NNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 22 février 2024 par

Morgane Sarrazin

Du diagnostic au traitement : les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins des molécules aux multiples applications pour lutter contre *Mycobacterium abscessus*

Discipline : Biologie-Santé

Spécialité Microbiologie

École doctorale 62 : Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires UMR7255

Centre National de la Recherche Scientifique

Devant le jury :

Geneviève HÉRY-ARNAUD	Rapportrice
CHRU de Brest, Université de Bretagne Occidentale	
Franck BIET	Rapporteur
INRAE, Val-de-Loire	
Priscille BRODIN	Examinatrice
INSERM, Lille	
Julien BUYCK	Examinateur
INSERM, Université de Poitiers	
Sophie BLEVES	Présidente du jury
Aix Marseille Univ, LISM, Marseille	
Jean-Louis HERRMANN	Membre invité
INSERM, Université de Versailles St Quentin en Yvelines	
Stéphane CANAAN	Directeur de thèse
CNRS, LISM, Marseille	

Affidavit

Je soussignée, Morgane Sarrazin, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique du Dr Stéphane Canaan, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 15 décembre 2023



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste des publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevets réalisés dans le cadre du projet de thèse :

1. Avellan R.*, Sarrazin M.*, Christopher D. Spilling C.D., Crauste C., Canaan S. et Cavalier J-F., (* contribution égale), « Deciphering the physiological role of serine enzymes involved in mycobacterial lipid metabolism using activity-based protein profiling », Biology of Mycobacterial Lipids, Juin 2022, DOI : 10.1016/B978-0-323-91948-7.00001-4
2. Sarrazin M., Martin B.P., Avellan R., Gnawali G.R., Poncin I., Le Guenno H., Spilling C.D., Cavalier J-F. et Canaan S., « Synthesis and Biological characterization of Fluorescent Cyclipostins & Cyclophostin Analogs: new Insights for the Diagnosis of Mycobacterial-related Diseases. », ACS Infectious Diseases, Décembre 2022 DOI : 10.1021/acsinfecdis.2c00448
3. Sarrazin M., Poncin I., Fourquet P., Audebert S., Camoin L., Denis Y., Santucci P., Spilling C.D., Kremer L., Le Moigne V., Herrmann J-L., Cavalier J-F. et Canaan S., « Cyclophostin and Cyclipostins analogs counteract macrolide-induced resistance mediated by Erm(41) in *Mycobacterium abscessus* », Manuscrit soumis

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. Présentation poster : Les Cyclipostins/Cyclophostines de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose. M. Sarrazin, C. D. Spilling, J-L. Herrmann, L. Kremer, J-F. Cavalier, S. Canaan. 21ème colloque français des jeunes chercheurs – VLM, Paris le 14 février 2020.
2. Présentation orale : 22ème colloque français des jeunes chercheurs, 2021, Les Cyclophostines/Cyclipostins : de nouvelles perspectives d'applications thérapeutiques pour lutter contre la résistance inductible aux macrolides chez *Mycobacterium abscessus*. Le 5 mars 2021, en visioconférence.

3. Présentation poster : Les Cyclophostines/Cyclipostins : de nouvelles perspectives dans la lutte contre la résistance induite aux macrolides chez *Mycobacterium abscessus*. M. Sarrazin, C. D. Spilling, J-L. Herrmann, L. Kremer, J-F. Cavalier, S. Canaan. 22e colloque français des jeunes chercheurs – VLM, en visioconférence le 5 mars 2021.
4. Présentation orale : 23ème colloque français des jeunes chercheurs, 2022, Les Cyclipostins/Cyclophostines de nouvelles perspectives dans le traitement des infections à *Mycobacterium abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose. Le 15 février 2022, Paris.
5. Présentation poster : Synthesis and antimycobacterial activity of Fluorescent Labeled Affinity Probes Based on Monocylic Phosphonate and Phosphate Analogs of the Cyclipostins and Cyclophostins. Romain Avellan, Morgane Sarrazin, B.P. Martin, G.R. Gnawali, H. Le Guenno, C. Crauste, T. Durand, S. Audebert, L. Camoin, C.D. Spilling, S. Canaan, J-F. Cavalier. Mycodays, 20-22 juin 2022, Lyon.
6. Présentation poster : Les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins : des molécules aux multiples facettes pour lutter contre les infections à *Mycobacterium abscessus*. Morgane Sarrazin, C. D. Spilling, J-L. Herrmann, L. Kremer, J-F. Cavalier et S. Canaan. Microbes, 3-5 octobre 2022, Montpellier.
7. Présentation orale : 24ème colloque français des jeunes chercheurs, 2023, Les Cyclipostins/Cyclophostines de nouvelles perspectives dans le traitement des infections à *Mycobacterium abscessus*. Le 7 février 2023, Paris.

Résumé

Mycobacterium abscessus est un pathogène provoquant des infections pulmonaires sévères, en particulier chez des individus ayant des pathologies sous-jacentes comme la mucoviscidose ou la bronchopneumopathie chronique obstructive. Un des aspects préoccupant du traitement de *M. abscessus* repose sur la résistance extrême de la bactérie à la plupart des antibiotiques conventionnels, y compris tous les antituberculeux de première intention. En outre, une exposition prolongée aux macrolides, antibiotiques centraux utilisés dans la polythérapie actuelle, peut induire l'apparition d'une résistance médiée par la protéine Erm(41), limitant ainsi leur spectre d'action et conduisant à un échec thérapeutique. Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est axé sur les applications potentielles d'une famille de composés, les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins (CyC) présentant des propriétés anti-mycobactériennes, pour le traitement de ces infections. Leur mécanisme d'action, leur absence de cytotoxicité et leur effet multi-cible sont des atouts majeurs qui pourraient offrir de nouvelles opportunités thérapeutiques. Nous avons découvert que les CyC marquaient spécifiquement les mycobactéries et que cette caractéristique intéressante pourrait être exploitée pour développer de nouveaux outils de diagnostic. Également, j'ai pu identifier et valider Erm(41) comme étant une des cibles des CyC et montrer que l'inhibition de cette cible permettait de restaurer efficacement la susceptibilité aux macrolides. Les conclusions de ma thèse ont finalement permis de montrer que les CyC sont des composés de choix particulièrement attractifs dans le cadre d'une chimiothérapie anti-*M. abscessus*.

Mots clés : *M. abscessus*, macrolides, résistance, alternatives thérapeutiques, mucoviscidose

Abstract

Mycobacterium abscessus is a pathogen causing severe pulmonary infections, particularly in individuals with underlying pathologies such as cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease. A worrying aspect of *M. abscessus* treatment is the extreme resistance of this bacterium to most conventional antibiotics, including all first-line anti-tuberculosis drugs. Furthermore, prolonged exposure to macrolides, the central antibiotics used in current polytherapy, can induce the development of Erm(41)-mediated resistance, limiting their spectrum of action and leading to therapeutic failure. In this context, my thesis work focused on the potential applications of a family of compounds, Cyclophostins and Cyclipostins (CyC) analogs with anti-mycobacterial properties, for the treatment of these infections. Their mechanism of action, lack of cytotoxicity and multi-target effect are major assets that could open up new therapeutic opportunities. We discovered that CyCs specifically tagged mycobacteria, an interesting feature which could be exploited to develop new diagnostic tools. I was able to identify and validate Erm(41) as one of the CyC targets, and show that inhibition of this target effectively restored susceptibility to macrolides. The conclusions of my thesis have finally shown that CyCs are particularly attractive compounds of choice in the context of anti-*M. abscessus* chemotherapy.

Keywords: *M. abscessus*, macrolides, resistance, therapeutic alternatives, cystic fibrosis

Remerciements

Une thèse est avant tout une expérience humaine, je voudrais adresser ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à tout ce travail et pour leur soutien durant ces années. Ce travail est le fruit de rencontres, collaborations et discussions avec des personnes de divers horizons et c'est avec fierté que je vous présente ce manuscrit qui regroupe la majorité de mes travaux de recherche.

Mes remerciements vont en premier lieu à mon directeur de thèse, Stéphane Canaan. Je tiens à lui dire merci de m'avoir donné la possibilité de mener à bien ce travail, pour m'avoir accompagnée tout au long de ces années et pour sa confiance inébranlable dans tous les projets confiés et présentés dans ce manuscrit.

Je souhaiterais également remercier les membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux. Je remercie Geneviève Héry-Arnaud et Franck Biet de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail en tant que rapporteur, ainsi que Priscille Brodin, Julien Buyck, et Sophie Bleves d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Mes remerciements sont également adressés à Jean-Louis Herrmann, pour avoir accepté de participer à mon jury. Je tiens à le remercier pour sa contribution scientifique majeure dans ce projet et pour ses conseils avisés.

Évidemment, tout ceci n'aurait pas été réalisable sans le soutien indéfectible de la LBP team ! Je les remercie pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur quotidienne, leur humour inimitable et leur gentillesse qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse.

Merci à Jean-François Cavalier pour sa disponibilité, son aide précieuse que ce soit au niveau technique ou scientifique, évidemment pour toute sa contribution dans ce travail et en particulier pour sa grande implication dans les publications. Je garderai en mémoire la délectation chaque matin d'un très bon café soufflé unique au monde.

Je tiens à exprimer toute ma profonde reconnaissance à Pierre Santucci pour tout ce qu'il m'a apporté. Merci pour sa disponibilité sans faille même outre-Manche, pour toutes ces discussions scientifiques, ses nombreux conseils et ses idées complémentaires. J'ai pu découvrir un super collègue avec qui j'ai tant appris sur le plan scientifique et qui m'a permis de développer mon esprit critique. Merci aussi pour tous ces moments informels de rigolade et de fou rire au labo ou sur le chemin de la maison. Et vive les Mr. Freeze !

Assurément, ces années n'auraient pas été les mêmes sans notre duo mythique mesdames Isabelle Poncin et Vanessa Point. Je les remercie de m'avoir accompagné et aidé depuis mes débuts. J'ai pu rencontrer des personnes formidables qui sont un véritable soutien pour les étudiants de l'équipe. Merci également pour tous les bons moments que l'on a pu partager ensemble, les fous rires, les sorties culinaires, il y en a tellement qu'il serait long de tous les citer.

Et bien entendu, je souhaiterais remercier Tonia sans laquelle la vie dans le bureau n'aurait pas été la même. Merci pour ton soutien, les nombreuses discussions plus ou moins sérieuses, nos expéditions, les découvertes gustatives, et surtout d'avoir supporté mon humour durant ces années (mais pas plus de huit blagues par jour). Je garderai en mémoire tous les moments qu'on a pu passer au laboratoire ou même à l'extérieur. Je voudrais remercier aussi Léa pour sa bonne humeur quotidienne, son soutien, pour la multitude de blagues et de rigolades et à ces bons moments partagés. Merci au trio de choc Romain, Thomas et Emma pour ces nombreuses rigolades, leur humour unique et leur bonne humeur. Je voudrais aussi remercier les personnes qui ont rejoint récemment l'équipe Christine, Janis et Clémentine ; sans oublier les anciens Ivy, Siya, Inès, Graziella et Emma.

Je voudrais adresser un grand merci à Jean-Luc Mainardi, Jean-Michel Bolla, Bérengère Ize et Dukas Jurenas pour leur participation lors de mes comités de suivi individuel. Je les remercie pour leur bienveillance, leurs précieux conseils et leur soutien qui m'ont beaucoup apportée durant ces années. Je voudrais adresser une mention spéciale et toute ma gratitude à Bérengère qui a été une marraine en or. Merci de m'avoir épaulée toutes ces années, d'avoir été là dans les moments difficiles, d'avoir toujours trouvé les mots justes pour que je puisse rebondir et pour tes conseils avisés.

Durant ces années, j'ai pu rencontrer et interagir avec de nombreuses personnes. Je tiens à remercier toutes les personnes travaillant au LISM, les acteurs des plateformes et les membres de l'IMM. Un grand merci à tous les collaborateurs et en particulier à Laurent Kremer et Jean-Louis Herrmann qui ont étroitement participé à ce projet. Je voudrais également remercier l'association Vaincre la Mucoviscidose et l'association Grégory Lemarchal d'avoir soutenu ce projet et de m'avoir permis de participer aux rencontres annuelles patient-chercheur qui ont été une belle expérience humaine et très enrichissante.

Pour finir, je tiens à dire un grand merci aux amis, à ma famille et surtout à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix. Merci d'avoir toujours été là pour moi quels que soient les obstacles et fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Je souhaite dédier ce manuscrit à toutes les personnes qui me sont chères et en particulier à mon père, ma mère avec une mention spéciale pour mon grand-père qui je l'espère sera fier.

Sommaire

Abréviations

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **1**

Chapitre I : *Mycobacterium abscessus* **3**

I/ Le genre *Mycobacterium* 5

A) Généralités et caractéristiques 5
B) Classification 5
C) Les mycobactéries tuberculeuses 9
D) Les mycobactéries non tuberculeuses 9

II/ Généralités sur *Mycobacterium abscessus* 11

A) Le complexe *Mycobacterium abscessus* 11
B) Caractéristiques génomiques 13
C) Les morphotypes 15

III/ La paroi mycobactérienne et protéines membranaires 17

A) Paroi des Gram +/- 19
B) Structure de la paroi mycobactérienne 19
C) Les porines 25
D) Les pompes à efflux 29

IV/ Physiopathologie de *Mycobacterium abscessus* 39

A) Environnement pulmonaire 39
B) Infections pulmonaires 41
C) Infections extrapulmonaires 47

V/ Mucoviscidose et *Mycobacterium abscessus* 49

A) La mucoviscidose 49
B) Mucoviscidose et infections pulmonaires 53
C) Physiopathologie dans le contexte de la mucoviscidose 55

VI/ Diagnostic des infections pulmonaires à *Mycobacterium abscessus* 59

Chapitre II : Traitements et Antibiorésistances 65

I/ Antibiothérapie classique 67

A) Les β-lactamines 67
B) Les aminoglycosides 69
C) Les macrolides 69
D) Les tétracyclines 73
E) Les oxazolidinones 73
F) Les fluoroquinolones 75
G) Les phénazines 77

II/ Autres possibilités thérapeutiques 77

A) Les rifamycines 77
B) Les diarylquinolines 79
C) Association d'antibiotiques 81
D) Les mycobactériophages 85

III/ Mécanismes de résistance aux antibiotiques 87

A) Imperméabilité de l'enveloppe bactérienne 87
B) Polymorphisme génétique et mutations acquises 89
C) Export par les pompes à efflux 93
D) Modification/inactivation de l'antibiotique 99
E) Protection de la cible 107
F) Régulateurs transcriptionnels de la famille WhiB 117

Chapitre III : Les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins 123

I/ Découvertes des molécules naturelles 125

A) Les Cyclophostines 125
B) Les Cyclipostins 125

II/ Les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins 127

A) Synthèse des molécules analogues 127
B) Activité inhibitrice : enzymes de mammifères *vs* enzymes microbiennes 129
C) Mécanisme d'action 133

III/ Activité antibactérienne des analogues 135

IV/ Identification des cibles 139

Objectifs **143**

RÉSULTATS **145**

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES **169**

I/ Dynamique de pénétration des CyC chez *Mycobacterium abscessus* 171

II/ Implication des porines 173

III/ Implication des pompes à efflux 175

CONCLUSION & PERSPECTIVES **181**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **203**

Abréviations

AAC(2') : Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase
ABC : « ATP Binding Cassette »
ABPP : « Activity Based Protein Profiling »
AChE : Acétylcholinestérase
AG : Arabinogalactane
Ag85 : Antigène 85
AMK : Amikacine
AMP : Adénosine Monophosphate
ATP : Adénosine Triphosphate
ATS : « American Thoracic Society »
AZM : Azithromycine
BAAR : Bacille acido-alcoolo-résistant
BET : Bromure d'éthidium
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive
CC_{50} : Concentration en composé qui provoque 50% mortalité cellulaire
CCCP : Cyanure de carbonyle *m*-chlorophénylhydrazone
CFTR : « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator »
CI_{50} : Concentration inhibitrice médiane
CL : Cardiolipine
CLR : Clarithromycine
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CMI_{50} : Concentration minimale qui inhibe 50% de la croissance bactérienne
CoA : Coenzyme A
CTAB : Bromure de cétyltriméthylammonium
CyC : Analogues de Cyclophostines et Cyclipostins
DAT : Di-acyltréhalose
Eis : Enhanced in intracellular survival
ERDR : « Ethambutol Resistance Determining Region »
Erm : « Erythromycin resistance methylase »
ETZ : zone translucide aux électrons
FACS : « Fluorescence activated cell sorting »
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FDA : « Food and Drug Administration »
FIC : Concentration inhibitrice fractionnaire
FICI : Index de concentration inhibitrice fractionnaire
GC : Guanine et cytosine
GDND : « Glycosyl Diacetylated Nonadecyl Diol »
GFP : « Green Fluorescent Protein »
GPL : Glycopeptidolipides
HSL : Lipase hormono-sensible

IDSA : « Infectious Diseases Society of America »
kpb : kilo paire de bases
LAM : Lipoarabinomannane
LM : Lipomannane
LOS : Lipo-oligosaccharide
MABSC : Complexe *Mycobacterium abscessus*
MAC : Complexe *Mycobacterium avium*
MAM : « Macrolide-Arrest Motifs »
MATE : « Multidrug And Toxic compound Extrusion »
MC : Membrane cytoplasmique
MCL : Mycobactéries à croissance lente
MCR : Mycobactéries à croissance rapide
MFP : « Membrane Fusion-like Protein »
MFS : « Major Facilitator Superfamily »
MM : Mycomembrane
MmpL : « Mycobacterial Membrane Protein Large »
MmpS : « Mycobacterial Membrane Protein Small »
MNT : Mycobactéries non tuberculeuses
Mpb : Méga paire de bases
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NAG : N-acétylglucosamine
NAM : Acide N-acétylmuramique
NBD : « Nucleotide Binding Domain »
NBD_f : Nitrobenzoxadiazole
NDH-2 : NADH oxydoréductase de type II
NGM : N-glycolylmuramique
NLR : « NOD-like » récepteurs
NPET : « Nascent Peptide Exit Tunnel »
OMF : « Outer Membrane Fusion »
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PAT : Poly-acyltréhalose
PAβN : Phenylalanine-arginine β-naphthylamide
PDIM : Phtiocérol dimycocérosate
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Peptidoglycane
PGL : Glycolipides phénoliques
PGly : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PIM : Phosphatidylinositol mannoside
PKA : « Protein kinase A »
PLP : Protéines de liaison à la pénicilline
PRR : « Pattern recognition receptors »
QRDR : « Quinolone Resistance Determining Region »

R : « Rough »
RGM : « Rapidly-growing mycobacteria »
RND : Résistance Nodulation Division
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RT-qPCR : Reverse transcription et PCR quantitative
S : « Smooth »
SAH : S-adénosyl-L-homocystéine
SAM : S-adénosyl-L-méthionine
SL : Sulfolipide
SMR : « Small multiDrug Resistance »
TAT : Tri-acyltréhalose
TDM : Tréhalose dimycolate
TLR : « Toll-like » récepteurs
TMD : « Transmembrane Domain »
TMM : Tréhalose monomycolate
TNF : « Tumoral Necrosis Factor »
TPP : Tréhalose polyphléate
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
x_{150} **:** Excès molaire d'inhibiteur conduisant à 50% d'inhibition

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :

Mycobacterium abscessus

Mycobacterium abscessus fait partie du genre unique *Mycobacterium* qui regroupe un vaste panel d'organismes environnementaux et pathogènes. Cette mycobactérie est responsable d'un large éventail de pathologies allant de l'infection opportuniste aux infections sévères, en particulier, chez les individus ayant des pathologies sous-jacentes telles que la mucoviscidose, la bronchopneumopathie chronique obstructive, la pneumoconiose et bien d'autres. Décrite comme étant un « cauchemar pour les antibiotiques », cette bactérie est aujourd'hui considérée comme un pathogène émergent.

Au fil de son évolution, *M. abscessus* a acquis tous les éléments nécessaires pour sa vie environnementale, mais aussi pour sa survie dans un hôte. Toutes ses capacités d'adaptation en fait un organisme fascinant et laisse place à de nombreuses recherches au sein de la communauté scientifique. Aujourd'hui, il est primordial de mieux comprendre les mécanismes et facteurs qui régissent sa pathogénicité et sa virulence afin d'élaborer des stratégies de lutte efficace contre ce pathogène qui font actuellement défaut.

Dans ce premier chapitre, nous allons tout d'abord poser les bases de ce genre unique et des différents groupes qui le composent. Nous allons ensuite nous pencher sur les caractéristiques génétiques et phénotypiques de *M. abscessus* qui serviront à mieux comprendre son mécanisme d'infection. Enfin, nous finirons par la physiopathologie de *M. abscessus* dans le contexte de la mucoviscidose, pathologie où il peut causer des infections particulièrement sévères et chroniques.

Table 1 : Classification et liste non exhaustives des mycobactéries. Les mycobactéries peuvent être classées selon deux critères, leur appartenance ou non au complexe tuberculeux et leur vitesse de croissance. Adaptée de (Rastogi et al., 2001).

Croissance rapide	Croissance lente		
Mycobactéries non tuberculeuses		**Complexe tuberculeux**	***M. leprae***
M. abscessus *M. chelonae* *M. fortuitum* *M. smegmatis* *M. vaccae*	*M. marinum* *M. ulcerans* *M. avium* *M. kansasii* *M. simiae*	*M. tuberculosis* *M. africanum* *M. canettii* *M. bovis* *M. microti*	

I/ Le genre *Mycobacterium*

A) Généralités et caractéristiques

Les mycobactéries appartiennent au genre unique *Mycobacterium,* de la famille des *Mycobacteriaceae,* du phylum des *Actinobacteriaceae*. Le genre *Mycobacterium* fut introduit pour la première fois par Lehmann et Neumann en 1896 après la découverte du bacille de la tuberculose (Koch, 1882) et de la lèpre (Hansen, 1874) (Lehmann et al., 1896). Le préfixe myco- vient du grec *mukès*, signifiant champignon en raison de leur capacité à se développer en forme de moisissure à la surface des cultures (McCarter et al., 1935). Les mycobactéries se présentent comme des bacilles longs et fins légèrement incurvés d'environ 0,2 à 0,6 µm de large et d'1 à 10 µm de long. Les trois caractéristiques fondamentales et particulières de ce genre sont :

(i) l'acido-alcoolo-résistance des bacilles (BAAR), rendant la coloration de Gram inappropriée et dont la mise en évidence se fait par la coloration de Ziehl-Neelsen ;

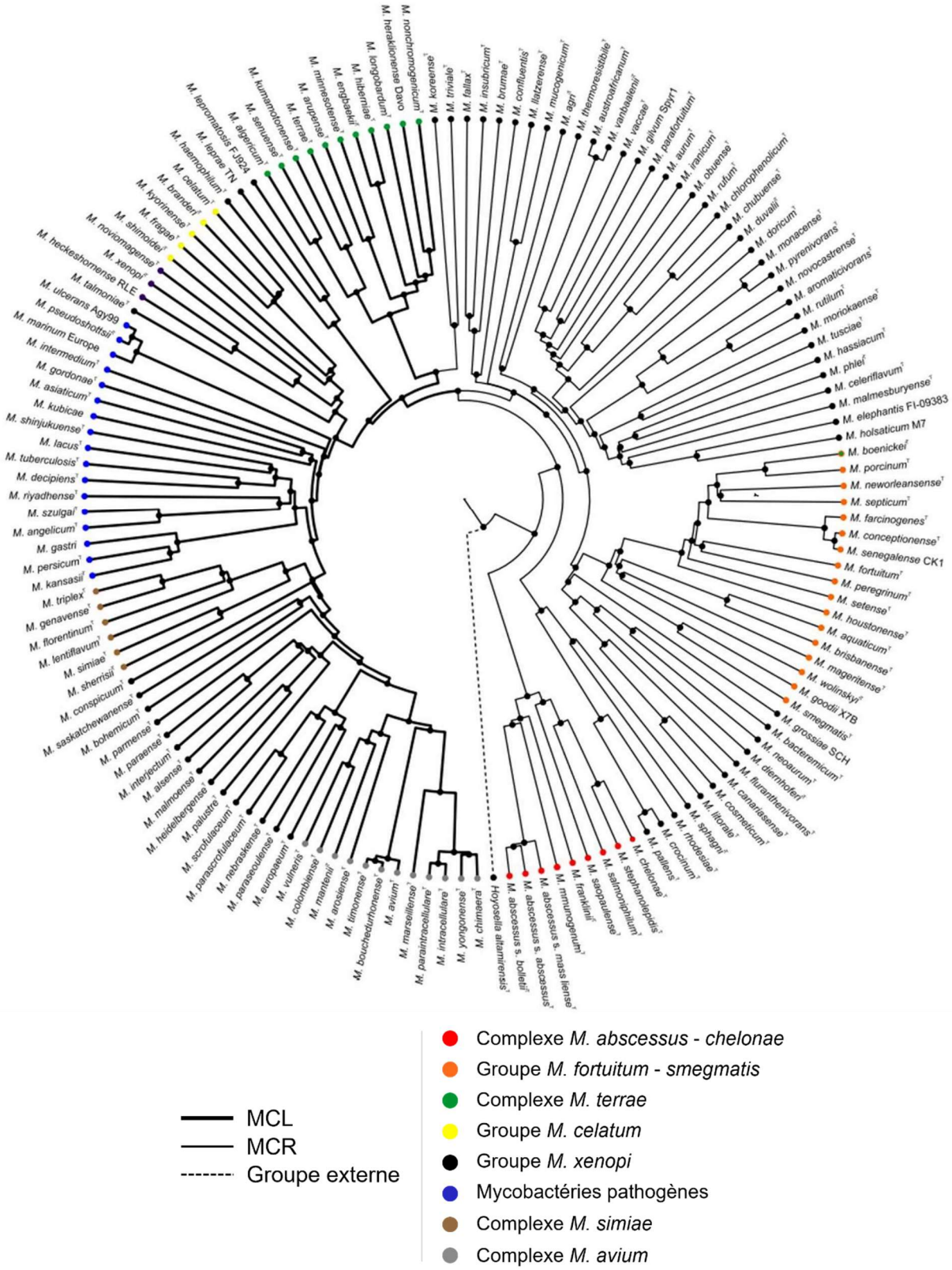
(ii) la présence d'acides mycoliques, constituants majeurs de la paroi avec des chaînes pouvant atteindre une longueur de 60 à 90 atomes de carbone ;

(iii) et un génome riche en guanine et cytosine (GC) allant jusqu'à 70 % pour certaines espèces (Shinnick et al., 1994).

Ces bactéries sont des microorganismes aérobies stricts bien qu'elles puissent survivre dans un environnement micro-aérophile. Ce sont des organismes saprophytes retrouvés dans diverses niches tels que l'eau, la terre et chez certains organismes supérieurs (Wolinsky et al., 1968 ; Collins et al., 1984). Non seulement ce genre regroupe une majorité d'espèces environnementales, mais également des espèces pathogènes strictes et opportunistes pour l'Homme et les animaux. Les pathogènes les plus connus sont *Mycobacterium tuberculosis,* l'agent responsable de la tuberculose, principale cause de mortalité due à un agent infectieux dans le monde, et *Mycobacterium leprae* responsable de la lèpre (OMS, 2023). Si historiquement la recherche s'est majoritairement axée sur l'étude de la tuberculose, l'émergence des infections aux mycobactéries dites « atypiques » cause un véritable problème de santé publique et font l'objet de nombreuses études (Johnson et al., 2014).

B) Classification

Le genre *Mycobacterium* compte environ 200 espèces qui peuvent être classées selon deux critères : leur vitesse de croissance et leur pathogénicité (**Table 1**).



