle des mêmes signaux d'initiation de la transcription et de la traduction pour éviter au maximum les variations liées au niveau d'expression des gènes *bla*. Ceci a conduit à un remplacement très précis de la phase de lecture ouverte de  $bla_{Mab}$  (du codon d'initiation de la traduction au codon de terminaison de la traduction).

## I. Obtention des souches

Comme expliqué dans le matériel et méthodes (cf supra), les souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab} N^{132}G$  et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}::bla_C G^{132}N$  ont été obtenues à partir de la souche *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$  par recombinaison homologue. Chaque transformant a été sélectionné sur LB agar contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline. Le phénotype a été vérifié par antibiogramme et le génotype par PCR et séquençage du génome complet. Les souches obtenues présentaient le phénotype attendu (Figure 53) :  $\Delta bla_{Mab}::bla_{Mab} N^{132}G$  et  $\Delta bla_{Mab}::bla_C G^{132}N$  sont résistantes à l'ampicilline (disque 1) et sensibles à la zéocine (disque 5). Les deux souches ont perdu le plasmide codant pour la recombinase puisqu'elles ne sont pas résistantes à la kanamycine (disque 6). Le locus «  $bla_{Mab}$  » a été amplifié par PCR à l'aide des amorces MC105 et MC106 pour confirmer la présence des gènes attendus (Figure 54).



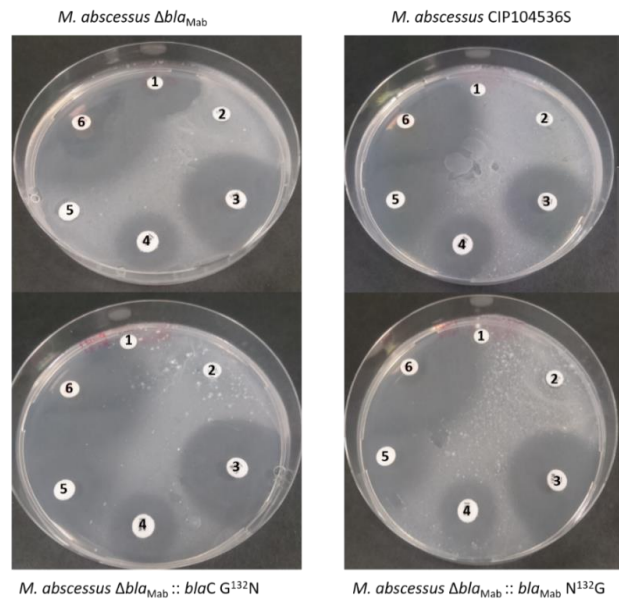


Figure 53. Antibioigrammes des souches *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ , *M. abscessus* CIP104536S, *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab} :: blaC G^{132N}$  et *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab} :: bla_{Mab} N^{132G}$  sur milieu 7H10sB. 1 : Ampicilline 100  $\mu$ g, 2 : amoxicilline 25  $\mu$ g + clavulanate 10 $\mu$ g, 3 : imipénème 10  $\mu$ g, 4 : amikacine 30  $\mu$ g, 5 : zeocine 50  $\mu$ g et 6 : kanamycine 1 mg.

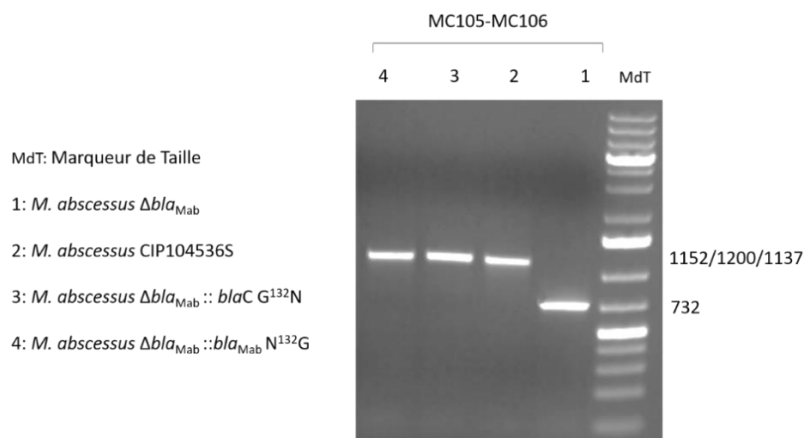


Figure 54. Analyse par PCR du locus «  $bla_{Mab}$  ». L'ADN génomique des différents mutants a été extrait puis une PCR a été réalisée. Le couple d'amorce MC105-MC106 qui amplifie toute la région de MAB\_2874 à MAB-2876c a été utilisé. La taille théorique des différentes bandes observées est reportée sur le côté du gel. Les produits PCR ont été séquencés.

## II. Analyse phénotypiques des souches isogéniques de *M. abscessus*

Les CMI de plusieurs  $\beta$ -lactamines ont été déterminées seules et en association avec l'avibactam et le clavulanate. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme dans la Figure 55.

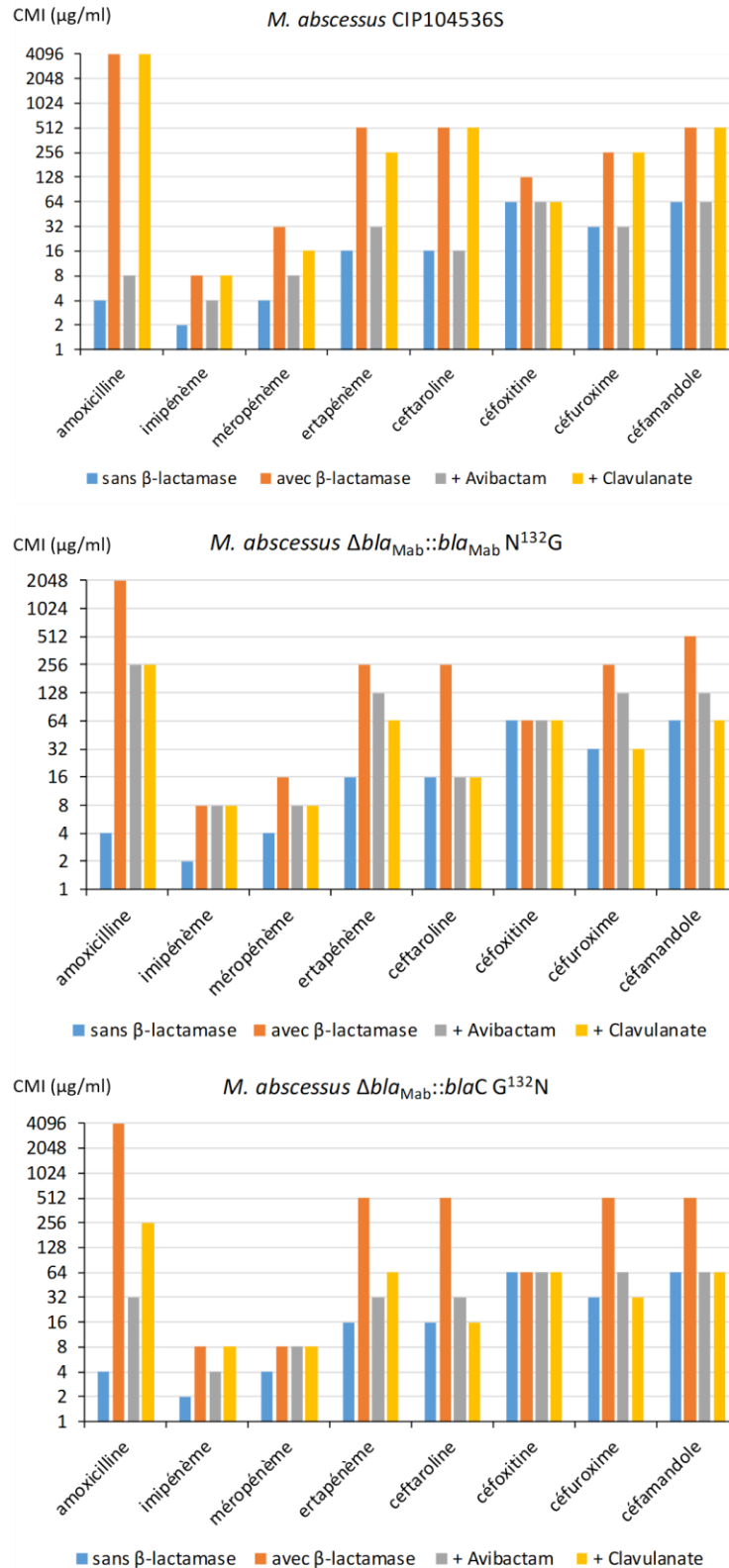


Figure 55. CMI en µg/ml de différentes β-lactamines seules ou en association avec l'avibactam (à 4 µg/ml) et le clavulanate (à 4 µg/ml) contre les souches *M. abscessus* CIP104536S, *M. abscessus* Δbla<sub>Mab</sub>::bla<sub>Mab</sub> N<sup>132</sup>G et *M. abscessus* Δbla<sub>Mab</sub>::blaC G<sup>132</sup>N. Les résultats présentés sont la médiane de cinq expériences indépendantes. Les valeurs reportées en bleu correspondent aux valeurs de CMI pour la souche *M. abscessus* Δbla<sub>Mab</sub>.



Comme précédemment décrit, Bla<sub>Mab</sub> est efficacement inactivée par l'avibactam puisque cet inhibiteur permet de diminuer les CMI des  $\beta$ -lactamines pour atteindre des CMI égales aux, ou proche des (au maximum 2 fois supérieur), CMI observées pour la souche qui ne produit pas de  $\beta$ -lactamases. Le clavulanate ne permet pas de réduire les CMI (au maximum une dilution de différence avec les CMI obtenues en l'absence d'inhibiteur).

L'introduction de la substitution N vers G dans le motif SDN de Bla<sub>Mab</sub> diminue l'efficacité de l'avibactam. En effet les CMI sont intermédiaires entre la souche sauvage produisant Bla<sub>Mab</sub> et la souche dépourvue de  $\beta$ -lactamase. L'inhibition de la  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> portant la substitution N vers G est donc très partielle. Ceci indique que les mutations conduisant à cette substitution peuvent émerger sous pression de sélection et compromettre l'activité des combinaisons d'antibiotiques comprenant une  $\beta$ -lactamine et l'avibactam. La substitution N vers G conduit à une inhibition de Bla<sub>Mab</sub> par le clavulanate. Cette inhibition reste cependant partielle. Le clavulanate ne paraît donc pas pouvoir constituer une alternative à l'avibactam en cas d'acquisition de la mutation conduisant à la substitution N vers G dans Bla<sub>Mab</sub>.

BlaC G<sup>132</sup>N est fonctionnelle chez *M. abscessus* puisque, en absence d'inhibiteur, les CMI associées à la production de BlaC G<sup>132</sup>N et de la forme sauvage de Bla<sub>Mab</sub> sont similaires. L'inhibition de BlaC G<sup>132</sup>N par le clavulanate est partielle puisque cet inhibiteur ne permet pas de diminuer les CMI des  $\beta$ -lactamines pour obtenir les CMI observées pour les souches sensibles de *M. abscessus* hébergeant la délétion  $\Delta bla_{Mab}$ . Ce résultat indique que la substitution G<sup>132</sup>N pourrait être un mécanisme d'acquisition de la résistance aux combinaisons clavulanate- $\beta$ -lactamines chez *M. tuberculosis*. L'avibactam permet de diminuer les CMI des  $\beta$ -lactamines mais l'inhibition de la  $\beta$ -lactamase reste partielle et semble insuffisante pour constituer une alternative au clavulanate. Malgré de très nombreuses tentatives, il a été impossible d'introduire l'allèle sauvage de *blaC* chez *M. abscessus*. Il n'est donc pas possible de caractériser plus précisément l'impact de la substitution G<sup>132</sup>N.

## Discussion Perspectives



*Mycobacterium abscessus* est responsable de 2,6% des infections pulmonaires chez les patients français atteints de mucoviscidose (Koh et al. 2011; H. Choi et al. 2017) (registre VLM 2017). Le traitement de ces infections est particulièrement long et difficile notamment à cause de la résistance naturelle de *M. abscessus* à de nombreux antibiotiques. A cette résistance naturelle s'ajoute une résistance acquise aux antibiotiques utilisés en première intention comme la résistance aux macrolides médiée par le gène *erm41* chez 40 à 50% des souches de *M. abscessus sensu stricto* (Choi et al., 2017; Koh et al., 2011). Les travaux menés dans le laboratoire d'accueil ont montré que la production naturelle d'une  $\beta$ -lactamase à large spectre, Bla<sub>Mab</sub>, entraîne un niveau élevé de résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles options thérapeutiques. Pour cela, le premier axe de mon travail de thèse a été de poursuivre l'évaluation de nouvelles combinaisons de  $\beta$ -lactamines et d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases de seconde génération ainsi que le repositionnement d'antibiotiques déjà approuvés pour le traitement d'infections dues à d'autres bactéries. Nous avons montré que la rifabutine, une rifamycine active *in vitro* contre des souches cliniques de *M. abscessus* (Aziz et al., 2017), agit en synergie avec l'imipénème *in vitro* mais n'a pas d'activité bactéricide sur *M. abscessus*. En revanche, dans le modèle du macrophage infecté par *M. abscessus*, la rifabutine à des concentrations atteignables chez l'homme dans le sérum et le poumon améliore fortement l'activité de l'imipénème. La triple combinaison imipénème-rifabutine-avibactam est la plus efficace dans ce modèle (Le Run et al., 2018). La rifabutine étant déjà utilisée lors de traitement prolongé des infections dues à des mycobactéries (complexe *Mycobacterium avium*, *M. tuberculosis* chez les patients infectés par le VIH, ...), cet antibiotique pourrait donc être proposé dans le traitement des infections à *M. abscessus*.

Le tédizolide est un nouvel antibiotique de la famille des oxazolidinones utilisé dans le traitement des infections bactériennes aiguës de la peau et des tissus mous dues à des bactéries à Gram positif dont les staphylocoques. Pour *M. abscessus*, nous avons montré que la combinaison tédizolide-imipénème présentait une faible synergie *in vitro* et aucune activité bactéricide. En revanche dans le modèle de macrophage infecté, le tédizolide, à une concentration de l'ordre de la concentration sérique maximale, améliore l'activité de l'imipénème en particulier en présence d'avibactam. La quadruple combinaison imipénème-tédizolide-rifabutine-avibactam était particulièrement efficace contre *M. abscessus* CIP104536S entraînant 91% de mortalité de *M. abscessus* (Le Run et al., 2019). L'avantage de la rifabutine et du tédizolide réside dans leur mode d'administration par voie orale. Ce mode d'administration offre la possibilité d'envisager une meilleure qualité de vie des patients bien que la survenue possible d'effets secondaires avec ces deux

molécules doit être prise en considération. En particulier, la réserve principale pour l'utilisation du tédizolide concerne l'absence de données de sécurité pour un traitement de longue durée.

Concernant les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase de seconde génération, trois études ont montré que l'avibactam est efficace *in vitro*, en intracellulaire et dans le modèle de poisson zèbre lorsqu'il est combiné avec les  $\beta$ -lactamines et en particulier avec l'imipénème (Dubée et al., 2015; Lefebvre et al., 2017; Soroka et al., 2016). Malheureusement, l'avibactam n'est commercialisé qu'en combinaison avec la ceftazidime qui n'a pas d'activité contre *M. abscessus* (Dubée et al., 2014 ; Pandey et al., 2019). En revanche, le relebactam, un nouvel inhibiteur de la famille des diazabicyclooctanes a récemment été approuvé en combinaison avec l'imipénème. Ceci nous a conduit à évaluer son activité en association avec l'imipénème (Le Run, J of Antimicrobial Chemotherapy in press ; Annexe III). Le relebactam améliore l'activité de l'imipénème et de l'amoxicilline à la fois en termes de CMI et d'activité intramacrophagique à un niveau similaire à celui de l'avibactam malgré une inhibition de Bla<sub>Mab</sub> 150 fois plus faible par le relebactam que par l'avibactam. L'imipénème faisant partie des antibiotiques recommandés de première intention dans le traitement des infections à *M. abscessus*, le fait de disposer en clinique de l'association imipénème-relebactam qui est plus active que l'imipénème seul apporte une arme thérapeutique supplémentaire.

Comme souligné précédemment, l'activité *in vitro* des antibiotiques ne reflètent pas leur efficacité dans le modèle macrophage. Les combinaisons identifiées comme efficace contre *M. abscessus* pourraient donc être évaluées en parallèle dans des modèles animaux comme le poisson-zèbre ou le modèle murin. Une des limitations des modèles murins est le fait que les infections à *M. abscessus* inoculées par nébulisation ou par voie intraveineuse ne deviennent pas chroniques (Le Moigne et al., 2015). En effet, après plusieurs semaines, les bactéries sont éliminées. L'équipe du Pr. JL. Herrmann a récemment implanté au laboratoire un modèle de souris C3HeB/FeJ dans laquelle peut se développer des infections chroniques à *M. abscessus*. Tester les combinaisons comprenant l'imipénème en association avec les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase seules ou associées à la rifabutine ou au tédizolide apporterait des informations complémentaires sur leur efficacité *in vivo*. Il est à noter que de nouveaux inhibiteurs appartenant à la famille des DBO, le nacubactam et le zidébactam, ont été récemment évalués *in vitro* sur *M. abscessus* (Kaushik et al., 2019b). Le nacubactam est combiné avec le méropénème alors que le zidébactam est développé en combinaison avec le céfépime. Ces deux inhibiteurs n'ont pas d'activité antimicrobienne intrinsèque (CMI > 256  $\mu$ g/ml) mais permettent une diminution de la CMI de leur  $\beta$ -lactamine partenaire (de 16 à 4  $\mu$ g/ml pour le méropénème et de 32 à 16  $\mu$ g/ml pour le céfépime). Enfin de nouveaux inhibiteurs de la famille des boronates comme

le vaborbactam ont récemment été évalués sur *M. abscessus* (Kaushik et al., 2019b). L'ajout du vaborbactam permet de diminuer la CMI des carbapénèmes et de plusieurs céphalosporines ; la CMI du méropénème seul est de 16 µg/ml contre *M. abscessus* CIP104536S, et diminue jusqu'à 4 µg/ml en combinaison avec le vaborbactam. Le vaborbactam étant développé en association avec le méropénème, il serait pertinent de tester cette combinaison *in vitro*, dans le modèle macrophage et dans le modèle murin et le comparer aux associations imipénème-avibactam et imipénème-relebactam.

Dans une optique d'optimisation des inhibiteurs de β-lactamases de seconde génération, j'ai contribué à l'étude de nouveaux dérivés de diazabicyclooctanes synthétisés par l'équipe du Pr. M. Etheve-Quellejeu. Les résultats publiés ont montré qu'un des composés synthétisés par cette équipe, le 15a, présentait une activité proche de celle de l'avibactam sur Bla<sub>Mab</sub> (constante d'inhibition  $k_2/K_i$  de  $(2,2 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) et permettait de réduire la CMI de l'amoxicilline de > 256 à 16 µg/ml, comme observé pour l'avibactam (Edoo et al., 2018 ; Annexe IV). Une perspective à court terme est d'évaluer ces inhibiteurs de synthèse dans le modèle macrophage.

Concernant la régulation de *bla<sub>Mab</sub>*, l'équipe avait montré dans un précédent travail que Bla<sub>Mab</sub> est surproduit dans les bactéries intracellulaires, ce qui pourrait avoir des conséquences sur l'activité des β-lactamines sur *M. abscessus* internalisé (Lefebvre et al., 2017). Comprendre la régulation de la β-lactamase Bla<sub>Mab</sub> est donc important afin d'améliorer le traitement de ces infections.

Chez *M. tuberculosis*, la β-lactamase BlaC, est régulée par un mécanisme bien décrit (Sala et al., 2009): sans traitement antibiotique, la transcription du gène *blaC* est réprimée par le répresseur BlaI qui se fixe au promoteur de ce gène. En présence de β-lactamines dans le milieu de culture, BlaR qui comprend un domaine censeur transmembranaire, clive le répresseur BlaI libérant ainsi le promoteur de *blaC* et permettant la production de la β-lactamase. Les gènes codant pour les protéines régulatrices BlaI et BlaR sont situés dans le même locus (*Rv1846c* et *Rv1845c*). La comparaison *in silico* des génomes de *M. tuberculosis* et *M. abscessus* a mis en évidence deux gènes contigus, *MAB\_2415c* et *MAB\_2414c*, qui pourraient être des orthologues de *blaI* et *blaR* (responsable de la régulation de *blaC*) (Figure 56). En revanche, *blaC* chez *M. tuberculosis* n'a pas le même contexte génétique que *bla<sub>Mab</sub>* (*MAB\_2875*) (Figure 57). L'environnement des gènes *bla* n'est donc pas conservé chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus*.

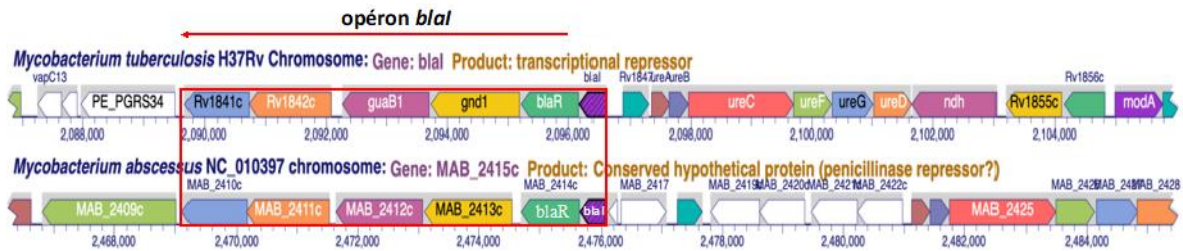


Figure 56. Locus contenant les gènes *blaI* (en violet) et *blaR* (en vert) chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus*. Ces gènes sont donc dans des environnements génétiques conservés. D'après Sezonov, non publié.

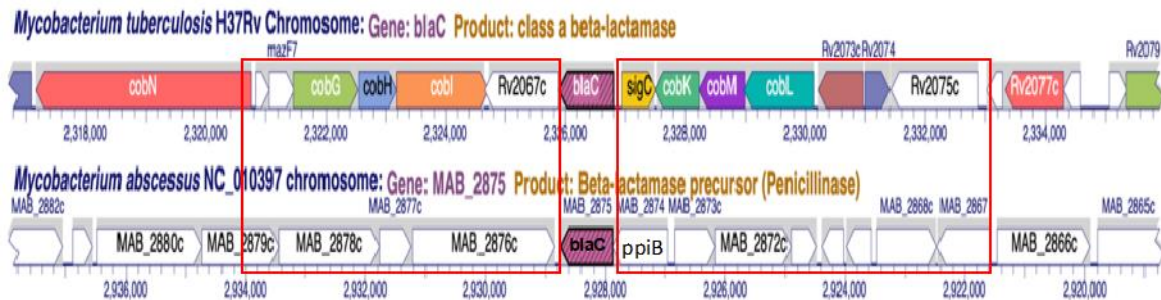


Figure 57. Locus du gène codant pour la  $\beta$ -lactamase chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus*. En rose est représenté le gène de la  $\beta$ -lactamase, *BlaC* de *M. tuberculosis* et *Bla<sub>Mab</sub>* de *M. abscessus*. Les gènes ne présentent pas le même environnement génétique. D'après Sezonov, non publiés.

De plus, la présence de  $\beta$ -lactamines dans le milieu de culture induit l'expression de *blaC* chez *M. tuberculosis* alors que le niveau d'expression de *bla<sub>Mab</sub>* reste inchangé lorsque *M. abscessus* est exposé à ces antibiotiques (Lefebvre *et al*, résultats non publiés).

Un des axes de mon travail était d'identifier les déterminants impliqués dans la surproduction de *Bla<sub>mab</sub>* dans les macrophages en utilisant plusieurs approches. J'ai d'abord testé sur des cultures planctoniques différents stress auxquelles les bactéries sont potentiellement confrontées dans les macrophages (cf Matériel et Méthodes). Aucune des modifications des conditions de cultures sous l'influence de différents stress n'a entraîné une augmentation d'activité spécifique. Dans un deuxième temps, des souches recombinantes fluorescentes ont été construites (Figure 50). Ces différentes souches permettraient de visualiser et de quantifier la production de la  $\beta$ -lactamase directement dans le macrophage sans étape d'extraction d'échantillon. De plus, des expériences de time lapse seraient envisageables. Ce type d'expérience permettrait de suivre la fluorescence sur une durée prolongée afin d'obtenir une cinétique de l'apparition de la surproduction de *Bla<sub>Mab</sub>*.

Une autre approche a commencé à être développée au laboratoire par un étudiant de Master 2 (Vincent Leguillier sous la direction du Pr Sezonov) en collaboration avec l'équipe de J-L Herrmann

et de F Girard-Misguich. Cette équipe dispose d'une banque de 10 000 mutants obtenus par insertion du transposon Tn5 dans le chromosome de *M. abscessus subsp. massiliense* (43S). Le niveau de production de la  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> a été estimé chez 5,000 mutants en plaques de 96 puits par spectrophotométrie en utilisant la nitrocéfine. Les résultats préliminaires obtenus par cette approche ont permis d'identifier des mutants présentant une diminution ou, au contraire, une augmentation du niveau de production Bla<sub>Mab</sub>. Ces phénotypes pourraient impliquer respectivement l'inactivation par transposition d'un gène codant pour un activateur transcriptionnel ou pour un répresseur.

Si des gènes codant pour des protéines portant des motifs de liaison à l'ADN sont identifiés par les essais sur la banque de transposon, ces protéines pourraient être produites chez *E. coli* et purifiées. En parallèle, le début de l'ARNm de l'opéron *MAB\_2874-bla<sub>Mab</sub>* pourrait être déterminé par une expérience d'extension d'amorce. Ainsi, la liaison spécifique des protéines régulatrices candidates pourrait être testée par expérience de gel retard en utilisant la portion d'ADN en amont du site d'initiation de l'ARNm. Enfin, par expérience de footprinting de l'ADN, la séquence de liaison de la protéine régulatrice pourrait être identifiée et séquencée. Toutes ses données pourraient permettre d'identifier et comprendre la régulation de Bla<sub>Mab</sub>.

La comparaison de Bla<sub>Mab</sub> et de BlaC purifiées a mis en évidence qu'une différence au niveau du site conservé SDN, remplacé par SDG chez BlaC, était responsable du profil d'inhibition de ces  $\beta$ -lactamases par le clavulanate et l'avibactam (Soroka et al., 2015, 2016). BlaC (motif SDG) est irréversiblement inhibée par le clavulanate alors que l'inhibition de cette  $\beta$ -lactamase par l'avibactam est très peu efficace. Au contraire, Bla<sub>Mab</sub> est très bien inhibée par l'avibactam alors que le clavulanate est hydrolysé par cette  $\beta$ -lactamase. Les expériences de mutagenèses dirigées ont montré que ces différences étaient dans une très large mesure dues au polymorphisme touchant le motif SDN. Le dernier axe de mon travail a été d'étudier l'effet de ce motif sur la sensibilité aux inhibiteurs lorsque les  $\beta$ -lactamases sont exprimées chez *M. abscessus*. Pour cela, j'ai construit des souches recombinantes portant le gène *bla<sub>Mab</sub>N<sup>132</sup>G* ou *blaC G<sup>132</sup>N* codant pour les différentes formes de  $\beta$ -lactamase. Les CMI de différentes  $\beta$ -lactamines ont ensuite été déterminées en présence ou en absence d'inhibiteurs (Figure 55). En absence d'inhibiteurs, ces souches présentent le même profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines. L'inhibition par le clavulanate est partiellement restaurée lorsque Bla<sub>Mab</sub> porte la simple mutation N<sup>132</sup>G. De même, BlaC portant le motif SDN présente un profil d'inhibition par l'avibactam proche de Bla<sub>Mab</sub>. Ces résultats montrent que cette mutation est en partie responsable de la différence de profil d'inhibition des  $\beta$ -lactamases.



Pour compléter ces résultats, une souche de *M. abscessus* produisant BlaC à la place de Bla<sub>Mab</sub> est en cours de construction par recombinaison homologe. La comparaison des CMI des différentes  $\beta$ -lactamines contre cette souche par rapport à la souche exprimant BlaC G<sup>132</sup>N permettra de confirmer les conclusions précédentes. Ainsi, le changement de motif SDN/G pourrait être un mécanisme de résistance acquise aux inhibiteurs utilisés en clinique. Ce travail tend à montrer que si *M. abscessus* produit une  $\beta$ -lactamase à motif SDG, l'avibactam ne serait plus efficace en combinaison avec les  $\beta$ -lactamines. L'utilisation du clavulanate ne pourrait pas être envisagée puisque l'ajout de clavulanate ne permet qu'une diminution partielle des CMI des  $\beta$ -lactamines sur une souche exprimant Bla<sub>Mab</sub> N<sup>132</sup>G.

Les différents résultats obtenus viennent confirmer l'hypothèse que les données cinétiques ne sont pas suffisantes pour l'évaluation des antibiotiques et que les expériences sur bactéries entières sont nécessaires dans la détermination de l'activité des  $\beta$ -lactamines et des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. On peut prendre l'exemple de la ceftazidime qui n'est pas un bon substrat de Bla<sub>Mab</sub> ( $k_{cat}/K_m = 83 \pm 12 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ; Soroka et al. 2016) mais qui pour autant ne présente pas d'activité sur *M. abscessus*. Pareillement, la céfoxitine est mal hydrolysée par Bla<sub>Mab</sub> ( $k_{cat}/K_m = 6,7 \pm 3,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ; Soroka et al. 2016), les CMI contre *M. abscessus* sont tout de même élevées (32  $\mu\text{g/ml}$  ;(Dubée et al., 2015). La même problématique existe pour les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Nous avons montré que le relebactam est un moins bon inhibiteur de Bla<sub>Mab</sub> que l'avibactam sur protéine purifiée ( $k_2/K_i = 7,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) alors que combiné avec une  $\beta$ -lactamine, l'association est aussi active que l'association  $\beta$ -lactamine-avibactam en CMI et dans le modèle macrophage (Le Run et al., 2019, Annexe III). Cette différence de comportement entre protéine purifiée et bactérie entière pourrait être expliquée par une mauvaise pénétration des molécules à travers la paroi bactérienne, et/ou par une faible affinité pour leurs cibles.

En conclusion, les résultats de mes travaux ont mis en évidence de nouvelles combinaisons d'antibiotiques dont pourraient bénéficier les patients atteints de mucoviscidose infectés par *M. abscessus*. De plus, les nouveaux outils génétiques développés lors de ma thèse pourront être utilisés pour poursuivre l'étude de la régulation de la  $\beta$ -lactamase de *M. abscessus*.

## Références



- Adekambi, T. (2006). *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *international journal of systematic and evolutionary microbiology* 56, 133–143.
- Adekambi, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5493–5501.
- Adekambi, T., Sassi, M., van Ingen, J., and Drancourt, M. (2017). Reinstating *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* as species of the *Mycobacterium abscessus* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 2726–2730.
- Agyeman, A.A., and Ofori-Asenso, R. (2016). Efficacy and safety profile of linezolid in the treatment of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15, 41.
- Ainsa, J.A. Aminoglycoside 2J-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2 J)-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2 J)-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology* 11.
- Aronoff, S.C., Jacobs, M.R., Jochenning, S., and Yamabe, S. Comparative activities of the  $\beta$ -lactamase inhibitors YTR 830, sodium clavulanate, and sulbactam combined with amoxicillin or ampicillin. 3.
- Aziz, D.B., Low, J.L., Wu, M.-L., Gengenbacher, M., Teo, J.W.P., Dartois, V., and Dick, T. (2017). Rifabutin is active against *Mycobacterium abscessus* Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00155-17, /aac/61/6/e00155-17.atom.
- Belanger, A.E., Besra, G.S., Ford, M.E., Mikusova, K., Belisle, J.T., Brennan, P.J., and Inamine, J.M. (1996). The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 11919–11924.
- Bernabeu-Wittel, M., Pichardo, C., García-Curiel, A., Pachón-Ibáñez, M.E., Ibáñez-Martínez, J., Jiménez-Mejías, M.E., and Pachón, J. (2005). Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the in-vivo efficacy of imipenem alone or in combination with amikacin for the treatment of experimental multiresistant

- Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection* 11, 319–325.
- Bernut, A., Le Moigne, V., Lesne, T., Lutfalla, G., Herrmann, J.-L., and Kremer, L. (2014). *In vivo* assessment of drug efficacy against *Mycobacterium abscessus* using the embryonic zebrafish test system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4054–4063.
- Biarrotte-Sorin, S., Hugonnet, J.-E., Delfosse, V., Mainardi, J.-L., Gutmann, L., Arthur, M., and Mayer, C. (2006). Crystal structure of a novel  $\beta$ -lactam-insensitive peptidoglycan transpeptidase. *Journal of Molecular Biology* 359, 533–538.
- Blaschke, T.F., and Skinner, M.H. (1996). The clinical pharmacokinetics of rifabutin. *Clinical Infectious Diseases* 22, S15–S22.
- Botella, H., Stadthagen, G., Lugo-Villarino, G., de Chastellier, C., and Neyrolles, O. (2012). Metallobiology of host–pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends in Microbiology* 20, 106–112.
- Brickner, S.J., Hutchinson, D.K., Barbachyn, M.R., Manninen, P.R., Ulanowicz, D.A., Garmon, S.A., Grega, K.C., Hendges, S.K., Toops, D.S., Ford, C.W., et al. (1996). Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant Gram-positive bacterial infections. *J. Med. Chem.* 39, 673–679.
- Brown-Elliott, B.A., and Wallace, R.J. (2017). *In vitro* susceptibility testing of tedizolid against nontuberculous mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 55, 1747–1754.
- Brown-Elliott, B.A., Nash, K.A., and Wallace, R.J. (2012). Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 25, 545–582.
- Burdette, S.D., and Trotman, R. (2015). Tedizolid: the first once-daily oxazolidinone class antibiotic. *Clin Infect Dis.* 61, 1315–1321.
- Chiu, Y.-C., Yang, S.-C., Wu, C.-H., Chuang, H.-W., Tu, Y.-K., and Ma, C.-H. (2017). *Mycobacterium abscessus* osteomyelitis of the calcaneus presenting as tumor-mimicking lesions: a case report. *J. Bone Joint Surg Case Connector* 7, e56.
- Choi, G.-E., Shin, S.J., Won, C.-J., Min, K.-N., Oh, T., Hahn, M.-Y., Lee, K., Lee, S.H., Daley, C.L., Kim, S., et al. (2012). Macrolide treatment for *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* infection and inducible resistance. *Am J Respir Crit Care Med* 186, 917–925.
- Choi, H., Kim, S.-Y., Kim, D.H., Huh, H.J., Ki, C.-S., Lee, N.Y., Lee, S.-H., Shin, S., Shin, S.J., Daley, C.L., et al. (2017). Clinical characteristics and treatment outcomes

of patients with acquired macrolide-resistant *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*, e01146-17, /aac/61/10/e01146-17.atom.

Cluck, D., Lewis, P., Stayer, B., Spivey, J., and Moorman, J. (2015). Ceftolozane-tazobactam: A new-generation cephalosporin. *American Journal of Health-System Pharmacy* *72*, 2135–2146.

Compain, F., Soroka, D., Heym, B., Gaillard, J.-L., Herrmann, J.-L., Dorchène, D., Arthur, M., and Dubée, V. (2018). *In vitro* activity of tedizolid against the *Mycobacterium abscessus* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* *90*, 186–189.

Cordillot, M., Dubée, V., Triboulet, S., Dubost, L., Marie, A., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2013). *In vitro* cross-linking of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan by 1,d-transpeptidases and inactivation of these enzymes by carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 5940–5945.

Dai, J., Chen, Y., Dean, S., Morris, J.G., Salfinger, M., and Johnson, J.A. (2011). Multiple-genome comparison reveals new loci for mycobacterium species Identification. *Journal of Clinical Microbiology* *49*, 144–153.

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. (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* *8*, 933–944.

Driver, E.R., Ryan, G.J., Hoff, D.R., Irwin, S.M., Basaraba, R.J., Kramnik, I., and Lenaerts, A.J. (2012). Evaluation of a mouse model of necrotic granuloma formation using C3HeB/FeJ mice for testing of drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 3181–3195.

Dubée, V., Triboulet, S., Mainardi, J.-L., Ethève-Quellejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., Dubost, L., Hugonnet, J.-E., and Arthur, M. (2012). Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* 1,d-transpeptidase Ldt<sub>Mt1</sub> by carbapenems and cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 4189–4195.

Dubée, V., Bernut, A., Cortes, M., Lesne, T., Dorchene, D., Lefebvre, A.-L., Hugonnet, J.-E., Gutmann, L., Mainardi, J.-L., Herrmann, J.-L., et al. (2014).  $\beta$ -Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Dubée, V., Soroka, D., Cortes, M., Lefebvre, A.-L., Gutmann, L., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2015). Impact of  $\beta$ -lactamase inhibition on the activity of ceftaroline against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 2938–2941.

Dubois, V., Viljoen, A., Laencina, L., Le Moigne, V., Bernut, A., Dubar, F., Blaise, M., Gaillard, J.-L., Guérardel, Y., Kremer, L., et al. (2018). MmpL8<sub>MAB</sub> controls *Mycobacterium abscessus* virulence and production of a previously unknown glycolipid family. *Proc Natl Acad Sci USA* *115*, E10147–E10156.

Dupont, C., Viljoen, A., Thomas, S., Roquet-Banères, F., Herrmann, J.-L., Pethe, K., and Kremer, L. (2017). Bedaquiline inhibits the ATP synthase in *Mycobacterium abscessus* and is effective in infected zebrafish. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*, e01225-17, /aac/61/11/e01225-17.atom.

Edoo, Z., Iannazzo, L., Compain, F., Li de la Sierra Gallay, I., van Tilbeurgh, H., Fonvielle, M., Bouchet, F., Le Run, E., Mainardi, J.-L., Arthur, M., et al. (2018). Synthesis of avibactam derivatives and activity on  $\beta$ -lactamases and peptidoglycan biosynthesis enzymes of mycobacteria. *Chem. Eur. J.* *24*, 8081–8086.

Ehmann, D.E., Jahic, H., Ross, P.L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G.K., and Fisher, S.L. (2012). Avibactam is a covalent, reversible, non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 11663–11668.

English, A.R., Retsema, J.A., Girard, A.E., Lynch, J.E., and Barth, W.E. (1978). CP-45,899, a  $\beta$ -lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of  $\beta$ -lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *14*, 414–419.

Eustace, K., Jolliffe, V., Sahota, A., and Gholam, K. (2016). Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection following hair transplant. *Clin Exp Dermatol* *41*, 768–770.

Falsey, R.R., Kinzer, M.H., Hurst, S., Kalus, A., Pottinger, P.S., Duchin, J.S., Zhang, J., Noble-Wang, J., and Shinohara, M.M. (2013). Cutaneous inoculation of nontuberculous mycobacteria during professional tattooing: a case series and epidemiologic study. *Clinical Infectious Diseases* *57*, e143–e147.

Ferro, B.E., van Ingen, J., Wattenberg, M., van Soolingen, D., and Mouton, J.W. (2015). Time-kill kinetics of antibiotics active against rapidly growing mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* *70*, 811–817.

Filée, P., Benlafya, K., Delmarcelle, M., Moutzourelis, G., Frère, J.-M., Brans, A., and Joris, B. (2002). The fate of the BlaI repressor during the induction of the *Bacillus licheniformis* BlaP  $\beta$ -lactamase: Induction of  $\beta$ -lactamase in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* *44*, 685–694.

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. (2016). US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the

management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* *71*, i1–i22.

Forbes, B.A. (2017). *Mycobacterial Taxonomy*. *J. Clin. Microbiol.* *55*, 380–383.

Goffin, C., and Ghuysen, J.-M. (2002). Biochemistry and Comparative Genomics of SxxK Superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox: presence of penicillin-susceptible target proteins versus lack of efficiency of penicillin as therapeutic agent. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *66*, 702–738.

Griffin, I., Schmitz, A., Oliver, C., Pritchard, S., Zhang, G., Rico, E., Davenport, E., Llau, A., Moore, E., Fernandez, D., et al. (2019). Outbreak of tattoo-associated nontuberculous mycobacterial skin infections. *Clinical Infectious Diseases* *69*, 949–955.

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.

Gupta, R., Lavollay, M., Mainardi, J.-L., Arthur, M., Bishai, W.R., and Lamichhane, G. (2010). The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat Med* *16*, 466–469.

Housman, S.T., Pope, J.S., Russomanno, J., Salerno, E., Shore, E., Kuti, J.L., and Nicolau, D.P. (2012). Pulmonary disposition of tedizolid following administration of once-daily oral 200-milligram tedizolid phosphate in healthy adult volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2627–2634.

Howard, S.T. (2006). Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* *152*, 1581–1590.

Hugonnet, J.-E., Tremblay, L.W., Boshoff, H.I., Barry, C.E., and Blanchard, J.S. (2009). Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* *323*, 1215–1218.

Im, W.B., Choi, S.H., Park, J.-Y., Choi, S.H., Finn, J., and Yoon, S.-H. (2011). Discovery of torezolid as a novel 5-hydroxymethyl-oxazolidinone antibacterial agent. *European Journal of Medicinal Chemistry* *46*, 1027–1039.

van Ingen, J., Egelund, E.F., Levin, A., Totten, S.E., Boeree, M.J., Mouton, J.W., Aarnoutse, R.E., Heifets, L.B., Peloquin, C.A., and Daley, C.L. (2012). The



- pharmacokinetics and pharmacodynamics of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 186, 559–565.
- Jankute, M., Cox, J.A.G., Harrison, J., and Besra, G.S. (2015). Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 405–423.
- Kaushik, A., Ammerman, N.C., Lee, J., Martins, O., Kreiswirth, B.N., Lamichhane, G., Parrish, N.M., and Nuermberger, E.L. (2019a). *In vitro* activity of the new  $\beta$ -lactamase inhibitors Relebactam and Vaborbactam in combination with  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e02623-18, /aac/63/3/AAC.02623-18.atom.
- Kaushik, A., Ammerman, N.C., Parrish, N.M., and Nuermberger, E.L. (2019b). New  $\beta$ -lactamase inhibitors Nacubactam and Zidebactam improve the *in vitro* activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00733-19, /aac/63/9/AAC.00733-19.atom.
- Khan, Z., Iregui, A., Landman, D., and Quale, J. (2019). Activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City medical centres. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74, 2938–2942.
- Kim, H.-Y., Kim, B.J., Kook, Y., Yun, Y.-J., Shin, J.H., Kim, B.-J., and Kook, Y.-H. (2010). *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns: Characteristic *erm*(41) of *M. massiliense*. *Microbiology and Immunology* 54, 347–353.
- Kim, N., Yi, J., and Chang, C.L. (2017). Recovery rates of non-tuberculous mycobacteria from clinical specimens are increasing in Korean tertiary-care hospitals. *J Korean Med Sci* 32, 1263.
- Kisgen, J.J., Mansour, H., Unger, N.R., and Childs, L.M. (2014). Tedizolid: A new oxazolidinone antimicrobial. *American Journal of Health-System Pharmacy* 71, 621–633.
- Kishida, D., Sato, M., Kobayashi, C., Ueno, K., Kinoshita, T., Kodaira, M., Shimojima, Y., Ishii, W., Ushiki, A., and Ikeda, S. (2017). Intractable cutaneous nontuberculous mycobacteriosis (*Mycobacterium abscessus*) during Treatment for Systemic Lupus Erythematosus. *Intern. Med.* 56, 1253–1257.
- Knapp, G.S., and McDonough, K.A. (2014). Cyclic AMP signaling in mycobacteria. *Microbiology Spectrum* 2.

- 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. (2011). Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 405–410.
- Koteva, K., Cox, G., Kelso, J.K., Surette, M.D., Zubyk, H.L., Ejim, L., Stogios, P., Savchenko, A., Sørensen, D., and Wright, G.D. (2018). Rox, a rifamycin resistance enzyme with an unprecedented mechanism of action. *Cell Chemical Biology* 25, 403-412.e5.
- Kumar, P., Chauhan, V., Silva, J.R.A., Lameira, J., d’Andrea, F.B., Li, S.-G., Ginell, S.L., Freundlich, J.S., Alves, C.N., Bailey, S., et al. (2017). *Mycobacterium abscessus* L,d-transpeptidases are susceptible to inactivation by carbapenems and cephalosporins but not penicillins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00866-17, /aac/61/10/e00866-17.atom.
- Kusunoki, S., and Ezak, T. (1992). 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. 6.
- Lam, S.W., and Bauer, S.R. (2013). Amikacin pharmacokinetics during continuous veno-venous hemodialysis. *Infect Dis Ther* 2, 217–226.
- Laochumroonvorapong, P., Paul, S., Manca, C., Freedman, V.H., and Kaplan, G. (1997). Mycobacterial growth and sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> killing in human monocytes *In Vitro*. *Infect. Immun.* 65, 8.
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L., and Mainardi, J.-L. (2008). The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *Journal of Bacteriology* 190, 4360–4366.
- Lavollay, M., Fourgeaud, M., Herrmann, J.-L., Dubost, L., Marie, A., Gutmann, L., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2011). The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases. *Journal of Bacteriology* 193, 778–782.
- Lavollay, M., Dubée, V., Heym, B., Herrmann, J.-L., Gaillard, J.-L., Gutmann, L., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2014). *In vitro* activity of cefoxitin and imipenem against *Mycobacterium abscessus* complex. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O297–O300.
- Le Moigne, V., Rottman, M., Goulard, C., Barteau, B., Poncin, I., Soismier, N., Canaan, S., Pitard, B., Gaillard, J.-L., and Herrmann, J.-L. (2015). Bacterial

phospholipases C as vaccine candidate antigens against cystic fibrosis respiratory pathogens: The *Mycobacterium abscessus* model. *Vaccine* 33, 2118–2124.

Le Run, E., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2018). *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with rifabutin and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 62, e00623-18, /aac/62/8/e00623-18.atom.

Le Run, E., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2019). *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with tedizolid, rifabutin, and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e01915-18, /aac/63/4/AAC.01915-18.atom.

Lee, J.-Y., Lee, M.-S., Kim, D.-J., Yang, S.-J., Lee, S.-J., Noh, E.-J., Shin, S.J., and Park, J.-H. (2017). Nucleotide-binding oligomerization domain 2 contributes to limiting growth of *Mycobacterium abscessus* in the lung of mice by regulating cytokines and nitric oxide production. *Front. Immunol.* 8, 1477.

Lee, Y., Kim, J., and Trinh, S. Meropenem–vaborbactam (Vabomere™): another option for carbapenem-resistant enterobacteriaceae. 4.

Lefebvre, A.-L., Dubée, V., Cortes, M., Dorchêne, D., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2016). Bactericidal and intracellular activity of  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1556–1563.

Lefebvre, A.-L., Le Moigne, V., Bernut, A., Veckerlé, C., Compain, F., Herrmann, J.-L., Kremer, L., Arthur, M., and Mainardi, J.-L. (2017). Inhibition of the  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> by avibactam improves the *in vitro* and *In Vivo* efficacy of imipenem against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02440-16, /aac/61/4/e02440-16.atom.

Lerat, I., Cambau, E., Roth dit Bettoni, R., Gaillard, J.-L., Jarlier, V., Truffot, C., and Veziris, N. (2014). *In vivo* evaluation of antibiotic activity against *Mycobacterium abscessus*. *The Journal of Infectious Diseases* 209, 905–912.

Levin, M.E., and Hatfull, G.F. (1993). *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol* 8, 277–285.

Levy, Z.D., Du, V., Chiluwal, A., Chalif, D.J., and Ledoux, D.E. (2016). Ventriculoperitoneal shunt infection with *Mycobacterium abscessus*: a rare cause of ventriculitis. *World Neurosurgery* 86, 510.e1-510.e4.

Lindman, M., and Dick, T. (2019). Bedaquiline eliminates bactericidal activity of  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00827-19, /aac/63/8/AAC.00827-19.atom.

- Livermore, D.M., Mushtaq, S., Warner, M., Zhang, J., Maharjan, S., Doumith, M., and Woodford, N. (2011). Activities of NXL104 Combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 390–394.
- Madsen, C.T., Jakobsen, L., Buriánková, K., Doucet-Populaire, F., Pernodet, J.-L., and Douthwaite, S. (2005). Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* *280*, 38942–38947.
- Mainardi, J.-L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J., and Gutmann, L. (2000). Novel mechanism of  $\beta$ -lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *J. Biol. Chem.* *275*, 16490–16496.
- Mainardi, J.-L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., Fréhel, C., Arthur, M., van Heijenoort, J., and Gutmann, L. (2002). Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Biol. Chem.* *277*, 35801–35807.
- Mainardi, J.-L., Hugonnet, J.-E., Rusconi, F., Fourgeaud, M., Dubost, L., Mouri, A.N., Delfosse, V., Mayer, C., Gutmann, L., Rice, L.B., et al. (2007). Unexpected inhibition of peptidoglycan LD-transpeptidase from *Enterococcus faecium* by the  $\beta$ -lactam imipenem. *J. Biol. Chem.* *282*, 30414–30422.
- Mainardi, J.-L., Villet, R., Bugg, T.D., Mayer, C., and Arthur, M. (2008). Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* *32*, 386–408.
- Maurer, F.P., Castelberg, C., Quiblier, C., Bottger, E.C., and Somoskovi, A. (2014). *Erm(41)*-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* *69*, 1559–1563.
- Maurer, F.P., Bruderer, V.L., Castelberg, C., Ritter, C., Scherbakov, D., Bloemberg, G.V., and Böttger, E.C. (2015). Aminoglycoside-modifying enzymes determine the innate susceptibility to aminoglycoside antibiotics in rapidly growing mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 1412–1419.
- McGuffin, S.A., Pottinger, P.S., and Harnisch, J.P. (2017). Clofazimine in nontuberculous mycobacterial infections: a growing niche. *Open Forum Infectious Diseases* *4*.
- Mengin-Lecreulx, D., Texier, L., Rousseau, M., and van Heijenoort, J. (1991). The *murG* gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine: N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine

transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* *173*, 4625–4636.

Mirnejad, R., Asadi, A., Khoshnood, S., Mirzaei, H., Heidary, M., Fattorini, L., Ghodousi, A., and Darban-Sarokhalil, D. (2018). Clofazimine: A useful antibiotic for drug-resistant tuberculosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* *105*, 1353–1359.

Molina-Torres, C.A., Barba-Marines, A., Valles-Guerra, O., Ocampo-Candiani, J., Cavazos-Rocha, N., Pucci, M.J., Castro-Garza, J., and Vera-Cabrera, L. (2014). Intracellular activity of tedizolid phosphate and ACH-702 versus *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* *13*, 13.