<u>Figure 1 :</u> Arbre phylogénétique des mycobactéries basé sur l'analyse des génomes entiers. Abréviations : MCL, mycobactéries à croissance lente ; MCR, mycobactéries à croissance rapide. Adaptée de (Tortoli et al., 2017).

Historiquement, les mycobactéries ont été classées en fonction de leur appartenance ou non au complexe tuberculeux. Ainsi, on distingue deux groupes majeurs : les mycobactéries du complexe tuberculeux, qui regroupe des pathogènes stricts responsables de la tuberculose chez l'Homme ou l'animal, et les mycobactéries non tuberculeuses ou dites « atypiques » qui sont généralement des pathogènes opportunistes responsables le plus souvent d'infections pulmonaires et cutanées. Seule *M. leprae* est classée à part, car cette mycobactérie est incultivable *in vitro* et elle est génétiquement distincte de toutes les autres espèces de mycobactéries à cause de son génome réduit et de la présence de nombreux pseudogènes (Cole et al., 2001 ; Rastogi et al., 2001).

En 1959, Runyon propose une classification des mycobactéries en fonction de leur vitesse de croissance et de leur capacité à produire des pigments. Les mycobactéries à croissance lente (MCL), dont les colonies nécessitent plus de 7 jours voire quelques semaines pour apparaître sur milieu gélosé se distinguent des mycobactéries à croissance rapide (MCR), dont l'apparition des colonies nécessite moins de 7 jours. De plus, les MCL sont divisées en 3 groupes : les non-chromogènes qui ne présentent aucune pigmentation, les scotochromogènes qui développent une pigmentation dans l'obscurité et les photochromogènes qui deviennent pigmentées en présence d'une source lumineuse (Runyon, 1959).

Depuis quelques années, l'avancée des techniques de séquençage a contribué à l'évolution de la phylogénie mycobactérienne. En effet, l'étude sur des génomes entiers (**Figure 1**) et l'analyse de 6 gènes conservés (*hsp65, rpoB, smpB, sodA, tuf* et *tmRNA*) en plus du gène codant pour l'ARNr 16S ont permis de différencier les espèces proches et de pouvoir les classer (Mignard et al., 2008 ; Tortoli et al., 2017). Par ailleurs, Gupta *et al.* ont proposé une nouvelle classification en 2018, basée sur l'analyse des génomes entiers des mycobactéries, modifiant grandement le genre *Mycobacterium* et classe les mycobactéries en 5 nouveaux genres :

- **(i)** le genre *Mycobacterium* n'inclut que les membres du clade Tuberculosis-Simiae (par exemple : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*. *M. kansasii*, *M. leprae*…) ;
- **(ii)** *Mycobacteroides* correspondant au clade Abscessus-Chelonae (par exemple : *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. chelonae*,…) ;
- **(iii)** *Mycolicibacterium* qui regroupe le clade Fortuitum-Vaccae (par exemple : *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*,…) ;
- **(iv)** *Mycolicibacter* comprend le clade Terrae ;
- **(v)** et *Mycolicibacillus* qui inclut le clade Triviale (Gupta et al., 2018).

Cependant, cette nouvelle classification a fait l'objet d'un débat important dans la communauté scientifique et n'est pas encore utilisée par les cliniciens et les microbiologistes. Sans compter que plusieurs études ont récusé cette nomenclature et soutiennent la reconstitution du genre unique *Mycobacterium* (Tortoli et al., 2019 ; Armstrong et al., 2021 ; Meehan et al., 2021).

C) Les mycobactéries tuberculeuses

Les mycobactéries du complexe tuberculeux regroupent peu d'espèces génétiquement apparentées qui ont toutes la capacité commune de provoquer la tuberculose chez les mammifères. La tuberculose est une maladie infectieuse principalement pulmonaire (80 % des cas) même s'il existe d'autres formes dites extrapulmonaires ou disséminées (Loddenkemper et al., 2015). En 2022, elle est considérée comme une des principales causes de décès due à un seul agent infectieux dans le monde avec un taux de mortalité de 1,3 million et près de 10,6 millions de nouveaux cas ont été déclarés (OMS, 2023). L'espèce la plus connue est *M. tuberculosis,* découverte par Robert Koch en 1882, mais d'autres espèces telles que *Mycobacterium canettii* et *Mycobacterium africanum* sont toutes aussi capables d'infecter l'Homme. De surcroît, d'autres bactéries du complexe sont des pathogènes adaptés à certaines espèces animales et peuvent être également à l'origine de zoonoses humaines. C'est le cas de *Mycobacterium bovis* qui est capable d'infecter une multitude d'hôtes y compris l'Homme (Palmer et al., 2011).

D) Les mycobactéries non tuberculeuses

Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont des bactéries environnementales retrouvées généralement dans les milieux aquatiques (eaux courantes, cours d'eau, etc…) (Collins et al., 1984 ; Thomson et al., 2013), mais aussi dans le sol (Falkinham, 2015). Les MNT comptent de nombreuses d'espèces qui regroupent à la fois des MCR et des MCL. Bien que la majorité soit des espèces non pathogènes, certaines sont capables d'induire des infections chez l'animal et peuvent déclencher des infections opportunistes chez l'Homme appelées mycobactérioses (Marsollier, 2019). Les mycobactérioses sont très diverses, mais les plus courantes sont les infections cutanées et les infections pulmonaires. D'autant plus que ces infections surviennent majoritairement chez des individus immunodéprimés, fragilisés ou à la suite d'une inoculation due à un traumatisme (Brown-Elliott et al., 2002a). Les infections cutanées peuvent survenir chez des sujets immunocompétents, mais nécessitent un point d'entrée comme une lésion cutanée.

Deux pathogènes majeurs peuvent provoquer ce type d'infection, il s'agit de *Mycobacterium marinum* et *Mycobacterium ulcerans*. *M. marinum* qui est responsable de la tuberculose chez le poisson peut causer des infections cutanées connues sous le nom de « granulome des aquariums » ou « granulome des piscines ». Quant à *M. ulcerans,* agent de l'ulcère de Buruli, il peut provoquer de vastes ulcérations cutanées des tissus sains (Walsh et al., 2011). Enfin, des mycobactérioses cutanées essentiellement dues aux MCR comme *M. abscessus, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum* peuvent survenir à la suite d'injections, d'interventions chirurgicales, changements corporels (piercing, tatouages) et traumatismes étendus (Marsollier, 2019).

Finalement, les infections pulmonaires surviennent chez des individus ayant des pathologies pulmonaires sous-jacentes et représentent entre 65 et 90 % des infections dues aux MNT (Porvaznik et al., 2017 ; Wani et al., 2020). De plus, dans la majorité des cas, les espèces responsables des infections pulmonaires dues aux MNT sont le complexe *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium kansasii*, le complexe *M. abscessus* (MABSC) et dans certaines régions *Mycobacterium xenopi*.

II/ Généralités sur *Mycobacterium abscessus*

A) Le complexe *Mycobacterium abscessus*

M. abscessus fut découverte en 1953 chez une patiente qui présentait une infection articulaire du genou gauche. La souche est appelée *M. abscessus* pour sa capacité à former des abcès sous-cutanés (Moore et al., 1953). Cette mycobactérie, présente dans le sol et l'eau, fait partie du groupe des MNT à croissance rapide. Sa classification a été modifiée au cours du temps suite à l'avancée des techniques de biologie moléculaire et au séquençage des génomes. Tout d'abord, par simple observation de ses caractères phénotypiques, elle fut rattachée à *M. chelonae* en tant que sous-espèce au sein du complexe *M. fortuitum* (Kubica et al., 1972). Puis, *M. abscessus* a été séparée de *M. chelonae* et élevée au rang d'espèce à part entière puisqu'elle ne partage que 35 % d'identité du génome entre elles (Kusunoki et al., 1992). Aujourd'hui, le MABSC contient trois sous-espèces composées de *M. abscessus* subsp *abscessus*, *M. abscessus* subsp *bolletii* et *M. abscessus* subsp *massiliense* (Tortoli et al., 2016). Ces pathogènes opportunistes ont la capacité de provoquer un grand nombre d'infection chez l'Homme comme des infections pulmonaires, cutanéo-muqueuses, osseuses ou encore d'atteintes disséminées (voir § **Chapitre I : IV/ Physiopathologie de *Mycobacterium abscessus***).

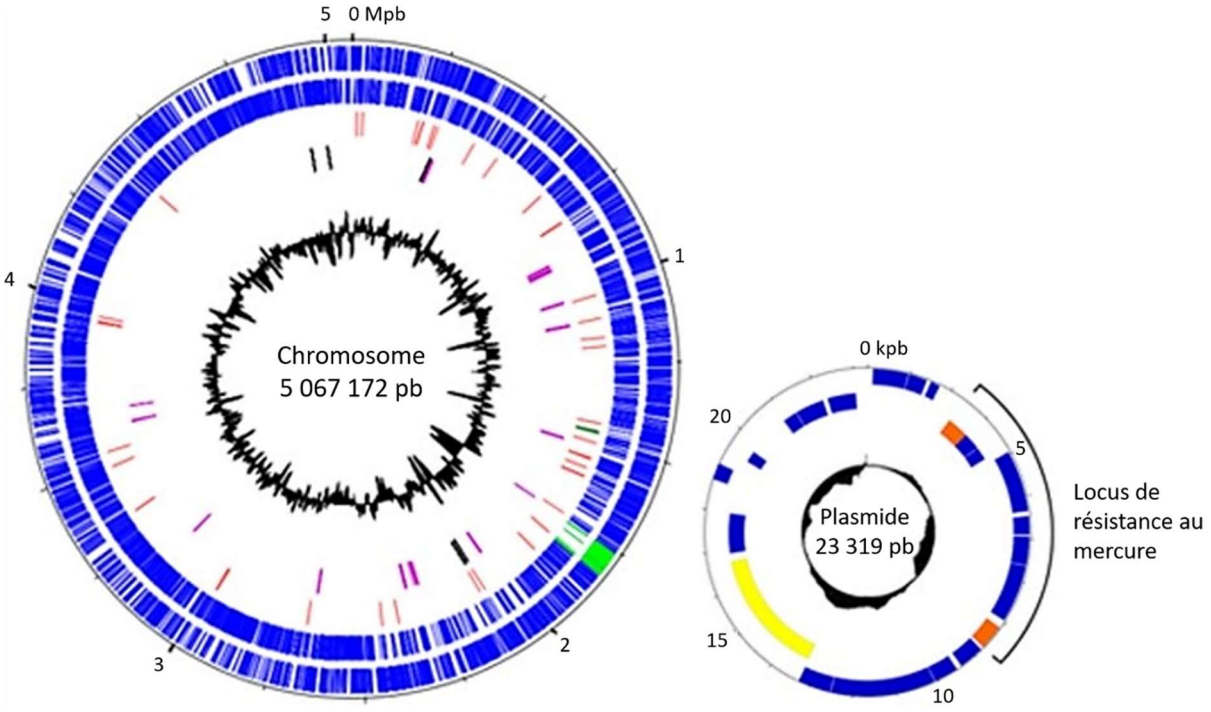


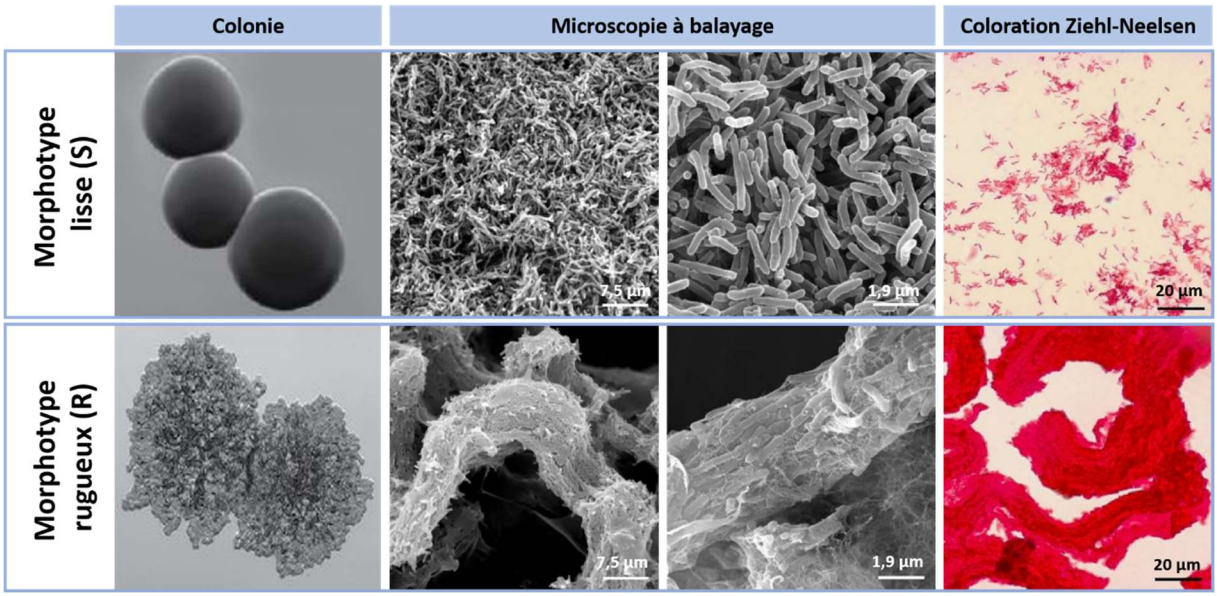
Figure 2 : Carte du génome de *M. abscessus* CIP104536T. À gauche, représentation circulaire du chromosome bactérien avec une échelle en méga paire de bases (Mpb). En se déplaçant de l'extérieur vers l'intérieur, les deux premiers cercles bleus indiquent les gènes mycobactériens. Les gènes d'origine phagique sont représentés en vert. Le troisième cercle représente les gènes codants pour les ARNt. Enfin, le dernier cercle montre les gènes acquis à partir d'organismes procaryotes non mycobactériens. À droite, représentation circulaire du plasmide de résistance au mercure avec une échelle en kilo paire de bases (kpb). L'annotation du plasmide est identique au chromosome. Les parties orange et jaune codent pour des recombinases spécifiques et des éléments nécessaires pour la conjugaison. Les cercles noirs au centre représentent le pourcentage en GC. Adaptée de (Ripoll et al., 2009).

Également, ils peuvent causer des infections pulmonaires, particulièrement sévères chez les individus ayant une pathologie sous-jacente, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose (Lerat I., 2011). Cette espèce mycobactérienne possède une polyrésistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques rendant les traitements difficiles et délicats (voir § **Chapitre II : Traitements et Antibiorésistances**). De plus, l'identification de la sous-espèce responsable de l'infection est essentielle pour permettre la mise en place d'un traitement efficace, car elles n'ont pas toutes les mêmes sensibilités aux antibiotiques (Benwill et al., 2014).

B) Caractéristiques génomiques

En 2009, le séquençage complet du génome de *M. abscessus* (CIP104536T) par Ripoll *et al.* a permis de compiler une multitude d'informations génétiques sur son mode de vie, sa pathogénicité et sa résistance aux molécules antimicrobiennes. Toutes ces informations permettront à terme de mieux caractériser ce pathogène et de mieux comprendre notamment comment il est capable de mettre en place différentes voies métaboliques lui permettant de s'adapter à son environnement. En tout premier lieu, le génome est constitué d'un chromosome circulaire d'une taille d'environ 5 méga paire de bases (Mpb), avec une teneur en GC de 64 %, contenant la séquence d'un prophage complet de 81 kpb (**Figure 2**) (Ripoll et al., 2009). D'autre part, la taille de son génome est plus grande que celle du génome de *M. tuberculosis* (4,4 Mpb) mais beaucoup plus petite que les génomes de *M. smegmatis* (6,9 Mpb) et *M. marinum* (6,6 Mpb). Le chromosome comprend 4 920 séquences codantes prédites dont une partie est retrouvée généralement chez les bactéries environnementales et l'autre typique des bactéries pathogènes (Ripoll et al., 2009). Ceci reflète du mode de vie à la fois environnemental et pathogène de *M. abscessus*.

Finalement, cette mycobactérie possède dans son génome tout un arsenal de gènes codants pour des protéines impliquées dans sa virulence qui participent à divers processus tels que l'invasion, la colonisation de l'hôte, l'activation, l'échappement au système immunitaire et à la survie intracellulaire (Choo et al., 2014). Tandis que certains gènes de virulence sont spécifiques des mycobactéries, d'autres sont présents chez d'autres agents pathogènes infectant les patients atteints de mucoviscidose tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia,* et ont été certainement acquis par transfert horizontal (Ripoll et al., 2009 ; Medjahed et al., 2010). S'ajoute à cela, un grand nombre de gènes de résistance aux antibiotiques rendant la bactérie résistante à un large spectre de composés antimicrobiens (voir § **Chapitre II : III/ Mécanismes de résistance aux antibiotiques**).



<u>Figure 3 :</u> Caractéristiques des deux morphotypes de *M. abscessus.* Observation macroscopique et microscopique des deux morphotypes. Le variant S forme des colonies lisses alors que le variant R forme des colonies rugueuses. Contrairement à la forme S, la forme R est capable de former des cordes que l'on peut observer par microscopie à balayage (panneau central) et par la coloration de Ziehl-Neelsen (panneau de droite). Adaptée de (Sanchez-Chardi et al., 2011 ; Johansen et al., 2020a).

M. abscessus possède aussi un plasmide de 23 kpb qui contient un locus de résistance au mercure. Ce locus contient des gènes qui codent pour le transport des ions Hg^{2+} et leur réduction en Hg pour leur diffusion vers l'extérieur du cytoplasme. Il est également retrouvé chez *M. marinum* suggérant que ces deux espèces ont partagé le même écosystème (Schue et al., 2009). La présence de cette résistance au mercure chez *M. abscessus* lui confère une grande résistance aux composés mercuriels qui peuvent être utilisés comme désinfectants et antiseptiques dans les hôpitaux, ce qui peut compliquer la désinfection du matériel chirurgical et augmenter le risque de provoquer des maladies nosocomiales (Barkay et al., 2003).

En fin de compte, *M. abscessus* possède dans son génome tout un arsenal qui lui permet à la fois d'infecter un hôte, d'y survivre, de le coloniser et de résister au stress environnant. En définitive, toutes ses capacités d'adaptation à son environnement font de cette mycobactérie un pathogène vraiment redoutable et potentiellement difficile à éradiquer.

C) Les morphotypes

M. abscessus présente deux morphotypes facilement identifiables par simple observation des colonies sur milieu gélosé (**Figure 3**). D'ailleurs, cette caractéristique est partagée par toutes les sous-espèces du complexe et par d'autres MNT tels que *M. avium* et *M. kansasii* (Belisle et al., 1989 ; Prinzis et al., 1994). Le morphotype lisse ou « Smooth » (S) forme des colonies lisses et le morphotype rugueux ou « Rough » (R) formes des colonies rugueuses qui semblent déshydratées, organisées en serpentine à leur périphérie. Chacun présente des propriétés phénotypiques et physiopathologiques qui lui sont propres. En effet, le variant S possède une motilité par glissement à la surface d'une boîte de pétri et il est capable de former des biofilms qui correspondent à une communauté multicellulaire adhérant entre eux et à une surface grâce à la synthèse d'une matrice extracellulaire (Howard et al., 2006).

À l'inverse le variant R, non motile, est capable de former des cordes définies comme une agrégation tridimensionnelle de multiples chaînettes parallèles de bacilles agencés bout à bout et incapables de se séparer après réplication (**Figure 3**) (Bernut et al., 2014b). Contrairement au biofilm, le « cording » mycobactérien ne présente pas de matrice extracellulaire. Le variant R est également capable de former des biofilms de même densité que le variant S, mais avec un aspect plus cireux. La formation de biofilm confère aux deux variants une plus grande tolérance au stress environnant et aux composés antimicrobiens (Clary et al., 2018).

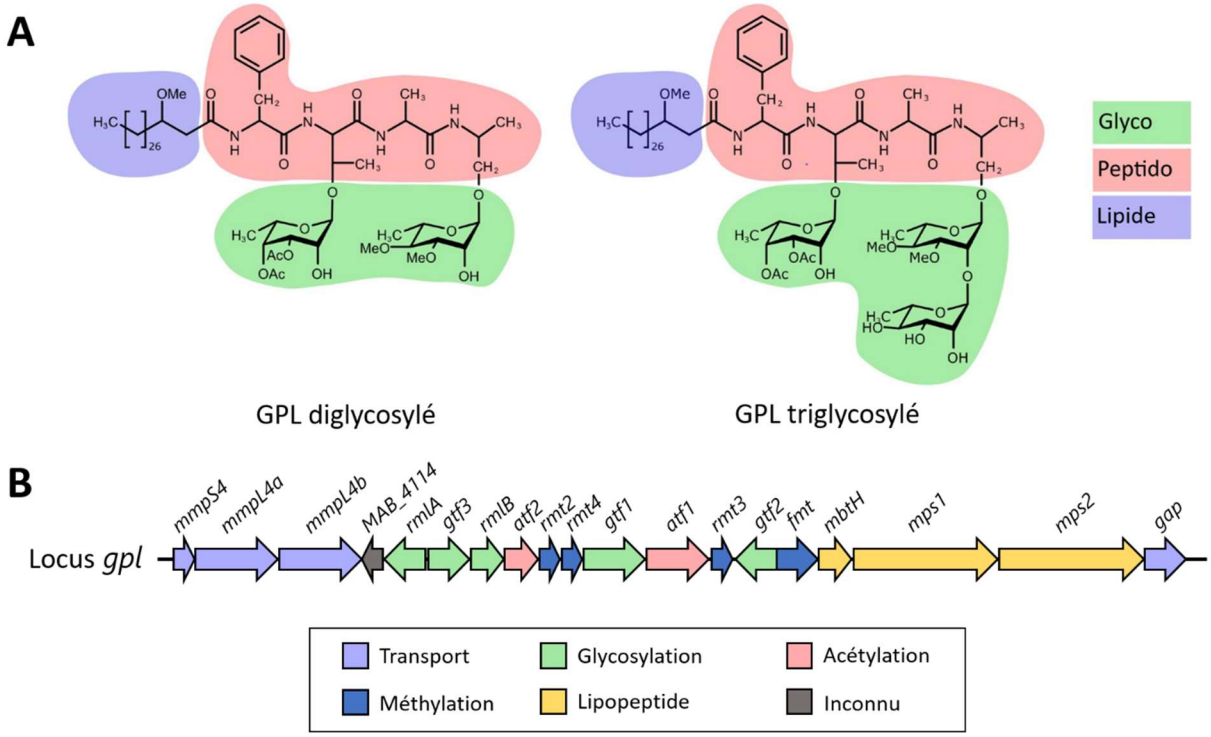


Figure 4 : Les glycopeptidolipides (GPL) chez *M. abscessus*. (A) Structure des GPL produit par *M. abscessus.* Ces molécules sont composées d'une partie glucidique (vert), peptidique (rose) et lipidique (violet). **(B)** Organisation génomique du locus *gpl* qui comprend les gènes de synthèse et de transport de ces molécules. Les flèches indiquent l'orientation de la transcription des gènes. Adaptée de (Gutierrez et al., 2018).

La différence entre les deux morphotypes est caractérisée par la présence de glycopeptidolipides (GPL) dans la mycomembrane chez le variant S, qui se trouve absent chez le variant R (Howard et al., 2006). Cette molécule comprend une partie lipidique constituée d'acides gras d'une longueur de chaîne de 28 à 30 atomes de carbone reliée à une partie tripeptide-amino-alcool généralement composée de D-phénylalanine-D-*allo*-thréonine-D-alanine-L-alaninol (**Figure 4A**) (Schorey et al., 2008). La partie peptidique peut être triglycosylée ou diglycosylée selon les espèces (Gutierrez et al., 2018). La comparaison des génomes et transcriptomes a permis de montrer que l'absence de GPL chez le morphotype R est due à la présence de lésions génétiques au niveau du locus *gpl* regroupant des gènes de synthèse et de transport de ces lipides (**Figure 4B**) (Pawlik et al., 2013).

La transition du morphotype S en R s'accompagne d'insertions ou de délétions et de polymorphismes d'un seul nucléotide au niveau du cluster *mps1-mps2-gap* et *mmpS4-mmpL4a-mmpL4b*. Les gènes *mps1* et *mps2* qui codent pour des peptides synthétases, sont impliqués dans l'assemblage du fragment tripeptide-aminoalcool du GPL (Billman-Jacobe et al., 1999 ; Gutierrez et al., 2018) et le gène *gap* est lui nécessaire au transport des GPL à la surface cellulaire (Sonden et al., 2005). Quant aux gènes *mmpL4a*, *mmpL4b* et *mmpS4*, ils sont impliqués dans le transport des GPL (voir § **Chapitre I : III/ D) *iv.* Les transporteurs RND**) (Park et al., 2015a). De plus, dans le cas d'un transport non fonctionnel, la mutation d'un seul résidu tyrosine dans le transporteur MmpL4a suffit à empêcher le passage des GPL et conduit à une formation accrue de cordes (Bernut et al., 2016). Ainsi, la présence ou non de ces lipides va définir les caractéristiques du morphotype comme la mobilité, la capacité à former des biofilms et la capacité à former des cordes. Tous ces traits phénotypiques vont alors avoir un impact sur la virulence et la réponse du système immunitaire lors de l'infection (voir § **Chapitre I : IV/ Physiopathologie de *Mycobacterium abscessus***).

III/ La paroi mycobactérienne et protéines membranaires

L'enveloppe bactérienne joue un rôle essentiel pour la physiologie de la bactérie. Elle contribue à la forme bactérienne, à la résistance mécanique cellulaire, la virulence et de nombreux processus biologiques se déroulent dans ce compartiment cellulaire. Une des caractéristiques des mycobactéries est leur paroi particulière et unique, extrêmement riche en lipides complexes, qui représente jusqu'à 60 % du poids sec bactérien. L'enveloppe mycobactérienne est caractérisée par son organisation en multicouches pluri-moléculaires jouant le rôle de barrière hydrophobe épaisse et très imperméable qui leur confère une grande résistance à leur environnement.