Monogue, M.L., Giovagnoli, S., Bissantz, C., Zampaloni, C., and Nicolau, D.P. (2018). *In vivo* efficacy of meropenem with a novel non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor, Nacubactam, against Gram-negative organisms exhibiting various resistance mechanisms in a murine complicated urinary tract infection model. *Antimicrob Agents Chemother* *62*, e02596-17, /aac/62/9/e02596-17.atom.

Moore, M., and Frerichs, J.B. (1953). An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region. *Journal of Investigative Dermatology* *20*, 133–169.

Morinaka, A., Tsutsumi, Y., Yamada, M., Suzuki, K., Watanabe, T., Abe, T., Furuuchi, T., Inamura, S., Sakamaki, Y., Mitsuhashi, N., et al. (2015). OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine  $\beta$ -lactamase inhibitor, antibiotic and  $\beta$ -lactam ‘enhancer.’ *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 2779–2786.

Munshi, T., Gupta, A., Evangelopoulos, D., Guzman, J.D., Gibbons, S., Keep, N.H., and Bhakta, S. (2013). Characterisation of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* *8*, e60143.

Nahid, P., Dorman, S.E., Alipanah, N., Barry, P.M., Brozek, J.L., Cattamanchi, A., Chaisson, L.H., Chaisson, R.E., Daley, C.L., Grzemska, M., et al. (2016). Official american thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of america clinical practice guidelines: treatment of drug-susceptible tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* *63*, e147–e195.

Nessar, R., Reyrat, J.M., Murray, A., and Gicquel, B. (2011). Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* *66*, 1719–1724.

Niederweis, M., Neyrolles, O., Wolschendorf, F., and Mitra, A. (2015). Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol Rev* *264*, 249–263.

Noordeen, S.K. (2016). History of chemotherapy of leprosy. *Clinics in Dermatology* 34, 32–36.

Nurizzo, D., Shewry, S.C., Perlin, M.H., Brown, S.A., Dholakia, J.N., Fuchs, R.L., Deva, T., Baker, E.N., and Smith, C.A. (2003). The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. *Journal of Molecular Biology* 327, 491–506.

Odds, F.C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 1–1.

Olson, M.W., Ruzin, A., Feyfant, E., Rush, T.S., O'Connell, J., and Bradford, P.A. (2006). Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 2156–2166.

Palmer, K.L., Aye, L.M., and Whiteley, M. (2007). Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum. *Journal of Bacteriology* 189, 8079–8087.

Pandey, R., Chen, L., Manca, C., Jenkins, S., Glaser, L., Vinnard, C., Stone, G., Lee, J., Mathema, B., Nuermberger, E.L., et al. (2019). Dual  $\beta$ -lactam combinations highly active against *Mycobacterium abscessus* complex *in vitro*. *MBio* 10, e02895-18, /mbio/10/1/mBio.02895-18.atom.

Prabhakaran, K., Harris, E.B., and Randhawa, B. (1999). Bactericidal action of ampicillin/sulbactam against intracellular mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13, 133–135.

Prammananan, T., Sander, P., Brown, B.A., Frischkorn, K., Onyi, G.O., Zhang, Y., Böttger, E.C., and Wallace, Jr., R.J. (1998). A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J infect dis* 177, 1573–1581.

Prokocimer, P., Bien, P., Surber, J., Mehra, P., DeAnda, C., Bulitta, J.B., and Corey, G.R. (2011). Phase 2, randomized, double-blind, dose-ranging study evaluating the safety, tolerability, population pharmacokinetics, and efficacy of oral torezolid phosphate in patients with complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 583–592.

Qvist, T., Taylor-Robinson, D., Waldmann, E., Olesen, H.V., Hansen, C.R., Mathiesen, I.H., Høiby, N., Katzenstein, T.L., Smyth, R.L., Diggle, P.J., et al. (2016). Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 15, 380–385.

- Randhawa, B. (1994). Bactericidal action of ampicillin/sulbactam against *Mycobacterium leprae*. *J Antimicrob Chemother* 33, 1035–1037.
- Richard, M., Gutiérrez, A.V., Viljoen, A.J., Ghigo, E., Blaise, M., and Kremer, L. (2018a). Mechanistic and structural insights into the unique TetR-dependent regulation of a drug efflux pump in *Mycobacterium abscessus*. *Front. Microbiol.* 9, 649.
- Richard, M., Gutiérrez, A.V., Viljoen, A., Rodriguez-Rincon, D., Roquet-Baneres, F., Blaise, M., Everall, I., Parkhill, J., Floto, R.A., and Kremer, L. (2018b). Mutations in the MAB\_2299c TetR regulator confer cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e01316-18, /aac/63/1/AAC.01316-18.atom.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. 245, 9.
- Roesch, E.A., Nichols, D.P., and Chmiel, J.F. (2018). Inflammation in cystic fibrosis: an update. *Pediatr Pulmonol* 53, S30–S50.
- Rudra, P., Hurst-Hess, K., Lappierre, P., and Ghosh, P. (2018). High levels of intrinsic tetracycline resistance in *Mycobacterium abscessus* are conferred by a tetracycline-modifying monooxygenase. *Antimicrob Agents Chemother* 62, e00119-18, /aac/62/6/e00119-18.atom.
- Sala, C., Haouz, A., Saul, F.A., Miras, I., Rosenkrands, I., Alzari, P.M., and Cole, S.T. (2009). Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 71, 1102–1116.
- 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: Fig. 1. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2293–2295.
- Shen, G.-H., Wu, B.-D., Hu, S.-T., Lin, C.-F., Wu, K.-M., and Chen, J.-H. (2010). High efficacy of clofazimine and its synergistic effect with amikacin against rapidly growing mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 400–404.
- Simons, S. (2011). Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, Eastern Asia. *Emerg. Infect. Dis.*
- Skinner, M.H., Hsieh, M., Torseth, J., Pauloin, D., Bhatia, G., Harkonen, S., Merigan, T.C., and Blaschke, T.F. (1989). Pharmacokinetics of rifabutin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1237–1241.

- Slauch, J.M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question: How do phagocytic ROS kill bacteria? *Molecular Microbiology* *80*, 580–583.
- Soroka, D., Dubee, V., Soulier-Escrihuela, O., Cuinet, G., Hugonnet, J.-E., Gutmann, L., Mainardi, J.-L., and Arthur, M. (2014). Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* *69*, 691–696.
- Soroka, D., Li de la Sierra-Gallay, I., Dubée, V., Triboulet, S., van Tilbeurgh, H., Compain, F., Ballell, L., Barros, D., Mainardi, J.-L., Hugonnet, J.-E., et al. (2015). Hydrolysis of clavulanate by *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -lactamase BlaC harboring a canonical SDN motif. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 5714–5720.
- Soroka, D., Ourghanlian, C., Compain, F., Fichini, M., Dubée, V., Mainardi, J.-L., Hugonnet, J.-E., and Arthur, M. (2016). Inhibition of  $\beta$ -lactamases of mycobacteria by avibactam and clavulanate. *J. Antimicrob. Chemother.* dkw546.
- Sousa, P.P. de, Cruz, R.C. da S., Schettini, A.P.M., and Westphal, D.C. (2015). *Mycobacterium abscessus* skin infection after tattooing - Case report. *An. Bras. Dermatol.* *90*, 741–743.
- Steele, M.A., Burk, R.F., and DesPrez, R.M. (1991). Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. *Chest* *99*, 465–471.
- Story-Roller, E., Maggioncalda, E.C., and Lamichhane, G. (2019). Synergistic Efficacy of  $\beta$ -Lactam Combinations against *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Infection in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* *63*, e00614-19, /aac/63/8/AAC.00614-19.atom.
- Sun-Wada, G.-H., Tabata, H., Kawamura, N., Aoyama, M., and Wada, Y. (2009). Direct recruitment of H<sup>+</sup>-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *Journal of Cell Science* *122*, 2504–2513.
- Tasneen, R., Betoudji, F., Tyagi, S., Li, S.-Y., Williams, K., Converse, P.J., Dartois, V., Yang, T., Mendel, C.M., Mdluli, K.E., et al. (2016). Contribution of oxazolidinones to the efficacy of novel regimens containing bedaquiline and pretomanid in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 270–277.
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T., Lowrie, D., Colston, M.J., and Cole, S. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet* *341*, 647–651.



- Thomson, R., Tolson, C., Sidjabat, H., Huygens, F., and Hargreaves, M. (2013). *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. *BMC Infect Dis* 13, 241.
- Triboulet, S., Dubée, V., Lecoq, L., Bougault, C., Mainardi, J.-L., Rice, L.B., Ethève-Quelquejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., Dubost, L., et al. (2013). Kinetic features of L,D-transpeptidase inactivation critical for  $\beta$ -lactam antibacterial activity. *PLoS ONE* 8, e67831.
- Ung, K.L., Alsarraf, H.M.A.B., Olieric, V., Kremer, L., and Blaise, M. (2019). Crystal structure of the aminoglycosides *N*-acetyltransferase Eis2 from *Mycobacterium abscessus*. *FEBS J* febs.14975.
- Van der Auwera, P., Matsumoto, T., and Husson, M. (1988). Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 22, 185–192.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., and Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochemical Journal* 366, 689–704.
- Viljoen, A., Herrmann, J.-L., Onajole, O.K., Stec, J., Kozikowski, A.P., and Kremer, L. (2017). Controlling extra- and intramacrophagic *Mycobacterium abscessus* by targeting mycolic acid transport. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 388.
- Walkty, A., DeCorby, M., Lagacé-Wiens, P.R.S., Karlowsky, J.A., Hoban, D.J., and Zhanel, G.G. (2011). *In vitro* activity of ceftazidime combined with NXL104 versus *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients in canadian hospitals (CANWARD 2009 Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2992–2994.
- Wallace, R.J., Meier, A., Brown, B.A., Zhang, Y., Sander, P., Onyi, G.O., and Böttger, E.C. (1996). Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1676–1681.
- Wallace, R.J., Brown-Elliott, B.A., Ward, S.C., Crist, C.J., Mann, L.B., and Wilson, R.W. (2001). Activities of linezolid against rapidly growing mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 764–767.
- Wang, S.-H., and Pancholi, P. (2014). Mycobacterial skin and soft tissue infection. *Curr Infect Dis Rep* 16, 438.
- Ward, S.K., Hoye, E.A., and Talaat, A.M. (2008). The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper. *Journal of Bacteriology* 190, 2939–2946.
- Weiss, G., and Schaible, U.E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* 264, 182–203.

Williams, M.M., Yakrus, M.A., Arduino, M.J., Cooksey, R.C., Crane, C.B., Banerjee, S.N., Hilborn, E.D., and Donlan, R.M. (2009). Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2091–2098.

Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A.L., Connell, S.R., and Fucini, P. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. 6.

Wirmer, J., and Westhof, E. (2006). Molecular contacts between antibiotics and the 30S ribosomal particle. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 180–202.

World Health Organization, and World Health Organization (2014). Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis.

Yano, T., Kassovska-Bratinova, S., Teh, J.S., Winkler, J., Sullivan, K., Isaacs, A., Schechter, N.M., and Rubin, H. (2011). Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH:quinone oxidoreductase: a pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 286, 10276–10287.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32, 361–385.

Zhang, D., Wang, Y., Lu, J., and Pang, Y. (2016). *In vitro* activity of  $\beta$ -lactams in combination with  $\beta$ -lactamase inhibitors against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 393–399.

Zhang, Z., Lu, J., Liu, M., Wang, Y., Zhao, Y., and Pang, Y. (2017). *In vitro* activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49, 383–386.

Zhou, Y., Song, K., Painter, R.G., Aiken, M., Reiser, J., Stanton, B.A., Nauseef, W.M., and Wang, G. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. *J Innate Immun* 5, 219–230.

(2016). 2016 Patient Registry Annual Data Report. 94.

(2017). ECFS Patient Registry. 149.



# Annexes



# *In Vitro* and Intracellular Activity of Imipenem Combined with Rifabutin and Avibactam against *Mycobacterium abscessus*

Eva Le Run,<sup>a,b,c</sup> Michel Arthur,<sup>a,b,c</sup> Jean-Luc Mainardi<sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup>INSERM, U1138, LRMA, Equipe 12 du Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

<sup>b</sup>Université Pierre et Marie Curie, UMR S 1138, Paris, France

<sup>c</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR S 1138, Paris, France

<sup>d</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

**ABSTRACT** Repurposing drugs may be useful as an add-on in the treatment of *Mycobacterium abscessus* pulmonary infections, which are particularly difficult to cure. *M. abscessus* naturally produces a  $\beta$ -lactamase, Bla<sub>MAB</sub>, which is inhibited by avibactam. The recommended regimens include imipenem, which is hydrolyzed by Bla<sub>MAB</sub> and used without any  $\beta$ -lactamase inhibitor. Here, we determine whether the addition of rifabutin improves the activity of imipenem alone or in combination with avibactam against *M. abscessus* CIP104536. Rifabutin at 16  $\mu$ g/ml was only bacteriostatic (MIC of 4  $\mu$ g/ml) and was moderately synergistic in combination with imipenem (fractional inhibitory concentration [FIC] index of 0.38). Addition of rifabutin (16  $\mu$ g/ml) moderately increased killing by a low (8  $\mu$ g/ml) but not by a high (32  $\mu$ g/ml) concentration of imipenem. Addition of avibactam (4  $\mu$ g/ml) did not further increase killing by the former combination. In infected macrophages, rifabutin (16  $\mu$ g/ml) increased the activity of imipenem at 8 and 32  $\mu$ g/ml, achieving 3- and 100-fold reductions in the numbers of intracellular bacteria, respectively. Avibactam (16  $\mu$ g/ml) improved killing by imipenem at 8  $\mu$ g/ml. A 5-fold killing was obtained for a triple combination comprising avibactam (16  $\mu$ g/ml) and therapeutically achievable doses of imipenem (8  $\mu$ g/ml) and rifabutin (1  $\mu$ g/ml). These results indicate that the imipenem-rifabutin combination should be further considered for the treatment of *M. abscessus* pulmonary infections in cystic fibrosis patients and that addition of a  $\beta$ -lactamase inhibitor might improve its efficacy. Mechanistically, the impact of Bla<sub>MAB</sub> inhibition by avibactam on antibiotic activity was assessed by comparing CIP104536 and a  $\beta$ -lactamase-deficient derivative.

**KEYWORDS** avibactam,  $\beta$ -lactamase inhibitor, cystic fibrosis, imipenem, *Mycobacterium abscessus*, rifabutin

*Mycobacterium abscessus*, a rapidly growing mycobacterium, has emerged as a significant pathogen responsible for chronic pulmonary infections in cystic fibrosis patients (1–5). Among the nontuberculous mycobacteria, *M. abscessus* is the predominant species isolated in these patients (40 to 50%) (6, 7). The treatment is particularly difficult since *M. abscessus* is intrinsically resistant to a broad range of antibiotics, including those used for the treatment of tuberculosis, such as rifampin (8, 9).

The recommended treatment of lung infections due to *M. abscessus* is not yet well standardized. For cystic fibrosis patients, it consists of an initial phase with the combination of a macrolide (azithromycin), an aminoglycoside (amikacin), a glycylicycline (tigecycline), and a carbapenem (imipenem) for 3 months (10). The continuation phase (at least 12 months) relies on four *per os*-administered drugs (azithromycin, minocycline, clofazimine, and moxifloxacin) (10). Since resistance to macrolides compromises the efficacy of this treatment schedule (11), there is an urgent need to identify

Received 29 March 2018 Returned for modification 15 May 2018 Accepted 29 May 2018

Accepted manuscript posted online 4 June 2018

**Citation** Le Run E, Arthur M, Mainardi J-L. 2018. *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with rifabutin and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 62:e00623-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00623-18>.

**Copyright** © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jean-Luc Mainardi, [jean-luc.mainardi@crc.jussieu.fr](mailto:jean-luc.mainardi@crc.jussieu.fr).

**TABLE 1** MIC of antibiotics against *M. abscessus*

<i>M. abscessus</i> strain	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Imipenem	Rifabutin
CIP104536	4	4
CIP104536 $\Delta\text{bla}_{\text{MAB}}$	2	4

additional therapeutic options. This could be achieved in the short term by repurposing existing drugs and in the longer term by the discovery of new antimycobacterial agents.

Infections due to *M. abscessus* are treated by  $\beta$ -lactams in the absence of any  $\beta$ -lactamase inhibitor although all *M. abscessus* isolates produce the broad-spectrum  $\beta$ -lactamase  $\text{Bla}_{\text{MAB}}$ . This enzyme effectively hydrolyzes most  $\beta$ -lactams except ceftazidime and imipenem, the latter being slowly inactivated (12, 13).  $\text{Bla}_{\text{MAB}}$  is not inhibited by classical inhibitors (clavulanate, tazobactam, and sulbactam) (14). In contrast, complete and rapid inactivation of  $\text{Bla}_{\text{MAB}}$  is obtained with avibactam (12), which has been developed and approved for the treatment of infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (15–17). Deletion of the gene encoding  $\text{Bla}_{\text{MAB}}$  ( $\Delta\text{bla}_{\text{MAB}}$ ) or chemical inhibition of the  $\beta$ -lactamase by avibactam extends the spectrum of  $\beta$ -lactams active against *M. abscessus* (12, 18) and improves the efficacy of imipenem in both the macrophage and zebrafish embryo models (19).

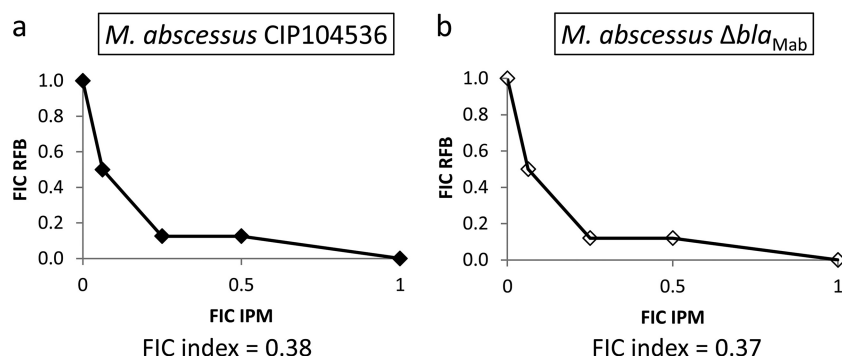
The rifampin derivative rifabutin is used as a first-line treatment for infections due to members of the *Mycobacterium avium* complex (8). Recently, screening of 2,700 approved drugs against *M. abscessus* identified rifabutin as an active drug (MIC and minimum bactericidal concentration [MBC] of 3 and 6  $\mu\text{g/ml}$ , respectively) (20). Rifabutin was active *in vitro* against reference strains belonging to the three subspecies of *M. abscessus* (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, and *M. abscessus* subsp. *massiliense*), as well as against a collection of clinical isolates (20).

In this study, we investigated the possibility of repurposing rifabutin for *M. abscessus* infections in combination with imipenem or with imipenem and avibactam. We report the *in vitro* and intracellular antibacterial activities of various combinations of these three drugs. We have also compared the activity of the drug combinations against a smooth variant of *M. abscessus* CIP104536 and a derivative obtained by deletion of the gene encoding  $\text{Bla}_{\text{MAB}}$  in order to assess the impact of  $\beta$ -lactamase production.

## RESULTS

**Bacteriostatic activity of rifabutin alone or combined with imipenem and synergy between these drugs.** The MIC of rifabutin was 4  $\mu\text{g/ml}$  against both *M. abscessus* CIP104536 and its  $\beta$ -lactamase-deficient ( $\Delta\text{bla}_{\text{MAB}}$ ) derivative (Table 1). The MICs of imipenem were 4  $\mu\text{g/ml}$  and 2  $\mu\text{g/ml}$  against CIP104536 and its  $\Delta\text{bla}_{\text{MAB}}$  derivative. The isobolograms for the interaction between rifabutin and imipenem are presented in Fig. 1. Against CIP104536 (Fig. 1a), the combination of rifabutin with imipenem showed a moderate synergistic effect, with a fractional inhibitory concentration (FIC) index of 0.38 at  $1/8\times$  the MIC of imipenem and  $1/4\times$  the MIC of rifabutin. Against the  $\Delta\text{bla}_{\text{MAB}}$  derivative (Fig. 1b), the FIC index was 0.37 at  $1/8\times$  the MIC of imipenem and  $1/4\times$  the MIC of rifabutin.

***In vitro* killing of *M. abscessus* by rifabutin alone or in combination with imipenem.** Rifabutin was tested at 4-fold the MIC (16  $\mu\text{g/ml}$ ), and imipenem was tested at 2- and 8-fold the MIC (8 and 32  $\mu\text{g/ml}$ ). Against CIP104536, rifabutin alone led to a 0.4- $\log_{10}$  reduction in CFU count (Fig. 2a; see Table S1 in the supplemental material for statistical analysis). Higher reductions in the  $\log_{10}$  CFU count were observed for imipenem alone at 8  $\mu\text{g/ml}$  (2.2- $\log_{10}$  reduction) and 32  $\mu\text{g/ml}$  (2.0- $\log_{10}$  reduction). The addition of rifabutin moderately increased bacterial killing for imipenem at 8  $\mu\text{g/ml}$  but not at 32  $\mu\text{g/ml}$ . Against CIP104536, none of the tested regimens showed bactericidal activity defined by a reduction of more than 99.9% of the CFU present in the inoculum. Similar results were obtained for the  $\Delta\text{bla}_{\text{MAB}}$  derivative of CIP104536 except



**FIG 1** Isobolograms showing the interaction between rifabutin (RFB) and imipenem (IPM) against *M. abscessus* CIP104536 (a) and its  $\Delta bla_{MAB}$  derivative (b). The fractional inhibitory concentration (FIC) index was determined by the checkerboard method.

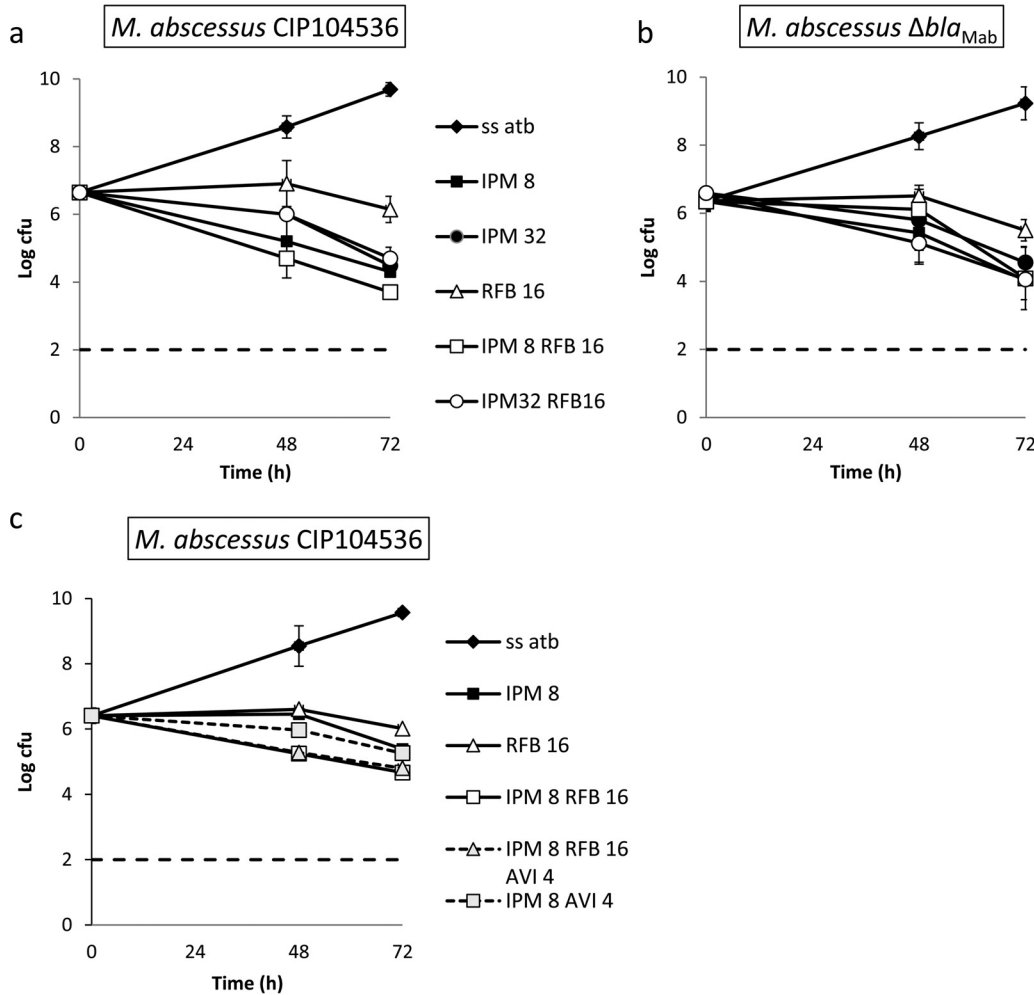
that rifabutin did not improve the activity of imipenem (Fig. 2a and statistical analysis in Table S2). Thus, the production of the  $\beta$ -lactamase compromised the activity of imipenem only if this antibiotic was tested at a low dose, and this effect was not observed if the carbapenem was associated with rifabutin.

**Impact of avibactam on *in vitro* killing of *M. abscessus* by rifabutin and imipenem.** Since the addition of rifabutin to imipenem led to a moderate increase in the activity of imipenem at 8  $\mu$ g/ml against *M. abscessus* CIP104536 (Fig. 2a), we investigated the benefit of adding avibactam (4  $\mu$ g/ml) to this combination (Fig. 2c and statistical analysis in Table S3). The triple combination of imipenem-rifabutin-avibactam was not more active than imipenem-rifabutin. Avibactam did not potentiate the killing by imipenem alone.

To summarize the *in vitro* activity of the drugs, rifabutin alone was bacteriostatic against *M. abscessus*. Against *M. abscessus* CIP104536, rifabutin moderately increased the activity of imipenem at 8  $\mu$ g/ml but not at 32  $\mu$ g/ml. Avibactam did not improve the activity of imipenem or imipenem-rifabutin. None of the combinations was bactericidal.

**Intramacrophage activity of rifabutin alone or in combination with imipenem.** THP-1-derived macrophages were infected with *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta bla_{MAB}$  derivative and exposed to various drugs for 48 h, and surviving bacteria were enumerated by plating serial dilutions of macrophage lysates (Fig. 3 and statistical analysis in Table S4). In the absence of antibiotic, *M. abscessus* CIP104536 grew in the macrophages, leading to a 130-fold increase in the number of CFU in 48 h (Fig. 3a). Rifabutin at 16  $\mu$ g/ml partially prevented intramacrophage growth (6.1- versus 134-fold increase in absence of antibiotic in the number of CFU;  $P < 0.05$ ). Imipenem at 8  $\mu$ g/ml was more active than rifabutin (1.7- versus 6.1-fold increase in CFU count, respectively;  $P < 0.05$ ). Increasing the concentration of imipenem from 8  $\mu$ g/ml to 32  $\mu$ g/ml improved the activity of this drug, leading to a minor decrease in the intracellular number of bacteria (1.7- versus 0.44-fold change in CFU count, respectively;  $P < 0.05$ ). The combination of rifabutin and imipenem (8  $\mu$ g/ml) was more active than that imipenem alone (0.22- versus 1.7-fold change in CFU count, respectively;  $P < 0.05$ ). Increasing the concentration of imipenem from 8  $\mu$ g/ml to 32  $\mu$ g/ml improved the activity of the combination (0.01- versus 0.22-fold increase in CFU count, respectively;  $P < 0.05$ ). Of note, the combination of imipenem (32  $\mu$ g/ml) and rifabutin (16  $\mu$ g/ml) achieved 99% killing of *M. abscessus* in macrophages.

Rifabutin (16  $\mu$ g/ml) and imipenem (8 and 32  $\mu$ g/ml) were also tested against the isogenic strain *M. abscessus* CIP104536  $\Delta bla_{MAB}$  to evaluate the impact of the production of the  $\beta$ -lactamase  $Bla_{MAB}$  on the intracellular activity of the combination (Fig. 3a and statistical analysis in Table S5). As expected, rifabutin alone was similarly active against CIP104536 and its  $\Delta bla_{MAB}$  derivative (6.1- versus 3.7-fold change, respectively,  $P = 0.27$ ). Deletion of  $bla_{MAB}$  significantly improved the activity of imipenem alone at

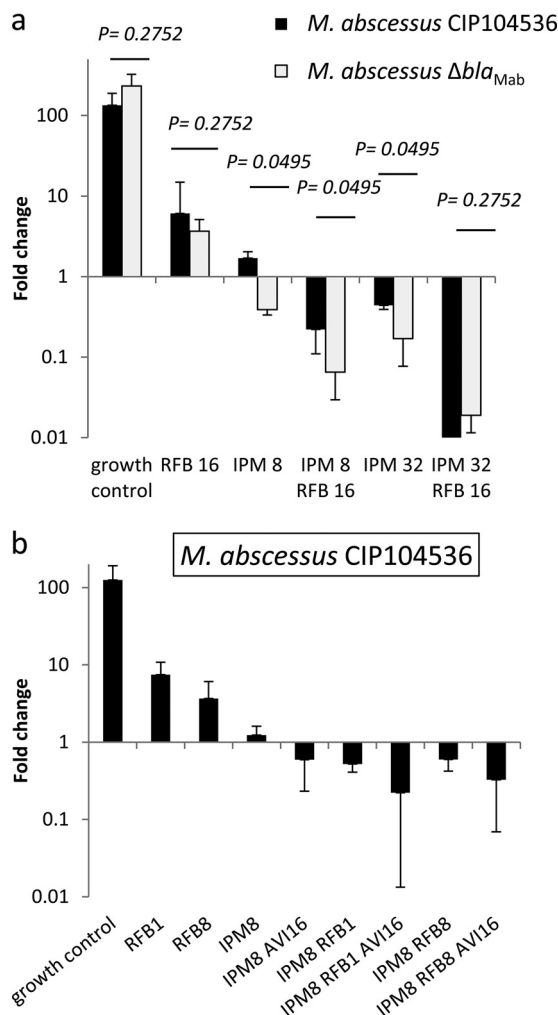


**FIG 2** Time-kill curves. Rifabutin (RFB) was tested alone or in combination with imipenem (IPM) and the  $\beta$ -lactamase inhibitor avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536 and its derivative  $\Delta bla_{MAB}$ . (a) Time-kill curves of rifabutin at 16  $\mu\text{g/ml}$  alone or in combination with imipenem (8 and 32  $\mu\text{g/ml}$ ) against *M. abscessus* CIP104536. (b) Time-kill curves of rifabutin at 16  $\mu\text{g/ml}$  alone or in combination with imipenem (8 and 32  $\mu\text{g/ml}$ ) against the  $\Delta bla_{MAB}$  derivative. (c) Time-kill curves of rifabutin at 1 and 8  $\mu\text{g/ml}$  alone or in combination with imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$ ) with or without avibactam (4  $\mu\text{g/ml}$ ) against *M. abscessus* CIP104536. The number of CFU was determined after 0, 48, and 72 h of exposure to antibiotics. Values are means of three independent experiments. Bars represent the standard deviations.

the two concentrations tested (1.7- versus 0.39-fold change at 8  $\mu\text{g/ml}$  and 0.44- versus 0.17-fold change at 32  $\mu\text{g/ml}$  for CIP104536 and the  $\Delta bla_{MAB}$  strain, respectively;  $P < 0.05$  for both comparisons). As observed for the parental strain, the addition of rifabutin improved the activity of imipenem against the  $\Delta bla_{MAB}$  derivative, leading to 93% and 98% killing at 8 and 32  $\mu\text{g/ml}$ , respectively ( $P < 0.05$  for both comparisons). At a low dose of imipenem, production of  $Bla_{MAB}$  reduced the activity of imipenem-rifabutin since the fold reduction was higher for the  $\Delta bla_{MAB}$  derivative than for the parental strain (93% versus 78% killing, respectively;  $P < 0.05$ ). However, this difference was not observed for the combination involving a high dose of imipenem (98% and 99% killing for the  $\Delta bla_{MAB}$  derivative and the parental strain, respectively;  $P = 0.27$ ).

**Impact of avibactam on intramacrophage killing of *M. abscessus* by rifabutin and imipenem.** Since production of  $Bla_{MAB}$  reduced the efficacy of the imipenem-rifabutin combination using a low dose of imipenem (above), we tested whether inhibition of the  $\beta$ -lactamase by avibactam at 16  $\mu\text{g/ml}$  could improve the intramacrophage activity of the combination (Fig. 3b and statistical analysis in Table S6). For these experiments, we used low doses of rifabutin (1 and 8  $\mu\text{g/ml}$ ) since these concentrations are achievable in the plasma (21) and in lung tissue (22), respectively. For the lowest concentration of rifabutin





**FIG 3** Intracellular activity of rifabutin (RFB) alone, in combination with imipenem (IPM), or in combination with imipenem (IPM) and avibactam (AVI). (a) Rifabutin (16  $\mu\text{g/ml}$ ) alone or in combination with imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$  and 32  $\mu\text{g/ml}$ ) against *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative. (b) Rifabutin (1 and 8  $\mu\text{g/ml}$ ) alone, in combination with imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$ ), or in combination with imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$ ) and avibactam (16  $\mu\text{g/ml}$ ) against *M. abscessus* CIP104536. Intracellular bacteria were enumerated, and the fold change in CFU counts was determined between days 0 and 2 postinfection. Values are means of three independent experiments. Bars represent standard deviations. A Mann-Whitney U test was used to compare *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative.

(1  $\mu\text{g/ml}$ ), the combination with imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$ ) led to 0.5-fold change in the number of CFU. This fold change is similar to that observed for imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$ ) combined with avibactam (16  $\mu\text{g/ml}$ ). Increasing the concentration of rifabutin from 1  $\mu\text{g/ml}$  to 8  $\mu\text{g/ml}$  did not improve the activity of the imipenem-rifabutin combination (1.5- versus 0.6-fold change in CFU, respectively;  $P = 0.65$ ). The triple combinations comprising rifabutin (1 or 8  $\mu\text{g/ml}$ ), imipenem (8  $\mu\text{g/ml}$ ), and avibactam (16  $\mu\text{g/ml}$ ) were the more active regimens, leading to a 0.22- or 0.33-fold change in the number of CFU, respectively. However, the addition of avibactam did not significantly increase the activity of the imipenem-rifabutin combinations.

**DISCUSSION**

Since rifabutin has recently been reported to display promising *in vitro* activity against *M. abscessus* (20), we investigated the *in vitro* and intramacrophage activity of a combination comprising this drug and imipenem, which is the recommended  $\beta$ -lactam for the treatment of pulmonary infections in cystic fibrosis patients (10). Drugs were tested at 4-fold the MIC and at therapeutically achievable concentrations. The

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on October 21, 2019 at INSERM

impact of imipenem hydrolysis by the  $\beta$ -lactamase Bla<sub>MAB</sub> on the activity of the combinations was evaluated based on the use of the  $\beta$ -lactamase inhibitor avibactam and a mutant lacking Bla<sub>MAB</sub>.

*In vitro*, the combination of imipenem and rifabutin was moderately synergistic (Fig. 1) and moderately active in the time-kill curve assay (Fig. 2). Comparison of *M. abscessus* CIP104536 and its Bla<sub>MAB</sub>-deficient derivative revealed that production of Bla<sub>MAB</sub> had a minor impact on the activity of imipenem only when the drug was tested alone. In agreement with this finding, avibactam increased the activity of imipenem alone but not that of the rifabutin combination.

In macrophages, the rifabutin-imipenem combination was significantly more active than either drug tested alone (Fig. 3). This was observed for rifabutin used at 4-fold the MIC (16  $\mu$ g/ml) (Fig. 3a) as well as at concentrations achievable in the lung (8  $\mu$ g/ml) and in serum (1  $\mu$ g/ml) (Fig. 3b) (21, 22). A 9-fold intracellular accumulation of rifabutin has been reported in human polymorphonuclear leukocytes (23). Thus, intramacrophage accumulation may account for the observed activity of rifabutin in our study at doses similar to or lower than the MIC (4  $\mu$ g/ml).

Comparisons of *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta$ bla<sub>MAB</sub> derivative in the macrophage model indicated that production of the  $\beta$ -lactamase impaired the activity of imipenem at 8  $\mu$ g/ml and 32  $\mu$ g/ml as well as the combination of rifabutin at 16  $\mu$ g/ml and a low dose of imipenem (8  $\mu$ g/ml). The impact of production of the  $\beta$ -lactamase, therefore, appears to be more important in macrophages than *in vitro*. This may be accounted for by a difference in the levels of production of the  $\beta$ -lactamase since we have recently reported that the bla<sub>MAB</sub> transcript was 20-fold less abundant in *M. abscessus* proliferating in planktonic cultures than in infected macrophages (19). This prompted us to determine whether inhibition of Bla<sub>MAB</sub> by avibactam could improve the intracellular killing activity of imipenem. This was the case for imipenem alone tested at 8  $\mu$ g/ml. Although the triple combinations of avibactam (16  $\mu$ g/ml), imipenem (8  $\mu$ g/ml), and rifabutin (1 and 8  $\mu$ g/ml) were the most active, the extents of killing were not statistically improved by the addition of avibactam.

Our results raise the possibility of replacing amikacin by rifabutin in the recommended treatment of lung infections due to *M. abscessus*. The gains from this replacement include the low toxicity and oral administration of rifabutin. In addition, imipenem combined with amikacin, as evaluated in a previous study in the same macrophage model (18, 19), was less active than the imipenem-rifabutin combination. For example, amikacin at 8  $\mu$ g/ml combined with imipenem at 8  $\mu$ g/ml led to a 5.0-fold change (19), in contrast to the 0.6-fold change for rifabutin (8  $\mu$ g/ml) combined with imipenem (8  $\mu$ g/ml) (this study).

In conclusion, the assessment of the efficacy of drug combinations in macrophages indicates that the combination of imipenem and rifabutin should be clinically evaluated, particularly in infections due to macrolide-resistant *M. abscessus*, which are often not cured by the recommended treatments (9, 24–26).

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** *M. abscessus* CIP104536 (ATCC 19977) with a smooth (S) phenotype and its  $\beta$ -lactamase-deficient derivative ( $\Delta$ bla<sub>MAB</sub> strain) (12) were grown in Middlebrook 7H9 broth (BD-Difco, Le Pont de Claix, France) supplemented with 10% (vol/vol) oleic acid, albumin, dextrose, and catalase (OADC; BD-Difco) and 0.05% (vol/vol) Tween 80 (Sigma-Aldrich) (7H9sB) at 30°C with shaking (150 rpm) (19).

**Antibiotics.** Imipenem, rifabutin, and avibactam were purchased from Mylan (Saint-Priest, France), Serb Laboratories (Paris, France), and Advanced ChemBlocks, Inc. (Burlingame, CA). Water was the solvent for preparing stock solutions for imipenem and avibactam. Rifabutin was solubilized in 96% ethanol. The stock solutions were freshly prepared for each experiment and filtered using a sterilized 0.22- $\mu$ m-pore-size polycarbonate syringe filter (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

**MIC determination.** MICs were determined in 96-well round-bottom microplates using the microdilution method, except that resazurin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used to facilitate reading. Briefly, approximately  $5 \times 10^5$  CFU/ml was inoculated into 7H9sB containing 2-fold dilutions of antibiotics (concentration range, 0.12 to 64  $\mu$ g/ml). After 2 days of incubation at 30°C, 10  $\mu$ l of a 0.05% (wt/vol) resazurin solution was added to each well (200  $\mu$ l), and incubation was continued for 24 h at 30°C. The MIC was defined as the lowest drug concentration preventing the resazurin color

change from blue to pink or violet. The experiments were performed in quintuplet. Data are the medians from five experiments.

**Synergy testing.** Synergic activities were tested by the two-dimensional dilution checkerboard method. Briefly a total of 80  $\mu$ l of 7H9sB was distributed into each well of the microdilution plates. Ten microliters of imipenem was serially diluted along the abscissa, while 10  $\mu$ l of rifabutin was serially diluted along the ordinate. Each well was inoculated with 100  $\mu$ l of a bacterial inoculum containing  $5 \times 10^5$  CFU/ml. The plates were incubated at 30°C for 3 days. All experiments were performed in quintuplet. For all of the wells that corresponded to a MIC,  $\Sigma$ FIC was calculated with the equation  $\Sigma$ FIC = FIC<sub>A</sub> + FIC<sub>B</sub> = (C<sub>A</sub>/MIC<sub>A</sub>) + (C<sub>B</sub>/MIC<sub>B</sub>), where MIC<sub>A</sub> and MIC<sub>B</sub> are the MICs of drugs A and B alone, and C<sub>A</sub> and C<sub>B</sub> are the concentrations of the drugs in combination. The smallest  $\Sigma$ FIC determined for the association is considered the FIC index of the combination. A combination with an FIC index of  $\leq 0.5$  is considered synergistic, an FIC index between 0.5 and 4 is considered indifferent, and an FIC index of  $> 4$  indicated an antagonist association, according to the American Society for Microbiology.

**Time-kill assays.** Bottles of 20 ml of 7H9sB containing imipenem (8 or 32  $\mu$ g/ml), rifabutin (16  $\mu$ g/ml), and avibactam (4  $\mu$ g/ml) alone or in combination were inoculated with exponentially growing bacteria of *M. abscessus* CIP104536 S or its  $\Delta$ bla<sub>MAB</sub> derivative strain ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) and incubated with shaking (150 rpm) at 30°C for 72 h. Imipenem (8 or 32  $\mu$ g/ml) was added every 24 h due to its instability. Bacteria were enumerated at 0, 48, and 72 h by plating serial dilutions prepared in sterile water on lysogeny broth (LB) plates. Plates were incubated for 4 days at 30°C. The detection limit was 2 log<sub>10</sub> CFU/ml. The experiments were performed in triplicate.

**Activity of rifabutin alone or in combination with imipenem and avibactam in THP-1 macrophages.** The activity of antibiotics was studied on a THP-1 macrophage infection model as previously described (19). Briefly, THP-1 cells were seeded into 24-well plates ( $5 \times 10^5$  cells per 1-ml well), differentiated for 24 h, and infected with *M. abscessus* CIP104536 S or its  $\Delta$ bla<sub>MAB</sub> derivative at a multiplicity of infection of 10 for 3 h. After three washes in phosphate-buffered saline (PBS), imipenem (8 and 32  $\mu$ g/ml), rifabutin (1, 8, and 16  $\mu$ g/ml), and avibactam (16  $\mu$ g/ml), alone or in combination, were added to each well. Plates were incubated with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 2 days. For imipenem, drug was added every 24 h due to its instability. After three washes in PBS, macrophages were lysed with deionized water. Dilutions were plated onto LB agar plates, and CFU were enumerated after 4 days of incubation at 30°C. The experiments were performed in triplicate.

**Statistical analysis.** A Mann-Whitney U test was used to compare the intracellular activity of antibiotics. All statistical analyses were performed with EPI Info software, version 7.1.3 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA).

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.00623-18>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.1 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Vaincre la Mucoviscidose and l'Association Grégory Lemarchal (RF20160501637 to J.-L.M.).

J.-L.M. has received consulting fees (scientific advisor for ceftaroline) and reimbursement of travel expenses (attendance at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, and attendance at the 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017) from Astra-Zeneca and Merck Sharp and Dohme. Other authors have no conflicts of interest to report.

## REFERENCES

- Sermet-Gaudelus I, Le Bourgeois M, Pierre-Audigier C, Offredo C, Guillemot D, Halley S, Akoua-Koffi C, Vincent V, Sivadon-Tardy V, Ferroni A, Berche P, Scheinmann P, Lenoir G, Gaillard JL. 2003. *Mycobacterium abscessus* and children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* 9:1587–1591. <https://doi.org/10.3201/eid0912.020774>.
- Esther CR, Jr, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. 2010. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 9:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.12.001>.
- Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR. 2003. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167:828–834. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC>.
- Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, Aviram M, Rivlin J, Picard E, Lavy A, Yahav Y, Rahav G. 2008. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis* 14:378–384. <https://doi.org/10.3201/eid1403.061405>.
- Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, Bellis G, Vibet MA, Le Roux E, Lemonnier L, Gutierrez C, Vincent V, Fauroux B, Rottman M, Guillemot D, Gaillard JL. 2009. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol* 47:4124–4128. <https://doi.org/10.1128/JCM.01257-09>.
- Qvist T, Gilljam M, Jonsson B, Taylor-Robinson D, Jensen-Fangel S, Wang M, Svahn A, Kotz K, Hansson L, Hollsing A, Hansen CR, Finstad PL, Pressler T, Hoiby N, Katzenstein TL, Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium (SCFSC). 2015. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J Cyst Fibros* 14:46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.08.002>.
- Bar-On O, Mussaffi H, Mei-Zahav M, Prais D, Steuer G, Stafler P, Hananya S,

- Blau H. 2015. Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 14:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.05.008>.
8. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. 2012. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 25:545–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.05030-11>.
  9. Novosad SA, Beekmann SE, Polgreen PM, Mackey K, Winthrop KL, Team MaS. 2016. Treatment of *Mycobacterium abscessus* Infection. *Emerg Infect Dis* 22:511–514. <https://doi.org/10.3201/eid2203.150828>.
  10. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, Noone PG, Bilton D, Corris P, Gibson RL, Hempstead SE, Koetz K, Sabadosa KA, Sermet-Gaudelus I, Smyth AR, van Ingen J, Wallace RJ, Winthrop KL, Marshall BC, Haworth CS. 2016. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 71(Suppl 1):i1–i22. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360>.
  11. Bastian S, Veziris N, Roux AL, Brossier F, Gaillard JL, Jarlier V, Cambau E. 2011. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rml* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 55:775–781. <https://doi.org/10.1128/AAC.00861-10>.
  12. Dubee V, Bernut A, Cortes M, Lesne T, Dorcène D, Lefebvre AL, Hugonnet JE, Gutmann L, Mainardi JL, Herrmann JL, Gaillard JL, Kremer L, Arthur M. 2015.  $\beta$ -Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 70:1051–1058. <https://doi.org/10.1093/jac/dku510>.
  13. Soroka D, Dubee V, Soulier-Escrihuela O, Cuinet G, Hugonnet JE, Gutmann L, Mainardi JL, Arthur M. 2014. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 69:691–696. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt410>.
  14. Soroka D, Ourghanlian C, Compain F, Fichini M, Dubée V, Mainardi J, Hugonnet J, Arthur M. 2017. Inhibition of  $\beta$ -lactamases of mycobacteria by avibactam and clavulanate. *J Antimicrob Chemother* 72:1081–1088. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw546>.
  15. Falcone M, Paterson D. 2016. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother* 71:2713–2722. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw239>.
  16. Bush K. 2015. A resurgence of beta-lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 46:483–493. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.011>.
  17. Papp-Wallace KM, Bonomo RA. 2016. New beta-lactamase inhibitors in the clinic. *Infect Dis Clin North Am* 30:441–464. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.007>.
  18. Lefebvre AL, Dubee V, Cortes M, Dorcène D, Arthur M, Mainardi J-L. 2016. Bactericidal and intracellular activity of  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 71:1556–1563. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw022>.
  19. Lefebvre AL, Le Moigne V, Bernut A, Veckerle C, Compain F, Herrmann JL, Kremer L, Arthur M, Mainardi JL. 2017. Inhibition of the  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> by avibactam improves the *in vitro* and *in vivo* efficacy of imipenem against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02440-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02440-16>.
  20. Aziz DB, Low JL, Wu ML, Gengenbacher M, Teo JWP, Dartois V, Dick T. 2017. Rifabutin is active against *Mycobacterium abscessus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00155-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-17>.
  21. van Ingen J, Egelund EF, Levin A, Totten SE, Boeree MJ, Mouton JW, Aarnoutse RE, Heifets LB, Peloquin CA, Daley CL. 2012. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 186:559–565. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0682OC>.
  22. Blaschke TF, Skinner MH. 1996. The clinical pharmacokinetics of rifabutin. *Clin Infect Dis* 22(Suppl 1):S15–S21. [https://doi.org/10.1093/clinids/22.Supplement\\_1.S15](https://doi.org/10.1093/clinids/22.Supplement_1.S15).
  23. Van der Auwera P, Matsumoto T, Husson M. 1988. Intraphagocytic penetration of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 22:185–192. <https://doi.org/10.1093/jac/22.2.185>.
  24. Koh WJ, Jeon K, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, Park YK, Kim CK, Shin SJ, Huitt GA, Daley CL, Kwon OJ. 2011. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* 183:405–410. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0395OC>.
  25. Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley CL. 2011. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 52:565–571. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq237>.
  26. Harada T, Akiyama Y, Kurashima A, Nagai H, Tsuyuguchi K, Fujii T, Yano S, Shigeto E, Kuraoka T, Kajiki A, Kobashi Y, Kokubu F, Sato A, Yoshida S, Iwamoto T, Saito H. 2012. Clinical and microbiological differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* lung diseases. *J Clin Microbiol* 50:3556–3561. <https://doi.org/10.1128/JCM.01175-12>.

**Table S1** Statistical analysis of the killing activity of imipenem (IPM) and rifabutin (RFB) against *M. abscessus* CIP104536S

		<i>P</i> value for the indicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 16	IPM 8 RFB 16	IPM 32 RFB 16
		9.7	4.3	4.5	6.1	3.7	4.7
ss Atb	9.7	NA	0.0262	0.0262	0.0262	0.0262	0.0262
IPM 8	4.3		NA	0.0339	0.0262	0.0253	0.4867
IPM 32	4.5			NA	0.0308	0.0339	0.8248
RFB 16	6.1				NA	0.0262	0.0323
IPM 8 RFB 16	3.7					NA	0.0369
IPM 32 RFB 16	4.7						NA

Log<sub>10</sub> cfu/ml after 72h of incubation in the presence of the drugs (µg/ml) are indicated. NA, not applicable.

**Table S2** Statistical analysis of the killing activity of imipenem (IPM) and rifabutin (RFB) against *M. abscessus* Δbla<sub>Mab</sub>

		<i>P</i> value for the indicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 16	IPM8 RFB16	IPM32 RFB16
		9.2	4.0	4.7	5.5	4.1	4.1
ss Atb	9.2	N.A	0.0025	0.016	0.0017	0.0025	0.0157
IPM 8	4.0		N.A	0.5962	0.0025	0.2539	0.4308
IPM 32	4.7			N.A	0.0384	0.7928	0.0463
RFB 16	5.5				N.A	0.0027	0.0157
IPM8 RFB16	4.1					N.A	0.4288
IPM32 RFB16	4.1						N.A

Log<sub>10</sub> cfu/ml after 72h of incubation in the presence of the drugs (µg/ml) are indicated. NA, not applicable.