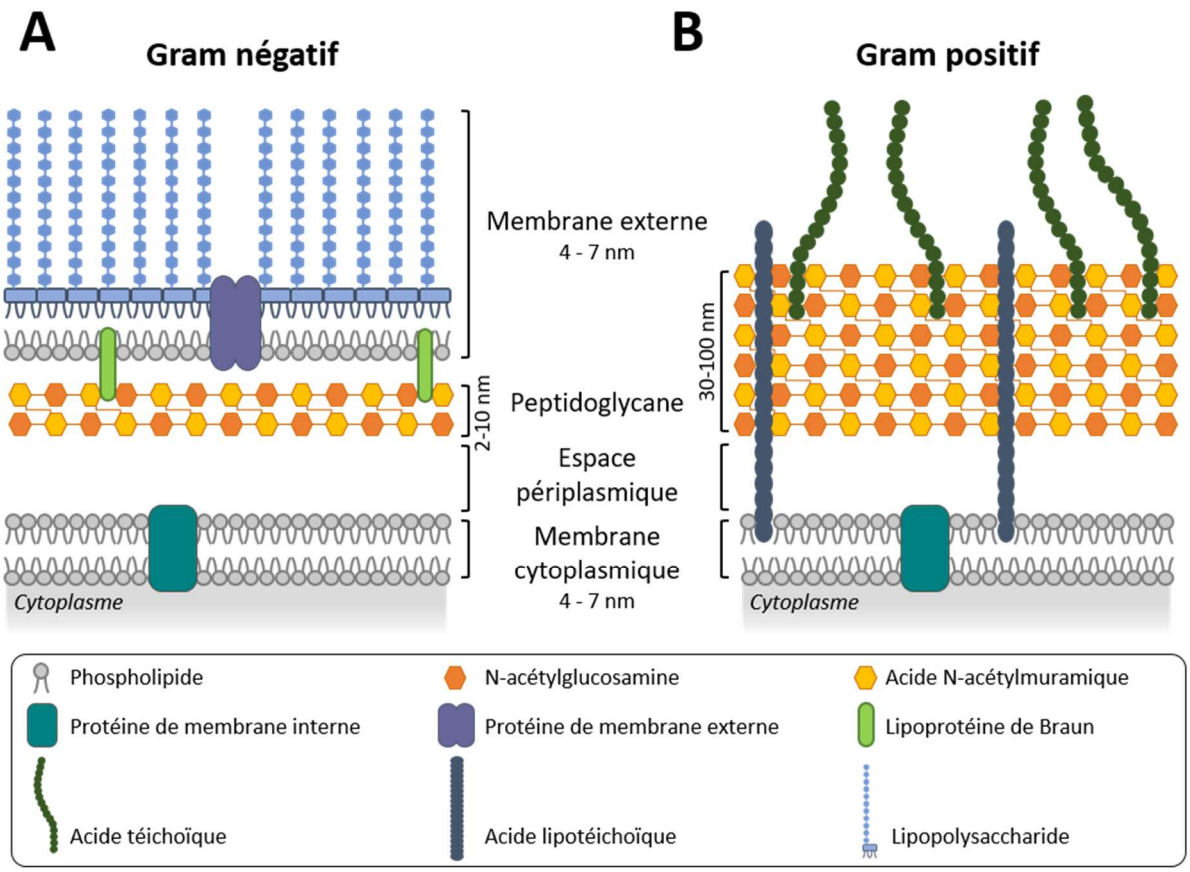


Figure 5 : Représentation schématique de la paroi bactérienne. Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif **(A)** et à Gram positif **(B)**. Adaptée de (Silhavy et al., 2010).

A) Paroi des Gram +/-

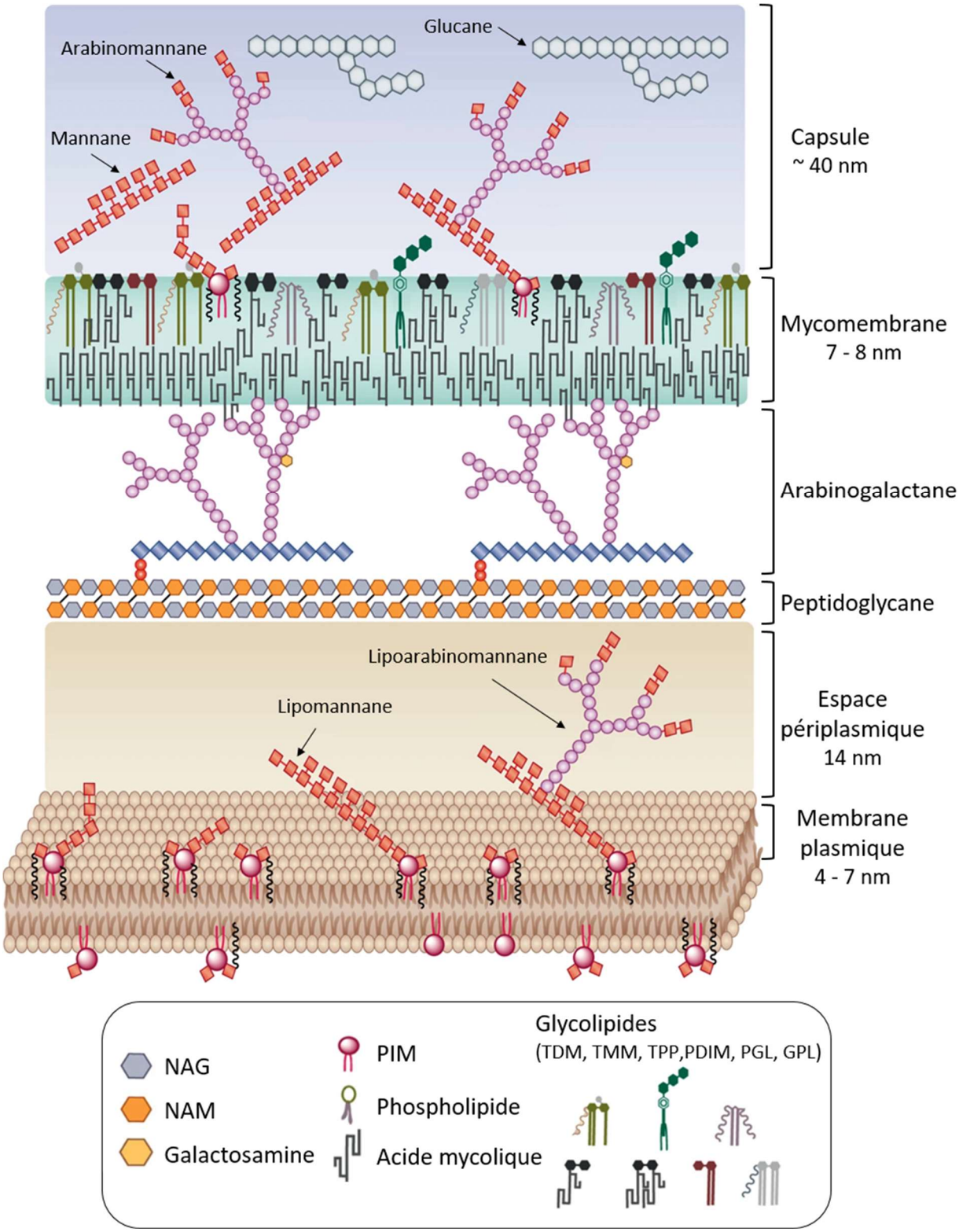
La coloration de Gram a permis de classer presque toutes les bactéries en deux groupes en fonction des caractéristiques de la paroi cellulaire. Ainsi, on distingue les bactéries à Gram positif, de couleur violette, des bactéries à Gram négatif qui apparaissent en rose.

Chez les bactéries à Gram négatif, l'enveloppe est structurée en 3 parties comprenant la membrane plasmique, le peptidoglycane et la membrane externe, caractéristique distinctive de ce groupe (**Figure 5A**). La membrane interne est une bicouche de phospholipides, majoritairement constituée de phosphatidyléthanolamine (PE) et de phosphatidylglycérol (PGly) (Silhavy et al., 2010). Le peptidoglycane (PG), ou encore appelé muréine, est un polymère constitué d'une alternance de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM), relié entre eux par une liaison osidique β 1-4. Les polymères sont assemblés par de courts peptides nommés pont peptidique au niveau du NAM (Vollmer et al., 2008). La membrane externe est une bicouche lipidique constituée d'un feuillet interne et d'un feuillet externe. Le feuillet interne contient des phospholipides alors que le feuillet externe contient des glycolipides avec principalement des lipopolysaccharides (Silhavy et al., 2010). Les lipoprotéines de Braun ou encore appelées « murein lipoprotein » permettent de relier la membrane externe au PG et de maintenir l'intégrité structurelle de la paroi. L'extrémité N-terminal est ancrée à la membrane externe et l'extrémité C-terminal est rattachée au PG via une liaison covalente à la chaîne peptidique du PG (Braun et al., 1970 ; Braun et al., 1973).

Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi constituée d'une membrane plasmique et de peptidoglycane, mais n'ont pas de membrane externe, contrairement aux bactéries à Gram négatif (**Figure 5B**). Chez ces bactéries, la couche de peptidoglycane est très épaisse, de 30 à 100 nm, traversée perpendiculairement par les acides téichoïques. Il existe deux types d'acides téichoïques, les acides téichoïques couplés au peptidoglycane et les acides lipotéichoïques ancrés eux dans la membrane plasmique (Silhavy et al., 2010).

B) Structure de la paroi mycobactérienne

La coloration de Gram fait apparaître les mycobactéries en violette, mais leur acido-alcoolo-résistance rend la coloration de Gram inappropriée. La structure de l'enveloppe mycobactérienne est unique en son genre dans le monde bactérien et diffère de la structure des Gram positif et négatif (Daffe et al., 2019).



<u>Figure 6 :</u> Représentation schématique de la paroi mycobactérienne. Abréviations : NAG, N-acétylglucosamine ; NAM, N-acétylmuramique ; PIM, phosphatidylinositol mannosides ; TMM, tréhalose monomycolate ; TDM, tréhalose dimycolate ; TPP, tréhalose polyphléates ; PDIM, dimycocérosates de phtiocérol ; PGL, glycolipides phénoliques ; GPL, glycopeptidolipide. Adaptée de (Angala et al., 2018).

Elle est structurée en plusieurs couches et comprend 5 parties : la membrane plasmique, l'espace périplasmique, le complexe peptidoglycane-arabinogalactane, la mycomembrane et la capsule, présente chez certaines espèces (**Figure 6**). La structure de la paroi reste identique chez les différentes espèces, mais avec des différences dans leur composition lipidique.

i. La membrane plasmique

La membrane plasmique est une bicouche composée majoritairement de glycérophospholipides tels que la PE, le PGly, la cardiolipine (CL), et le phosphatidylinositol (PI) (Chiaradia et al., 2017). La partie hydrophobe des phospholipides est composée d'acides gras saturés, insaturés ou ramifiés mono-méthylés, généralement d'une longueur de moins de 20 atomes de carbone (Daffe et al., 2019). On retrouve majoritairement de l'acide palmitique ($C_{16:0}$), de l'acide stéarique ($C_{18:0}$), de l'acide oléique ($C_{18:1}$) et de l'acide tuberculostéarique (ou L-méthyl-10 stéarique ; C_{19r0}). La membrane plasmique contient également des phosphatidylinositol mannosides (PIM), différentes formes mannosylées du PI, retrouvés uniquement chez des espèces du phylum des *Actinobacteriaceae* (Brennan et al., 1995). Il existe différents types de PIMs (de PIM_2 à PIM_6) caractérisés en fonction du nombre de mannoses ramifiés (**Figure 7**). D'autre part, ils peuvent être présents sous différentes formes acylées au niveau des radicaux $R_{1\text{-}4}$ et participent activement dans la réponse immunitaire de l'hôte (Gilleron et al., 2001 ; Gilleron et al., 2003 ; Gilleron et al., 2016). Les PIM sont également des précurseurs de lipoglycanes plus complexe comme le lipomannane (LM), qui possèdent de longues chaînes de mannose ramifiées rattachées au PIM, et le lipoarabinomannane (LAM), qui ont des chaînes d'arabinose ramifiées supplémentaires, coiffées de résidus de mannose, attachées à la base du LM (Guerin et al., 2010). Toutes ces molécules sont essentielles pour maintenir l'intégrité de la paroi cellulaire dont certaines peuvent s'étendre jusqu'à la surface de la cellule et peuvent intervenir dans l'interaction hôte pathogène (Pitarque et al., 2008 ; Guerin et al., 2010 ; Fukuda et al., 2013).

ii. Peptidoglycane-Arabinogalactane

Ensuite, vient la structure peptidoglycane-arabinogalactane avec l'espace périplasmique, lieu de nombreux échanges, qui le sépare de la membrane plasmique. Cette structure est constituée d'une couche de PG reliée de façon covalente à l'arabinogalactane (AG) lui-même estérifié d'acides mycoliques (Petit et al., 1969).

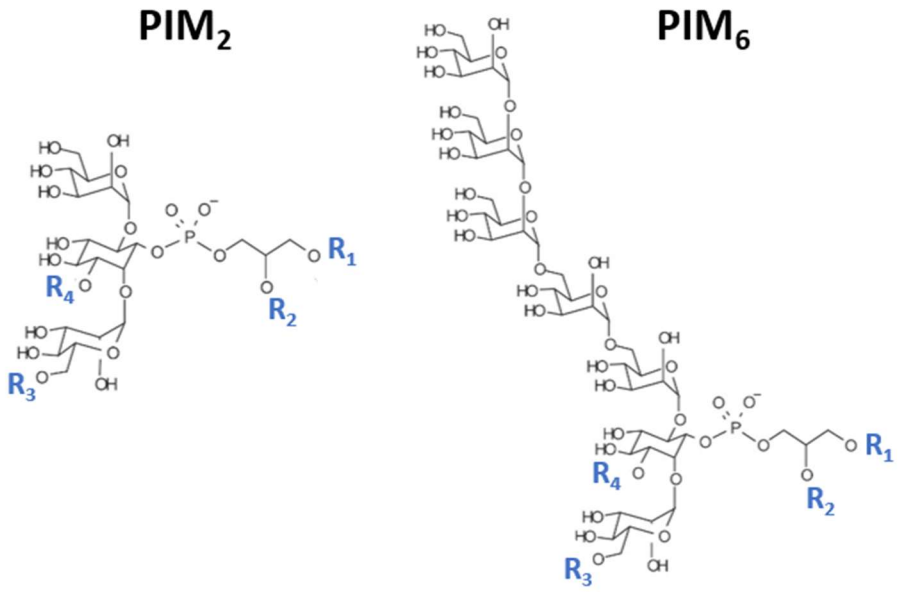


Figure 7 : Structure des PIM mycobactériens. Structure chimique du PIM_2 (à gauche) et du PIM_6 (à droite). Les sites d'acylation sont indiqués par R_1 à R_4. Adaptée de (Gilleron et al., 2016).

Table 2 : Récapitulatif des principaux lipides de la mycomembrane présents chez trois espèces mycobactériennes : *M. tuberculosis stricto sensu*, *M. smegmatis* et *M. abscessus*. Abréviations : TMM, tréhalose monomycolate ; TDM, tréhalose dimycolate ; TPP, tréhalose polyphléates ; PIM, phosphatidylinositol mannoside ; LM, lipomannane ; LAM, lipoarabinomannane ; PDIM, dimycocérosates de phtiocérol ; PGL, glycolipide phénolique ; SL, sulfolipide ; GPL, glycopeptidolipide ; LOS, lipo-oligosaccharide. Adaptée de (Daffe et al., 1991 ; Brennan et al., 1995 ; Etienne et al., 2009 ; Jackson, 2014 ; Dubois et al., 2018).

	M. tuberculosis	*M. smegmatis*	*M. abscessus*
TMM	+	+	+
TDM	+	+	+
TPP	-	+	+
PIM	+	+	+
LM	+	+	+
LAM	+	+	+
PDIM	+	-	-
PGL/SL	+	-	-
GPL	-	+	S+/R-
LOS	-	+	-

Le PG chez le genre *Mycobacterium* diffère légèrement de celui des autres bactéries puisqu'il est composé de NAG et de NAM ou de N-glycolylmuramique (NGM) relié par des liaisons osidiques de type β 1-4 (Petit et al., 1969 ; Mahapatra et al., 2005). Il est impliqué dans le maintien de la forme cellulaire et protège la membrane plasmique contre la pression osmotique du cytoplasme. L'AG est une macromolécule constituée de galactose et d'arabinose qui est lié au PG via des ponts oligosaccharidiques entre les chaînes galactanes et les acides muramiques (McNeil et al., 1990). Tout comme le PG, il participe à la rigidité de la paroi mycobactérienne, mais également sert d'ancrage pour les acides mycoliques de la mycomembrane.

iii. La mycomembrane

De façon générale, la mycomembrane (MM) est une bicouche d'une épaisseur d'environ 7 à 8 nm contenant des lipides, glycolipides et des protéines dont la composition peut varier selon les espèces (**Table 2**). Elle est composée d'un feuillet interne constitué d'acides mycoliques, des acides gras à très longue chaîne de 30 à 90 atomes de carbone, liés de manière covalente à l'AG (Zuber et al., 2008). Le feuillet externe est lui composé aussi d'acides mycoliques intercalés de divers lipides et glycolipides. Ce feuillet possède majoritairement des mycolates de tréhalose tels que du tréhalose monomycolate (TMM) et du tréhalose dimycolate (TDM) mais peut contenir également du dimycocérosates de phtiocérol (PDIM), des glycolipides phénoliques (PGL), du lipo-oligosaccharide (LOS), des PIM, du LM, du LAM, et des GPL (Jackson, 2014 ; Chiaradia et al., 2017). De plus, il existe d'autres lipides de la MM présents chez *M. tuberculosis* tels que les di-acyltréhaloses (DAT), les poly-acyltréhaloses (PAT), les tri-acyltréhaloses (TAT) et les sulfolipides (SL) (Jackson, 2014). Les lipides de la MM, extrêmement variés, interviennent dans la fluidité et la perméabilité de l'enveloppe mycobactérienne à l'origine de la résistance intrinsèque à l'environnement (pH, température, hydratation, dessiccation, etc…) et à certains composés antimicrobiens (voir § **Chapitre II : III/ A) Imperméabilité de l'enveloppe bactérienne**) (Liu et al., 1996a). D'autant plus que divers constituants de la MM participent à la pathogénicité comme le TDM qui est nécessaire pour le blocage de la fusion phagosome-lysosome et ainsi permettre la croissance dans le macrophage (Dulberger et al., 2020). Également, le TDM, aussi appelé « *Cord factor* », favorise la formation d'agrégats et la survie intracellulaire. Les PDIM et le PGL jouent un rôle important dans la pathogenèse mycobactérienne. Ils sont notamment impliqués dans le processus de rupture phagosomale, mais aussi dans la perméabilité de l'enveloppe (Yu et al., 2012 ; Quigley et al., 2017 ; Osman et al., 2020).

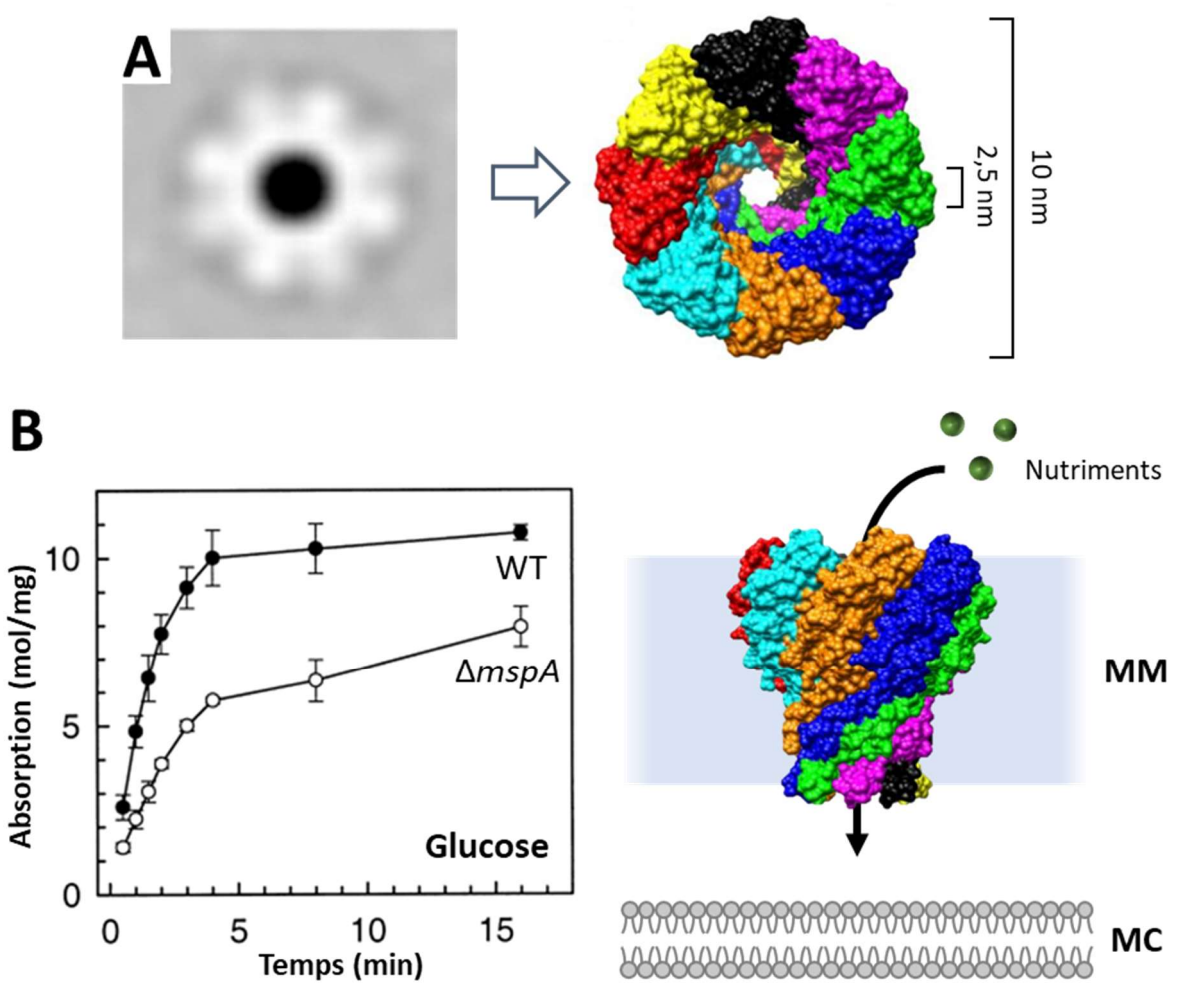


Figure 8 : Porine MspA chez *M. smegmatis*. (A) Observation en microscopie électronique du pore (à gauche) et modélisation 3D de la structure du pore formé par huit monomères de MspA (à droite). **(B)** Cinétique d'absorption du glucose à 37 °C par *M. smegmatis* sauvage (WT) et chez le mutant de délétion Δ*mspA*. MspA est impliquée dans l'absorption des solutés à travers la MM, sa délétion entraîne un défaut dans l'absorption du glucose. Abréviations : MC, membrane cytoplasmique ; MM, mycomembrane. Adaptée de (Stahl et al., 2001 ; Engelhardt et al., 2002 ; Pavlenok et al., 2012).

M. abscessus possède dans sa MM du tréhalose polyphléates (TPP) mais il est dépourvu de LOS, PDIM et de PGL (**Table 2**). La composition en acides mycoliques est identique chez les deux morphotypes. En revanche, des analyses de génomique et de lipidomique ont permis de montrer que la différence entre le morphotype S et R est due non seulement à la présence de GPL chez le S et pas chez le R (Ripoll et al., 2007 ; Medjahed et al., 2009), mais également le TPP présent chez le morphotype R indispensable pour la formation d'amas et des cordes (Llorens-Fons et al., 2017).

iv. La capsule

Enfin, la capsule est la couche la plus externe de la paroi mycobactérienne que l'on retrouve chez certaines mycobactéries comme *M. marinum*, *M. smegmatis* et *M. tuberculosis*, mais absente chez *M. abscessus*. La composition de la capsule varie selon l'espèce et elle contient principalement de l'arabinomannane, du glucane, des glycolipides et de nombreuses protéines sécrétées (Sani et al., 2010). Il s'agit d'une structure labile jouant un rôle dans l'interaction avec l'hôte et immunomodulateur (Geurtsen et al., 2009 ; Ates et al., 2016).

C) Les porines

La paroi mycobactérienne est une barrière particulièrement imperméable qui assure à la bactérie un rôle protecteur. Toutefois, il lui est nécessaire de maintenir le passage des nutriments à travers la paroi pour garantir sa survie. Les porines constituent une des portes d'entrée conçues pour l'absorption et l'échange des métabolites, y compris les ions et les petites molécules comme les sucres ou les nucléosides (Zeth et al., 2010). Ces protéines ont été décrites pour la première fois chez *M. chelonae* par Trias *et al.*, mais elles sont retrouvées également chez d'autres MCR et MCL (Trias et al., 1992 ; Senaratne et al., 1998 ; Niederweis et al., 1999).

La protéine MspA identifiée chez *M. smegmatis* est la porine qui a été la plus étudiée et la mieux caractérisée au cours de ces dernières années. Le génome de *M. smegmatis* présente quatre gènes codants pour des porines annotés *mspA*/*B*/*C*/ et *D*. La perte de la perméabilité au glucose et à la céphaloridine chez un mutant de délétion Δ*mspA* a permis de montrer que MspA est la porine qui permet la diffusion majoritaire de ses molécules (Stahl et al., 2001). MspA forme un complexe octamérique en forme de cône de 10 nm de long dans la mycomembrane avec un seul pore central permettant le passage de composés hydrophiles (**Figure 8**) (Engelhardt et al., 2002).

D'autre part, la perméabilité de la membrane mycobactérienne aux solutés hydrophiles est beaucoup plus faible que chez les bactéries à Gram négatif. Il a été montré que les mycobactéries présentaient un nombre inférieur de porine dans leur paroi (~50 fois moins) par rapport aux bactéries à Gram négatif (Engelhardt et al., 2002). Sans compter qu'il a été démontré que MspA était 2,5 fois plus longue que les porines d'*Escherichia coli* et que cette longueur du pore était corrélée avec une plus faible diffusion des solutés à travers la membrane (Engelhardt et al., 2002). Par conséquent, le nombre restreint de porine dans la MM, la présence de pores moins permissive pourrait expliquer la faible perméabilité de la paroi mycobactérienne aux solutés.

En plus de leur implication dans la perméabilité membranaire, les porines peuvent d'être impliquées dans la virulence et la survie intracellulaire. Chez *M. tuberculosis*, la protéine OmpATb permet le passage des petites molécules à travers la membrane. Cependant, cette protéine ne semble pas majoritaire, car un mutant de délétion d'*ompATb* est toujours capable d'absorber les solutés dans des conditions standards de croissance (Raynaud et al., 2002). En revanche, la croissance du mutant est réduite à un faible pH, dans les macrophages infectés et chez la souris (Raynaud et al., 2002). Ces résultats suggèrent qu'OmpATb serait nécessaire pour l'adaptation à un faible pH et pour la survie intracellulaire de la bactérie. L'augmentation significative de l'expression du gène à faible pH suggère que l'acidification du phagosome pourrait être le signal déclenchant un mécanisme de défense de *M. tuberculosis*, dépendant de la protéine OmpATb, au sein du macrophage afin de neutraliser le pH acide (Niederweis, 2003 ; Song et al., 2011).

Une étude récente a permis d'identifier chez *M. abscessus*, deux gènes, annotés *mmpA* (*MAB_1080*) et *mmpB* (*MAB_1081*), codants pour des porines. Ces protéines partagent 72 et 73 % d'identité avec la protéine MspA présente chez *M. smegmatis*. Il a été montré qu'un mutant de délétion Δ*mmpA* avait un défaut d'absorption du glucose contrairement au mutant de délétion Δ*mmpB* (de Moura et al., 2021). Ces résultats ont permis de conclure que la protéine MmpA est la porine majoritaire qui contribue au passage des nutriments chez *M. abscessus*. Cependant, aucune relation entre l'activité des porines et la virulence n'a jusqu'à présent été établie. D'autres gènes codants pour des porines putatives sont également présents dans le génome de *M. abscessus*, mais n'ont toujours pas été caractérisés (Ripoll et al., 2009).