**Table S3** Statistical analysis of the killing activity of imipenem (IPM) and rifabutin (RFB) alone or in combination with avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536S

		<i>P</i> value for the indicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		ss Atb	IPM 8	RFB 16	IPM 8 RFB 16	IPM 8 AVI 4	IPM 8 RFB 16 AVI 4
		9.6	5.4	6.0	4.7	4.8	5.3
ss Atb	9.6	NA	0.0463	0.0463	0.0463	0.0463	0.0463
IPM 8	5.4		NA	0.0431	0.0431	0.0431	0.0431
RFB 16	6.0			NA	0.0431	0.0431	0.0431
IPM 8 RFB 16	4.7				NA	0.0431	0.0431
IPM 8 AVI 4	4.8					NA	0.0431
IPM 8 RFB 16 AVI 4	5.3						NA

Log<sub>10</sub> cfu/ml after 72h of incubation in the presence of the drugs (µg/ml) are indicated. NA, not applicable.

**Table S4** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) and rifabutin (RFB) against *M. abscessus* CIP104536S

		<i>P</i> value for the indicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 16	IPM 8 RFB 16	IPM 32 RFB 16
		134	1.7	0.44	6.1	0.22	0.01
ss Atb	134	NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8	1.7		NA	0.0495	0.0389	0.0495	0.0495
IPM 32	0.44			NA	0.0495	0.0495	0.0495
RFB 16	6.1				NA	0.0495	0.0495
IPM 8 RFB 16	0.22					NA	0.0495
IPM 32 RFB 16	0.01						NA

Fold change in the number of intracellular bacteria after 72h of incubation in the presence of the drugs (µg/ml) are indicated. NA, not applicable.

**Table S5** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) and rifabutin (RFB) against *M. abscessus*  $\Delta bla_{Mab}$ 

		P value for the indicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		ss Atb	IPM 8	IPM 32	RFB 16	IPM 8 RFB 16	IPM 32 RFB 16
		233.5	0.39	0.17	3.65	0.065	0.019
ss Atb	233.5	NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8	0.39		NA	0.0763	0.0201	0.0495	0.0495
IPM 32	0.17			NA	0.0495	0.0495	0.0495
RFB 16	3.65				NA	0.0495	0.0495
IPM 8 RFB 16	0.065					NA	0.5127
IPM 32 RFB 16	0.019						NA

Fold change in the number of intracellular bacteria after 72h of incubation in the presence of the drugs ( $\mu\text{g/ml}$ ) are indicated. NA, not applicable.

**Table S6** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) and rifabutin (RFB) alone or in combination with avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536S

		P value for the indicated comparison (Mann-Whitney U test)								
		ss Atb	IPM 8	RFB 1	RFB 8	IPM 8 RFB 1	IPM8 RFB8	IPM 8 AVI 16	IPM 8 RFB 1 AVI 16	IPM 8 RFB 8 AVI 16
		125	1.23	7.48	3.65	0.52	0.6	0.59	0.22	0.33
ss Atb	125	NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8	1.23		NA	0.0495	0.2752	0.0495	0.0495	0.011	0.0495	0.0495
RFB 1	7.48			NA	0.1266	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
RFB 8	3.65				NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8 RFB 1	0.52					NA	0.6579	0.5127	0.1266	0.2752
IPM 8 RFB 8	0.6						NA	0.8273	0.0495	0.2752
IPM 8 AVI	0.59							NA	0.2752	0.2752
IPM 8 RFB 1 AVI 16	0.22								NA	0.5127
IPM 8 RFB 8 AVI 16	0.33									NA

Fold change in the number of intracellular bacteria after 72h of incubation in the presence of the drugs ( $\mu\text{g/ml}$ ) are indicated. NA, not applicable.



# *In Vitro* and Intracellular Activity of Imipenem Combined with Tedizolid, Rifabutin, and Avibactam against *Mycobacterium abscessus*

Eva Le Run,<sup>a</sup> Michel Arthur,<sup>a</sup> Jean-Luc Mainardi<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, USPC, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>b</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

**ABSTRACT** *Mycobacterium abscessus* infections are difficult to treat because of their resistance to many antibiotics. *In vitro*, tedizolid combined with imipenem displayed a moderate synergistic effect (fractional inhibitory concentration index, 0.41) but no bactericidal activity. Intracellularly, tedizolid 2  $\mu\text{g/ml}$  (half of the MIC), corresponding to the peak serum concentration, increased the efficacy of imipenem at 8 and 32  $\mu\text{g/ml}$ . Addition of avibactam and rifabutin, alone or in combination, improved the activity of the imipenem-tedizolid combination.

**KEYWORDS** *Mycobacterium abscessus*, avibactam, cystic fibrosis, imipenem, rifabutin, tedizolid

Among nontuberculous mycobacteria, *Mycobacterium abscessus*, a rapidly growing mycobacterium, has emerged in recent years as an important opportunistic pathogen responsible for chronic lung disease in patients with cystic fibrosis (CF), bronchiectasis, or chronic obstructive pulmonary disease (1–9).

The treatment is particularly complex and difficult because *M. abscessus* is intrinsically resistant to a broad range of antibiotics, including those used for the treatment of tuberculosis (10, 11). In CF patients, the typical treatment consists of an initial phase with the combination of a carbapenem (imipenem), a macrolide (azithromycin), an aminoglycoside (amikacin), and a glycolcyclycline (tigecycline) for 3 to 12 weeks (12). For the continuation phase, four oral drugs (azithromycin, minocycline, clofazimine, and moxifloxacin) and inhaled amikacin are proposed (12). In spite of these lengthy courses of antibiotics, the prognosis of pulmonary infections is poor in the context of CF, with a cure rate of 30% to 50% (13, 14). In case of inducible or constitutive macrolide resistance, present in 40% to 60% of the isolates (15), the rate of bacteriological eradication is on the order of 25% (13). In this context, there is an urgent need to identify additional therapeutic options. This may be achieved in the short term by repurposing existing drugs approved for the treatment of other bacterial infections.

*M. abscessus* isolates produce a broad-spectrum  $\beta$ -lactamase, Bla<sub>Mab</sub>, which hydrolyzes most  $\beta$ -lactams, except ceftazidime, and inactivates imipenem at a very slow rate (16, 17). Imipenem is currently used in the absence of any  $\beta$ -lactamase inhibitor, although Bla<sub>Mab</sub> was recently shown to limit the intracellular activity of imipenem in human macrophages (16, 18, 19). First generation  $\beta$ -lactamase inhibitors, clavulanate, tazobactam, and sulbactam, are inactive against Bla<sub>Mab</sub> (20). However, Bla<sub>Mab</sub> is inhibited by a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor, avibactam (16), which has been developed in combination with ceftazidime for the treatment of infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (21). Avibactam extends the spectrum of  $\beta$ -lactams active against *M. abscessus* (16, 19) and improves the efficacy of imipenem, both in macrophages and in zebrafish embryos (18).

**Citation** Le Run E, Arthur M, Mainardi J-L. 2019. *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with tedizolid, rifabutin, and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother 63:e01915-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01915-18>.

**Copyright** © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jean-Luc Mainardi, jean-luc.mainardi@crc.jussieu.fr.

**Received** 6 September 2018

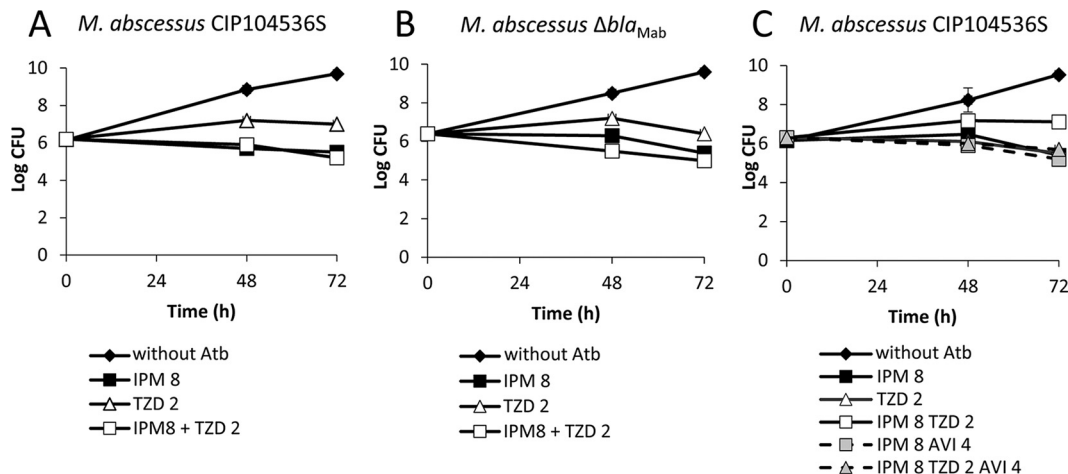
**Returned for modification** 31 December 2018

**Accepted** 1 February 2019

**Accepted manuscript posted online** 11 February 2019

**Published** 27 March 2019





**FIG 1** Bactericidal activity of tedizolid (TZD) alone and in combination with imipenem (IPM) and the  $\beta$ -lactamase inhibitor avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative. Time-kill curves of TZD 2  $\mu$ g/ml alone or in combination with IPM 8  $\mu$ g/ml against CIP104536 (A) and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative (B). (C) Time-kill curves of TZD and IPM with and without AVI 4  $\mu$ g/ml against CIP104536. without Atb, without antibiotic. Results are means  $\pm$  standard deviations from three experiments.

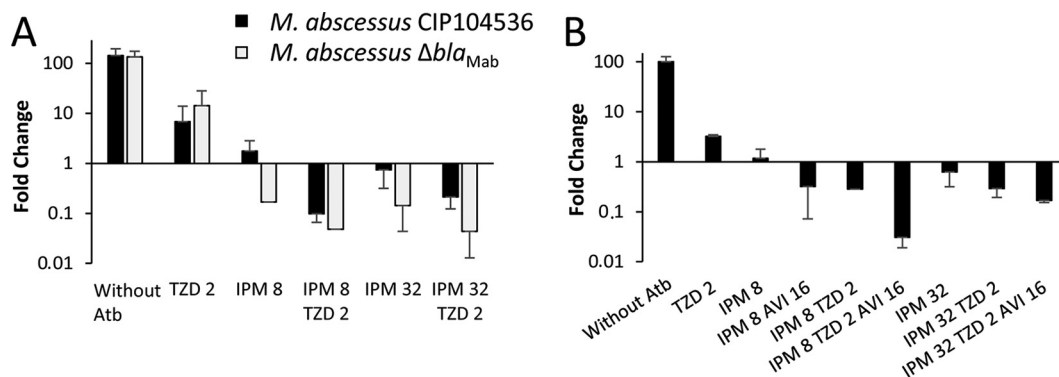
Tedizolid is a recently developed once-daily oxazolidinone antibiotic that has been approved for the treatment of acute bacterial skin and soft tissue infections (22). In *M. abscessus*, a recent *in vitro* study showed that tedizolid has better *in vitro* activity than linezolid, in that the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of tedizolid (2 and 8  $\mu$ g/ml, respectively) were 2- to 16-fold lower than those of linezolid (23).

In this study, we investigated the interest of repurposing tedizolid for *M. abscessus* infections in combination with imipenem alone or with imipenem, avibactam, and rifabutin. We report the *in vitro* and intracellular antibacterial activities of various combinations of these four drugs. The impact of  $\beta$ -lactamase production was assessed by comparing *M. abscessus* CIP104536 and a derivative obtained by deletion of the gene encoding Bla<sub>Mab</sub>.

The MIC of tedizolid, determined in 96-well round-bottom microplates using the microdilution method (24), was 4  $\mu$ g/ml against both *M. abscessus* subspecies *abscessus* CIP104536 and its  $\beta$ -lactamase-deficient ( $\Delta bla_{Mab}$ ) derivative (16). The MICs of imipenem were 4 and 2  $\mu$ g/ml against CIP104536 and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative, respectively. Against CIP104536, the combination of tedizolid with imipenem showed a moderate synergistic effect by the two-dimensional dilution checkerboard method (24), with a fractional inhibitory concentration (FIC) index of 0.41 at one-fourth of the MIC of imipenem and one-eighth that of tedizolid. Against the  $\Delta bla_{Mab}$  derivative, the FIC index was 0.38 at one-fourth the MIC of imipenem and one-eighth the MIC of tedizolid. *In vitro* killing of *M. abscessus* by tedizolid alone, in combination with imipenem, or in combination with imipenem and avibactam was determined using the time-kill assay (19, 24). Tedizolid was tested at half-fold the MIC (2  $\mu$ g/ml) corresponding to the peak serum concentration for an administration of 200 mg/day (25) and imipenem at 2-fold the MIC (8  $\mu$ g/ml). Against CIP104536, tedizolid alone had no effect in the reduction of CFU (Fig. 1A and Table S1 in the supplemental material). A 0.7- $\log_{10}$  reduction in CFU was observed for imipenem alone at 8  $\mu$ g/ml. The addition of tedizolid did not increase bacterial killing by imipenem (1.0- $\log_{10}$  reduction in CFU). Similar results were obtained for the  $\Delta bla_{Mab}$  derivative of CIP104536 (Fig. 1B and Table S2 in the supplemental material).

Since the addition of tedizolid to imipenem did not improve the activity of imipenem against *M. abscessus* CIP104536, we investigated the benefit of adding avibactam (4  $\mu$ g/ml) (Fig. 1C and Table S3 in the supplemental material). Avibactam did not potentiate the killing by imipenem alone. The triple combination of imipenem-tedizolid-avibactam was not more active than the imipenem-tedizolid combination.





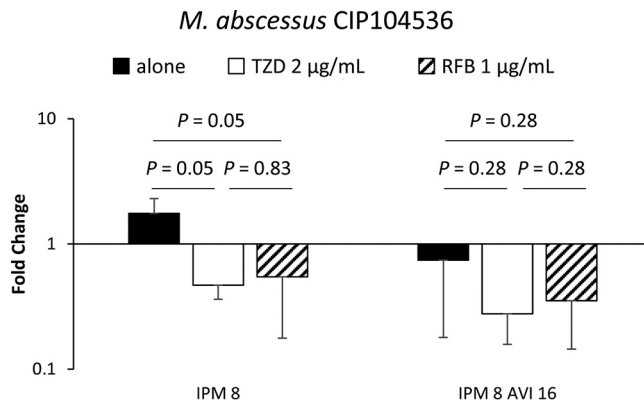
**FIG 2** Intracellular activities of antibiotics against *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative in the macrophage model. (A) Tedizolid (TZD) 2  $\mu\text{g/ml}$  and imipenem (IPM) 8 or 32  $\mu\text{g/ml}$  were tested alone and in combination against *M. abscessus* CIP104536 and its  $\Delta bla_{Mab}$  derivative. (B) IPM 8 and 32  $\mu\text{g/ml}$  and TZD 2  $\mu\text{g/ml}$  were tested with and without AVI 16  $\mu\text{g/ml}$  against *M. abscessus* CIP104536. Without Atb, without antibiotic. CFU were enumerated after 4 days of incubation at 30°C by plating serial dilutions of macrophage lysates. Results are means  $\pm$  standard deviations from three experiments.

Inhibition of  $Bla_{Mab}$  by avibactam and comparison of *M. abscessus* CIP104536 and its  $Bla_{Mab}$ -deficient derivative both indicated that hydrolysis of imipenem by  $Bla_{Mab}$  had a minor impact on the *in vitro* activity of imipenem.

The intracellular activity of antibiotics was studied on a THP1 macrophage infection model, as previously described (18, 24). Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney *U* test. In the absence of antibiotic, *M. abscessus* CIP104536 grew in the macrophages, leading to a 143-fold increase in the number of CFU in 48 h (Fig. 2A and Table S4 in the supplemental material). Tedizolid 2  $\mu\text{g/ml}$  partially prevented intramacrophage growth (6.85- versus 143-fold increase in the number of CFU;  $P < 0.05$ ). Imipenem 8  $\mu\text{g/ml}$  was more active than tedizolid (1.75- versus 6.85-fold increase in CFU;  $P < 0.05$ ). Increasing the concentration of imipenem from 8 to 32  $\mu\text{g/ml}$  increased the activity of this drug, but the difference was not statically significant (1.75- versus 0.74-fold change in CFU;  $P = 0.13$ ). The combination of tedizolid and imipenem 8  $\mu\text{g/ml}$  was more active than imipenem alone (0.10- versus 1.75-fold change in CFU;  $P < 0.05$ ). Of note, the combination of imipenem 8  $\mu\text{g/ml}$  and tedizolid 2  $\mu\text{g/ml}$  achieved 90% killing of *M. abscessus* in the macrophage. Increasing the concentration of imipenem from 8 to 32  $\mu\text{g/ml}$  did not improve killing (90% versus 79%;  $P = 0.13$ ). A 10- to 15-fold intracellular accumulation of tedizolid has been reported in human macrophages (26). The intramacrophage accumulation may account for the observed activity of tedizolid in the macrophage model at a concentration lower than the MIC (4  $\mu\text{g/ml}$ ).

The combinations of imipenem and tedizolid were also tested against the isogenic strain of *M. abscessus* CIP104536  $\Delta bla_{Mab}$  to evaluate the impact of the production of the  $\beta$ -lactamase  $Bla_{Mab}$  on the intracellular activity of the drugs (Fig. 2A and Table S5 in the supplemental material). Tedizolid alone displayed similar activity against  $\Delta bla_{Mab}$  and CIP104536 (14.27- versus 6.85-fold change;  $P = 0.72$ ) (see Table S6 in the supplemental material). Deletion of  $bla_{Mab}$  significantly improved the activity of imipenem alone at the two tested concentrations (0.17- versus 1.75-fold change at 8  $\mu\text{g/ml}$  and 0.14- versus 0.74-fold change at 32  $\mu\text{g/ml}$ ;  $P < 0.05$  for both). Addition of tedizolid improved the activity of imipenem at 8 and 32  $\mu\text{g/ml}$  against the  $\Delta bla_{Mab}$  derivative, leading to 95% and 96% killing, respectively. At a low dose of imipenem, production of  $Bla_{Mab}$  moderately reduced the activity of imipenem-tedizolid, but the difference was not statistically significant (95% versus 90% killing, respectively;  $P = 0.37$ ). This difference was slightly more pronounced for the combination involving the high dose of imipenem (96% and 79% killing, respectively), reaching statistical significance ( $P < 0.05$ ). In contrast to the *in vitro* results,  $Bla_{Mab}$  significantly impaired the activity of imipenem in the macrophage model. As previously described, this difference may be accounted for by a 20-fold induction of  $Bla_{Mab}$  synthesis in the macrophage (18).

Because production of  $Bla_{Mab}$  reduced the efficacy of the imipenem-tedizolid



**FIG 3** Impact of the addition of rifabutin (RFB) and tedizolid (TZD) on the activity of imipenem (IPM) alone and in combination with avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536 in the macrophage model. RFB 1 µg/ml and TZD 2 µg/ml were tested in combination with IPM 8 µg/ml alone and combined with AVI 16 µg/ml. CFU were enumerated after 4 days of incubation at 30°C by plating serial dilutions of macrophage lysates. Results are means ± standard deviations of three experiments.

combination, we tested whether inhibition of  $Bla_{\text{Mab}}$  by avibactam at 16 µg/ml would improve the intramacrophage activity of the combination against *M. abscessus* CIP104536 (Fig. 2B and Table S7 in the supplemental material). As previously described (18, 24), the activity of imipenem at 8 µg/ml was improved by avibactam, leading to a 0.32-fold change in the number of CFU. This fold change is similar to that observed for the imipenem-tedizolid combination (0.28-fold change). The triple combination comprising tedizolid, imipenem, and avibactam was the most active regimen, leading to 97% killing. Increasing the concentration of imipenem from 8 to 32 µg/ml did not improve the activity of the triple combination. In conclusion, the addition of avibactam significantly increases the activity of the imipenem-tedizolid combination when imipenem is used at a low concentration (8 µg/ml).

Since it was recently shown that rifabutin has promising activity against *M. abscessus* (24, 27), the second objective of our study was to compare the activity of tedizolid and rifabutin in the macrophage model and to evaluate whether combinations comprising these two drugs have a potential therapeutic interest (Fig. 3 and Table S8 in the supplemental material). Tedizolid and rifabutin were similarly active in improving the activity of imipenem alone (Fig. 3). Rifabutin at 1 µg/ml, corresponding to a concentration achievable in the serum, significantly improved the activity of the imipenem-avibactam-tedizolid triple combination (0.09- versus 0.28-fold change;  $P = 0.05$ ) (Fig. S1 in the supplemental material and Table S8). Increasing the concentration of rifabutin (8 µg/ml) did not improve the activity of the quadruple combination (Fig. S1 and Table S8).

To explore the mechanism underlying the improved activity of imipenem at a low dose (8 µg/ml), when combined with tedizolid, we determined the  $\beta$ -lactamase specific activity in crude bacterial extracts by spectrophotometry at 480 nm using nitrocefin (100 µM) as the substrate. Growth of *M. abscessus* CIP104536 in the presence of subinhibitory concentrations of tedizolid (1 and 2 µg/ml, corresponding to one-fourth and one-half of the MIC) decreased the  $\beta$ -lactamase specific activity from  $50 \pm 3$  to  $28 \pm 6$  nmol/min/mg ( $P = 0.05$ ) and from  $50 \pm 3$  to  $14 \pm 8$  nmol/min/mg ( $P = 0.03$ ), respectively. These results suggest that a decrease in the production of the  $\beta$ -lactamase  $Bla_{\text{Mab}}$  by subinhibitory concentrations of tedizolid may contribute to the antibacterial activity of the tedizolid-imipenem combination.

In conclusion, the assessment of the efficacy of drug combinations in the macrophage indicates that imipenem-avibactam-tedizolid-rifabutin should be clinically evaluated, particularly in infections caused by macrolide-resistant *M. abscessus*. However, avibactam is only available in combination with ceftazidime, and this cephalosporin would be administered without any benefit because it is not active against *M. abscessus*.

(16). The advantage of tedizolid and rifabutin as potential therapeutic options for the treatment of lung infections in CF patients is also supported by the relatively good tolerance of these drugs and their oral route of administration. Tedizolid and rifabutin in particular should be considered alternatives to amikacin in the recommended treatment combining imipenem, azithromycin, amikacin, and tigecycline.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.01915-18>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.6 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Vaincre la Mucoviscidose and l'Association Grégory Lemarchal (RF20160501637 to J.-L.M).

J.-L.M. has received consulting fees from Merck Sharp and Dohme and reimbursement for travel expenses from AstraZeneca and Merck Sharp and Dohme. We have no other conflicts of interest to declare.

## REFERENCES

- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Jr, Winthrop K. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175:367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>.
- Park IK, Olivier KN. 2015. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 36: 217–224. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546751>.
- Huang HL, Cheng MH, Lu PL, Shu CC, Wang JY, Wang JT, Chong IW, Lee LN. 2017. Epidemiology and predictors of NTM pulmonary infection in Taiwan - a retrospective, five-year multicenter study. *Sci Rep* 7:16300. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16559-z>.
- Nagano H, Kinjo T, Nei Y, Yamashiro S, Fujita J, Kishaba T. 2017. Causative species of nontuberculous mycobacterial lung disease and comparative investigation on clinical features of *Mycobacterium abscessus* complex disease: a retrospective analysis for two major hospitals in a subtropical region of Japan. *PLoS One* 12:e0186826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186826>.
- Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr, Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR. 2003. Nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 167:828–834. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC>.
- Bar-On O, Mussaffi H, Mei-Zahav M, Prais D, Steuer G, Stafler P, Hananya S, Blau H. 2015. Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 14:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.05.008>.
- Levy I, Grisar-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, Aviram M, Rivlin J, Picard E, Lavy A, Yahav Y, Rahav G. 2008. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis* 14:378–384. <https://doi.org/10.3201/eid1403.061405>.
- Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, Bellis G, Vibet MA, Le Roux E, Lemonnier L, Gutierrez C, Vincent V, Fauroux B, Rottman M, Guillemot D, Gaillard JL. 2009. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol* 47:4124–4128. <https://doi.org/10.1128/JCM.01257-09>.
- Qvist T, Gilljam M, Jonsson B, Taylor-Robinson D, Jensen-Fangel S, Wang M, Svahn A, Kotz K, Hansson L, Hollings A, Hansen CR, Finstad PL, Pressler T, Hoiby N, Katzenstein TL, Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. 2015. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J Cyst Fibros* 14:46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.08.002>.
- Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. 2012. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 25:545–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.05030-11>.
- Novosad SA, Beekmann SE, Polgreen PM, Mackey K, Winthrop KL. 2016. Treatment of *Mycobacterium abscessus* infection. *Emerg Infect Dis* 22: 511–514. <https://doi.org/10.3201/eid2203.150828>.
- Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, Noone PG, Bilton D, Corris P, Gibson RL, Hempstead SE, Koetz K, Sabadosa KA, Sermet-Gaudelus I, Smyth AR, van Ingen J, Wallace RJ, Winthrop KL, Marshall BC, Haworth CS. 2016. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 71:i1–i22. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207360>.
- Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley CL. 2011. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 52:565–571. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq237>.
- Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, Park YK, Kim CK, Koh WJ. 2009. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. *Am J Respir Crit Care Med* 180:896–902. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0704OC>.
- Bastian S, Veziris N, Roux AL, Brossier F, Gaillard JL, Jarlier V, Cambau E. 2011. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm*(41) and *rhl* sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 55:775–781. <https://doi.org/10.1128/AAC.00861-10>.
- Dubee V, Bernut A, Cortes M, Lesne T, Dorcène D, Lefebvre AL, Hugonnet JE, Gutmann L, Mainardi JL, Herrmann JL, Gaillard JL, Kremer L, Arthur M. 2015.  $\beta$ -Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 70:1051–1058. <https://doi.org/10.1093/jac/dku510>.
- Soroka D, Dubee V, Soulier-Escrihueta O, Cuinet G, Hugonnet JE, Gutmann L, Mainardi JL, Arthur M. 2014. Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 69:691–696. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt410>.
- Lefebvre AL, Le Moigne V, Bernut A, Veckerle C, Compain F, Herrmann JL, Kremer L, Arthur M, Mainardi JL. 2017. Inhibition of the beta-lactamase Bla<sub>Mab</sub> by avibactam improves the *in vitro* and *in vivo* efficacy of imipenem against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02440-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02440-16>.
- Dubee V, Bernut A, Cortes M, Dorcène D, Arthur M, Mainardi J-L. 2016. Bactericidal and intracellular activity of  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 71:1556–1563. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw022>.
- Soroka D, Ourghanlian C, Compain F, Fichini M, Dubée V, Mainardi J, Hugonnet J, Arthur M. 2017. Inhibition of  $\beta$ -lactamases of mycobacteria by avibactam and clavulanate. *J Antimicrob Chemother* 72:1081–1088. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw546>.
- Falcone M, Paterson D. 2016. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new

- option for MDR Gram-negative infections. *J Antimicrob Chemother* 71: 2713–2722. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw239>.
22. Burdette SD, Trotman R. 2015. Tedizolid: the first once-daily oxazolidinone class antibiotic. *Clin Infect Dis* 61:1315–1321. <https://doi.org/10.1093/cid/civ501>.
  23. Compain F, Soroka D, Heym B, Gaillard JL, Herrmann JL, Dorchene D, Arthur M, Dubee V. 2018. *In vitro* activity of tedizolid against the *Mycobacterium abscessus* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 90:186–189. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.001>.
  24. Le Run E, Arthur M, Mainardi JL. 2018. *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with rifabutin and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:0623–0618. <https://doi.org/10.1128/AAC.00623-18>.
  25. Flanagan SD, Bien PA, Munoz KA, Minassian SL, Prokocimer PG. 2014. Pharmacokinetics of tedizolid following oral administration: single and multiple dose, effect of food, and comparison of two solid forms of the prodrug. *Pharmacotherapy* 34:240–250. <https://doi.org/10.1002/phar.1337>.
  26. Lemaire S, Van Bambeke F, Appelbaum PC, Tulkens PM. 2009. Cellular pharmacokinetics and intracellular activity of torezolid (TR-700): studies with human macrophage (THP-1) and endothelial (HUVEC) cell lines. *J Antimicrob Chemother* 64:1035–1043. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp267>.
  27. Aziz DB, Low JL, Wu ML, Gengenbacher M, Teo JWP, Dartois V, Dick T. 2017. Rifabutin is active against *Mycobacterium abscessus* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00155-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-17>.

**Table S1** Statistical analysis of *in vitro* killing activity of imipenem (IPM) and tedizolid (TZD) alone or in combination against *M. abscessus* CIP104536

		<i>P</i> value for the undicated comparison (Mann-Whitney U test)			
		without Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2
		9.70	7.00	5.50	5.20
without Atb	9.70	NA	0.0495	0.0495	0.0495
TZD 2	7.00		NA	0.0495	0.0495
IPM 8	5.50			NA	0.1288
IPM 8 TZD 2	5.20				NA

**Table S2** Statistical analysis of *in vitro* killing activity of imipenem (IPM) and tedizolid (TZD) alone or in combination against *M. abscessus*  $\Delta$ *bla*<sub>Mab</sub>

		<i>P</i> value for the undicated comparison (Mann-Whitney U test)			
		without Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2
		9.60	6.40	5.40	5.00
without Atb	9.60	NA	0.0495	0.0495	0.0495
TZD 2	6.40		NA	0.0495	0.0495
IPM 8	5.40			NA	0.1288
IPM 8 TZD 2	5.00				NA

**Table S3** Statistical analysis of *in vitro* killing activity of imipenem (IPM) and tedizolid (TZD) alone or in combination with avibactam against *M. abscessus* CIP104536

		<i>P</i> value for the undicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		without Atb	TZD 2	IPM 8	IPM8 AVI 16	IPM 8 TZD 2	IPM 8 TZD 2 AVI 16
		9.60	7.10	5.60	5.40	5.40	5.60
without Atb	9.60	NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TZD 2	7.10		NA	0.0495	0.0431	0.0495	0.0431
IPM 8	5.60			NA	0.1266	0.1266	0.8845
IPM8 AVI 16	5.40				NA	0.8845	0.1266
IPM 8 TZD 2	5.40					NA	0.1266
IPM 8 TZD 2 AVI 16	5.60						NA

**Table S4** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) and tedizolid (TZD) against *M. abscessus*

		<i>P</i> value for the undicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		without Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2	IPM 32	IPM 32 TZD 2
		143.48	6.85	1.75	0.10	0.74	0.21
without Atb	143.48	NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
TZD 2	6.85		NA	0.0495	0.0495	0.0495	0.0495
IPM 8	1.75			NA	0.0495	0.1266	0.0495
IPM 8 TZD 2	0.10				NA	0.0495	0.1266
IPM 32	0.74					NA	0.0765
IPM 32 TZD 2	0.21						NA

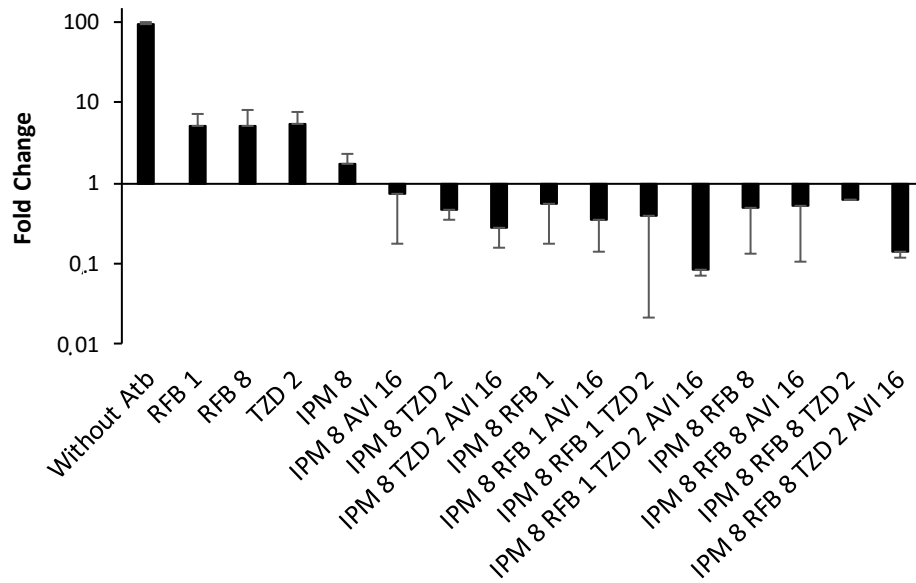
**Table S5** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) and tedizolid (TZD) against *M. abscessus*  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub>

		<i>P</i> value for the undicated comparison (Mann-Whitney U test)					
		without Atb	TZD 2	IPM 8	IPM 8 TZD 2	IPM 32	IPM 32 TZD 2
		134.10	14.27	0.17	0.05	0.14	0.04
without Atb	134.10	NA	0.0209	0.0209	0.0339	0.0209	0.0209
TZD 2	14.27		NA	0.0209	0.0339	0.0209	0.0209
IPM 8	0.17			NA	0.2118	0.8845	0.1489
IPM 8 TZD 2	0.05				NA	0.1573	1
IPM 32	0.14					NA	0.1489
IPM 32 TZD 2	0.04						NA

**Table S6** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) and tedizolid (TZD) against *M. abscessus*CIP104536 and  $\Delta$ bla<sub>Mab</sub>

	fold change		<i>P</i> value
	CIP104536	$\Delta$ bla <sub>Mab</sub>	
without Atb	143.48	134.10	0.2888
TZD 2	6.85	14.27	0.7237
IPM 8	1.75	0.17	0.0339
IPM 8 TZD 2	0.10	0.05	0.3758
IPM 32	0.74	0.14	0.0339
IPM 32 TZD 2	0.21	0.04	0.0339





**FIG S1** Impact of addition of rifabutin on the intracellular activity of tedizolid, imipenem and avibactam against *M. abscessus* CIP104536 in the macrophage model. Rifabutin (RFB) at 1 and 8 µg/mL was tested alone or in combination with imipenem (IPM) at 8 µg/mL, tedizolid (TZD) at 2 µg/mL, and avibactam (AVI) at 16 µg/mL.



# Impact of relebactam-mediated inhibition of *Mycobacterium abscessus* Bla<sub>Mab</sub> β-lactamase on the *in vitro* and intracellular efficacy of imipenem

Eva Le Run<sup>1</sup>, Heiner Atze<sup>1</sup>, Michel Arthur<sup>1</sup> and Jean-Luc Mainardi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM UMR5138, Sorbonne Université, Université de Paris, F-75006, Paris, France; <sup>2</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Centre-Université de Paris, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

\*Corresponding author. E-mail: jean-luc.mainardi@crc.jussieu.fr

Received 13 August 2019; returned 4 September 2019; revised 12 September 2019; accepted 19 September 2019

**Objectives:** Imipenem is one of the recommended β-lactams for the treatment of *Mycobacterium abscessus* pulmonary infections in spite of the production of Bla<sub>Mab</sub> β-lactamase. Avibactam, a second-generation β-lactamase inhibitor, was previously shown to inactivate Bla<sub>Mab</sub>, but its partner drug, ceftazidime, is devoid of any antibacterial activity against *M. abscessus*. Here, we investigate whether relebactam, a novel second-generation inhibitor developed in combination with imipenem, improves the activity of this carbapenem against *M. abscessus*.

**Methods:** The impact of Bla<sub>Mab</sub> inhibition by relebactam was evaluated by determining MICs, time-kill curves and *M. abscessus* intracellular proliferation in human macrophages. Kinetic parameters for the inhibition of Bla<sub>Mab</sub> by relebactam were determined by spectrophotometry using nitrocefin as the substrate. The data were compared with those obtained with avibactam.

**Results:** Combination of relebactam (4 mg/L) with β-lactams led to >128- and 2-fold decreases in the MICs of amoxicillin (from >4096 to 32 mg/L) and imipenem (from 8 to 4 mg/L). *In vitro*, *M. abscessus* was not killed by the imipenem/relebactam combination. In contrast, relebactam increased the intracellular activity of imipenem, leading to 88% killing. Relebactam and avibactam similarly potentiated the antibacterial activities of β-lactams although Bla<sub>Mab</sub> was inactivated 150-fold less effectively by relebactam than by avibactam.

**Conclusions:** Inhibition of Bla<sub>Mab</sub> by relebactam improves the efficacy of imipenem against *M. abscessus* in macrophages, indicating that the imipenem/relebactam combination should be clinically considered for the treatment of infections due to *M. abscessus*.

## Introduction

*Mycobacterium abscessus*, a rapidly growing opportunistic mycobacterium, is responsible for chronic lung disease in patients with cystic fibrosis, COPD and bronchiectasis.<sup>1–5</sup> Two β-lactams, ceftazidime and imipenem, are proposed for the treatment of pulmonary infections due to *M. abscessus*.<sup>1</sup> We have shown that imipenem at clinically achievable drug concentrations is more active than ceftazidime both *in vitro* and in macrophages.<sup>6</sup> In 2016, the US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society positioned the use of imipenem in the initial phase of treatment in combination with a macrolide (azithromycin), an aminoglycoside (amikacin) and a glycolylglycylcycline (tigecycline).<sup>7</sup>

*M. abscessus* naturally produces a broad-spectrum β-lactamase, Bla<sub>Mab</sub>, which is the major β-lactam resistance determinant in *M. abscessus*.<sup>8</sup> We have investigated the optimization of treat-

ments involving β-lactams and shown that avibactam, a second-generation β-lactamase inhibitor belonging to the diazabicyclooctane (DBO) family, efficaciously inhibits Bla<sub>Mab</sub><sup>9,10</sup> and substantially increases the efficacy of imipenem *in vitro*, intracellularly and in a zebrafish model.<sup>11</sup> We have also recently shown that rifabutin and tedizolid improve the intramacrophage activity of the imipenem/avibactam combination.<sup>12,13</sup> Unfortunately, avibactam is currently manufactured in combination with ceftazidime, which has no activity against *M. abscessus*.<sup>10</sup> Consequently, the use of avibactam for the treatment of infections due to *M. abscessus* currently requires coadministration with ceftazidime, which could be responsible for adverse effects without any clinical benefit. Relebactam, a β-lactamase inhibitor structurally related to avibactam, is currently being developed in combination with imipenem/cilastatin. These drugs are being investigated in several ongoing

Phase III clinical trials for the treatment of complicated intra-abdominal and urinary tract infections (ClinicalTrials.gov NCT03293485), bacterial pneumonia (ClinicalTrials.gov NCT02493764) and imipenem-resistant bacterial infections (ClinicalTrials.gov NCT02452047). Relebactam was recently shown to decrease the MIC of many cephalosporins and carbapenems for *M. abscessus*,<sup>14,15</sup> indicating that cystic fibrosis patients may benefit in the near future from therapies based on the imipenem/relebactam combination. This prompted us to evaluate the efficacy of relebactam for inhibition of the purified Bla<sub>Mab</sub> β-lactamase and for potentiation of the antibacterial activity of β-lactams *in vitro* and in macrophages.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*M. abscessus* CIP104536 (ATCC 19977) and its β-lactamase-deficient derivative ( $\Delta$ Bla<sub>Mab</sub>) were grown in Middlebrook 7H9 broth (BD-Difco, Le Pont de Claix, France) supplemented with 10% (v/v) OADC (BD-Difco) and 0.05% (v/v) Tween 80 (Sigma-Aldrich) (7H9sB) at 30°C with shaking (150 rpm).<sup>12,13</sup>

### Antibiotics

Amoxicillin and avibactam were provided by Mylan (Saint-Priest, France). Imipenem and relebactam were provided by Merck Sharp and Dohme. Water was the solvent for preparing stock solutions for amoxicillin (10 mg/mL), imipenem (1 mg/mL), avibactam (1 mg/mL) and relebactam (1 mg/mL). Rifabutin was solubilized in 96% ethanol (16 mg/mL).

### Antibiotic susceptibility testing

The MICs of imipenem and amoxicillin alone or in combination with relebactam (4 mg/L) or avibactam (4 mg/L) were determined in 96-well round-bottom microplates using the microdilution method as previously described.<sup>12,13</sup> The MIC was defined as the lowest drug concentration preventing visible bacterial growth. The experiments were performed in quintuplet. Data are the medians of five experiments.

### Time-kill assay

Erlenmeyer flasks containing 20 mL of 7H9sB supplemented with imipenem (8 or 32 mg/L) alone or in combination with relebactam (4 mg/L) or avibactam (4 mg/L) were inoculated with exponentially growing *M. abscessus* CIP104536 ( $3 \times 10^6$  cfu/mL) and incubated with shaking (150 rpm) at 30°C for 72 h. Imipenem was added at the same doses every 24 h to compensate for drug instability. Bacteria were enumerated at 0, 48 and 72 h by plating serial dilutions prepared in sterile water on lysogeny broth (LB) plates. Plates were incubated for 4 days at 30°C. Results are the means ( $\pm$ SD) of three experiments.

### Activity of imipenem and amoxicillin alone or in combination with avibactam, relebactam and rifabutin in THP-1 macrophages

The activity of antibiotics was studied as previously described.<sup>12,13</sup> Briefly, THP-1 cells were seeded into 24-well plates ( $5 \times 10^5$  cells per 1 mL well), differentiated for 24 h and infected with *M. abscessus* CIP104536 at an moi of 10 for 3 h. Imipenem (8 and 32 mg/L) or amoxicillin (8, 32 and 128 mg/L) alone or in combination with relebactam (16 mg/L) or avibactam (16 mg/L) were added to each well. Rifabutin (1 mg/L) was also studied in combination with imipenem (8 mg/L), imipenem/relebactam or imipenem/

avibactam. Plates were incubated with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 2 days. Imipenem was added every 24 h. Intracellular bacteria were enumerated by plating serial dilutions of macrophage lysates on LB agar plates that were incubated for 4 days at 30°C. Results are the means ( $\pm$ SD) of four independent experiments.

### Inhibition of purified Bla<sub>Mab</sub> by relebactam

The kinetic parameters for Bla<sub>Mab</sub> inhibition by relebactam were determined for a reversible two-step reaction as previously described.<sup>9,16</sup> Briefly, purified Bla<sub>Mab</sub> (0.25 nM) was incubated with nitrocefin (100 μM) and relebactam (7, 9, 11, 20, 30 and 50 μM) in 100 mM MES (pH 6.4) at 20°C. Hydrolysis of nitrocefin was monitored by spectrophotometry at 486 nm ( $\Delta\epsilon = 15\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ).

### Statistical analysis

The Mann-Whitney *U*-test was used to compare the bactericidal and intracellular activity of antibiotics. Statistical analyses were performed with EPI Info™ software version 7.1.3 (CDC, Atlanta, GA, USA).

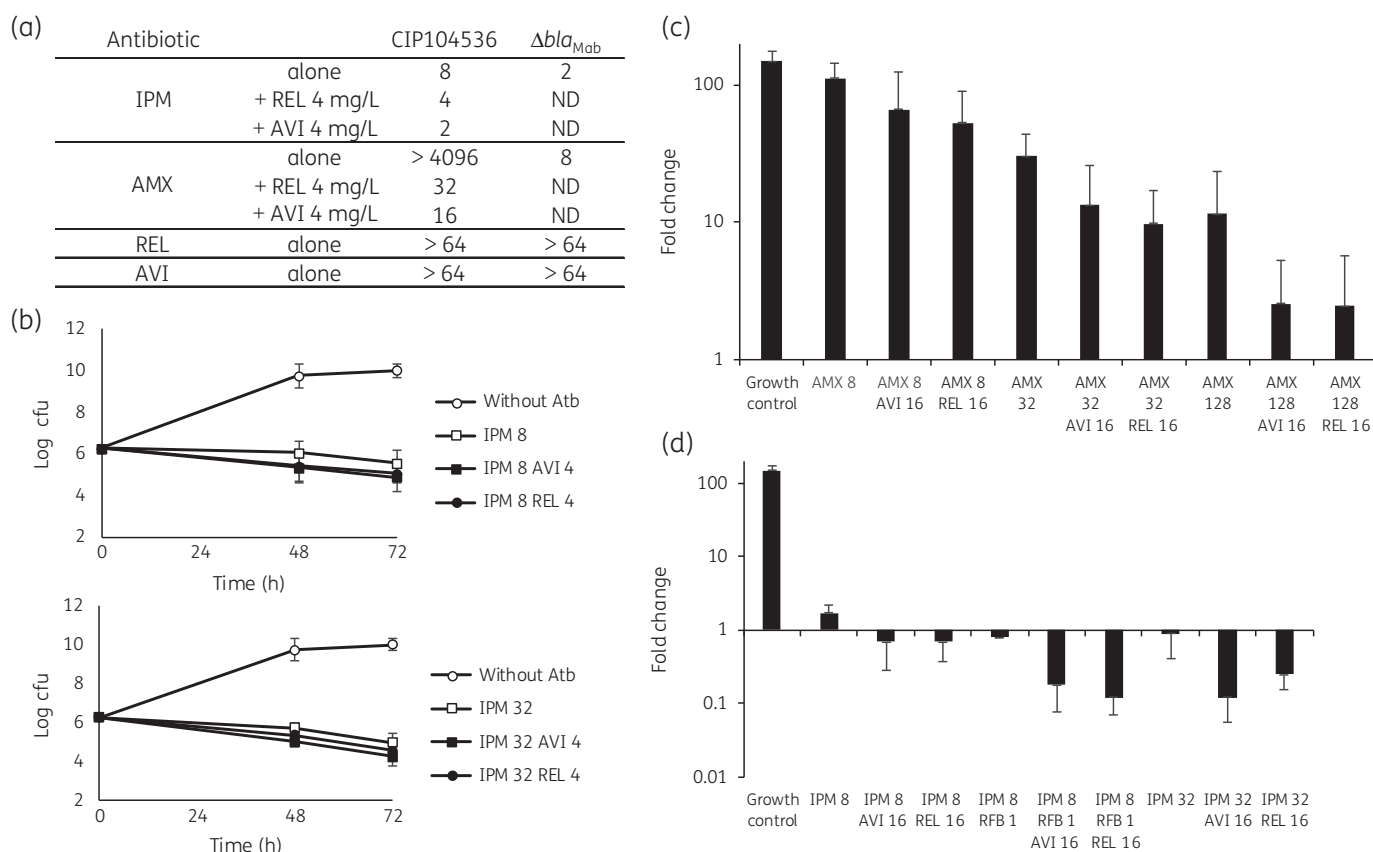
## Results

### MICs of imipenem and amoxicillin alone or in combination with relebactam or avibactam

The MICs of imipenem and amoxicillin were 8 and >4096 mg/L, respectively, for *M. abscessus* CIP104536 (Figure 1a). In the presence of 4 mg/L relebactam, the MIC of amoxicillin was reduced more than 128-fold (from >4096 to 32 mg/L), a reduction slightly less than that obtained with avibactam at the same concentration (from >4096 to 16 mg/L). Inhibition of Bla<sub>Mab</sub> was efficacious, but not total since the MIC of amoxicillin was 8 mg/L for *M. abscessus*  $\Delta$ Bla<sub>Mab</sub>, which does not produce the β-lactamase following deletion of the bla<sub>Mab</sub> gene. The impact of the inhibitors on the MICs of imipenem followed the same trend with a 2-fold reduction for relebactam (from 8 to 4 mg/L) and a 4-fold reduction for avibactam (from 8 to 2 mg/L). In the latter case, inhibition appeared complete since the MIC for the β-lactamase-deficient strain was also 2 mg/L. Together, these results indicate that relebactam reaches the periplasm of *M. abscessus* leading to improved activity of β-lactams presumably due to inhibition of Bla<sub>Mab</sub>. Relebactam was slightly less effective than avibactam in this assay.

### In vitro killing of *M. abscessus* CIP104536 by imipenem alone or in combination with relebactam or avibactam

Imipenem was tested at 8 and 32 mg/L, corresponding to concentrations equal to 1- and 4-fold the MIC of the drug for *M. abscessus* CIP104536, respectively (Figure 1a). Relebactam and avibactam were tested at 4 mg/L, as used for susceptibility testing in enterobacteria.<sup>17,18</sup> Reductions in the log<sub>10</sub> cfu were observed for imipenem at 8 mg/L, tested alone (0.7 log<sub>10</sub>) or in combination with relebactam (1.2 log<sub>10</sub>) or avibactam (1.4 log<sub>10</sub>) (Figure 1b). Statistical analysis (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online) indicated that the addition of relebactam or avibactam did not significantly improve bacterial killing by imipenem. Increasing the imipenem concentration from 8 to 32 mg/L (Figure 1b) was associated with slightly higher killing (0.7 versus 1.3 log<sub>10</sub> reduction), but the difference was not significant (*P*=0.27). Combinations comprising the high dose of imipenem (32 mg/L) and relebactam or avibactam were the most active



**Figure 1.** *In vitro* and intracellular activities of  $\beta$ -lactams alone or in combination with  $\beta$ -lactamase inhibitors against *M. abscessus* CIP104536. (a) MICs of amoxicillin and imipenem alone or in combination with relebactam and avibactam; data are the medians of five experiments. (b) Time-kill curves obtained for imipenem alone or in combination with relebactam and avibactam; the number of cfu was determined after 0, 48 and 72 h of exposure to antibiotics; values are the means of at least three independent experiments. (c) Intracellular activity of amoxicillin alone or in combination with relebactam or avibactam and (d) intracellular activity of imipenem alone or in combination with relebactam, avibactam and rifabutin; intracellular bacteria were enumerated and cfu fold changes were determined between Days 0 and 2 post-infection; results are the means of four independent experiments. Bars represent SDs. Drug concentrations are indicated in mg/L. AMX, amoxicillin; Atb, antibiotic; AVI, avibactam; IPM, imipenem; ND, not determined; RFB, rifabutin.

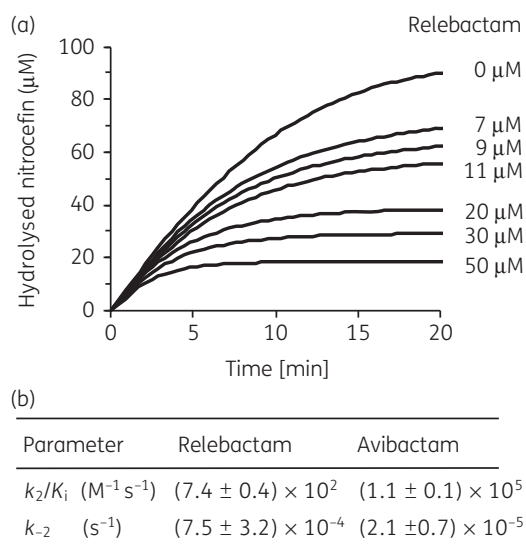
(1.7 and 2.0  $\log_{10}$  reduction, respectively). As observed for the low dose of imipenem, relebactam and avibactam did not significantly improve bacterial killing by imipenem at 32 mg/L. None of the combinations showed bactericidal activity defined by a reduction of more than 99.9% of the cfu present in the inoculum. Together, these results indicate that imipenem has moderate killing activity against *M. abscessus* *in vitro*. This activity is not significantly improved by relebactam and avibactam.