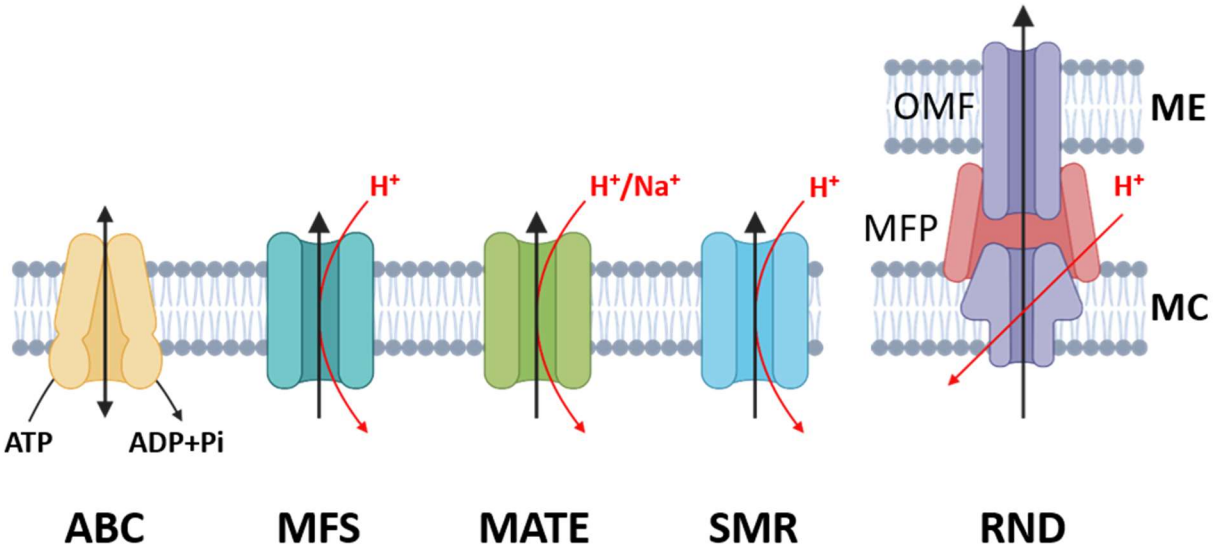


Figure 9 : Représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux. Les ABC transporteurs utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour le passage des solutés à travers la membrane. Il existe deux types d'ABC transporteurs, les importateurs et les exportateurs. Les autres familles de transporteurs utilisent le gradient de protons ou de sodium pour les transporteurs MATE. Abréviations : ABC, « ATP Binding Cassette » ; MFS, « Major Facilitator Superfamily » ; MATE, « Multidrug And Toxic compound Extrusion » ; SMR, « Small multiDrug Resistance » ; RND, Résistance Nodulation Division ; MFP, « Membrane Fusion-like Protein » ; OMF, « Outer Membrane Fusion » ; ME, membrane externe ; MC, membrane cytoplasmique. Adaptée de (Chitsaz et al., 2017).

D) Les pompes à efflux

Les pompes à efflux regroupent un grand nombre de protéines impliquées dans l'import et l'export des solutés à travers la membrane. Et comme les porines, elles jouent un rôle important dans la physiologie bactérienne comme le maintien de l'homéostasie, la croissance, le relargage des molécules toxiques ou encore la virulence. Les pompes à efflux peuvent être classées en deux groupes principaux selon la source d'énergie utilisée pour le passage des molécules (**Figure 9**).

i. Les ABC transporteurs

Le premier est le groupe des transporteurs ABC (« ATP Binding Cassette »), également nommé transporteur actif primaire, qui utilisent la fixation et l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour le passage unidirectionnel de molécule au travers de la membrane (Lubelski et al., 2007). Ces transporteurs sont impliqués dans l'import des nutriments essentiels tels que les acides aminés, les sucres ou encore les métaux et également dans l'export des molécules toxiques. Ils partagent une architecture caractéristique qui comprend quatre domaines : deux domaines transmembranaires (TMD) intégrés dans la bicouche membranaire et deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD : « Nucleotide Binding Domain ») localisés dans le cytoplasme (Rees et al., 2009). Chez les mycobactéries, les transporteurs ABC peuvent être impliqués dans l'import des sucres, des métaux, des acides aminés, des peptides et des lipides nécessaires à plusieurs processus physiologiques comme la nutrition, la virulence et la pathogenèse (Cassio Barreto de Oliveira et al., 2020).

Chez *M. tuberculosis*, les transporteurs de type importateur sont responsables de l'adaptation du bacille chez l'hôte et important pour la survie intracellulaire. Il a été montré également chez *M. tuberculosis* que les transporteurs ABC de type exportateur sont impliqués dans le recyclage/transport des composants de la membrane, la virulence et l'efflux des antibiotiques (Cassio Barreto de Oliveira et al., 2020). L'analyse du génome de *M. abscessus* a montré qu'il contenait un grand nombre de gènes codants pour des transporteurs ABC putatifs qui n'ont pas encore été caractérisés.

Le deuxième groupe est composé de transporteurs secondaires qui utilisent un gradient électrochimique de proton ou de sodium pour l'expulsion des molécules. Ce groupe peut être divisé en plusieurs familles.

ii. Les transporteurs MFS

Les transporteurs MFS (« Major Facilitator Superfamily ») constituent la plus grande superfamille de transporteur secondaire. Ces protéines utilisent la force proton motrice pour faire passer divers substrats à travers la membrane comme les ions, les acides aminés, les lipides, les petits peptides et les nucléosides (Yan, 2015). Ces protéines fonctionnent en monomère, constituées de deux domaines transmembranaires avec une cavité centrale formant la voie de passage des solutés (Chitsaz et al., 2017). Chez les mycobactéries, les transporteurs MFS sont souvent associés à une résistance intrinsèque aux médicaments. Par exemple, la protéine LfrA est une pompe responsable de l'efflux des fluoroquinolones chez *M. smegmatis* (Liu et al., 1996b). Il existe également un grand nombre de transporteurs MFS identifiés chez *M. tuberculosis*, impliqués dans l'efflux de médicament comme par exemple la protéine Rv2459 impliquée dans l'efflux de l'isoniazide et l'éthambutol (Li et al., 2017).

iii. Les transporteurs MATE

La famille des transporteurs MATE (« Multidrug And Toxic compound Extrusion ») utilise l'énergie du gradient de sodium ou de protons ou les deux pour l'exportation de composés cationiques (Li et al., 2015). Ces protéines sont composées de plusieurs segments transmembranaires qui forment une grande cavité interne ouverte sur l'espace périplasmique (Chitsaz et al., 2017). À l'exception de *M. leprae* qui n'en possède pas, un seul cadre de lecture ouvert codant pour un transporteur MATE a pu être identifié chez *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. marinum* et *M. bovis* (Mishra et al., 2013). La caractérisation de cette protéine annotée MSMEG_2631, ou Mmp (protéine MATE mycobactérienne) chez *M. smegmatis*, a permis de montrer qu'il s'agissait d'un transporteur dépendant du gradient de sodium impliqué dans l'efflux de médicament. En effet, le mutant de délétion présentait une sensibilité augmentée aux antibiotiques et à plusieurs antiseptiques, comme l'amikacine, la kanamycine et le chlorure de cétylpyridinium, par rapport à la souche sauvage (Mishra et al., 2013). Cependant, l'efflux de ces molécules par ce transporteur peut être compensé par d'autres pompes à efflux qui présentent la même spécificité de substrat et qui sont également impliquées dans l'expulsion d'autres molécules toxiques (Mishra et al., 2013).

iv. Les transporteurs SMR

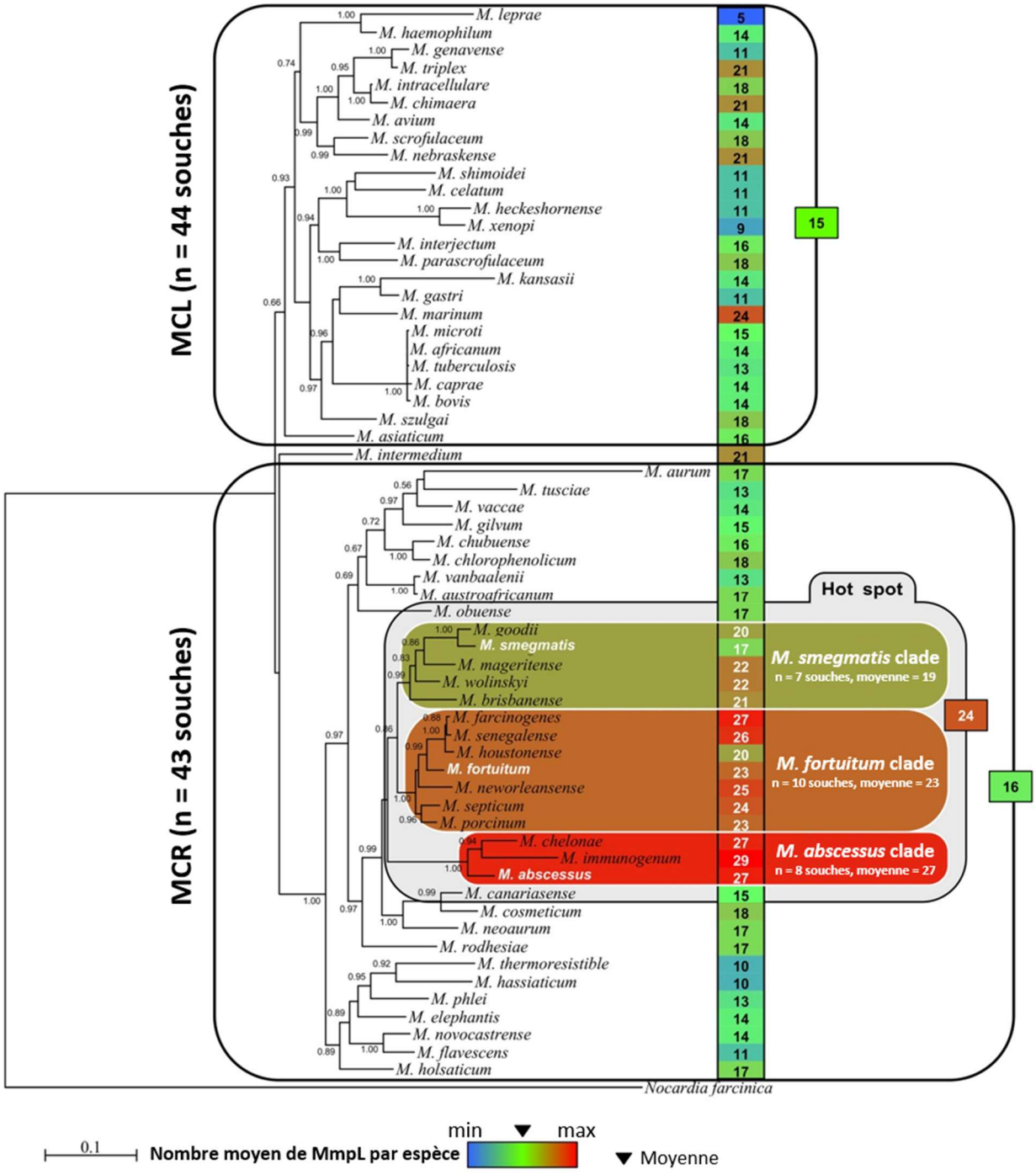
La famille des transporteurs SMR (« Small multiDrug Resistance ») regroupe les plus petites protéines de transport membranaire qui utilise l'énergie du gradient de protons pour le passage des solutés.

Ces protéines sont impliquées dans le transport de composés lipophiles, d'antibiotiques et de détergents (Bay et al., 2008). Leur organisation structurelle dans la membrane n'a pas été complètement résolue, mais on sait que ces protéines forment généralement des multimères avec quatre segments transmembranaires. Un des membres de cette famille a été identifié chez *M. tuberculosis*, il s'agirait de la protéine annotée Rv3065 (ou Mmr), qui permettrait l'expulsion de diverses molécules comme le bromure d'éthidium (BET), l'érythromycine, la kanamycine, le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) et l'acriflavine (De Rossi et al., 1998). Dans ce contexte, il a été montré que l'activité d'efflux de ce transporteur serait associée à la résistance à certains antibiotiques et désinfectants comme le CTAB et l'acriflavine (Rodrigues et al., 2013).

v. Les transporteurs RND

La famille des transporteurs RND (Résistance-Nodulation-Division) regroupe un grand nombre de protéines d'efflux qui présente une spécificité pour les substrats hydrophobes et amphiphiles. Ces transporteurs interagissent avec une protéine de fusion périplasmique (MFP : « Membrane Fusion-like Protein ») reliée à une protéine canal dans la membrane externe formant ainsi un système de transport de molécule en tripartie qui couvre la membrane interne, le périplasme et la membrane externe (**Figure 9**) (Chitsaz et al., 2017). Les pompes de cette famille utilisent un gradient de protons entre le périplasme et le cytosol comme force proton motrice pour le passage des solutés. Ces transporteurs jouent un rôle important dans la résistance aux antibiotiques, mais sont également impliqués dans la pathogénicité et la survie bactérienne (Piddock, 2006). Chez les mycobactéries, parmi cette famille de transporteurs, on retrouve les protéines transmembranaires MmpL.

Les protéines MmpL (« Mycobacterial Membrane Protein Large ») font partie de la famille des transporteurs RND qui permettent le transport d'une multitude de substrats à travers la membrane cytoplasmique grâce au gradient électrochimique transmembranaire (Szekely et al., 2016). Ces protéines se retrouvent principalement chez le genre *Mycobacterium*, même s'il existe des orthologues chez d'autres actinomycètes (Varela et al., 2012).



<u>Figure 10 :</u> Les transporteurs MmpL chez les mycobactéries. Répartition des MmpL chez différentes espèces mycobactériennes à croissance lente et rapide. L'arbre est enraciné avec *Norcadia farcinica*. Le nombre moyen de MmpL est indiqué à côté des espèces correspondantes. Adaptée de (Viljoen et al., 2017).

Elles sont présentes chez diverses espèces mycobactériennes incluant les MCL et MCR avec un nombre de MmpL variable selon l'espèce, mais avec une prépondérance pour les MCR tels que *M. abscessus* (n=27), *M. chelonae* (n=27) ou encore *M. fortuitum* (n=23) (**Figure 10**) (Viljoen et al., 2017). De plus, les gènes codants pour des MmpL sont majoritairement retrouvés en clusters à proximité des gènes de biosynthèse des molécules qu'elles exportent.

Les MmpL sont des protéines de grande taille allant de 700 à 1300 résidus qui comprennent 10 à 12 domaines transmembranaires et deux grandes boucles périplasmiques (Chalut, 2016). L'organisation structurelle de ces transporteurs chez les mycobactéries n'a pas encore été totalement résolue. Il est possible que ces protéines agissent en association avec d'autres protéines. Cependant, la présence d'un système tripartie avec une protéine MFP reliée à un canal dans la membrane externe comme chez les bactéries à Gram négatif n'a pas été démontrée (Chalut, 2016 ; Viljoen et al., 2017). Néanmoins, certaines de ces protéines peuvent fonctionner avec des protéines accessoires les MmpS (« Mycobacterial Membrane Protein Small »), lesquelles peuvent être impliquées dans la stabilisation des MmpL pour le transport des solutés.

Chez *M. tuberculosis*, on retrouve 13 gènes codants pour des MmpL qui sont principalement impliquées dans le transport des lipides de la paroi, molécules essentielles à l'intégrité de l'enveloppe cellulaire et à la virulence. Quant à *M. abscessus*, la bactérie possède au total 27 gènes codants pour des protéines MmpL, un nombre élevé par rapport à d'autres espèces telles que *M. tuberculosis* (n=13) ou *M. leprae* (n=5). Il a été proposé que ce nombre important pourrait conférer un avantage à la bactérie pour l'absorption de nutriments essentiels comme le fer ou le relargage des molécules toxiques et ainsi favoriser sa survie et son adaptation dans des environnements hostiles (Viljoen et al., 2017).

Chez *M. tuberculosis*, la protéine MmpL3 est impliquée dans le transport du TMM et dans l'importation d'hèmes (Szekely et al., 2016 ; Ma et al., 2020). C'est le seul transporteur essentiel à la viabilité bactérienne puisqu'une baisse de la régulation chez un mutant conditionnel entraîne l'accumulation de TMM suivi d'un arrêt de la division cellulaire et la mort bactérienne (Degiacomi et al., 2017). De plus, cette protéine est strictement conservée chez plusieurs espèces mycobactériennes. Ces caractéristiques rendent MmpL3 particulièrement attractive comme cible pour l'élaboration de nouveaux médicaments pour le traitement des infections mycobactériennes (Sethiya et al., 2020). Chez *M. abscessus*, on retrouve un homologue de MmpL3, également essentielle à la croissance, codé par le gène *MAB_4508* qui présente 63 % d'identité avec celui de *M. tuberculosis*.

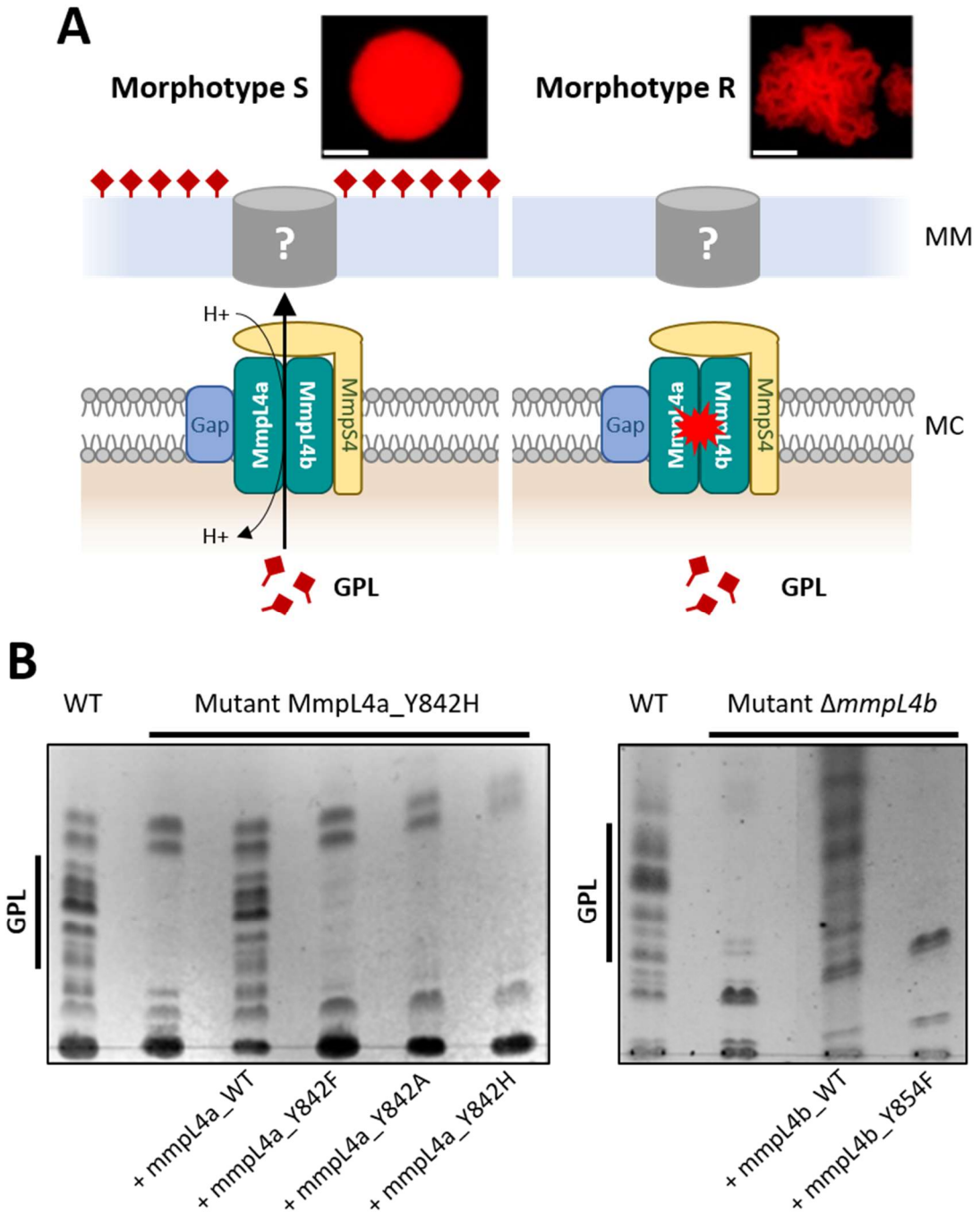


Figure 11 : Transport des GPL chez *M. abscessus* médié par le système MmpL4a/MmpL4b. (A) Schéma du système de transport des GPL chez le morphotype S et R. Les images correspondent à la morphologie des colonies sur milieu solide 7H10 des souches S et R transformées avec le pTEC27. Les barres d'échelle sont de 1 mm. MmpL4a/b, MmpS4 et la protéine Gap forment un complexe membranaire nécessaire au passage des GPL. La présence d'OMF n'a pas été démontrée. La mutation du résidu tyrosine 842 de MmpL4a ou 854 de MmpL4b rend le système non fonctionnel, entraîne la perte des GPL et permet la transition de la souche S en R. Abréviations : MC, membrane cytoplasmique ; MM, mycomembrane. **(B)** Analyse par chromatographie sur couche mince des GPL chez une souche parentale (WT) lisse, du mutant MmpL4a/b et du mutant complémenté. Adaptée de (Bernut et al., 2016 ; Viljoen et al., 2017).

L'inhibition de MAB_4508 par une nouvelle classe d'inhibiteur a permis de montrer une accumulation dose dépendante de TMM confirmant ainsi le rôle de la protéine comme transporteur (Dupont et al., 2016).

Toujours chez *M. tuberculosis*, il a été montré que MmpL7 assure le transport du PDIM ; MmpL8 permet le transfert du SL-1 dans l'enveloppe ; enfin, MmpL4 et MmpL5 coordonnent l'exportation des sidérophores, essentielles dans l'acquisition du fer (Szekely et al., 2016 ; Ma et al., 2020). Également, MmpL5 et MmpL7 sont responsables de l'exportation d'antibiotiques tels que l'isoniazide ou la bédaquiline (Ma et al., 2020). En outre, des mutations non-sens par insertion de transposons dans les gènes *mmpL4*, *mmpL5*, *mmpL7*, *mmpL8*, *mmpL10* et *mmpL11* affectent la multiplication bactérienne dans les poumons de souris suggérant que ces transporteurs jouent un rôle important dans l'expulsion de facteurs nécessaires à la survie *in vivo* (Lamichhane et al., 2005). Chez *M. abscessus*, MmpL8 (annotée MAB_0855) permet le transport d'un lipide, le « Glycosyl Diacetylated Nonadecyl Diol » (GDND) qui serait impliqué dans la virulence, l'échappement au phagosome et la survie intracellulaire (Dubois et al., 2018). Cependant, la fonction exacte de ce lipide dans l'interaction hôte pathogène n'a pas encore été complètement élucidée.

Chez *M. abscessus*, le système de transport le mieux caractérisé reste le système MmpS4-MmpL4a/MmpL4b impliqué dans l'export des GPL. Le locus *gpl* comprend les gènes nécessaires à la synthèse, à l'assemblage et au transport de ces lipides et il est strictement conservé chez les espèces qui produisent les GPL comme *M. smegmatis*, *M. abscessus* et *M. avium* (Gutierrez et al., 2018). Dans le locus, les gènes *mmpS4* (*MAB_4117c*), *mmpL4a* (*MAB_4116c*) et *mmpL4b* (*MAB_4115c*) sont organisés en opéron et codent pour des protéines qui forment un complexe membranaire permettant la translocation des GPL à travers la membrane plasmique (**Figure 11A**).

L'étude génétique de la transition du morphotype lisse en rugueux a permis de montrer que la perte de MmpL4a ou MmpL4b abolit le passage des GPL conduisant à la transition de la forme S en R suggérant qu'il n'y a pas de redondance fonctionnelle entre ces deux protéines (Medjahed et al., 2009 ; Pawlik et al., 2013 ; Bernut et al., 2016). En outre, il a été montré l'importance du résidu Tyr842 chez MmpL4a et du résidu Tyr854 chez MmpL4b dans l'activité d'export. En effet, la mutation ponctuelle d'un de ces résidus abroge l'activité d'export et conduit à la perte des GPL (**Figure 11B**) (Bernut et al., 2016). L'hypothèse émise est que ces résidus semblent être un élément clé dans la voie du relais protonique requis pour l'activité.

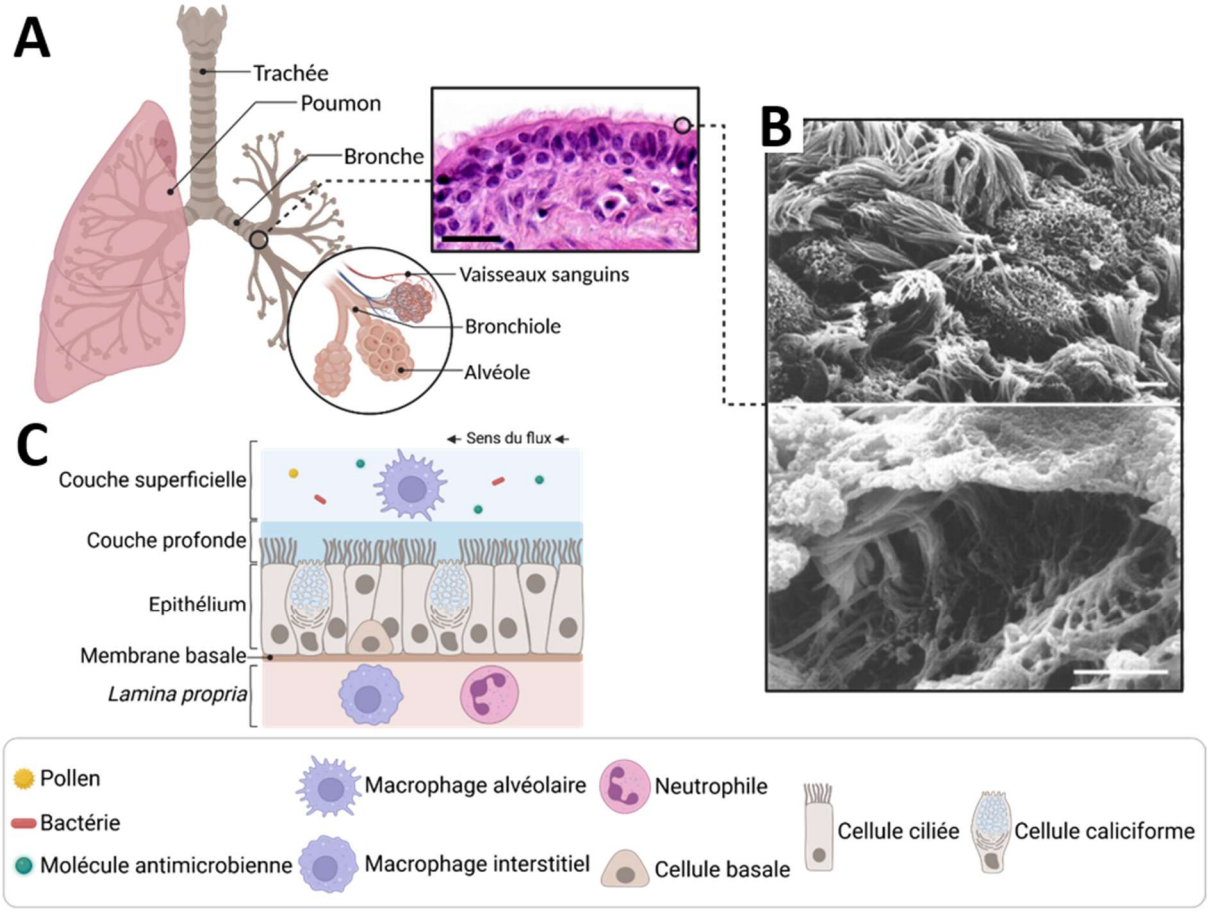


Figure 12 : Système respiratoire chez l'Homme. (A) Représentation schématique du système respiratoire de l'Homme avec une coupe histologique de l'épithélium pulmonaire. **(B)** Images de microscopie à balayage de la surface apicale de l'épithélium pulmonaire. Le panneau supérieur est à faible grossissement et le panneau inférieur montre une zone de l'épithélium avec la présence de mucus. La barre d'échelle correspond à 3 µm. **(C)** Schéma de l'épithélium pulmonaire. L'épithélium pulmonaire est un épithélium pseudostratifié composé de cellules basales, de cellules ciliées, et de cellules caliciformes sécrétrices de mucus, permettant la capture et l'élimination des bactéries, soutenu par un tissu conjonctif la *lamina propria*. Adaptée de (Smith et al., 1996 ; Rock et al., 2010 ; Jouan Y., 2017).