#### **Intramacrophage activity of imipenem and amoxicillin alone or in combination with relebactam or avibactam**

In the absence of antibiotic, *M. abscessus* CIP104536 grew in the macrophages, leading to a 150-fold increase in the number of cfu in 48 h (Figure 1c). Amoxicillin alone partially prevented intramacrophage growth in a dose-dependent manner (Figure 1c; for statistical analysis see Table S2), in spite of an *in vitro* MIC of >4096 mg/L (Figure 1a). This could indicate significant potentiation of amoxicillin alone in macrophages. The addition of relebactam (16 mg/L) improved the intracellular activity of amoxicillin at

32 mg/L (30- versus 9.7-fold change in cfu;  $P < 0.05$ ) and at 128 mg/L (11.4- versus 2.5-fold change in cfu;  $P = 0.08$ ). Fold changes were higher for the amoxicillin/relebactam combinations than for the amoxicillin/avibactam combinations, but the differences were not statistically significant. Of note, none of the combinations comprising amoxicillin and a  $\beta$ -lactamase inhibitor achieved killing of *M. abscessus* in the macrophage.

Intracellularly, imipenem alone was similarly active at 8 and 32 mg/L, leading to 1.7- and 0.89-fold changes in the number of cfu (Figure 1d; for statistical analysis see Table S3). Relebactam significantly improved the activity of imipenem at 8 mg/L (1.7- versus 0.70-fold change in cfu;  $P < 0.05$ ). The same fold reduction was observed with the imipenem/avibactam combination. Increasing the concentration of imipenem to 32 mg/L significantly improved the activity of the combinations including relebactam and avibactam, achieving significant killing with fold changes of 0.25 and 0.12 corresponding to 75% and 88% killing of bacteria present in the macrophages at the onset of drug exposure, respectively. Together, these results indicate that relebactam significantly improved the intramacrophage activity of imipenem at the two



**Figure 2.** Relative efficacies of relebactam and avibactam for inhibition of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$   $\beta$ -lactamase. (a) Kinetics of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  inhibition by relebactam.  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  (0.25 nM) was incubated with nitrocefirin (100  $\mu\text{M}$ ) and various concentrations of relebactam (7 to 50  $\mu\text{M}$ ). Hydrolysis of nitrocefirin was monitored by spectrophotometry, as previously described.<sup>10</sup> (b) Kinetic parameters for inhibition of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  by relebactam and avibactam. Kinetic parameters were determined as previously described.<sup>10</sup> Kinetic parameters obtained with avibactam have been previously reported<sup>10</sup> and are included for comparison.

tested concentrations. Relebactam and avibactam had similar efficacies in this assay.

Rifabutin at 1 mg/L was used to evaluate whether this drug could be used to reduce the dose of imipenem required for bacterial killing. This appears to be the case since triple combinations including rifabutin in addition to the low dose of imipenem (8 mg/L) and relebactam or avibactam killed *M. abscessus* in the macrophages to the same extent as the high dose of imipenem (32 mg/L) combined with relebactam or avibactam.

### In vitro inhibition of $\text{Bla}_{\text{Mab}}$ by relebactam

A soluble form of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  was produced in *Escherichia coli* and purified to assess the efficacy of its inhibition by relebactam. Kinetics of nitrocefirin hydrolysis in the presence of increasing concentrations of relebactam (Figure 2a) revealed time-dependent inhibition of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  with a carbamylation rate constant ( $k_2/K_i$ ) of  $(7.4 \pm 0.4) \times 10^2 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Figure 2b). This estimate of the inhibition efficacy of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  by relebactam is 150-fold lower than that previously reported for inhibition of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  by avibactam using the same assay (Figure 2b).<sup>10</sup>

### Discussion

Here, we show that inhibition of the  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$   $\beta$ -lactamase by relebactam improves the efficacy of amoxicillin and imipenem against *M. abscessus*. The impact of the addition of relebactam was higher in infected macrophages than *in vitro*, as previously reported for avibactam,<sup>11</sup> probably because the  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$   $\beta$ -lactamase is

produced at a higher level by intracellular bacteria than by bacteria growing in pure culture in standard media.<sup>11</sup>

Since  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  hydrolyses imipenem with moderate, but significant, catalytic efficacy ( $3 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ),<sup>10</sup> inhibition of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  by relebactam (Figure 2) may contribute to the improved activity of imipenem in the presence of relebactam. However, the extent of intracellular killing of *M. abscessus* by the imipenem/relebactam and imipenem/avibactam combinations is similar in spite of a 150-fold difference in the inhibition efficacy of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  by relebactam and avibactam. The lower inhibition efficacy of  $\text{Bla}_{\text{Mab}}$  by relebactam could be compensated by a direct impact of the  $\beta$ -lactamase inhibitor on the imipenem targets since such dual action on the  $\beta$ -lactamase and the transpeptidases has been documented in Enterobacteriaceae for structurally related inhibitors.<sup>19</sup>

In macrophages, relebactam significantly improved the activity of imipenem at two dosages corresponding to clinically achievable drug concentrations in serum (Figure 1d).<sup>20</sup> In addition, the combination of relebactam with the low dose of imipenem and rifabutin achieved significant killing. These results indicate that relebactam should be clinically evaluated in the treatment of infections due to *M. abscessus* since approval of the imipenem/relebactam combination would potentially offer a unique treatment opportunity for cystic fibrosis patients.

### Acknowledgements

We thank Merck Sharp and Dohme for providing imipenem and relebactam.

### Funding

This work was supported by Vaincre la Mucoviscidose and l'Association Grégory Lemarchal (PhD fellowship to E.L.R.; RF20160501637) and ANR MycWall (PhD fellowship to H.A.). Imipenem and relebactam were gifts from Merck Sharp and Dohme.

### Transparency declarations

J.-L.M. has received consulting fees (scientific advisor for ceftolozane/tazobactam, Merck Sharp and Dohme) and reimbursement of travel expenses (attendance at Twenty-Seventh European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017) from Merck Sharp and Dohme. All other authors: none to declare.

### Supplementary data

Tables S1 to S3 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

### References

- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**: 367–416.
- Park IK, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 2015; **36**: 217–24.
- Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L et al. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 378–84.

- 4** Roux AL, Catherinot E, Ripoll F *et al.* Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 4124–8.
- 5** Qvist T, Gilljam M, Jonsson B *et al.* Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J Cyst Fibros* 2015; **14**: 46–52.
- 6** Lefebvre AL, Dubee V, Cortes M *et al.* Bactericidal and intracellular activity of  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1556–63.
- 7** Floto RA, Olivier KN, Saiman L *et al.* US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax* 2016; **71** Suppl 1: i1–22.
- 8** Soroka D, Dubee V, Soulier-Escrihuela O *et al.* Characterization of broad-spectrum *Mycobacterium abscessus* class A  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 691–6.
- 9** Dubee V, Bernut A, Cortes M *et al.*  $\beta$ -Lactamase inhibition by avibactam in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 1051–8.
- 10** Soroka D, Ourghanlian C, Compain F *et al.* Inhibition of  $\beta$ -lactamases of mycobacteria by avibactam and clavulanate. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 1081–8.
- 11** Lefebvre AL, Le Moigne V, Bernut A *et al.* Inhibition of the  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> by avibactam improves the *in vitro* and *in vivo* efficacy of imipenem against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e02440-16.
- 12** Le Run E, Arthur M, Mainardi JL. *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with rifabutin and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e00623-18.
- 13** Le Run E, Arthur M, Mainardi JL. *In vitro* and intracellular activity of imipenem combined with tedizolid, rifabutin and avibactam against *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: e01915-18.
- 14** Kaushik A, Ammerman NC, Lee J *et al.* *In vitro* activity of the new  $\beta$ -lactamase inhibitors relebactam and vaborbactam in combination with  $\beta$ -lactams against *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: e02623-18.
- 15** Kaushik A, Ammerman NC, Parrish NM *et al.* New  $\beta$ -lactamase inhibitors nacubactam and zidebactam improve the *in vitro* activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Mycobacterium abscessus* complex clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: e00733-19.
- 16** Ehmann DE, Jahic H, Ross PL *et al.* Avibactam is a covalent, reversible, non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 11663–8.
- 17** Hackel M, Kazmierczak KM, Hoban DJ *et al.* Assessment of the *in vitro* activity of ceftazidime-avibactam against multidrug-resistant *Klebsiella* spp. collected in the INFORM global surveillance study, 2012 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**: 4677–83.
- 18** Karłowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM *et al.* *In vitro* activity of imipenem-relebactam against clinical isolates of Gram-negative bacilli isolated in hospital laboratories in the United States as part of the SMART 2016 program. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e00169-18.
- 19** Bush K, Bradford PA. Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* 2019; **17**: 295–306.
- 20** Sakka SG, Glauner AK, Bulitta JB *et al.* Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of continuous versus short-term infusion of imipenem-cilastatin in critically ill patients in a randomized, controlled trial. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3304–10.

## Supplementary data

**Table S1.** Statistical analysis of the killing activity of imipenem (IPM) alone or in combination with relebactam (REL) or avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536.

		without Atb	IPM8	IPM8AVI4	IPM8REL4	IPM32	IPM32AVI4	IPM32REL4
		(10.01)	(5.56)	(4.88)	(5.05)	(4.98)	(4.26)	(4.55)
without Atb	(10.01)	N.A	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495	0,0495
IPM8	(5.56)		N.A	0,1266	0,1840	0,2752	0,0495	0,0495
IPM8AVI4	(4.88)			N.A	0,5127	1,0000	0,2752	0,8273
IPM8REL4	(5.05)				N.A	0,8273	0,0495	0,0495
IPM32	(4.98)					N.A	0,1266	0,2752
IPM32AVI4	(4.26)						N.A	0,5127
IPM32REL4	(4.55)							N.A

Abbreviations: Without ATB, without any antibiotic; IPM 8, imipenem at 8 mg/L; IPM 32, imipenem at 32 mg/L; REL 4, relebactam at 4 mg/L; AVI 4, avibactam at 4 mg/L. Log<sub>10</sub> of cfus are indicated in parenthesis.

**Table S2.** Statistical analysis of the intracellular activity of amoxicillin (AMOX) alone or in combination with relebactam (REL) or avibactam (AVI) against *M. abscessus* CIP104536.

	without atb (147.92)	AMOX 8 (110.76)	AMOX 8 AVI 16 (65.90)	AMOX 8 REL 16 (52.43)	AMOX 32 (29.97)	AMOX 32 AVI 16 (13.23)	AMOX 32 REL 16 (9.68)	AMOX 128 (11.37)	AMOX 128 AVI 16 (2.54)	AMOX 128 REL 16 (2.45)
Without atb	(147.92)	N.A	0,0814	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0194
AMOX 8	(110.76)	N.A	0,1489	0,0833	0,0209	0,0209	0,0209	0,0209	0,0209	0,0202
AMOX 8 AVI 16	(65.90)		N.A	0,7728	0,7728	0,0833	0,0433	0,0833	0,0209	0,0202
AMOX 8 REL 16	(52.43)			N.A	0,4678	0,0833	0,0209	0,0833	0,0209	0,0202
AMOX 32	(29.97)				N.A	0,1489	0,0433	0,1489	0,0209	0,0202
AMOX 32 AVI 16	(13.23)					N.A	0,7728	0,3865	0,0833	0,0814
AMOX 32 REL 16	(9.68)						N.A	1,0000	0,0833	0,0814
AMOX 128	(11.37)							N.A	0,0833	0,0814
AMOX 128 AVI 16	(2.54)								N.A	0,5614
AMOX 128 REL 16	(2.45)									N.A

Abbreviations: Without ATB, without any antibiotic; AMOX 8, amoxicillin at 8 mg/L; AMOX 32, amoxicillin at 32 mg/L; AMOX 128, amoxicillin at 128 mg/L; REL 16, relebactam at 16 mg/L; AVI 16, avibactam at 16 mg/L. Fold changes in the number of cfus are indicated in parenthesis (*i.e.* number of intracellular bacteria after 48 h of exposure to drugs divided by the number of intracellular bacteria at the onset of drug exposure). In the absence of drug, the ratio was 147.92 indicating intramacrophage proliferation.



**Table S3.** Statistical analysis of the intracellular activity of imipenem (IPM) alone or in combination with relebactam (REL) or avibactam (AVI) and rifabutin (RFB) against *M. abscessus* CIP104536.

		Without ATB (147.92)	IPM 8 (1.72)	IPM 8+AVI 16 (0.70)	IPM 8+REL 16 (0.70)	IPM 8+RFB 1 (0.8)	IPM 8+RFB+AVI 16 (0.18)	IPM 8+RFB+REL 16 (0.12)	IPM 32 (0.89)	IPM 32+AVI 16 (0.12)	IPM 32+REL 16 (0.25)
Without ATB	(147.92)	N.A	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202	0,0202
IPM 8	(1.72)		N.A	0,0209	0,0209	0,1489	0,0209	0,0209	0,0833	0,0209	0,0209
IPM 8+AVI 16	(0.70)			N.A	1	1	0,0294	0,0209	0,5637	0,0209	0,0433
IPM 8+REL 16	(0.70)				N.A	0,5637	0,0209	0,0209	0,5637	0,0209	0,0433
IPM 8+RFB 1	(0.8)					N.A	0,0833	0,0433	0,5637	0,0833	0,2482
IPM 8+RFB+AVI 16	(0.18)						N.A	0,2482	0,0433	0,5637	0,1913
IPM 8+RFB+REL 16	(0.12)							N.A	0,0209	1	0,0433
IPM 32	(0.89)								N.A	0,0209	0,0433
IPM 32+AVI 16	(0.12)									N.A	0,0833
IPM 32+REL 16	(0.25)										N.A

Abbreviations: Without ATB, without any antibiotic; IPM 8, imipenem at 8 µg/ml; IPM 32, imipenem at 32 mg/L; REL 16, relebactam at 16 mg/L; AVI 16, avibactam at 16 mg/L; RFB, rifabutin at 1 mg/L. Fold changes in the number of cfus are indicated in parenthesis (i.e. number of intracellular bacteria after 48 h of exposure to drugs divided by the number of intracellular bacteria at the onset of drug exposure). In the absence of drug, the ratio was 147.92 indicating intramacrophage proliferation. A ratio of 1 indicates a bacteriostatic effect. A ratio lower than 1 indicates killing of the intracellular bacteria.



## Synthetic Methods

Synthesis of Avibactam Derivatives and Activity on  $\beta$ -Lactamases and Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes of Mycobacteria

Zainab Edo<sup>+</sup>,<sup>[a]</sup> Laura Iannazzo<sup>+</sup>,<sup>[c, d]</sup> Fabrice Compain,<sup>[a, b]</sup> Inès Li de la Sierra Gallay,<sup>[e]</sup> Herman van Tilbeurgh,<sup>[e]</sup> Matthieu Fonvielle,<sup>[a]</sup> Flavie Bouchet,<sup>[c]</sup> Eva Le Run,<sup>[a]</sup> Jean-Luc Mainardi,<sup>[a, b]</sup> Michel Arthur<sup>++</sup>,<sup>\*[a]</sup> Mélanie Ethève-Quellejeu<sup>++</sup>,<sup>[c, d]</sup> and Jean-Emmanuel Hugonnet<sup>++[a]</sup>

**Abstract:** There is a renewed interest for  $\beta$ -lactams for treating infections due to *Mycobacterium tuberculosis* and *M. abscessus* because their  $\beta$ -lactamases are inhibited by classical (clavulanate) or new generation (avibactam) inhibitors, respectively. Here, access to an azido derivative of the diazabicyclooctane (DBO) scaffold of avibactam for functionalization by the Huisgen–Sharpless cycloaddition reaction is reported. The amoxicillin–DBO combinations were active, indicating that the triazole ring is compatible with drug penetration (minimal inhibitory concentration of  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$  for both species). Mechanistically,  $\beta$ -lactamase inhibition was not sufficient to account for the potentiation of amoxicillin by DBOs. Thus, the latter compounds were investigated as inhibitors of L,D-transpeptidases (Ldts), which are the main peptidoglycan polymerases in mycobacteria. The DBOs acted as slow-binding inhibitors of Ldts by S-carbamoylation indicating that optimization of DBOs for Ldt inhibition is an attractive strategy to obtain drugs selectively active on mycobacteria.

The  $\beta$ -lactams remain the first-line treatment for numerous bacterial infections despite the emergence of multiple resistance mechanisms resulting from an intensive use of the drugs in the last 70 years. This reflects the covalent mechanism-based mode of action of  $\beta$ -lactams and the unique properties of their targets, the peptidoglycan D,D-transpeptidases belonging to the penicillin-binding protein (PBP) family.<sup>[1]</sup> These prop-

erties include the presence of multiple essential paralogues in nearly all bacteria and a periplasmic location. To combat resistance, the  $\beta$ -lactam scaffold has been successfully engineered to obtain drugs that are active against low-affinity PBPs, are poorly hydrolyzed by  $\beta$ -lactamases, or act as inhibitors of these enzymes.<sup>[2]</sup> However, this strategy is presently not sufficient to counteract the rapidly evolving resistance mechanisms involving the production of extended-spectrum and inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases and of low-affinity PBPs.

Avibactam, a recently approved  $\beta$ -lactamase inhibitor, is original in its structure since it is based on a diazabicyclooctane (DBO) scaffold containing a cyclic urea rather than a  $\beta$ -lactam ring found in classical inhibitors such as clavulanate (Figure 1a).<sup>[3]</sup> Avibactam is also original in its mode of action since it reversibly inactivates  $\beta$ -lactamases containing an active-site serine by formation of a carbamoyl-enzyme, which is not, or poorly, prone to hydrolysis.<sup>[2b,4]</sup>

Although avibactam has been developed for inhibiting  $\beta$ -lactamases from multi-drug resistant Gram-negative bacteria, we have recently reported that avibactam is also active against the  $\beta$ -lactamase Bla<sub>Mab</sub> from *Mycobacterium abscessus*.<sup>[5]</sup> Avibactam potentiates the activity of imipenem, a  $\beta$ -lactam of the carbapenem class used in the reference treatment of lung infections due to *M. abscessus* in cystic fibrosis patients.<sup>[6]</sup> Of note, avibactam is a poor inhibitor of BlaC from *Mycobacterium tuberculosis*. Clavulanate, a classical  $\beta$ -lactam-containing  $\beta$ -lactamase inhibitor, is hydrolyzed by Bla<sub>Mab</sub>.<sup>[7]</sup> In contrast, clavulanate irreversibly inhibits BlaC<sup>[8]</sup> and this molecule is currently evaluated for the treatment of tuberculosis in combination

[a] Z. Edo<sup>+</sup>, Dr. F. Compain, Dr. M. Fonvielle, E. Le Run, Dr. J.-L. Mainardi, Dr. M. Arthur<sup>++</sup>, Dr. J.-E. Hugonnet<sup>++</sup>  
Sorbonne Université, Sorbonne Paris Cité  
Université Paris Descartes, Université Paris Diderot  
INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, CRC  
75006 Paris (France)  
E-mail: michel.arthur@crc.jussieu.fr  
jean-emmanuel.hugonnet@crc.jussieu.fr

[b] Dr. F. Compain, Dr. J.-L. Mainardi  
Service de Microbiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris  
Hôpital Européen Georges Pompidou  
Paris (France)

[c] Dr. L. Iannazzo<sup>+</sup>, F. Bouchet, Dr. M. Ethève-Quellejeu<sup>++</sup>  
Laboratoire de Chimie et de Biochimie  
Pharmacologiques et Toxicologiques

Université Paris Descartes, UMR 8601  
75005 Paris (France)  
E-mail: melanie.etheve-quelquejeu@parisdescartes.fr

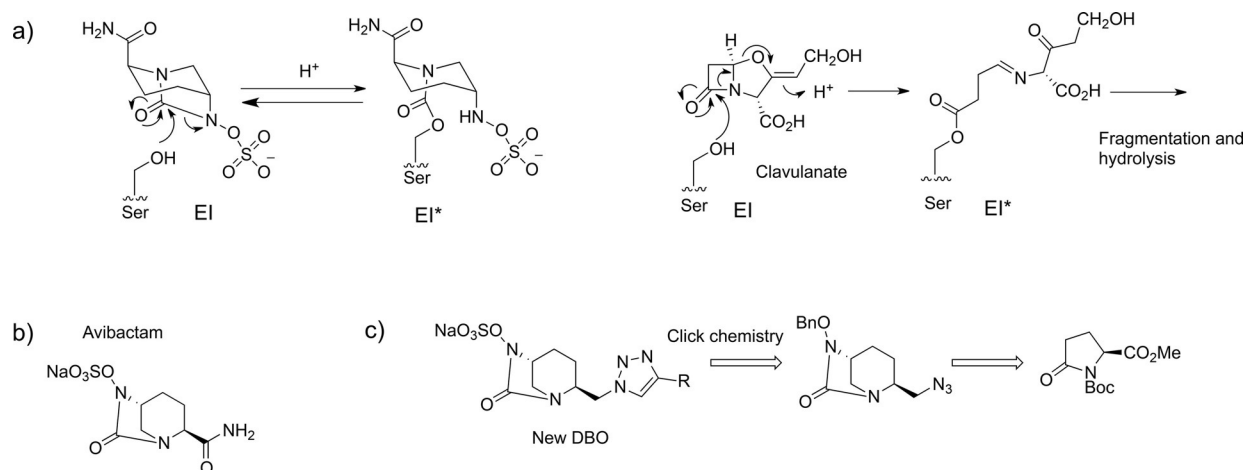
[d] Dr. L. Iannazzo<sup>+</sup>, Dr. M. Ethève-Quellejeu<sup>++</sup>  
CNRS UMR 8601, 75006 Paris (France)

[e] Dr. I. Li de la Sierra Gallay, Dr. H. van Tilbeurgh  
Fonction et Architecture des Assemblages Macromoléculaires  
Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC)  
CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay  
91198 Gif-sur-Yvette cedex (France)

[\*] Equal contribution

[++] Equal contribution

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/chem.201800923>



**Figure 1.** a) Mechanism of action of  $\beta$ -lactamase inhibitors. EI = non-covalent  $\beta$ -lactamase:inhibitor complex; EI\* = covalent adduct resulting from the carbamylation (avibactam) or acylation (clavulanate) of the active-site serine of the  $\beta$ -lactamase. b) Structure of avibactam. c) Retrosynthetic Scheme for the synthesis of DBO analogues.

with the carbapenem meropenem.<sup>[9]</sup> The opposite behavior of Bla<sub>Mab</sub> and BlaC with avibactam and clavulanate is almost exclusively determined by a single amino acid polymorphism, that is, the presence of motif SDG in BlaC instead of the nearly invariant motif SDN present in Bla<sub>Mab</sub> and in most class A  $\beta$ -lactamases.<sup>[8b,10]</sup>

The potential of avibactam for improving the efficacy of  $\beta$ -lactams against mycobacterial infections prompted us to further investigate DBOs and to develop a synthetic route to easily obtain functionalized DBOs. Synthesis of avibactam was previously described using chiral piperidine derivatives,<sup>[11]</sup> L-glutamic acid,<sup>[12]</sup> or L-pyrroglutamic acid<sup>[12]</sup> as starting material. Recently, the process has been optimized starting from commercially available Boc-benzylglutamate.<sup>[13]</sup> Synthetic efforts devoted to the discovery of new DBOs have also been based on the olefin metathesis reaction<sup>[14]</sup> or on a lipase catalytic resolution.<sup>[13]</sup> Here, we report a versatile route for the functionalization of DBOs via the copper(I)-catalyzed Huisgen–Sharpless cycloaddition reaction (Figure 1c). We show that the resulting triazole-containing DBOs retain the capacity to reach the periplasm of mycobacteria and to inhibit their  $\beta$ -lactamases. We also unexpectedly show that DBOs act as slow-binding inhibitors of L,D-transpeptidases, opening the way to the development of antibiotics specific to mycobacteria.

Our synthetic approach to obtain avibactam analogues leads to azido DBO **13** from a commercially available oxopyrrolidine in 12 steps followed by a Huisgen–Sharpless cycloaddition as a key step (Figure 1c). In the first step (Scheme 1), a premixed slurry of trimethylsulfoxonium iodide and potassium *tert*-butoxide are added to the oxopyrrolidine to afford the  $\beta$ -keto sulfoxonium ylide **1**.<sup>[12e]</sup> The next step, catalyzed by an iridium complex, leads to the formation of the piperidinone **2**. The latter compound is selectively reduced to alcohol **3** and converted into compound **5** by a Mitsunobu reaction with *N*-protected *O*-benzyl hydroxylamine **4**.<sup>[15]</sup> Compounds **6** and **7** are obtained by deprotection of the *N*-*O*-benzyl hydroxylamine and of the *N*-Boc, respectively. Reduction of the methyl ester

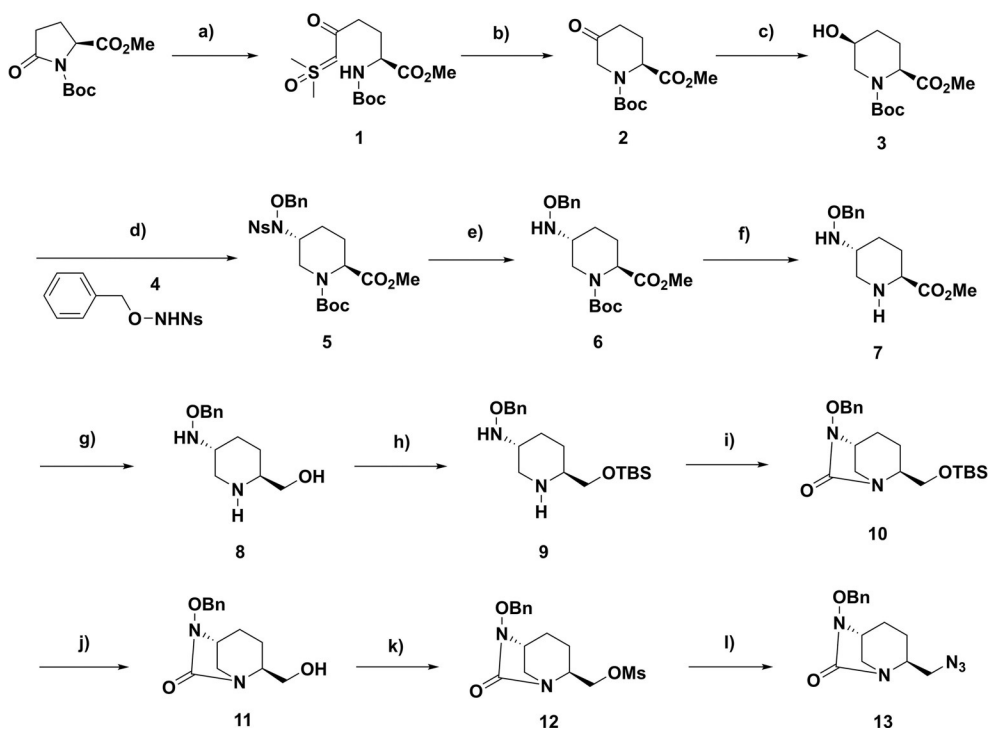
affords alcohol **8**, which is then protected by a silyl group to obtain compound **9**. The bicyclic urea ring of **10** is formed in the presence of triphosgene.<sup>[11d,14a]</sup> Final modification steps of the side-chain lead to the formation of precursor **13** by deprotection and activation of the alcohol, and addition of sodium azide.