Enfin, la délétion de *mmpS4* chez *M. smegmatis* entraîne une production réduite de GPL, mais n'affecte pas leur localisation cellulaire (Deshayes et al., 2010) suggérant que la protéine MmpS4 joue un rôle de médiateur dans la formation du mégacomplexe de synthèse et de transport des GPL. Dans ce modèle, MmpS4 interagirait avec MmpL4a et MmpL4b ainsi qu'avec les enzymes de biosynthèse des GPL permettant d'augmenter la synthèse et l'exportation de ces lipides.

IV/ Physiopathologie de *Mycobacterium abscessus*

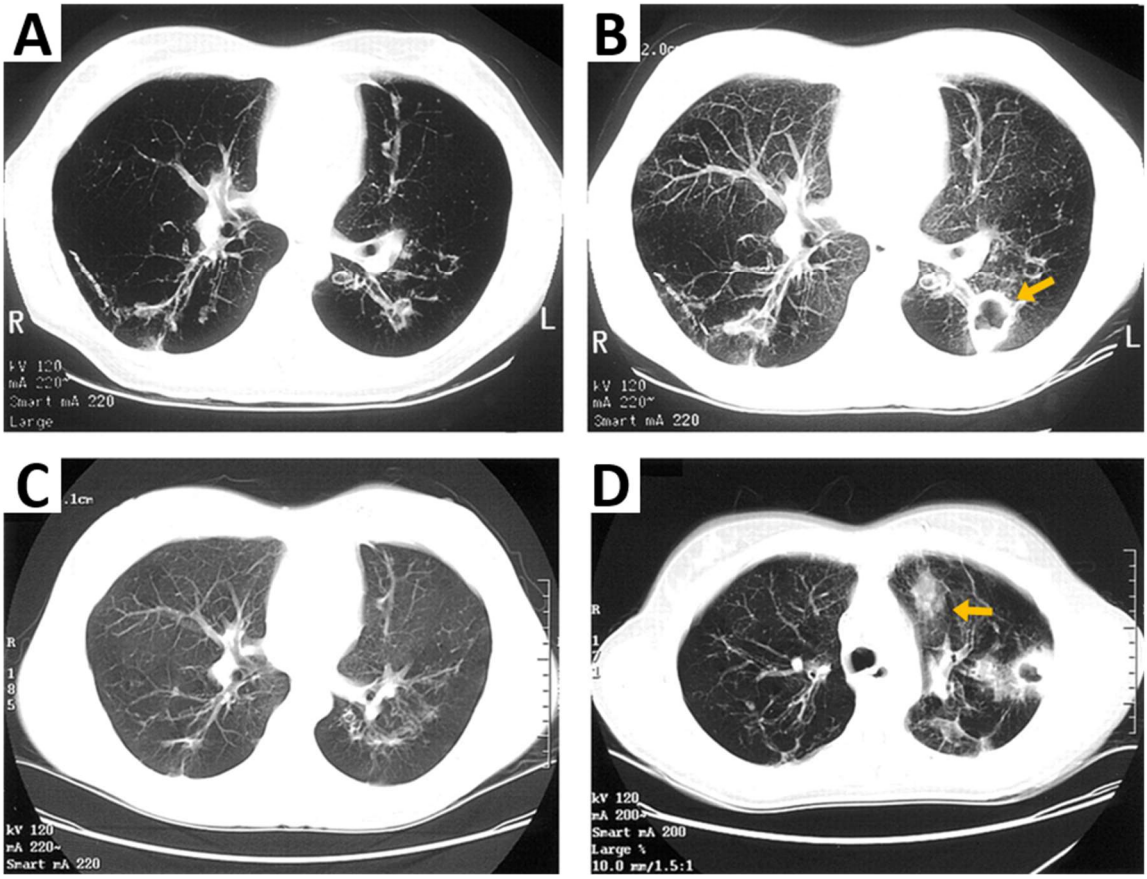
A) Environnement pulmonaire

La muqueuse pulmonaire est en contact direct avec le milieu extérieur et représente donc la première barrière de protection aux éléments étrangers du système respiratoire. L'épithélium pulmonaire est un épithélium pseudostratifié soutenu par un tissu conjonctif appelé le chorion ou la *lamina propria* et comprend principalement des cellules basales, ciliées et caliciformes sécrétrices de mucus (**Figure 12**) (Coraux et al., 2005). En condition physiologique, les bactéries présentes dans les voies respiratoires vont être éliminées grâce à la production de mucus et à la clairance mucociliaire. Le mucus est composé en majorité d'eau, mais également d'une variété de molécules dont les propriétés antibactériennes permettent la défense des voies respiratoires comme le lysozyme ou la lactoferrine (Thompson et al., 1995). Le mucus produit par les cellules caliciformes, se compose :

(i) d'une couche superficielle visqueuse riche en mucines qui lui confèrent son caractère collant et élastique permettant la capture efficace des bactéries,

(ii) et d'une couche profonde fluide permettant le battement ciliaire qui propulse la couche superficielle vers le pharynx (Jouan Y., 2017).

Lors d'une infection bactérienne, les cellules épithéliales pulmonaires jouent un rôle de sentinelle par leur capacité à réguler les réponses immunitaires suite à la reconnaissance d'un agent pathogène. En effet, elles vont permettre la reconnaissance du pathogène et le déclenchement de la réponse immunitaire innée. Les cellules sont capables de reconnaître différents motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, les « pattern recognition receptors » (PRR). Les PRR regroupent différentes catégories telles que les « Toll-like » récepteurs (TLR) et les « NOD-like » récepteurs (NLR) (Jouan Y., 2017). L'activation de ces récepteurs par les PAMP, aboutit à l'expression d'une variété de molécules pro-inflammatoires nécessaires aux recrutements des cellules de l'immunité comme les macrophages.



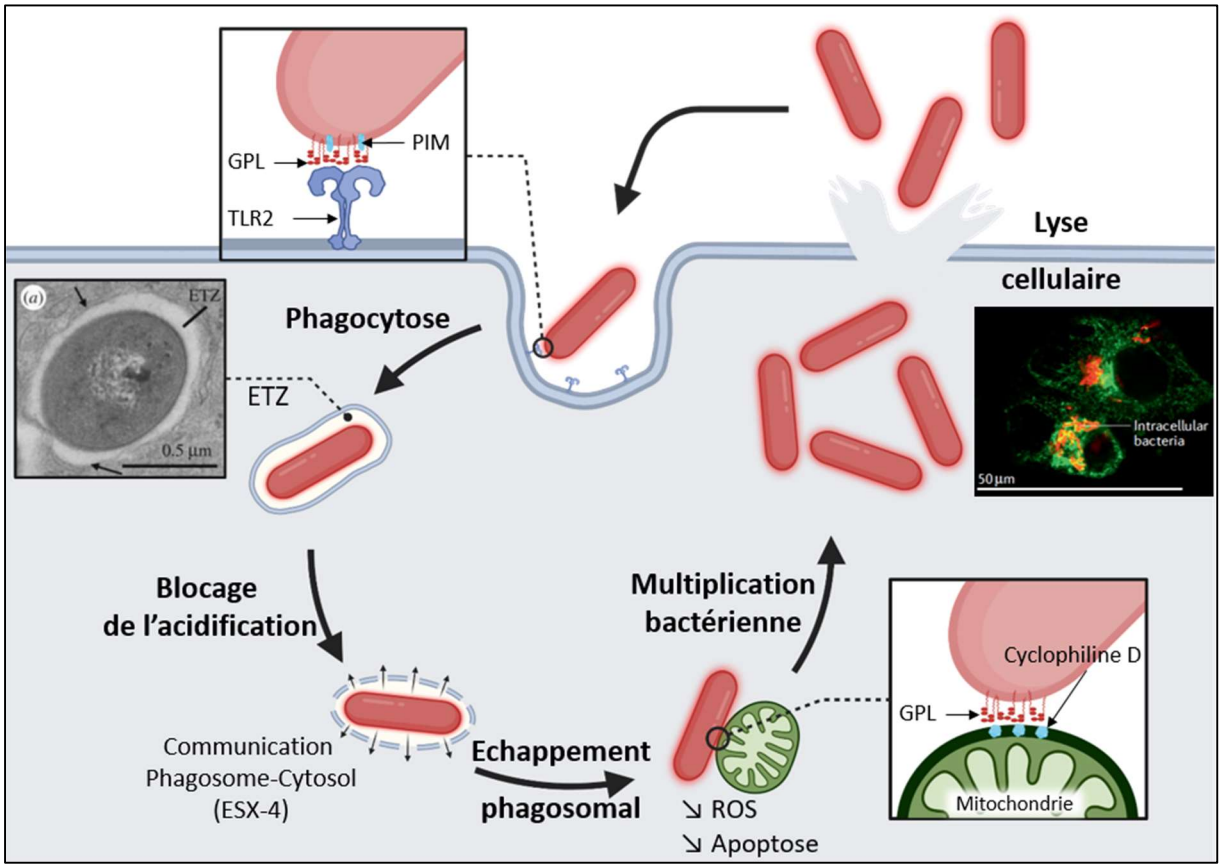
<u>Figure 13 :</u> Évolution radiologique par tomographie d'une infection provoquée par *M. abscessus* chez un patient atteint de mucoviscidose. (A-C) coupes au même niveau, **(D)** coupe niveau supérieur. **(A)** Scan en novembre 1996 avec la présence d'une bronchectasie diffuse modérée avec un épaississement de la paroi bronchique. **(B)** Scan de février 1997 avec la présence de grandes cavités (flèche jaune) dans le lobe inférieur gauche **(C)** Scan de juin 1998, amélioration de l'état clinique du patient **(D)** Scan d'octobre 1998, rechute avec apparition de nouvelles cavités (flèche jaune). Adaptée de (Cullen et al., 2000).

Les macrophages représentent la première ligne de défense aux agents pathogènes dans les poumons. Il existe deux types de macrophages : ceux qui résident directement dans les tissus et ceux qui circulent dans le sang. Dans l'environnement pulmonaire, les macrophages qui y résident sont les macrophages alvéolaires présents dans la lumière des voies respiratoires et les macrophages interstitiels situés eux dans le parenchyme pulmonaire (**Figure 12**) (Bruscia et al., 2016).

Les macrophages possèdent une variété de récepteurs, incluant les TLR, leur permettant de capter toute modification de l'environnement ou la présence de bactéries grâce aux PAMP. Ces cellules ont une fonction à la fois effectrice, impliquée dans la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et de médiateurs inflammatoires pour le recrutement de nouvelles cellules immunitaires comme les macrophages et les neutrophiles ; et une fonction phagocytaire impliquée dans la destruction du corps étranger (Soehnlein et al., 2010). Quant aux ROS, ils ont non seulement un rôle antimicrobien pour la destruction du pathogène, mais également jouent un rôle dans la traduction du signal pour la production de cytokines (Soehnlein et al., 2010).

B) Infections pulmonaires

M. abscessus peut causer plusieurs types d'infections (voir § **Chapitre I : IV/ C) Infections extrapulmonaires**), mais les infections pulmonaires restent toutefois les formes les plus fréquentes. Ces infections peuvent toucher des individus en bonne santé qui ne présentent pas de facteurs de risque où des lésions pulmonaires peuvent être observées. Cependant, ces infections ont une incidence rare chez ces individus (Varghese et al., 2012). En revanche, les individus qui ont des pathologies sous-jacentes comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la pneumoconiose, la mucoviscidose, le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), le reflux gastro-œsophagien ou encore des antécédents de tuberculose peuvent représenter un risque important d'infections aux MNT (Gopalaswamy et al., 2020). Les symptômes cliniques d'une infection pulmonaire sont variables et incluent une toux chronique souvent accompagnée d'expectorations purulentes, une dyspnée, de la fatigue, une perte de poids, ainsi que de la fièvre (Johnson et al., 2014). La maladie peut ensuite évoluer vers une infection sévère, sous forme de bronchectasie nodulaire ou de bronchectasie fibro-cavitaire affectant significativement la fonction respiratoire et provoquant une détresse respiratoire (**Figure 13**).



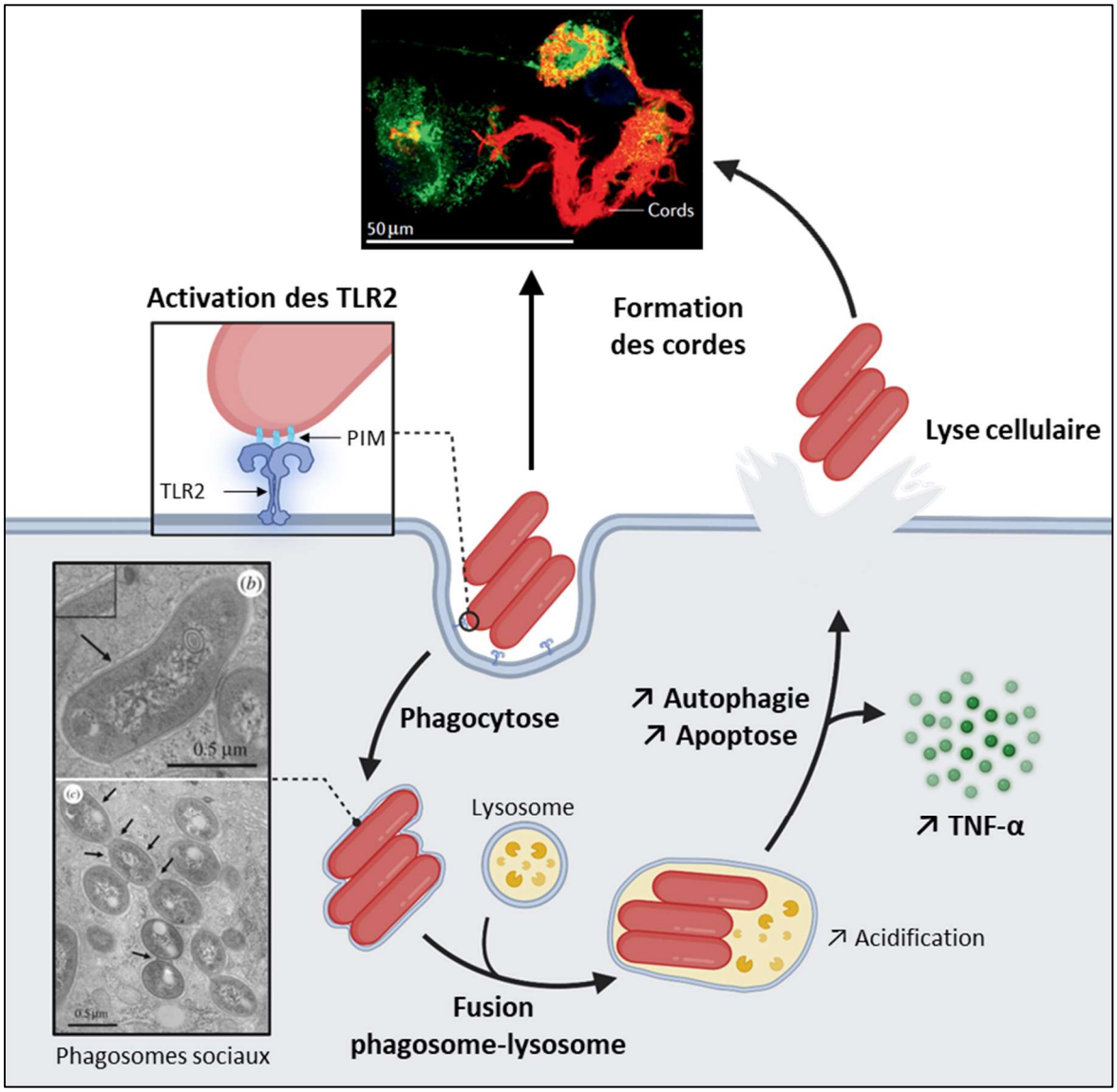
<u>Figure 14 :</u> Schéma du mécanisme d'infection du macrophage par le morphotype S. Abréviations : GPL, glycopeptidolipide ; TLR2, « Toll-like » récepteurs 2 ; PIM, phosphatidylinositol mannoside ; ETZ, zone translucide aux électrons ; ROS, espèces réactives de l'oxygène. Adaptée de (Roux et al., 2016 ; Whang et al., 2017 ; Gutierrez et al., 2018 ; Laencina et al., 2018 ; Johansen et al., 2020a).

Aujourd'hui, les voies exactes de transmission de *M. abscessus* n'ont pas été encore caractérisées. Plusieurs études phylogénétiques sur des isolats cliniques issus de patients ont permis de mettre en évidence que certaines souches sont génétiquement identiques ou quasi-identiques (Bryant et al., 2013 ; Fujiwara et al., 2022 ; Wetzstein et al., 2022). Bien que la transmission interhumaine directe soit suspectée, elle n'a pas été clairement démontrée. De plus, il serait possible que la contamination se fasse via l'environnement par l'intermédiaire de sources d'eau contaminées, de fomites ou encore d'aérosols (Jonsson et al., 2007 ; Bryant et al., 2016 ; Johansen et al., 2020a).

La physiopathologie de l'infection pulmonaire à *M. abscessus* chez l'Homme est encore mal connue. Néanmoins, des études chez la souris et le poisson-zèbre ont permis d'établir de nouvelles connaissances sur le mécanisme d'infection qui partage des similitudes avec celui de *M. tuberculosis* (Bernut et al., 2017). Il a été observé que le morphotype S se retrouve généralement au stade précoce de l'infection, correspondant à la forme environnementale et colonisatrice de *M. abscessus*, contrairement au morphotype R qui est lui associé à une forme chronique de la maladie et apparaît à un stade plus tardif remplaçant au fur et à mesure la forme S (Jonsson et al., 2007 ; Catherinot et al., 2009).

Au premier stade, les bactéries envahissantes vont être phagocytées par les cellules immunitaires comme les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (Chan et al., 2010). La présence ou non de GPL dans la paroi de *M. abscessus*, élément déterminant le morphotype, va grandement influencer la réponse phagocytaire du macrophage lors de l'infection (**Figure 14**). En effet, les macrophages vont dans un premier temps internaliser le variant S sous forme de bacille individuel dans des phagosomes solitaires (Roux et al., 2016), puis à l'intérieur du phagosome, la bactérie va pouvoir moduler les réponses intrinsèques du macrophage à son avantage afin de favoriser sa survie intracellulaire. La présence des GPL va former une barrière physique entre la bactérie et la membrane du phagosome visible en microscopie électronique par une zone translucide aux électrons (**Figure 14**) (Roux et al., 2016).

Dans ce contexte, les GPL vont recouvrir les agonistes, présents à la surface bactérienne, des « Toll-like » récepteurs-2 (TLR2) du macrophage empêchant alors toutes interactions avec ces récepteurs et limitant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (Rhoades et al., 2009). De plus, *M. abscessus* S est capable de bloquer l'acidification des phagosomes empêchant ainsi leur fusion avec le lysosome pour former le phagolysosome. Ce processus est médié par une communication entre le phagosome et le cytosol grâce aux effecteurs de son système de sécrétion de type VII ESX-4 (Laencina et al., 2018).



<u>Figure 15 :</u> Schéma du mécanisme d'infection du macrophage par le morphotype R. Abréviations : TLR2, « Toll-like » récepteurs 2 ; PIM, phosphatidylinositol mannoside ; TNF-α, « Tumoral Necrosis Factor ». Adaptée de (Roux et al., 2016 ; Gutierrez et al., 2018 ; Johansen et al., 2020a).

Enfin, les GPL vont également inhiber l'apoptose du macrophage en interagissant avec la cyclophiline D des mitochondries ce qui va fortement diminuer la production de ROS (**Figure 14**) (Whang et al., 2017). Tous ces processus mis en place par *M. abscessus* vont lui permettre de maintenir sa survie au sein du macrophage et de créer un environnement favorable pour sa réplication. L'augmentation importante de la charge bactérienne au cours de l'infection conduit à l'apoptose des macrophages qui libèrent ainsi les bacilles dans le milieu extracellulaire et permettant le début d'un nouveau cycle d'infection.

Au cours du temps, la capacité du morphotype S à empêcher sa destruction et favoriser sa survie intracellulaire va conduire à une production de cytokines permettant une activation du système immunitaire et le recrutement de nouvelles cellules au point d'infection (Bernut et al., 2017). Dans certains cas, afin de contenir et d'empêcher la dissémination de *M. abscessus*, les macrophages et les neutrophiles peuvent former des granulomes, une structure immunitaire entourée par des lymphocytes B et T (Cullen et al., 2000 ; Chan et al., 2010 ; Bernut et al., 2017). Cette structure immunitaire joue un rôle important dans la protection de l'hôte. Toutefois, la mise en échec de l'arsenal immunitaire par *M. abscessus* peut conduire à une infection chronique chez le patient qui peut dans certains cas perdurer pendant plusieurs années.

Au cours de l'infection, il peut arriver que le morphotype S ait la capacité de transiter de manière irréversible en morphotype R (Catherinot et al., 2009). La transition en phénotype R est corrélée avec d'une augmentation de la virulence ce qui contribue au développement d'une infection aiguë (Park et al., 2015b). Aujourd'hui, les facteurs responsables de cette transition sont encore inconnus. En l'absence de GPL, la physiopathologie de la forme R devient totalement différente. En effet, le caractère agrégatif du variant R et la formation des cordes représentent un réel défi pour les macrophages. Ces structures sont longues et de tailles supérieures aux cellules phagocytaires qui sont alors incapables de les internaliser (Bernut et al., 2014a). Toutefois, il peut arriver que des petits amas de bacilles soient phagocytés par les macrophages entraînant la formation de phagosomes sociaux (**Figure 15**) (Roux et al., 2016).

En l'absence des GPL dans la paroi, les agonistes du TLR-2, comme les PIM, sont découverts et peuvent déclencher une réponse immunitaire innée des macrophages, médiée par les TLR-2 avec la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α (« Tumoral Necrosis Factor ») (Rhoades et al., 2009). D'ailleurs, il a été observé en microscopie électronique que la membrane du phagosome est plus étroitement collée à la membrane bactérienne d'un variant R que d'un variant S et qu'au niveau de certaines zones, les membranes semblent même entrer en contact (**Figure 15**) (Roux et al., 2016).

Dans le phagosome, *M. abscessus* R ne sera pas capable de détourner les réponses du macrophage contrairement au variant S. En effet, le manque de GPL va induire l'acidification et la formation du phagolysosome ainsi qu'une réponse apoptotique plus forte (Whang et al., 2017). Le relargage des bacilles dans le milieu extracellulaire va induire une réponse inflammatoire forte avec une production de cytokines pro-inflammatoires exacerbée (Roux et al., 2011). La formation des cordes va contribuer au mécanisme d'échappement au système immunitaire qui va conduire à une croissance et une dissémination incontrôlée des bacilles dans l'hôte (Bernut et al., 2014a). Tous ces éléments vont contribuer à favoriser une destruction tissulaire étendue qui provoque un déclin important de la fonction respiratoire provoquant des symptômes sévères qui peut conduire à la mort du patient dans certains cas.

C) Infections extrapulmonaires

En plus des infections pulmonaires, *M. abscessus* est capable de provoquer un large spectre d'infections extrapulmonaires. En effet, la mycobactérie peut être responsable d'infections cutanées, des tissus mous, osseuses, du système nerveux central ou encore d'atteinte disséminée (Griffith et al., 2007 ; Lee et al., 2015). Les infections extrapulmonaires se déclarent généralement chez des individus immunodéprimés, fragilisés ou à la suite d'un traumatisme physique (Brown-Elliott et al., 2002a).

M. abscessus est l'une des principales MNT responsable des atteintes cutanées. Les infections de l'épiderme ou des tissus mous sont caractérisées par des nodules violets, souvent douloureux, des pustules érythémateuses ou encore des abcès. Elles surviennent généralement à la suite d'un traumatisme (plaies, brûlure…), d'une intervention chirurgicale via du matériel contaminé ou d'un changement corporel (tatouage, piercing…) (Kothavade et al., 2013).

Aujourd'hui, les infections du système nerveux central provoquées par *M. abscessus* sont très rares, mais elles peuvent surgir des suites d'une neurochirurgie ou à cause de cathéter intracrânien contaminé. Ces infections sont caractérisées par des méningites ou des abcès cérébraux (Lee et al., 2012).

Les atteintes disséminées restent le cas le plus grave et ont tendance à survenir chez des individus immunodéprimés. Dans ce cas de figure, la dissémination de *M. abscessus* dans l'organisme devient hors de contrôle. Ces infections peuvent toucher les poumons, les ganglions lymphatiques, la peau et les tissus mous. La bactérie est également capable de provoquer des bactériémies et se retrouve dans tout l'organisme (El Helou et al., 2013).

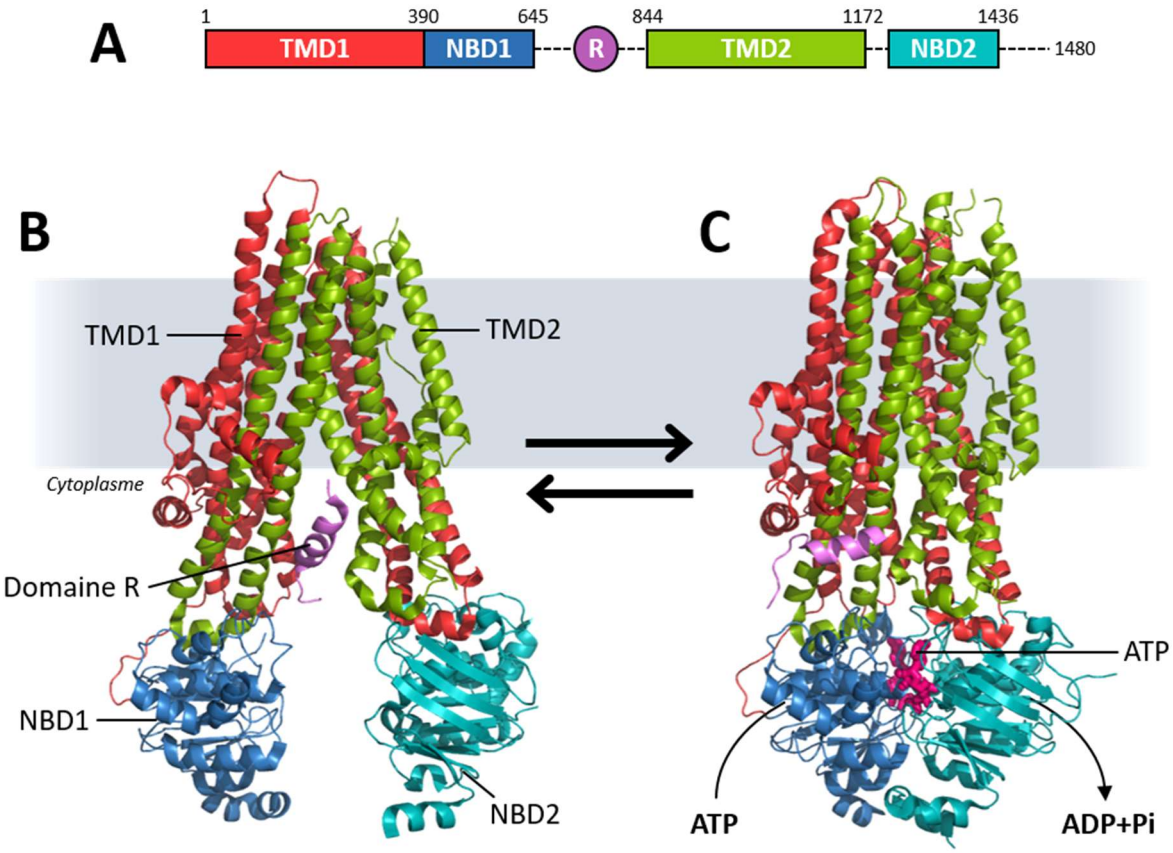


Figure 16 : Structure du canal CFTR. (A) Répartition des domaines de CFTR sur la séquence protéique. La protéine possède deux domaines TMD insérés dans la membrane et deux domaines NBD et un domaine R cytoplasmiques. Les lignes en pointillés représentent les régions dont la structure n'a pas été résolue. **(B-C)** Structure 3D de la protéine CFTR humaine en conformation de canal **(B)** fermé (PDB 5UAK) et **(C)** ouvert (PDB 6MSM). Adaptée de (Liu et al., 2017 ; Zhang et al., 2018).