Functionalization of azido **13** (Scheme 2) was performed by copper(I)-catalyzed 1,3-cycloaddition in the presence of commercially available alkynes affording compounds **14a** and **14b** in good yield (Scheme 2). Access to the final DBOs, **15a** and **15b**, included debenzoylation of **14a** and **14b** by hydrogenolysis followed by sulfation with pyridinium sulfate.

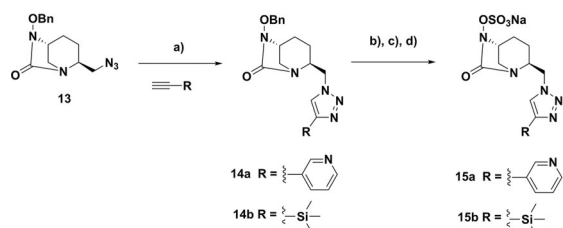
The biological activity of avibactam and **15a** was evaluated by determining their ability to potentiate the activity of amoxicillin, a  $\beta$ -lactam of the penicillin class, against mycobacteria (Table 1). Avibactam inhibited  $\beta$ -lactamases BlaC and Bla<sub>Mab</sub> in the periplasm of *M. tuberculosis* and *M. abscessus* since the minimal inhibitory concentrations (MICs) of amoxicillin were reduced at least 16 fold (from 128 to 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and from > 256

Table 1. Potentiation of the activity of amoxicillin by $\beta$ -lactamase inhibitors. <sup>[a]</sup>					
Strain	$\beta$ -lactamase	MIC of amoxicillin [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] in the presence or absence of DBOs			
		None	Avibactam	15a	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	BlaC	128	8	16	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv $\Delta$ blaC	None	1	0.5	1	
<i>M. abscessus</i> CIP104536	Bla <sub>Mab</sub>	> 256	16	16	
<i>M. abscessus</i> CIP104536 $\Delta$ bla <sub>Mab</sub>	None	4	4	4	

[a] Minimal inhibitory concentrations (MICs) are defined as the lowest drug concentration that prevents visible growth. Avibactam and **15a** were used at a concentration of 15  $\mu\text{M}$  (4 and 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively). DBOs had no antibacterial activity when tested alone (MIC > 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Scheme 1.** a)  $S(O)(CH_2)_3I$ ,  $tBuOK$ , DMSO, RT, 2 h (53%), b)  $[Ir(COD)Cl]_2$ , DCE, 80 °C, overnight (72%), c)  $NaBH_4$ , MeOH, 2 h, 0 °C (91%), d) DEAD,  $PPh_3$ , THF, RT, overnight (83%), e)  $PhSH$ ,  $K_2CO_3$ , MeCN, RT, overnight (98%), f) TFA, DCM, RT, overnight (97%), g)  $LiAlH_4$ , THF, 0 °C, 2 h (51%), h) TBDMSCl, imidazole, DCM, RT, overnight (79%), i) triphosgene, DIPEA, MeCN, 0 °C, 2 h (61%), j) TBAF, THF, 0 °C, 1 h (98%), k)  $MsCl$ ,  $NEt_3$ , DMAP, DCM, 0 °C, 1 h (73%), l)  $NaN_3$ , DMF, 80 °C, overnight (78%). COD = cyclooctadiene; DCE = dichloroethene; DEAD = diethyl azodicarboxylate; TFA = trifluoroacetic acid; DCM = dichloromethane; TBDMSCl = *tert*-butyldimethylsilyl chloride; DIPEA = *N,N*-diisopropylethylamine; TBAF = tetrabutylammonium fluoride;  $MsCl$  = methanesulfonyl chloride; DMAP = 4-dimethylaminopyridine.



**Scheme 2.** a)  $CuSO_4$  30 mol%, sodium ascorbate 60 mol%, THF/ $H_2O$  (2/1), RT, overnight (**14a** 77%, **14b** 99%), b)  $H_2$ , Pd/C, MeOH, RT, 48 h, c)  $SO_2$ -Pyr, Pyr, RT, overnight, d) DOWEX  $Na^+$  (**15a** 10%, **15b** 9%). Pyr = pyridine.

to  $16 \mu g mL^{-1}$ , respectively). Inhibition of  $Bla_C$  and  $Bla_{Mab}$  was apparently partial since the MICs of amoxicillin remained higher than those observed for isogenic strains obtained by deletion ( $\Delta$ ) of the *bla\_C* and *bla\_{Mab}* genes. **15a** was similarly active in reducing the MICs of amoxicillin indicating that functionalization of the DBO scaffold by the cycloaddition reaction affords biologically active compounds. Since the antibacterial activity of **15a** and **15b** against *M. abscessus* was similar (Table S1 in the Supporting Information) biological evaluation was only pursued with **15a**.

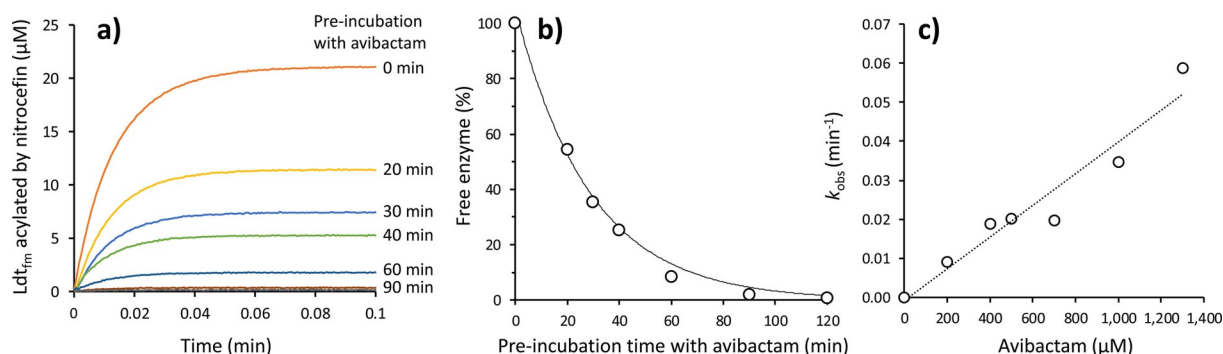
Inhibition of the  $\beta$ -lactamase activity of  $Bla_C$  and  $Bla_{Mab}$  was determined by using the chromogenic cephalosporin nitrocefin as the substrate (Table 2 and Figure S1 in the Supporting Information). As previously described,  $Bla_{Mab}$  was effectively in-

**Table 2.** Efficacy of  $\beta$ -lactamase inhibition by DBOs.

$\beta$ -lactamase	$k_2/K_i$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ]	<b>15a</b>
$Bla_{Mab}$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^5$	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^4$
$Bla_C$	$(2.4 \pm 0.8) \times 10^1$	$< 5 \times 10^0$

hibited by avibactam,<sup>[8b,16]</sup> whereas an 8-fold lower carbamoylation efficacy was obtained for **15a**. As previously described,  $Bla_C$  was poorly inhibited by avibactam<sup>[8a]</sup> and marginally inhibited by **15a** preventing quantitative assessment of the carbamoylation constant for the latter compound. This is in marked contrast with potentiation of the antibacterial activity of amoxicillin by avibactam and **15a** against *M. tuberculosis* (Table 1). This observation suggests that the DBOs might not only inhibit the  $\beta$ -lactamases, but additionally act on peptidoglycan polymerases.

The target of  $\beta$ -lactams is unusual in *M. abscessus* and *M. tuberculosis* since the last cross-linking step of peptidoglycan synthesis is mostly performed by  $L,D$ -transpeptidases, which replace classical PBPs.<sup>[17]</sup> This prompted us to investigate inhibition of the model enzyme of the  $L,D$ -transpeptidase family,  $Ldt_{fm}$ , by avibactam. Incubation of  $Ldt_{fm}$  with avibactam for various times followed by titration of the free active site by nitrocefin indicated time-dependent and complete inactivation of



**Figure 2.** Slow-binding inhibition of  $Ldt_{fm}$  by avibactam assayed by titration of the free active site with nitrocefin. a)  $Ldt_{fm}$  (40  $\mu\text{M}$ ) was incubated with avibactam (1,000  $\mu\text{M}$ ) for 0 to 170 min and the free active site was titrated by nitrocefin. b) Time-dependent inactivation of  $Ldt_{fm}$ . Data were fitted to exponential decay ( $E/E^{\circ} = e^{-k_{obs}t}$ , in which  $E/E^{\circ}$  is the proportion of free enzyme). c)  $k_{obs}$  linearly increased with the concentration of avibactam revealing an S-carbamoylation efficacy of  $0.7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

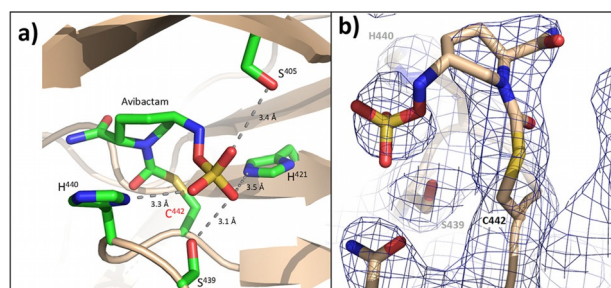
the enzyme (Figure 2a,b). Further analyses showed that the rate of inactivation of  $Ldt_{fm}$  by avibactam linearly increases with the inhibitor concentration (Figure 2c).

Mass spectrometry revealed formation of a covalent adduct between  $Ldt_{fm}$  and avibactam (Table S2 in the Supporting Information). The S-carbamoyl-enzyme was stable upon prolonged incubation at 22 °C (up to 8 days) although minor forms resulting from desulfation or hydrolysis of the thioester bond were detected (Table S3 and Figure S2 in the Supporting Information). The adduct was not observed for a derivative of  $Ldt_{fm}$  in which the catalytic Cys was replaced by Ala. Accordingly, co-crystallization of  $Ldt_{fm}$  with avibactam established that the inhibitor was covalently linked to the catalytic Cys residue (Figure 3 and Figure S3). The position of the sulfate of avibactam suggests that it might be in hydrogen interaction with two His (421 and 440) and two Ser (405 and 439) residues. Since desulfation of the S-carbamoyl-enzyme may have occurred during crystallogenesis, we assessed the stability of the adduct in nitrate buffer, which was also used for crystallogenesis. No free form of  $Ldt_{fm}$  was detected after four weeks of incubation indicating that the S-carbamoyl-enzyme was stable (Table S4). However, this does not formally exclude the possibility that desulfation occurred in the crystal and that the elec-

tron density attributed to the avibactam sulfate could in fact correspond to a phosphate originally present in the  $Ldt_{fm}$  purification buffer.

Our next objective was to determine whether DBOs could inhibit the peptidoglycan cross-linking reaction in mycobacteria. There are five L,D-transpeptidase paralogues in mycobacteria,<sup>[17a]</sup> including  $Ldt_{Mt2}$ , which has been identified as the main cross-linking enzyme during exponential growth of *M. tuberculosis*.<sup>[18]</sup> DBO 15a and avibactam were both found to inhibit  $Ldt_{Mt2}$  (Figure S4).

In conclusion, we have developed access to an azido-DBO that can be easily functionalized by the Huisgen–Sharpless cycloaddition reaction. Using this click chemistry reaction, we synthesized two new DBOs and showed that the resulting triazole linker is compatible with biological activity and penetration into the periplasm of *M. tuberculosis* and *M. abscessus*. In these mycobacteria, the potential targets involved in peptidoglycan cross-linking are complex, as they include the L,D-transpeptidases (Ldts) and the D,D-transpeptidases (PBPBs), responsible for formation of 80% and 20% of the cross-links, respectively, as well as the D,D-carboxypeptidases that generate the tetrapeptide-containing substrate of the Ldts.<sup>[19]</sup> The potentiation of the antibacterial activity of amoxicillin by avibactam and 15a (Table 1) is likely to involve inhibition of these biosynthetic enzymes by the DBOs since the antibacterial activity of the amoxicillin–DBO combinations poorly correlates with the inhibition efficacy of the  $\beta$ -lactamases  $Bla_{Mab}$  and  $Bla_C$  (Table 2). In agreement, we showed that the DBOs act as slow-binding inhibitors of the model L,D-transpeptidase  $Ldt_{fm}$  (Figure 2) by S-carbamoylation of the active-site Cys residue (Figure 3). These observations suggest that inhibition of the Ldts may contribute to antibacterial activity, although the inhibition of the D,D-carboxypeptidases and of the D,D-transpeptidases, that were not explored in this study, may also be important. In agreement DBOs active on PBPBs have been reported.<sup>[20]</sup> Since transpeptidases of the L,D- and D,D-specificities are structurally unrelated and proceed via distinct catalytic mechanisms involving Cys and Ser nucleophiles,<sup>[21]</sup> development of DBOs specifically active on Ldts is an attractive strategy to obtain drugs selectively active on mycobacteria. Specificity of such com-



**Figure 3.** a) Structure of avibactam in the  $Ldt_{fm}$  active site (PDB accession code 6FJ1) (see Table S5 in the Supporting Information for data-collection and refinement statistics). The sulfate of avibactam might be stabilized by hydrogen interactions with Ser405, His421, Ser439, and His440 (dashed lines). b) Electron density map showing covalent linkage of avibactam to the catalytic Cys.



pounds would rely on the fact that the L,D-transpeptidation pathway is absent or plays a minor unessential role in peptidoglycan polymerization in most bacteria.<sup>[22]</sup> Development of such Ldt-specific drugs would prevent side effects of current  $\beta$ -lactams, such as the carbapenems, which lead to opportunistic fungal infections and the selection of resistance to these last resort antibiotics. It is therefore worth noting that the carbapenemase KPC-2, one of the key targets in the development of avibactam, was carbamoylated 50-fold less effectively by **15a** than by avibactam (Figure S5). This observation indicates that selectivity could potentially be achieved by the functionalization of the DBO scaffold. The route of synthesis of DBOs and the various bacteriologic and enzymatic assays described in this study will pave the way to the development of such specific inhibitors.

## Acknowledgements

We thank L. Dubost and A. Marie for technical assistance in the collection of mass spectra. We thank the staff of the Proxima1 beamlines at the SOLEIL synchrotron for assistance during the diffraction data collections. This work was supported by the French National Research Agency (grant MycWall, ANR-17-CE18-0010), the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) [ANR-10-INSB-05-01], the Fondation pour la Recherche Médicale (grant ECO20160736080 to Z.E.), and Vaincre la Mucoviscidose (grant RIF2017050244 to J.L.M.).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** Avibactam · L,D-transpeptidases · *Mycobacterium abscessus* · *Mycobacterium tuberculosis* ·  $\beta$ -lactamase

- [1] A. Zapun, C. Contreras-Martel, T. Vernet, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 361.
- [2] a) S. M. Drawz, R. A. Bonomo, *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 160; b) D. Y. Wang, M. I. Abboud, M. S. Markoulides, J. Brem, C. J. Schofield, *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 1063.
- [3] K. Bush, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 483.
- [4] D. E. Ehmann, H. Jahic, P. L. Ross, R. F. Gu, J. Hu, G. Kern, G. K. Walkup, S. L. Fisher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11663.
- [5] V. Dubee, A. Bernut, M. Cortes, T. Lesne, D. Dorchene, A. L. Lefebvre, J. E. Hugonnet, L. Gutmann, J. L. Mainardi, J. L. Herrmann, J. L. Gaillard, L. Kremer, M. Arthur, *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1051.
- [6] a) A. L. Lefebvre, V. Dubée, M. Cortes, D. Dorchène, M. Arthur, J.-L. Mainardi, *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 1556; b) A. L. Lefebvre, V. Le Moigne, A. Bernut, C. Veckerle, F. Compain, J. L. Herrmann, L. Kremer, M. Arthur, J. L. Mainardi, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02440-16.
- [7] a) J. E. Hugonnet, L. W. Tremblay, H. I. Boshoff, C. E. R. Barry, J. S. Blanchard, *Science* **2009**, *323*, 1215; b) J. E. Hugonnet, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **2007**, *46*, 11998; c) D. Soroka, V. Dubee, O. Soulier-Escrihueta, G. Cuinet, J. E. Hugonnet, L. Gutmann, J. L. Mainardi, M. Arthur, *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 691.
- [8] a) H. Xu, S. Hazra, J. S. Blanchard, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4551; b) D. Soroka, C. Ourghanlian, F. Compain, M. Fichini, V. Dubee, J. L. Mainardi, J. E. Hugonnet, M. Arthur, *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1081.
- [9] A. H. Diacon, L. van der Merwe, M. Barnard, F. von Groote-Bidlingmaier, C. Lange, A. L. Garcia-Basteiro, E. Sevene, L. Ballell, D. Barros-Aguirre, *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 393.
- [10] a) D. Soroka, I. Li de la Sierra-Gallay, V. Dubee, S. Triboulet, H. van Tilbeurgh, F. Compain, L. Ballell, D. Barros, J. L. Mainardi, J. E. Hugonnet, M. Arthur, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5714; b) C. Ourghanlian, D. Soroka, M. Arthur, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02510-16; c) F. Compain, M. Arthur, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00451-17.
- [11] a) J. Aszodi, M. Lampilas, C. Fromentin, D. Rowlands, (Aventis, Pharma SA), FR 2835186, **2003**; b) M. Lampilas, D. Rowlands, A. Keksi, B. Ledoussal, C. Pierres, (Novexel), WO2008142285, **2008**; c) S.-W. Yang, X. Linghu, E. Smith, J. Pan, V. Sprague, J. Su, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2838; d) S. P. Miller, Y.-L. Zhong, Z. Liu, M. Simeone, N. Yasuda, J. Limanto, Z. Chen, J. Lynch, V. Capodanno, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 174; e) T. A. Blizzard, H. Chen, S. Kim, J. Wu, R. Bodner, C. Gude, J. Imbriglio, K. Young, Y.-W. Park, A. Ogawa, S. Raghoobar, N. Hairston, R. E. Painter, D. Wisniewski, G. Scapin, P. Fitzgerald, N. Sharma, J. Lu, S. Ha, J. Hermes, M. L. Hammond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 780; f) J. Brias, A. Caravano, S. Chasset, F. Chevreuil, F. Faivre, B. Ledoussal, F. Le Strat, S. Richard, C. Simon, S. Vomscheid, (Mutabilis), WO2016156344, **2016**.
- [12] a) V. J. Patil, R. Tadiparthi, S. Birajdar, S. Bhagwat, (Wockhardt Ltd), US8969334, **2015**; b) Y. G. Gu, Y. He, N. Yin, D. C. Alexander, J. B. Cross, C. A. Metcalf, R. Busch, (Cubist Pharmaceuticals, Inc.), WO2013149136, **2013**; c) J. A. Boyd, J. H. Cherryman, M. Golden, Y. B. Kalyan, G. R. Lawton, D. Milne, A. J. Phillips, S. Racha, M. S. Ronsheim, A. Telford, S. H. Zhou, M. G. Dedhiya, (Astrazeneca Ab), WO2012172368, **2012**; d) T. Abe, M. Okue, Y. Sakamaki, (Meiji Seika Pharma Co.), WO2012086241, **2012**; e) I. K. Mangion, R. T. Ruck, N. Rivera, M. A. Huffman, M. Shevlin, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5480; f) E. A. Hecker, A. Baldwin, (Cubist Pharmaceuticals, Inc.), US9120796, **2015**; g) V. P. Chavan, K. S. Wankhede, V. V. Deshmukh, S. Bhavsar, K. R. Patil, R. D. Yeole, P. K. Deshpande, M. V. Patel, (Wockhardt Ltd), WO2015136473, **2015**.
- [13] M. Ball, A. Boyd, G. J. Ensor, M. Evans, M. Golden, S. R. Linke, D. Milne, R. Murphy, A. Telford, Y. Kalyan, G. R. Lawton, S. Racha, M. Ronsheim, S. H. Zhou, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1799.
- [14] a) H. Xiong, B. Chen, T. F. Durand-Réville, C. Joubran, Y. W. Alelyunas, D. Wu, H. Huynh, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1143; b) T. F. Durand-Réville, S. Guler, J. Comita-Prevoir, B. Chen, N. Bifulco, H. Huynh, S. Lahiri, A. B. Shapiro, S. M. McLeod, N. M. Carter, S. H. Moussa, C. Velez-Vega, N. B. Olivier, R. McLaughlin, N. Gao, J. Thresher, T. Palmer, B. Andrews, R. A. Giacobbe, J. V. Newman, D. E. Ehmann, B. de Jonge, J. O'Donnell, J. P. Mueller, R. A. Tommasi, A. A. Miller, *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17104; c) H. McGuire, S. Bist, N. Bifulco, L. Zhao, Y. Wu, H. Huynh, H. Xiong, J. Comita-Prevoir, D. Dussault, B. Geng, B. Chen, T. Durand-Reville, S. Guler, (Entasis Therapeutics Ltd), US9309245, **2016**; d) H. McGuire, S. Bist, N. Bifulco, L. Zhao, Y. Wu, H. Huynh, H. Xiong, J. Comita-Prevoir, D. Dussault, B. Geng, B. Chen, T. Durand-Reville, S. Guler, (Astrazeneca Ab), WO2013150296, **2013**.
- [15] Y. Hwang, J. Q. Gu, A. Jain, S. Garad, J. Sizemore, United State Patent No. US 9,120,795 B2, **2015**.
- [16] V. Dubée, A. Bernut, M. Cortes, T. Lesne, D. Dorchene, A.-L. Lefebvre, J.-E. Hugonnet, L. Gutmann, J.-L. Mainardi, J.-L. Herrmann, J.-L. Gaillard, L. Kremer, M. Arthur, *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1051.
- [17] a) M. Lavollay, M. Arthur, M. Fourgeaud, L. Dubost, A. Marie, N. Veziris, D. Blanot, L. Gutmann, J. L. Mainardi, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 4360; b) M. Lavollay, M. Fourgeaud, J. L. Herrmann, L. Dubost, A. Marie, L. Gutmann, M. Arthur, J. L. Mainardi, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 778.
- [18] R. Gupta, M. Lavollay, J. L. Mainardi, M. Arthur, W. R. Bishai, G. Lamichhane, *Nat. Med.* **2010**, *16*, 466.
- [19] a) P. Kumar, K. Arora, J. R. Lloyd, I. Y. Lee, V. Nair, E. Fischer, H. I. Boshoff, C. E. Barry, III, *Mol. Microbiol.* **2012**, *86*, 367; b) J. L. Mainardi, V. Morel, M. Fourgeaud, J. Cremniter, D. Blanot, R. Legrand, C. Frehel, M. Arthur, J. Van Heijenoort, L. Gutmann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35801; c) J. L. Mainardi, M. Fourgeaud, J. E. Hugonnet, L. Dubost, J. P. Brouard, J. Ouazzani, L. B. Rice, L. Gutmann, M. Arthur, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38146.
- [20] a) A. Asli, E. Brouillette, K. M. Krause, W. W. Nichols, F. Malouin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 752; b) A. Morinaka, Y. Tsutsumi, M. Yamada, K. Suzuki, T. Watanabe, T. Abe, T. Furuuchi, S. Inamura, Y. Saka-

- maki, N. Mitsuhashi, T. Ida, D. M. Livermore, *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 2779.
- [21] L. Lecoq, V. Dubee, S. Triboulet, C. Bougault, J. E. Hugonnet, M. Arthur, J. P. Simorre, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1140.
- [22] a) J.-E. Hugonnet, D. Mengin-Lecreulx, A. Monton, T. den Blaauwen, E. Carbonnelle, C. Veckerle, Y. V. Brun, M. van Nieuwenhze, C. Bouchier, K. Tu, L. B. Rice, M. Arthur, *eLife* **2016**, *5*, e19469; b) S. Magnet, L. Dubost, A. Marie, M. Arthur, L. Gutmann, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 4782.
- 
- Manuscript received: February 23, 2018  
Accepted manuscript online: March 30, 2018  
Version of record online: May 14, 2018
-