V/ Mucoviscidose et *Mycobacterium abscessus*

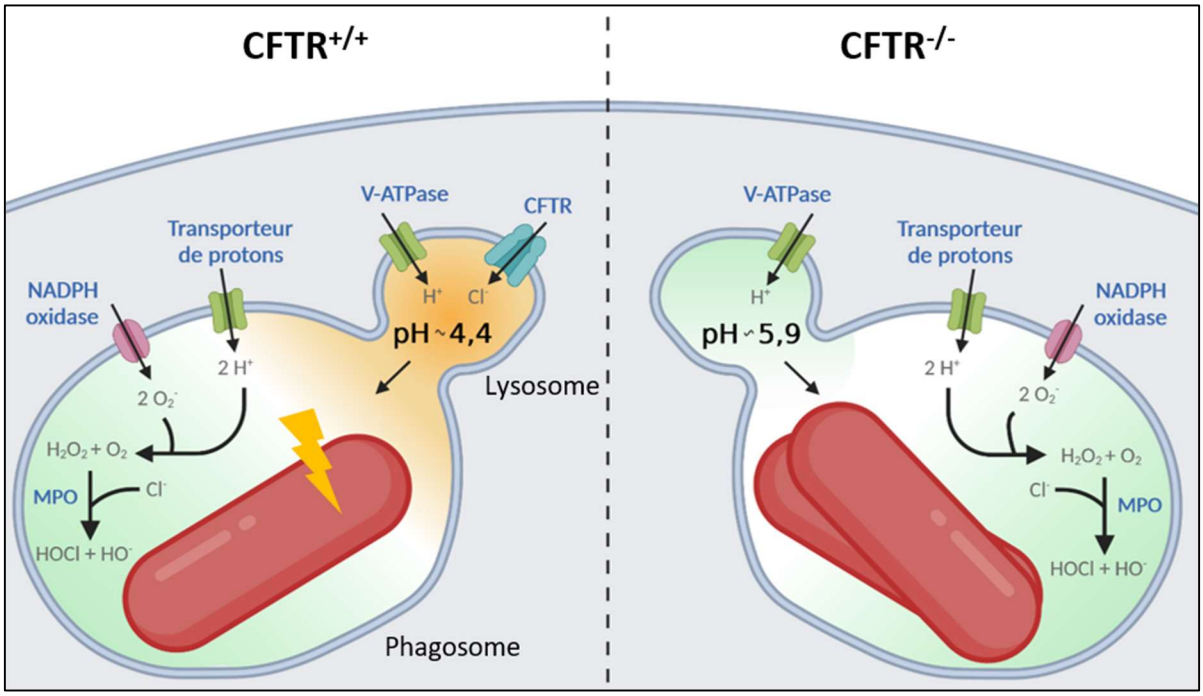
A) La mucoviscidose

La mucoviscidose ou « maladie des mucus visqueux » est une maladie génétique à transmission autosomique récessive plus fréquemment retrouvée au sein des populations caucasiennes. Aujourd'hui, plus de 7 700 personnes sont atteintes de mucoviscidose en France (VLM, 2023) et concerne 1 naissance sur 3 500 en Europe (Scotet et al., 2012).

Cette maladie affecte de nombreux organes notamment les voies respiratoires, le système digestif et les organes reproducteurs causant différentes affections telles que l'infertilité, l'insuffisance pancréatique, le diabète, le syndrome d'occlusion intestinale distale et la bronchectasie, qui reste la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients (Leitch et al., 2013). La mucoviscidose est due à une altération de la protéine CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator ») provoquée par des mutations du gène *cftr* localisé sur le chromosome 7 (Riordan et al., 1989).

La protéine CFTR est un canal ionique membre des ABC transporteurs permettant le passage des ions chlorure entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, à travers la membrane apicale des cellules épithéliales. Le passage des ions par ce canal est nécessaire au bon fonctionnement des cellules épithéliales qui tapissent les voies respiratoires, le tractus intestinal, les canaux pancréatiques, les canaux déférents et les glandes sudoripares (Gadsby et al., 2006). La protéine CFTR est caractérisée par un pore transmembranaire d'hélices alpha composé de deux domaines TMD1 et TMD2 liés à deux domaines cytoplasmiques de liaison nucléotidique NBD1 et NBD2 respectivement, impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (**Figure 16**) (Sebastian et al., 2013). Le domaine R est une région régulatrice non structurée qui relie les deux moitiés de la protéine et qui possède des séquences consensus pour la phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) permettant l'activation du canal (Gadsby et al., 1994).

Dans le contexte de la mucoviscidose, plus de 2 000 mutations de la protéine CFTR ont été recensées (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html) et la mutation du résidu phénylalanine 508 dans le domaine NBD1 reste la plus fréquente. La mutation ΔF508 empêche la maturation conformationnelle normale des domaines cytoplasmiques de CFTR provoquant une instabilité de la protéine et sa dégradation (Du et al., 2005). D'autres mutations peuvent conduire soit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle ou soit une protéine entière, mais avec une activité de transport amoindrie.



<u>Figure 17 :</u> Rôle de la protéine CFTR dans l'acidification du phagosome du macrophage proposé par Di *et al.* L'entrée d'ions chlorure par le CFTR et de protons par la V-ATPase dans le lysosome permet de maintenir un pH acide. Lors de la fusion du phagosome avec le lysosome, le contenu lysosomal, qui comprend des protéases, est libéré dans le phagosome et participe à l'activité bactéricide. La NADH oxydase libère les radicaux superoxydes (O_2^-) dans la lumière phagosomale qui réagissent avec des protons transportés par des canaux à protons pour former de l'hydrogène peroxyde (H_2O_2). L'H_2O_2 combiné avec le Cl^- phagosomal entraîne la formation d'acide hypochloreux (HOCl) via la myéloperoxydase (MPO), qui fait également partie de la réponse bactéricide du macrophage. En l'absence de CFTR l'acidification lysosomale sera retardée et les facteurs bactéricides ne fonctionneront pas efficacement favorisant ainsi la survie bactérienne. Adaptée de (Di et al., 2006).

Ainsi, la présence d'une protéine CFTR non fonctionnelle ne permet plus le passage des ions chlorure à travers la membrane des cellules épithéliales créant un déséquilibre ionique entre le milieu intra et extracellulaire entrainant une déshydratation, un épaississement et une accumulation de mucus (Puchelle et al., 2002). Au niveau du poumon, organe le plus impacté, l'accumulation de ce mucus épais empêche une fonction mucociliaire normale favorisant une forte détresse respiratoire et un environnement propice à la prolifération bactérienne. D'autre part, la présence de molécules antimicrobiennes dans le mucus constitue la première ligne de défense du poumon aux bactéries. Or, en absence du canal CFTR, la concentration en ions chlorure devient particulièrement élevée dans le mucus ce qui conduit à inactiver l'activité bactéricide de ces molécules favorisant ainsi la prolifération bactérienne (Smith et al., 1996).

Toutefois, la protéine CFTR n'est pas uniquement présente chez les cellules épithéliales, mais également chez les cellules immunitaires comme les macrophages et les neutrophiles (Yoshimura et al., 1991). Chez les patients atteints de mucoviscidose, la réponse immunitaire innée médiée par les macrophages est altérée. Une étude en 2006 par Di *et al*. a permis de montrer que le canal CFTR est présent sur la membrane plasmique des macrophages, mais également présent dans les phagosomes et les lysosomes. Ils ont pu montrer que chez des macrophages alvéolaires murins *cftr*$^{-/-}$, l'activité bactéricide était fortement réduite et que cette réduction était corrélée avec un défaut dans l'acidification du phagosome (Di et al., 2006). Malgré tout, les macrophages conservaient leur mécanisme de maturation du phagosome en phagolysosome. Ils ont alors émis l'hypothèse que la protéine CFTR pourrait contribuer à l'acidification phagosomale et qu'en son absence, les phagolysosomes s'acidifieraient mal permettant aux pathogènes de proliférer (**Figure 17**) (Di et al., 2006). Néanmoins, l'implication directe ou indirecte de la protéine CFTR dans le processus d'acidification n'a toujours pas été complètement résolue et ce modèle n'a pour l'instant pas été reproduit et validé par d'autres études.

Par ailleurs, l'environnement pulmonaire anormal et la colonisation bactérienne chronique favorisent la production exacerbée de cytokines pro-inflammatoires chez les patients (Bonfield et al., 1995). De plus, lors de l'infection, les macrophages ont une production accrue de cytokines lorsqu'ils sont exposés à des PAMP (Bruscia et al., 2016). Ainsi, il a été proposé que la perte de CFTR dans les macrophages contribue à un phénomène inflammatoire pulmonaire chronique chez les patients.

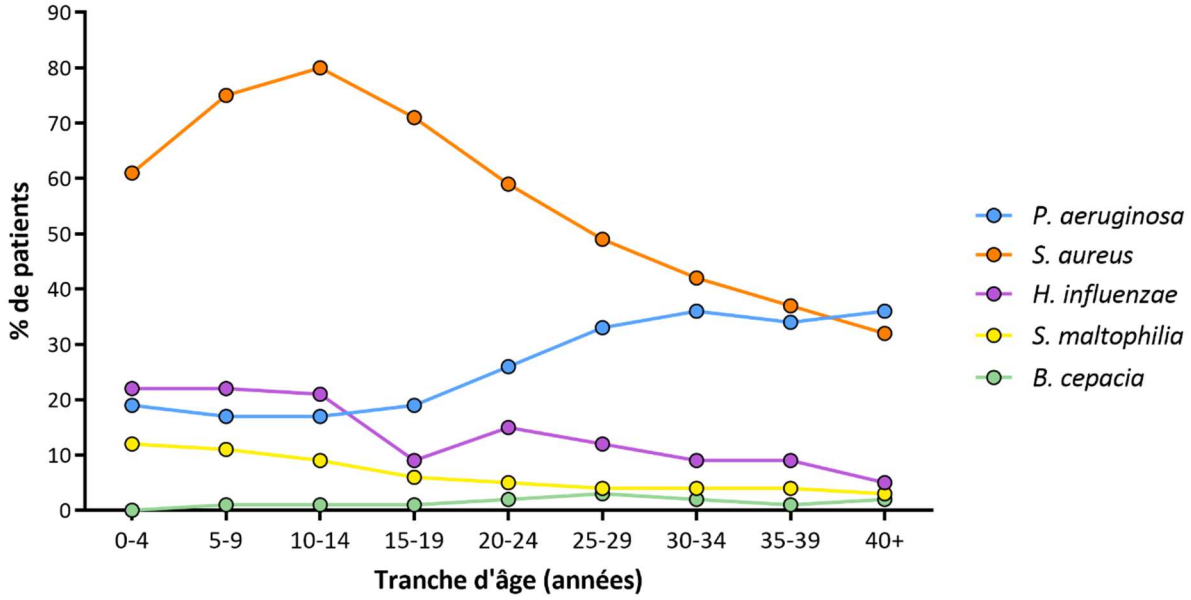


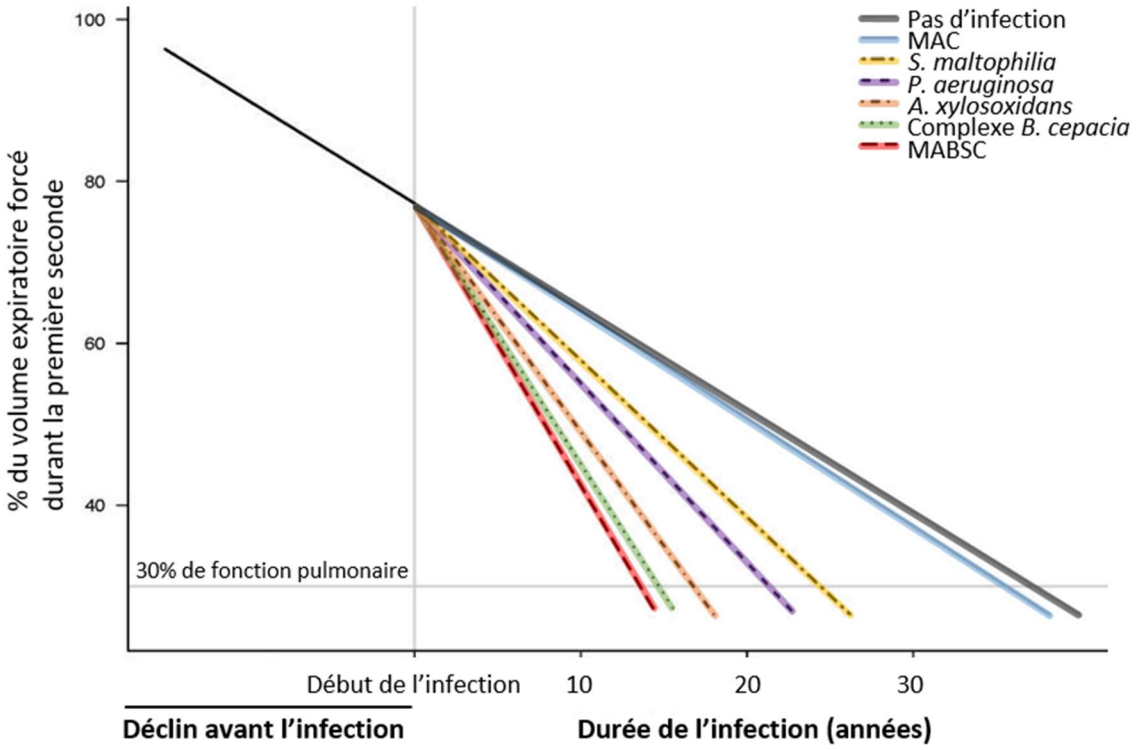
Figure 18 : Répartition des pathogènes majeurs responsables des infections chez les patients atteints de mucoviscidose en France en fonction de l'âge. Adaptée de (VLM, 2023).

Finalement, la présence d'un environnement pulmonaire favorable à la colonisation bactérienne, un défaut dans l'activité bactéricide des macrophages et une inflammation chronique des poumons rendent les patients atteints de mucoviscidose particulièrement vulnérables aux infections bactériennes.

B) Mucoviscidose et infections pulmonaires

Comme décrit précédemment, les patients atteints de mucoviscidose sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes. Les infections des voies respiratoires sont associées à un déclin progressif de la fonction pulmonaire aboutissant à une détresse respiratoire et peuvent être responsables en partie de morbidité pulmonaire et de la mortalité chez les patients. En effet, les infections chroniques vont favoriser une forte production de cytokines à l'origine d'une inflammation chronique et persistante (Bruscia et al., 2016). Ce phénomène peut conduire à la formation de lésions progressives et à une destruction de l'épithélium pulmonaire.

La colonisation des poumons par les agents pathogènes est rarement due à une seule espèce à la fois et varie de la petite enfance jusqu'à l'âge adulte. Ainsi, la dynamique des communautés polymicrobiennes favorise les infections chroniques chez ces individus et la composition microbienne dans l'environnement pulmonaire est variable d'un individu à un autre (Jean-Pierre et al., 2021). Chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections sont causées principalement par quatre espèces pathogènes majeures : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae* et *Stenotrophomonas maltophilia* (VLM, 2023). Également, *Burkholderia cepacia* qui était considéré comme un des pathogènes majeurs responsable d'infections chez les patients, a vu ces dernières années sa prévalence diminuer grâce à la mise en place de protocole de prévention et de contrôle des infections (Blanchard et al., 2022). En France, pour l'année 2022, la prévalence des infections provoquées par *P. aeruginosa* représente 27 % et la prévalence des infections à *S. aureus* est de 56 % (VLM, 2023). *H. influenzae* et *S. aureus* sont des colonisateurs précoces des voies respiratoires alors que *P. aeruginosa* provoque des infections plus tardivement, mais reste le pathogène le plus courant chez les patients adultes (**Figure 18**). De plus, certains patients peuvent présenter des co-infections qui affectent de manière significative les fonctions respiratoires et peuvent provoquer une maladie plus grave (Limoli et al., 2019). *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont fréquemment impliqués dans des co-infections avec une progression puis une dominance de *P. aeruginosa* au fil du temps. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette transition sont encore mal compris.



<u>Figure 19 :</u> Effet des infections bactériennes chroniques sur la fonction pulmonaire chez les individus atteints de mucoviscidose. Le graphique représente la trajectoire moyenne du volume expiratoire forcé durant la première seconde, correspondant à la quantité d'air expulsée durant la première seconde d'une expiration rapide et forcée, sur une population de patients suivie de 1974 à 2014. Adaptée de (Qvist et al., 2016).

Par ailleurs, l'amélioration des traitements antibiotiques pour les infections pulmonaires a entraîné l'émergence de nouveaux pathogènes tels qu'*Achromobacter xylosoxidans, S. aureus* résistant à la méticilline et les MNT (Surette, 2014). Aussi, les patients peuvent être sujet à des infections fongiques provoquées par exemple par *Aspergillus fumigatus* ou *Candida albicans*, mais également sujet aux infections virales qui peuvent augmenter le risque d'exacerbations pulmonaires (Blanchard et al., 2019).

Les MNT étaient auparavant considérées comme des bactéries environnementales qui étaient à l'origine d'infections bénignes. Cependant, cette vision a aujourd'hui bien changé. Les MNT sont maintenant reconnus comme des pathogènes insidieux qui peuvent fortement impacter les fonctions respiratoires (Qvist et al., 2014). Chez les individus atteints de mucoviscidose, les infections pulmonaires impliquant les MNT représentent environ 20 % des infections bactériennes et peuvent varier de 3 à 24 % selon les zones géographiques (Hill et al., 2012 ; Martiniano et al., 2022). En France, la prévalence des infections dues aux MNT chez les patients a atteint 2,1 % en 2022 et elle est en constante augmentation au fil des années (VLM, 2023).

Les complexes MAC et MABS sont les plus fréquemment isolés et représentent environ 90 % des infections pulmonaires dues aux MNT avec une prédominance pour les espèces du complexe MABS qui sont le plus fréquemment isolées chez les populations européennes atteintes de mucoviscidose (Roux et al., 2009 ; Degiacomi et al., 2019). D'autres espèces mycobactériennes peuvent également provoquer des infections pulmonaires chez les patients comme *M. fortuitum* ou *M. kansasii*, mais restent minoritaires (Efthimiou et al., 1984 ; Seddon et al., 2013).

C) Physiopathologie dans le contexte de la mucoviscidose

Les individus atteints de mucoviscidose sont particulièrement sensibles aux infections provoquées par *M. abscessus*. Aujourd'hui, cette mycobactérie est reconnue comme un pathogène qui peut affecter gravement la fonction pulmonaire. En effet, il a été montré que *M. abscessus* affectent la fonction pulmonaire négativement de manière bien plus importante que des infections provoquées par *P. aeruginosa* ou encore au MAC (**Figure 19**) (Qvist et al., 2016). De plus, les infections à *M. abscessus* peuvent être à l'origine de lésions pulmonaires sévères qui sont responsables de morbidité pulmonaire (Cullen et al., 2000) et peut dans certains cas conduire à la mort du patient.

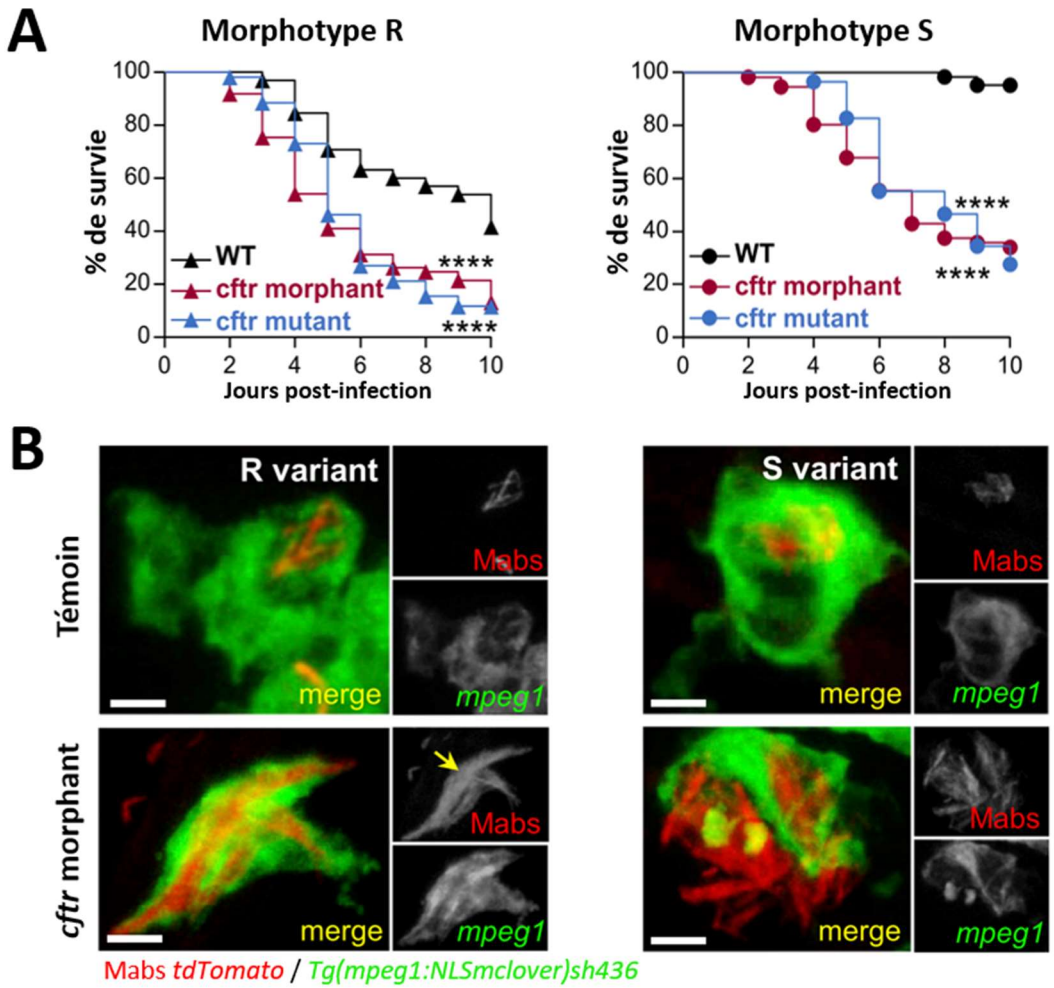


Figure 20 : Lien entre CFTR et sensibilité aux infections à *M. abscessus* (A) Pourcentage de survie des larves sauvages de poisson zèbre ou ayant un déficit en CFTR infectées par *M. abscessus* R ou S. Le défaut en CFTR rend les larves plus sensibles aux infections à *M. abscessus* **(B)** Images de microscopie confocale de macrophages sauvages (témoin) et « *cftr* morphant » infectés par le variant R ou S. Les barres d'échelle correspondent à 2 µm et la flèche jaune montre la présence de cordes. Adaptée de (Bernut et al., 2019).

La connaissance sur les mécanismes intrinsèques impliqués dans la vulnérabilité aux infections de *M. abscessus* chez les patients reste encore limitée. En 2019, l'étude de Bernut *et al.* dans le modèle du poisson zèbre a permis d'établir un lien entre la protéine CFTR et sensibilité aux infections à *M. abscessus* (Bernut et al., 2019). En effet, des mutants déficients en CFTR présentaient une hypersensibilité aux morphotypes S et R (**Figure 20A**). Il a été montré que la délétion de cette protéine provoque une déficience dans la production de ROS par les cellules phagocytaires compromettant ainsi la destruction des bactéries intracellulaires. Ceci est corrélé avec une réplication incontrôlée des bactéries (**Figure 20B**) entrainant une mort cellulaire prématurée, une dissémination bactérienne, la formation d'abcès, la destruction des tissus et une mortalité larvaire accrue (Bernut et al., 2019). L'étude du mécanisme d'infection de *M. abscessus* dans les modèles macrophage, murin et du poisson zèbre en l'absence d'altération de CFTR a permis de montrer que les macrophages jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection (Bernut et al., 2017). Or dans le contexte de la mucoviscidose et d'après le modèle de Di *et al.* l'activité bactéricide des macrophages est altérée due à un défaut dans l'acidification du phagosome (Di et al., 2006). Ceci peut probablement contribuer à favoriser la multiplication bactérienne non contrôlée dans le poumon.

D'autre part, la protéine semble jouer un rôle indirect dans le recrutement des cellules immunitaires tel que les neutrophiles nécessaires au maintien d'un granulome protecteur. En effet, en l'absence de la protéine CFTR, la mort prématurée des cellules immunitaires ne permettra pas l'activation de celle-ci pour le recrutement des neutrophiles au point d'infection ce qui altérera l'intégrité du granulome (Bernut et al., 2019). La formation et le maintien d'un granulome jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection à *M. abscessus* et dans la protection de l'hôte. Dans le contexte pathologique, l'altération du granulome ne permettra plus de contenir les bactéries et va ainsi favoriser une propagation des bactéries extracellulaires.

La progression de l'infection à *M. abscessus* chez les patients reste mal comprise. Il a été rapporté que *M. abscessus* était capable de former des biofilms dans les cavités alvéolaires chez des individus qui présentaient des infections persistantes (Fennelly et al., 2016). Ce phénomène a une implication clinique importante puisque le mode de vie en biofilm a un impact sur la réponse immunitaire et la sensibilité aux antibiotiques ce qui contribue à l'installation d'une infection chronique difficile à éradiquer (Ciofu et al., 2015). Il a été supposé que comme le morphotype S est associé à une infection persistante, il semblerait que ce morphotype soit à l'origine de la formation de biofilm dans les poumons contrairement au morphotype R qui est lui associé à une croissance invasive et une infection aiguë (Qvist et al., 2015).

En outre, *M. abscessus* présente une résistance à diverses classes d'antibiotiques rendant les traitements délicats et compliqués (voir § **Chapitre II : Traitements et Antibiorésistances**). Les patients subissent alors des infections chroniques et souvent incurables, c'est pourquoi en 2006, la société internationale de transplantation cardiaque et pulmonaire a mis les infections aux MNT sur la liste des contre-indications à la greffe pulmonaire (Martiniano et al., 2022). La greffe pulmonaire est généralement envisagée chez des patients qui souffrent de bronchectasie sévère ou de maladie pulmonaire en phase terminale. Finalement, la présence de *M. abscessus* dans les poumons reste très problématique chez ces individus. Dans ces conditions, il devient donc primordial de traiter au mieux ces infections.

VI/ Diagnostic des infections pulmonaires à *Mycobacterium abscessus*

Aujourd'hui, le diagnostic des infections pulmonaires aux mycobactéries atypiques reste complexe et difficile. Contrairement à la tuberculose, l'isolement de MNT dans des échantillons pulmonaires n'est pas forcément un signe d'infection. En effet, il a été signalé la présence de MNT commensales chez des individus sans pour autant provoquer de maladie pulmonaire (Catanzaro, 2002). Afin de différencier un isolat de MNT en tant que commensal par rapport à un agent causal de l'infection pulmonaire, l'ATS (« American Thoracic Society ») et l'IDSA (« Infectious Diseases Society of America ») ont publié un ensemble de critères pour l'identification des infections pulmonaires dues aux MNT (Griffith et al., 2007).

Ces recommandations se basent sur les résultats cliniques comprenant les symptômes et une radiographie thoracique ou un scanner qui montre l'atteinte pulmonaire ainsi que la présence de nodules ou de cavités opaques ; les tests microbiologiques et l'identification de la souche pour confirmer une maladie provoquée par une MNT. Il est également recommandé de réaliser trois prélèvements d'expectoration ou de lavage bronchique à des jours différents (Ryu et al., 2016). En raison des différences de sensibilité aux antibiotiques, l'identification de l'espèce mycobactérienne revêt d'une importance capitale sur le plan clinique afin de déterminer un traitement optimal pour soigner l'infection (Benwill et al., 2014).

Afin d'établir un diagnostic rapide, la mise en évidence des mycobactéries par la coloration reste l'outil usuel. La coloration de Gram n'étant pas adaptée pour la détection des mycobactéries, deux types de coloration sont communément utilisés. Il s'agit de la coloration de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'auramine en association avec la rhodamine B (Ryu et al., 2016).

Cependant, bien que ces méthodes permettent d'identifier les mycobactéries dans un échantillon complexe, elles ne permettent pas de les discriminer. De plus, un résultat négatif ne signifie pas forcément de l'absence d'une MNT dans l'échantillon. C'est pourquoi la mise en culture des mycobactéries à partir d'échantillon bronchique sur milieu solide et liquide reste la méthode principale pour leur détection (Griffith et al., 2007). Également, l'utilisation de milieu spécifique comme le milieu RGM (« Rapidly-growing mycobacteria ») peut être préconisée pour la différenciation entre espèces à croissance lente et espèces à croissance rapide (Stephenson et al., 2019). Finalement, la présence de mycobactérie est confirmée suite à un résultat de culture positif d'au moins deux échantillons bronchiques distincts.

La culture des mycobactéries à partir d'expectorât reste primordial pour le diagnostic et nécessaire afin de réaliser des tests complémentaires pour l'identification de l'espèce, mais cette méthode est très longue et nécessite entre 10 à 42 jours d'incubation (Sarro et al., 2021). D'autant plus que les échantillons d'expectorât issu de patients atteints de mucoviscidose contiennent généralement d'autres bactéries comme *P. aeruginosa* ou *S. aureus* qui ont une croissance plus rapide que les mycobactéries et leur présence peut interférer dans la récupération des mycobactéries. Pour tenter de contourner ce problème, une étape de décontamination avec une solution de soude à 4 % qui permet d'éliminer les autres bactéries contaminantes est réalisée avant la mise en culture (Griffith et al., 2007). Néanmoins, cette étape peut parfois entraîner également la perte de mycobactérie au sein de l'échantillon et conduire à un faible rendement de la culture.

L'outil majeur à l'heure actuelle dans l'étape de l'identification de l'espèce mycobactérienne impliquée dans l'infection reste l'identification par PCR et séquençage. Cette méthode s'appuie sur l'amplification et le séquençage du gène *rrs* codant pour l'ARN ribosomique 16S présent chez toutes les espèces bactériennes qui possède des régions variables spécifiques de chaque espèce (Gopalaswamy et al., 2020). En complément, l'amplification des gènes de ménage tel que *rpoB* permet également une détection différentielle des MNT. L'identification par technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight ») peut être également utilisée (Alcaide et al., 2018). Cette méthode permet l'identification rapide et précise des espèces mycobactériennes avec une bonne sensibilité de détection (Neuschlova et al., 2017). Cependant, certains pays endémiques ne disposent pas de toute l'avancée technologique pour ce type de diagnostic. Dans ces pays les méthodologies pour diagnostiquer les infections aux MNT et différencier l'espèce restent limitées, contrairement à la tuberculose.

Pour répondre à ce besoin, divers tests biochimiques peuvent être utilisés pour l'identification des MNT couramment isolées comme par exemple l'accumulation de niacine dans le milieu de culture, le test catalase ou encore la réduction des nitrates (Bhalla et al., 2018). En complément des méthodes classiques de détection pour les infections aux MNT, la recherche de biomarqueurs spécifiques aux mycobactéries, et en particulier à *M. abscessus*, pour le développement de test sérologique est en cours d'étude (Le Moigne et al., 2020 ; Le Moigne et al., 2022a ; Le Moigne et al., 2022b). D'ailleurs, une réponse élevée d'anticorps a pu être identifiée pour la phospholipase C et sur un extrait lipoprotéique activant les TLR2. Ces antigènes semblent être des marqueurs sérologiques prometteurs pour le diagnostic de *M. abscessus*.

En conclusion de ce chapitre, *M. abscessus* fait partie d'un groupe de bactérie reconnu pour provoquer des infections sévères chez l'Homme comme la tuberculose ou la lèpre. Au cours de ces années, *M. abscessus* est devenu un pathogène particulièrement préoccupant, pouvant provoquer des infections particulièrement sévères chez des individus ayant une pathologie sous-jacente, notamment chez les individus atteints de mucoviscidose. De plus, l'implication du morphotype S ou R a une incidence clinique importante. En effet, le variant S provoque des infections chroniques qui peuvent persister dans le temps contrairement au variant R qui provoque des infections aiguës. D'autre part, *M. abscessus* et les mycobactéries de manière générale sont particulièrement résistantes aux changements environnementaux grâce à leur paroi rigide et imperméable. D'ailleurs, cette caractéristique les rend très résistantes aux stress environnants déployés par le système immunitaire ou encore face aux antibiotiques. En plus de provoquer des infections sévères chez les patients atteints de mucoviscidose, *M. abscessus* est difficile à éradiquer en raison de sa polyrésistance à la plupart des antibiotiques conventionnels. Ce dernier point sera traité dans le chapitre suivant qui va se centrer sur les traitements actuellement utilisés pour traiter les infections à *M. abscessus* et les principaux mécanismes de résistance identifiés chez cette mycobactérie.

Chapitre II :

Traitements et Antibiorésistances

L'aspect préoccupant des infections provoquées par *M. abscessus* repose sur les niveaux de résistance extrême de cette bactérie à la plupart des antibiotiques conventionnels y compris tous les antituberculeux de première intention comme l'isoniazide, la rifampicine ou le pyrazinamide. Aujourd'hui, le traitement des infections comprend une polythérapie particulièrement longue qui peut déclencher de nombreux effets indésirables chez le patient et dont les chances de succès sont restreintes. En effet, la résistance naturelle et l'apparition de résistance acquise au cours du traitement peuvent conduire dans certains cas à un échec thérapeutique. Face à des bactéries multi-résistantes, les options thérapeutiques sont généralement limitées.

Au fil des années, l'étude du « résistome » de *M. abscessus*, qui se définit comme l'ensemble des mécanismes de résistance naturelle ou acquise par la bactérie, a permis d'améliorer les connaissances sur la grande diversité de système qu'elle peut mettre en place pour se protéger des antibiotiques. Cette compréhension est un élément nécessaire au développement d'alternatives ou de nouveaux schémas thérapeutiques qui pourront, dans le futur, s'inscrire dans l'élaboration d'une thérapie efficace. Aujourd'hui, la recherche d'alternative thérapeutique se centre sur deux axes de recherche qui sont : la découverte et le développement de nouvelles molécules antimicrobiennes, ou la réaffectation et le repositionnement d'antibiotiques déjà disponibles.

Dans ce deuxième chapitre, nous allons tout d'abord aborder l'antibiothérapie classique qui est préconisée et utilisée en clinique pour traiter les infections à *M. abscessus* puis nous évoquerons les alternatives thérapeutiques à travers quelques exemples. Enfin, les principaux mécanismes de résistance présents chez cette mycobactérie seront abordés.

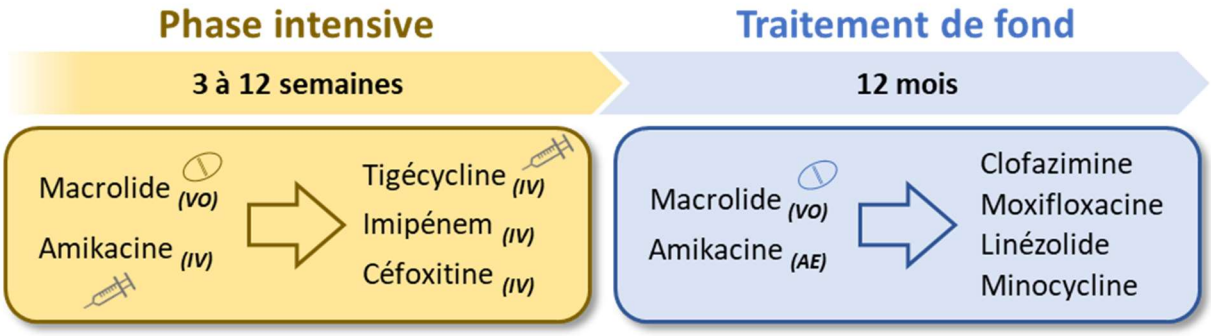


Figure 21 : Antibiothérapie préconisée pour le traitement des infections à *M. abscessus*. Le traitement comprend une phase intensive de 3 à 12 semaines suivie d'un traitement de fond de 12 mois. La première phase inclut une dose journalière de macrolide, de préférence de l'azithromycine, d'amikacine et d'un ou plusieurs antibiotiques supplémentaires : la tigécycline, l'imipénem ou la céfoxitine. Le traitement de fond lui comprend une dose journalière de macrolide, d'amikacine ainsi que deux ou trois antibiotiques supplémentaires (clofazimine, moxifloxacine, linézolide, minocycline). Abréviations : VO, voie orale ; IV, intraveineuse ; AE, aérosol. Adaptée de (Floto et al., 2016b).

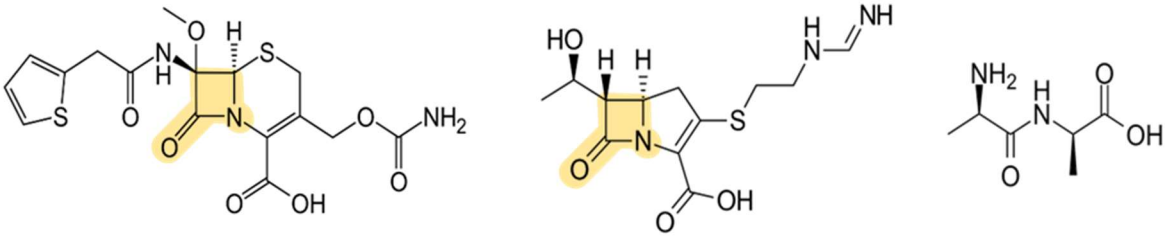


Figure 22 : Structure et activité antibactérienne *in vitro* des β-lactamines sur *M. abscessus*. La céfoxitine et l'imipénem sont les deux seules β-lactamines utilisées dans la thérapie anti-*M. abscessus*. Le noyau β-lactame est encadré en jaune. L'activité antibactérienne est évaluée grâce à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale qui inhibe la croissance bactérienne. Le D-Ala-D-Ala, représenté à droite, est le substrat des transpeptidases. Adaptée de (Nessar et al., 2012).

I/ Antibiothérapie classique

Contrairement à ce qui est utilisé actuellement, pendant plusieurs années, les recommandations pour traiter les infections à *M. abscessus* préconisaient une trithérapie associant une β-lactamine (imipénem ou céfoxitine), un aminoglycoside (amikacine), administrés par voie parentérale pendant 12 mois et un macrolide (clarithromycine ou azithromycine) par voie orale. Afin d'optimiser cette thérapie, plusieurs nouvelles recommandations ont été établies par un consortium entre « l'US Cystic Fibrosis Foundation » et « l'European Cystic Fibrosis Society » en 2016 (Floto et al., 2016a). Le traitement des infections à *M. abscessus* préconise une phase intensive suivie d'un traitement de fond (**Figure 21**). La phase intensive inclut une prise par voie orale d'un macrolide, de préférence l'azithromycine, en association pendant 3 à 12 semaines avec de l'amikacine intraveineuse et d'un ou plusieurs antibiotiques supplémentaires : la tigécycline en intraveineuse, l'imipénem ou la céfoxitine (Floto et al., 2016b). Le traitement de fond comprend de l'amikacine inhalée avec un macrolide, de préférence de l'azithromycine, en prise orale et de deux à trois antibiotiques supplémentaires incluant la minocycline, la clofazimine, la moxifloxacine et le linézolide (Floto et al., 2016b).

A) Les β-lactamines

Les β-lactamines regroupent une large classe d'antibiotiques incluant les pénicillines, les carbapénèmes, les céphalosporines et les monobactames qui vont interférer à des étapes spécifiques de la synthèse de la paroi cellulaire. Cette famille de molécules est caractérisée par un noyau β-lactame (**Figure 22**) (Zapun et al., 2008). La couche de PG permet de protéger la bactérie contre les changements de la pression osmotique environnante. L'activité des enzymes transglycosylase et transpeptidase vont catalyser l'ajout des pentapeptides pour étendre les brins glycanes du PG existant et réticuler les brins peptidiques adjacents des unités de PG en cours de synthèse, respectivement, permettant le maintien de l'intégrité du PG (Kohanski et al., 2010). Les β-lactamines vont bloquer la formation de la liaison peptidique catalysée par les transpeptidases également nommées protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Le noyau β-lactame présente une structure proche du dipeptide D-ala-D-ala qui est le substrat de ces PLP (**Figure 22**). La sérine catalytique de la PLP va attaquer le carbonyle du cycle du β-lactame permettant l'ouverture du cycle et la formation d'un complexe covalent acyl-enzyme. La formation de ce complexe va ainsi inhiber son activité ce qui va provoquer l'arrêt de la synthèse du PG (Zapun et al., 2008).

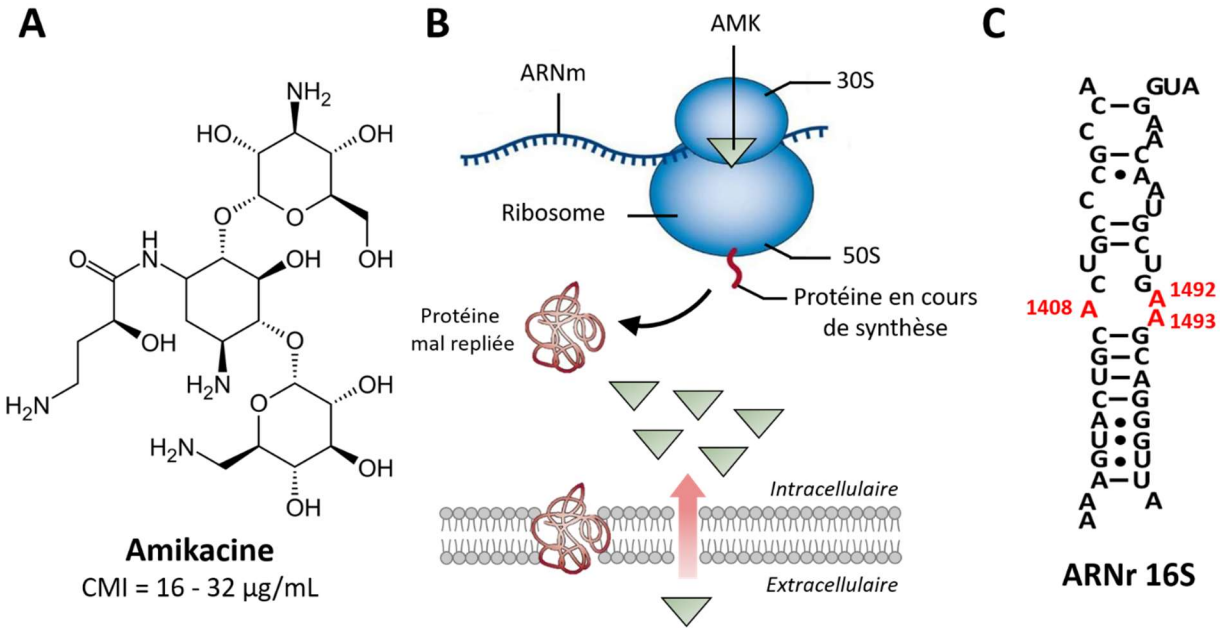


Figure 23 : Structure et activité antibactérienne de l'amikacine (AMK). (A) Structure chimique et CMI *in vitro* sur *M. abscessus* de l'AMK. **(B)** Mécanisme d'action de l'AMK sur la synthèse protéique. L'AMK va interagir avec l'ARNr 16S au niveau de trois résidus **(C**, en rouge) perturbant la conformation du complexe formé entre l'ARMm et l'ARNt ce qui va conduire à une mauvaise lecture des codons et l'incorporation de mauvais acides aminés dans la protéine en cours de synthèse. La synthèse et l'intégration de protéines membranaires mal repliées dans l'enveloppe entraînent une déstabilisation de la paroi et l'absorption massive d'AMK ce qui entraînera la mort. Adaptée de (Kohanski et al., 2010 ; Nessar et al., 2012 ; Dudek et al., 2014).

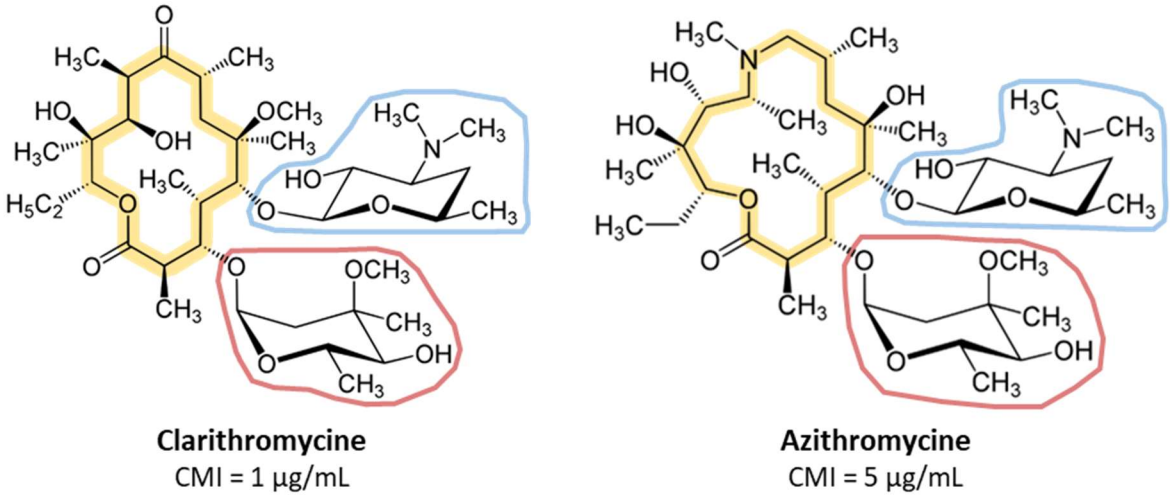


Figure 24 : Structure et activité antibactérienne *in vitro* contre *M. abscessus* de la clarithromycine et de l'azithromycine. Le cycle macrolactone est surligné en jaune, le désosamine en bleu et le cladinose en rouge. Adaptée de (Nessar et al., 2012).

La céfoxitine et l'imipénem sont les deux seules β-lactamines utilisées dans la thérapie contre *M. abscessus*. La céfoxitine est un antibiotique semi-synthétique de deuxième génération qui fait partie de la famille des céphamycines (Birnbaum et al., 1978). L'imipénem est également un antibiotique semi-synthétique qui appartient à la famille des carbapénèmes (Hellinger et al., 1999).

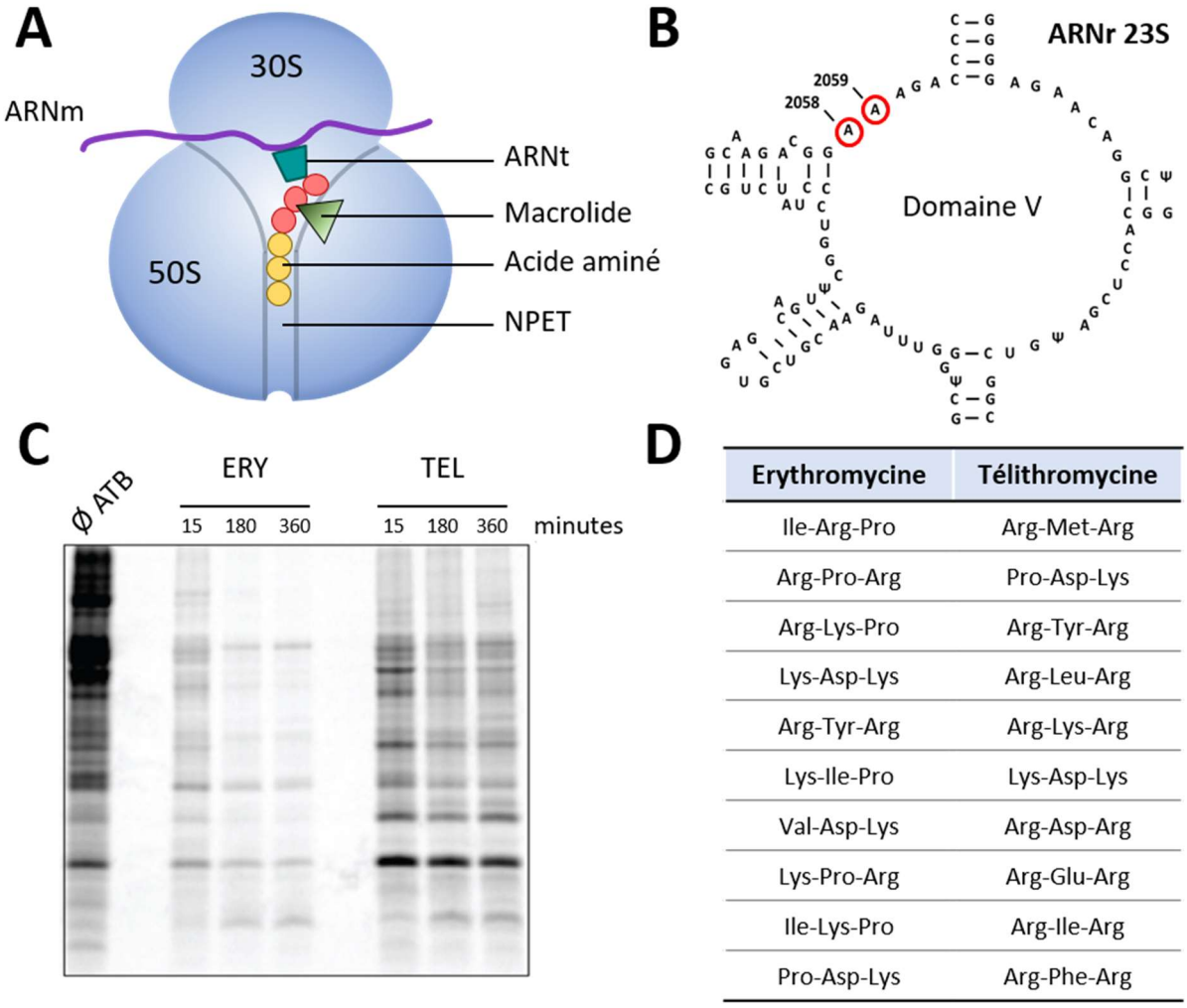
B) Les aminoglycosides

Les aminoglycosides, ou encore appelés aminosides, sont une classe d'antibiotiques qui ciblent la synthèse protéique et regroupent l'amikacine (AMK), la streptomycine, la kanamycine et la gentamicine. L'AMK est une molécule semi-synthétique dérivée de la kanamycine qui est considérée comme la deuxième molécule la plus importante dans le traitement anti-*M. abscessus* (**Figure 23A**) (Griffith et al., 2022). Cette famille d'antibiotiques interagit avec l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome au niveau du site A avec trois résidus adénines en position 1408, 1492 et 1493 (**Figure 23B et C**) (Dudek et al., 2014). Cette interaction va perturber la conformation du complexe formé entre l'ARMm et l'ARNt induisant une mauvaise lecture des codons et l'incorporation d'aminoacides ne correspondant pas au codon de l'ARNm. Ces antibiotiques vont favoriser une mauvaise traduction qui peut entraîner la synthèse de protéines mal repliées ou non fonctionnelles. L'incorporation de protéines membranaires mal repliées va alors déstabiliser l'intégrité de la membrane pouvant conduire à la mort cellulaire (Kohanski et al., 2010).

La tobramycine est un aminoglycoside non conventionnel qui possède une meilleure activité antibactérienne *in vitro* que l'AMK (Maurer et al., 2014a). Néanmoins, son utilisation en clinique reste limitée à cause de la résistance que possède *M. abscessus* à cette classe d'antibiotique (voir § **Chapitre II : III/ Mécanismes de résistance aux antibiotiques**).

C) Les macrolides

Les macrolides sont considérés comme les antibiotiques centraux dans la thérapie contre *M. abscessus*. Cette classe d'antibiotiques est caractérisée par un noyau formé d'un cycle macrolactone d'une taille qui peut varier de 12 à 16 atomes de carbone et souvent associé à des sucres via des liaisons glycosidiques (Vazquez-Laslop et al., 2018). La clarithromycine (CLR) et l'azithromycine (AZM), majoritairement utilisées dans la thérapie, sont des macrolides de deuxième génération dérivés de l'érythromycine et composés d'un cycle lactone de 14 et 15 atomes de carbone respectivement, lui-même associé aux sucres désosamine et cladinose (**Figure 24**) (Alvarez-Elcoro et al., 1999).



Erythromycine	Télithromycine
Ile-Arg-Pro	Arg-Met-Arg
Arg-Pro-Arg	Pro-Asp-Lys
Arg-Lys-Pro	Arg-Tyr-Arg
Lys-Asp-Lys	Arg-Leu-Arg
Arg-Tyr-Arg	Arg-Lys-Arg
Lys-Ile-Pro	Lys-Asp-Lys
Val-Asp-Lys	Arg-Asp-Arg
Lys-Pro-Arg	Arg-Glu-Arg
Ile-Lys-Pro	Arg-Ile-Arg
Pro-Asp-Lys	Arg-Phe-Arg

Figure 25 : Mécanisme d'action des macrolides. (A) Schéma simplifié de l'action des macrolides sur la synthèse protéique. Les macrolides interagissent avec l'ARNr 23S depuis le tunnel de sortie du ribosome (NPET), ce qui va bloquer l'activité du ribosome au niveau des « Macrolide-Arrest Motifs » (MAM) (en rouge). **(B)** Région de l'ARNr 23S possédant les deux résidus adénines (entourés en rouge) qui interagissent avec les macrolides **(C)** Analyse de la synthèse protéique d'*Escherichia coli* exposée à l'érythromycine (ERY) et à la télithromycine (TEL) avec une concentration supérieure à 100 fois la CMI au cours du temps. Les protéines nouvellement synthétisées ont été radiomarquées grâce à de la [^{35}S]-méthionine. Les protéines totales ont été extraites puis déposées sur gel SDS-PAGE. **(D)** Tableau regroupant les principaux MAM pour l'érythromycine et la télithromycine. Adaptée de (Kannan et al., 2012 ; Vazquez-Laslop et al., 2018).

Les macrolides sont des molécules à effet bactériostatique qui ciblent également les ribosomes. Au cours de la traduction, la chaîne protéique est synthétisée dans le centre peptidyltransférase du ribosome puis sort de la grande sous-unité par le tunnel de sortie du ribosome, appelé NPET (« Nascent Peptide Exit Tunnel ») (Frank et al., 1995). Les macrolides vont interagir au niveau du NPET avec deux résidus adénines 2058 et 2059 (annotation chez *E. coli*) de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome grâce au groupe diméthyl-amino de la désosamine (**Figure 25A et B**) (Pestka et al., 1974). Ces résidus sont présents au niveau du domaine V de l'ARNr 23S responsable de l'activité peptidyltransférase permettant la formation des liaisons peptidiques des protéines en cours de synthèse (Noller, 1984 ; Hansen et al., 1999). Pendant longtemps, cet encombrement stérique du NPET par les macrolides était considéré comme responsable de l'inhibition de l'activité du ribosome. Cependant, de nouvelles études ont permis de montrer que le mécanisme d'action des macrolides était plus complexe.

En 2012 Kannan *et al*., ont montré sur des cellules d'*Escherichia coli* traitées avec 100 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) avec différents macrolides, que même dans ces conditions la synthèse protéique n'était jamais complètement abolie (**Figure 25C**) (Kannan et al., 2012). Également, bien qu'ils aient pu observer que la traduction de nombreux polypeptides s'interrompait lorsque la chaîne protéique atteignait le site de liaison du macrolide dans le NPET, certains polypeptides avaient la capacité de se faufiler dans le NPET malgré la présence de l'antibiotique (Kannan et al., 2012). De ces observations, ils en ont déduit que les macrolides interféraient sélectivement sur la traduction et que cette interférence était dépendante de la structure du macrolide utilisé.

Des études complémentaires ont permis de montrer que l'arrêt de la traduction se produisait au niveau de séquences spécifiques, nommées « Macrolide-Arrest Motifs » (MAM), et si une protéine est dépourvue de MAM, la traduction du gène reste insensible à la présence de macrolides (Davis et al., 2014 ; Kannan et al., 2014). Ces MAM possèdent généralement des résidus arginine ou lysine dans leur séquence (**Figure 25D**). En outre, l'activité des macrolides serait corrélée avec la diversité de séquence des MAM affectée. Plus la diversité des MAM affectés par un macrolide est large, plus il y a de chance qu'une protéine en contienne un et plus le macrolide va pouvoir bloquer la synthèse d'un large panel de protéines (Vazquez-Laslop et al., 2018). Le motif Lys/Arg-X-Lys/Arg représente le site d'arrêt majoritaire. Les deux acides aminés lysine et arginine ont une chaîne latérale chargée et la plus longue parmi les vingt acides aminés. Ces deux caractéristiques peuvent être à l'origine du blocage du ribosome par les macrolides (Sothiselvam et al., 2016).

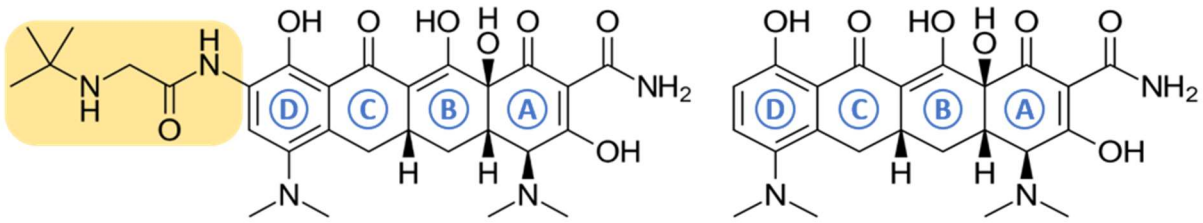


Figure 26 : Structure et activité antibactérienne *in vitro* des tétracyclines sur *M. abscessus*. La classe des tétracyclines est caractérisée par un noyau tétracyclique fusionné linéaire avec des anneaux désignés A, B, C et D. Adaptée de (Chopra et al., 2001 ; Nessar et al., 2012).

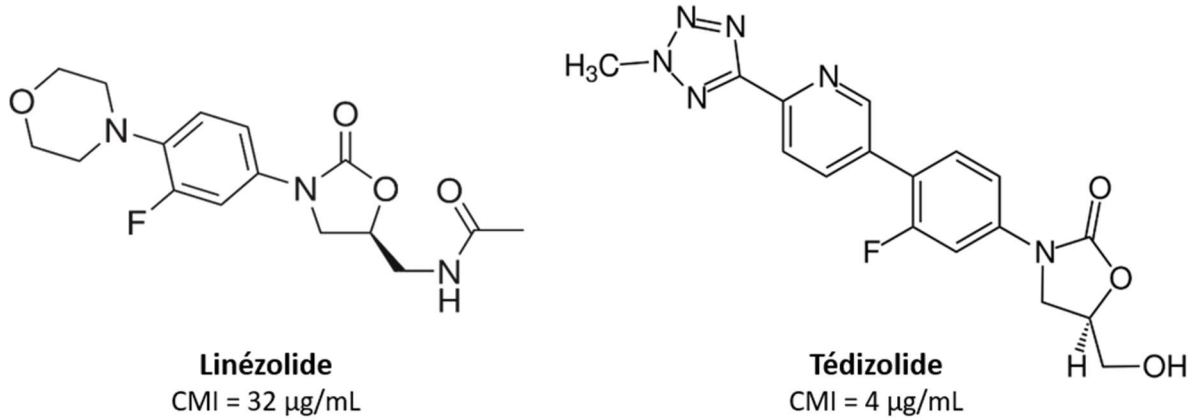


Figure 27 : Structure et activité antibactérienne *in vitro* du linézolide et du tédizolide sur *M. abscessus*. Les oxazolidinones sont des composés hétérocycliques qui contiennent un cycle à 5 atomes composé d'un atome d'azote et d'un atome de carbone. Adaptée de (Nessar et al., 2012).

Cependant, le mécanisme à l'origine du blocage provoqué par ces deux résidus en particulier n'est pas encore complètement résolu. Il est probable que la présence de l'antibiotique puisse limiter la dynamique de mouvement du NPET requis pour le passage de ces résidus bloquant ainsi le ribosome.

D) Les tétracyclines

La tigécycline et la minocycline sont des antibiotiques qui font partie de la classe des tétracyclines, découvertes dans les années 1940, caractérisée par un noyau tétracyclique fusionné linéaire (anneaux désignés A, B, C et D) (**Figure 26**) qui peut être rattaché à plusieurs groupes fonctionnels (Chopra et al., 2001). Ces antibiotiques ciblent la synthèse protéique en interagissant avec la petite sous-unité ribosomale, ce qui va empêcher l'accès des aminoacyl-ARNt au site A dans le centre peptidyltransférase et l'incorporation de nouveaux acides aminés dans le peptide en cours de synthèse (Chopra et al., 2001). Les tétracyclines ont un effet bactériostatique, car l'interaction avec leur cible est réversible. La tigécycline fait partie du groupe des glycylcyclines qui sont dérivés de la tétracycline et possède une chaîne 2-tert-butylglycylamido en position C9 du cycle aromatique D (**Figure 26**). Cet antibiotique n'est pas affecté par les principaux mécanismes de résistance à la tétracycline chez les bactéries comme l'efflux, la protection de la cible et l'inactivation enzymatique (Tally et al., 1995 ; Rudra et al., 2018).

La tigécycline est la seule tétracycline efficace sur *M. abscessus* et montre une efficacité clinique comme traitement de sauvetage chez des patients qui présentaient une maladie grave (Wallace et al., 2002 ; Wallace et al., 2014). Cependant, la tigécycline est uniquement recommandée par la « Food and Drug Administration » (FDA) dans le cadre d'un traitement d'infections difficiles en raison de ces effets secondaires qui peuvent être très graves (FDA, 2010). En revanche, la minocycline n'est pas active *in vitro* contre *M. abscessus* et a montré une très faible efficacité sur des isolats cliniques avec un pourcentage de susceptibilité de 5 % (Nessar et al., 2012). Également, la minocycline ne présente pas d'effet synergique avec d'autres antibiotiques comme la clarithromycine, l'amikacine, la céfoxitine ou encore la clofazimine (Ruth et al., 2018) et son efficacité clinique reste encore à être démontré.

E) Les oxazolidinones

Le linézolide est un antibiotique synthétique hétérocyclique de la famille des oxazolidinones qui bloque la synthèse protéique, et il est utilisé dans la deuxième phase du traitement anti-*M. abscessus* (**Figures 21 et 27**).

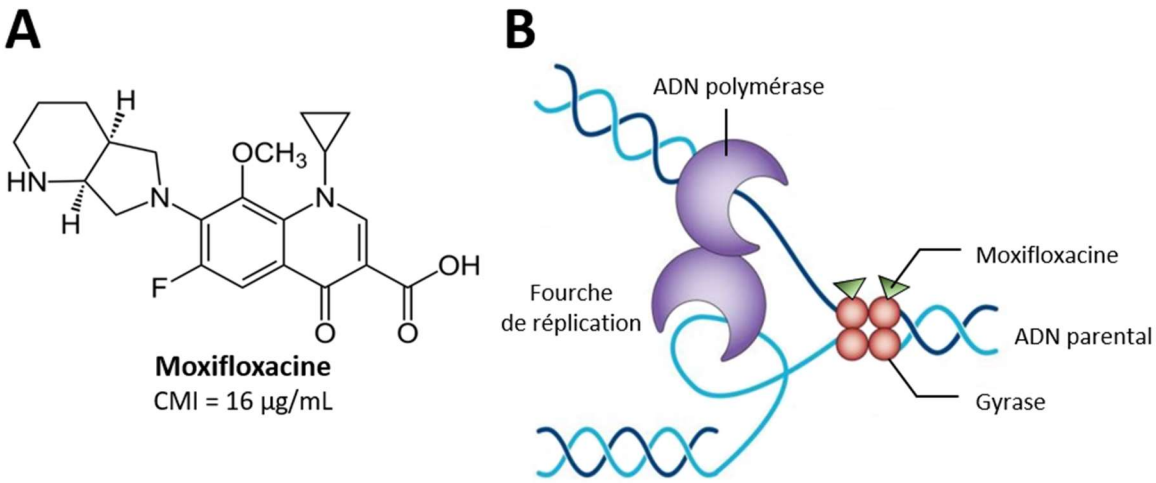


Figure 28 : Structure et mécanisme d'action de la moxifloxacine. (A) Structure et activité antibactérienne (CMI) *in vitro* de la moxifloxacine sur *M. abscessus*. **(B)** Schéma du mécanisme d'action des fluoroquinolones. Les fluoroquinolones piègent les topoisomérases sur l'ADN au stade de clivage pendant la réplication. La formation de ce complexe va provoquer des cassures de l'ADN et bloquer la machinerie de réplication. Adaptée de (Kohanski et al., 2010).

Cette famille d'antibiotiques va interagir avec plusieurs résidus de l'ARNr 23S au niveau du site A dans la poche où vont se lier les ARNt du centre peptidyltransférase de la grande sous-unité ribosomique (Ippolito et al., 2008). La présence de l'oxazolidinone va induire des changements conformationnels du centre peptidyltransférase qui vont alors bloquer la formation du complexe d'initiation de la traduction (Patel et al., 2001 ; Ippolito et al., 2008).

Le linézolide a tout d'abord été développé pour les infections graves dues aux bactéries à Gram positif résistantes. Puis, il a été utilisé pour le traitement des infections à *M. tuberculosis* multi-résistantes et ultra-résistantes (Zhang et al., 2014). Le tédizolide quant à lui a été récemment approuvé pour le traitement des infections à *M. abscessus* (**Figure 27**). En effet, cette molécule présente une meilleure activité *in vitro* contre *M. abscessus* avec, selon l'isolat clinique, des CMI 2 à 16 fois inférieures à celles du linézolide (Compain et al., 2018).

F) Les fluoroquinolones

La moxifloxacine est un antibiotique à effet bactéricide de quatrième génération faisant partie de la classe des fluoroquinolones (**Figure 28A**). Cet antibiotique est un dérivé de l'acide nalidixique qui cible les ADN topoisomérases II (gyrase) et IV (Drlica et al., 2008). Ces enzymes sont essentielles pour la réplication du chromosome bactérien, car elles permettent le déroulement de la double hélice d'ADN et le maintien de la fourche de réplication pour la progression de l'ADN polymérase (Drlica et al., 1997). Au cours du déroulement de l'ADN, la gyrase va générer des coupures temporaires de la double hélice et se lier de manière covalente aux extrémités 5' de l'ADN coupé permettant le passage d'un nouveau segment d'ADN (Mizuuchi et al., 1980). Aussi, la topoisomérase IV sera également requise pour les derniers stades de la réplication où elle est impliquée dans la séparation des deux chromosomes néo-synthétisés avant leurs ségrégations dans les cellules filles (Drlica et al., 1997). Les fluoroquinolones se lient aux topoisomérases, les piégeant sur l'ADN au stade du clivage et l'inhibition de leur activité enzymatique va empêcher la jonction des brins (**Figure 28B**). La formation du complexe ADN-enzyme et antibiotique va générer des cassures de l'ADN et bloquer la machinerie de réplication au niveau des fourches de réplication inhibant ainsi la synthèse de l'ADN (Drlica et al., 2008 ; Kohanski et al., 2010). Ces phénomènes vont finir par induire un fort stress cellulaire conduisant à la mort cellulaire.

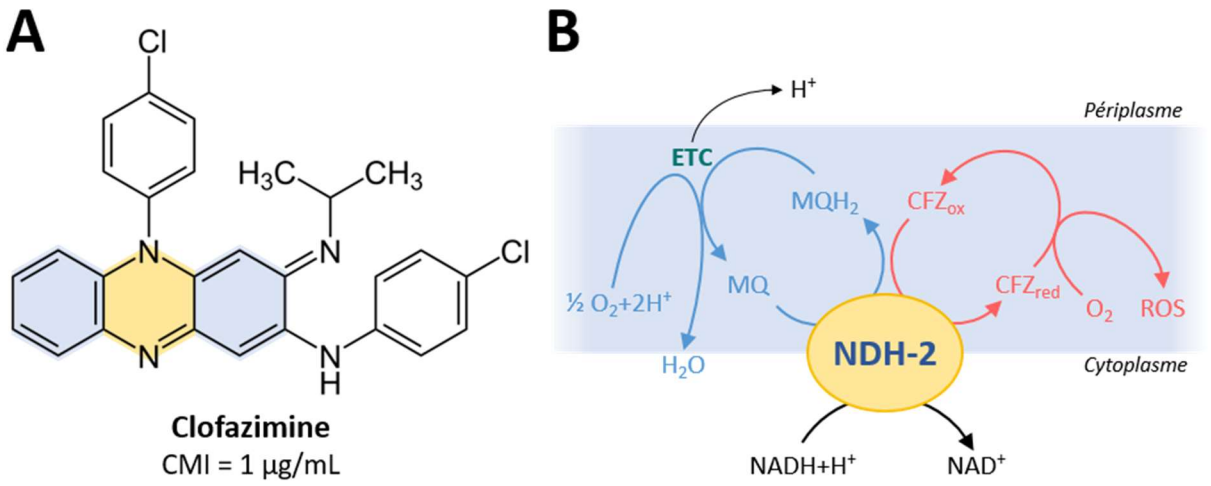


Figure 29 : Structure et modèle du mécanisme d'action du clofazimine. (A) Structure et activité antibactérienne (CMI) *in vitro* du clofazimine sur *M. abscessus*. La clofazimine est composée d'un noyau pyrazine (en jaune) fusionné avec deux cycles benzéniques (en bleu). **(B)** Modèle du mécanisme d'action du clofazimine proposé par Yano et *al.* chez *M. smegmatis*. La NDH-2 catalyse le transfert de protons à la ménaquinone qui va à son tour transférer les électrons vers les autres oxydoréductases de la chaîne respiratoire. La clofazimine va entrer en compétition comme substrat de la NDH-2 et sera réduite. La réoxydation de l'antibiotique va entraîner la production de ROS, toxique pour la cellule. Abréviations : ETC, « Electron transport chain » ; MQ, Ménaquinone ; CFZ, Clofazimine ; ox, oxydée ; red, réduite ; NDH-2, NADH oxydoréductase de type II. Adaptée de (Yano et al., 2011).

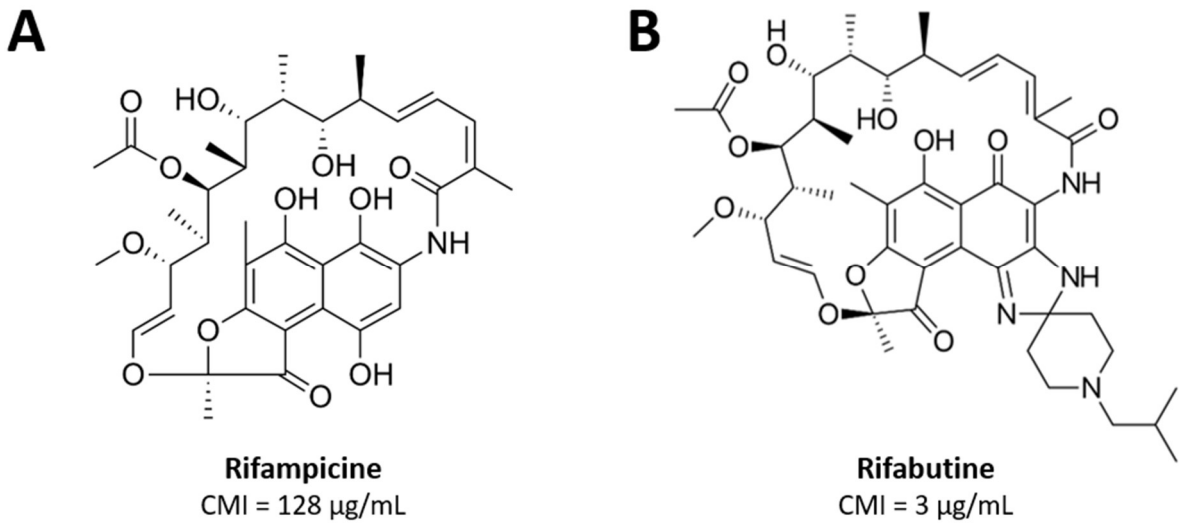


Figure 30 : Structure et activité antibactérienne *in vitro* de la rifampicine et de la rifabutine sur *M. abscessus*. (A) Structure de la rifampicine **(B)** Structure de la rifabutine, un dérivé de la rifampicine. Adaptée de (Aziz et al., 2017 ; Rominski et al., 2017a).

G) Les phénazines

La clofazimine est une molécule lipophile qui possède un noyau phénazine, un composé aromatique tricyclique constitué de pyrazine fusionné avec deux cycles benzéniques (**Figure 29A**). Initialement, la clofazimine a été utilisée comme médicament anti-lépreux puis repositionnée dans le traitement de *M. tuberculosis* multi-résistante et ultra-résistante (Mirnejad et al., 2018). Cette molécule possède également une activité antibactérienne sur les MNT et en particulier sur le MABSC avec des CMI *in vitro* comprise entre 0,125 et 8 µg/mL en fonction des isolats cliniques (Schulthess et al., 2022).

Le mécanisme d'action n'a pas été encore complètement identifié, cependant une étude de Yano *et al* en 2011 a permis de proposer un mécanisme en lien avec la chaîne respiratoire chez *M. smegmatis*. La clofazimine peut être réduite par l'enzyme membranaire NADH oxydoréductase de type II (NDH-2), qui en condition physiologique catalyse le transfert de proton et d'électron du $NADH/H^+$ à la ménaquinone, impliquée dans l'activité de la chaîne respiratoire chez les mycobactéries (**Figure 29B**) (Weinstein et al., 2005 ; Yano et al., 2011). La forme réduite de la clofazimine est instable et va être réoxydée en réagissant avec l'oxygène ce qui va entraîner la libération importante de ROS qui peut s'avérer toxique pour la bactérie.

II/ Autres possibilités thérapeutiques

La résistance naturelle de *M. abscessus* à plusieurs classes d'antibiotique et l'émergence de nouvelle souche multi-résistante représentent un réel défi pour les cliniciens. Le taux de guérison d'une infection à *M. abscessus* reste relativement faible allant de 30 à 50 % (Jarand et al., 2011). Aujourd'hui, la recherche d'alternative thérapeutique pour traiter ces infections et augmenter le pourcentage de succès du traitement reste une priorité pour la communauté scientifique.

A) Les rifamycines

Les rifamycines sont des antibiotiques bactéricides qui ciblent la synthèse d'ARN en interagissant avec la sous-unité β de l'ARN polymérase, codée par le gène *rpoB*, lors de la phase d'initiation de la transcription (Campbell et al., 2001 ; Floss et al., 2005). Cette interaction va alors bloquer stériquement l'extension de la chaîne d'ARN naissante après la première ou deuxième étape d'élongation (Campbell et al., 2001). Les rifamycines présentent un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et négatif. La rifampicine est devenue un médicament de choix dans le traitement de la tuberculose, mais ne peut pas être utilisée en clinique contre *M. abscessus* en raison de sa faible activité (**Figure 30A**) (Chopra et al., 2011).

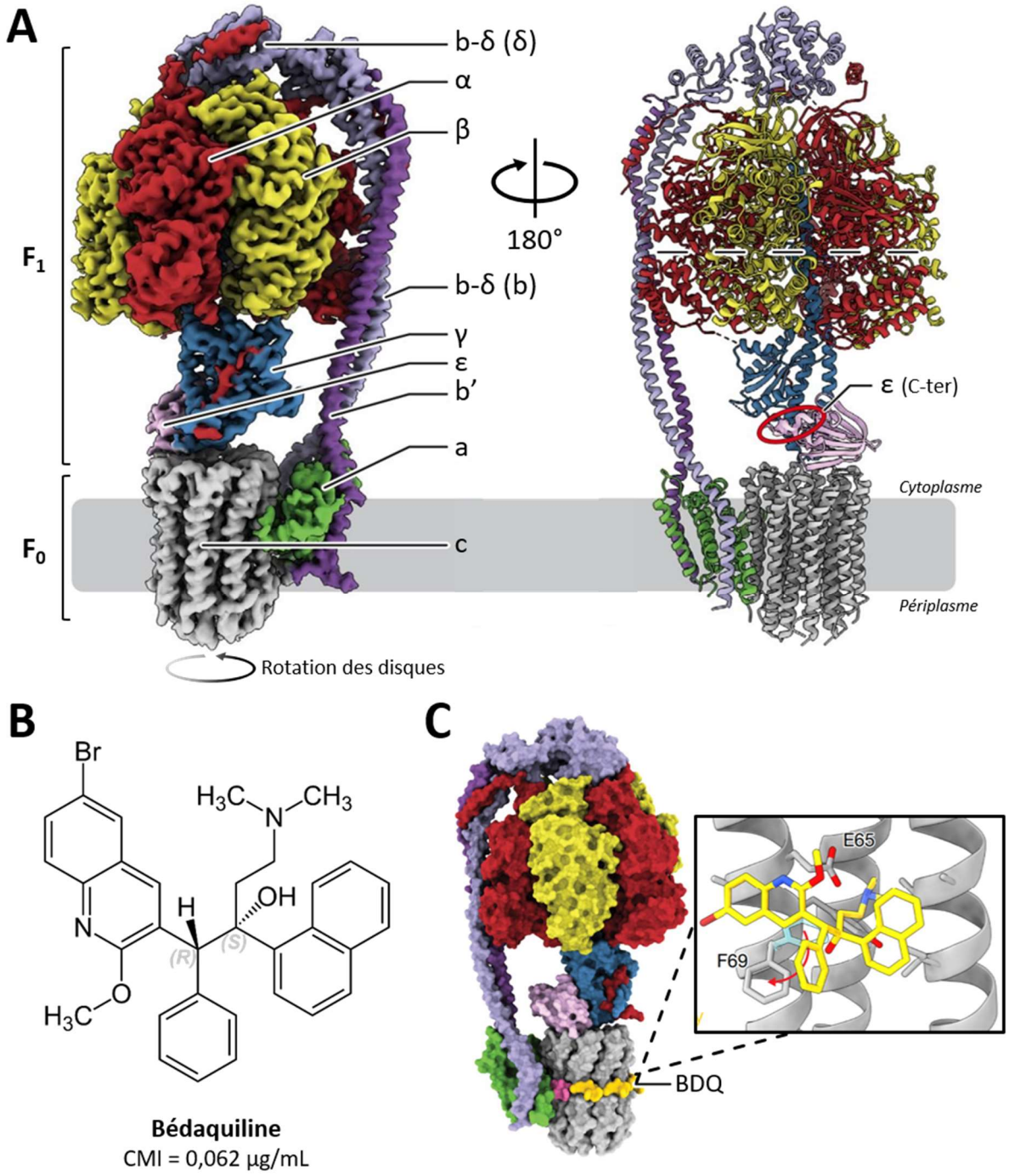


Figure 31 : ATP synthase mycobactérienne et bédaquiline (A) Structure tridimensionnelle de l'ATP synthase mycobactérienne. L'ATP synthase possède deux domaines F_0 composé de 13 à 15 sous-unités (a, b_2 et $c_{9\text{-}12}$), et F_1 composé de 9 sous-unités (α3, β3, γ, δ et ε). **(B)** Structure et activité antibactérienne (CMI) *in vitro* de la bédaquiline sur *M. abscessus*. **(C)** Structure de l'ATP synthase de *M. smegmatis* liée avec de la bédaquiline (BDQ). La bédaquiline interagit avec deux résidus au niveau des sous-unités c. Adaptée de (Guo et al., 2021).

Le criblage de molécules approuvées par la FDA contre *M. abscessus* a permis de montrer qu'un dérivé de la rifampicine, la rifabutine, présentait une bonne activité antibactérienne sur le MABSC ainsi que sur plusieurs isolats cliniques (**Figure 30B**) (Aziz et al., 2017). Des études complémentaires ont permis de montrer que la rifabutine est également active et permet de réduire la charge bactérienne dans un modèle macrophage, chez le poisson zèbre et chez la souris (Dick et al., 2020 ; Johansen et al., 2020b). De plus, elle présente des propriétés pharmacodynamiques intéressantes puisque la molécule possède une demi-vie longue, pénètre dans les tissus et a une meilleure tolérance chez les patients que la rifampicine (Ganapathy et al., 2019). La rifabutine présente également un potentiel synergique avec d'autres antibiotiques *in vitro* comme l'imipénem (Le Run et al., 2018), la tigécycline ou la CLR (Cheng et al., 2019).

B) Les diarylquinolines

La bédaquiline (ou TMC2017, ou R207910) est un antibiotique de synthèse qui fait partie d'une nouvelle famille d'antibiotiques, les diarylquinolines. Elle a été découverte lors d'un criblage de nouveaux composés antituberculeux sur la croissance de *M. smegmatis* (Andries et al., 2005). Il a été rapporté que la bédaquiline possède une puissante activité *in vitro* sur des souches de *M. tuberculosis* présentant différents profils de sensibilité aux antibiotiques, ainsi que sur d'autres espèces mycobactériennes incluant le MAC, *M. kansasii*, *M. abscessus* et *M. fortuitum* (Andries et al., 2005). Son activité est telle qu'en 2013, l'Organisation mondial de la Santé (OMS) recommande son utilisation dans le cadre d'une antibiothérapie contre des souches *M. tuberculosis* multi-résistantes (OMS, 2013).

La bédaquiline va interférer dans la production d'énergie en inhibant l'activité de l'ATP synthase mycobactérienne (**Figure 31**). L'ATP synthase possède deux domaines F_0, un domaine transmembranaire composé de 13 à 15 sous-unités (a, b_2 et c_{9-12}), et F_1, un domaine cytoplasmique composé de 9 sous-unités (α3, β3, γ, δ et ε), qui agissent comme un moteur rotatif alimenté par la force proton motrice (Cole et al., 2005). Les sous-unités c sont organisées en disques symétriques capables de tourner. Il a été montré chez *M. abscessus* que la bédaquiline se lie avec les résidus aspartate 32 et alanine 64 se situant à l'interface des sous-unités a et c du domaine F_0 (Dupont et al., 2017). Cette interaction va bloquer la rotation des disques et ainsi interférer dans la synthèse d'ATP (Haagsma et al., 2011).

La bédaquiline s'est montrée très active contre le MABSC et contre plusieurs isolats cliniques avec des CMI *in vitro* comprises entre 0,03 et 0,125 µg/mL (Dupont et al., 2017 ; Brown-Elliott et al., 2019).

De plus, il a été montré dans le modèle du poisson zèbre que la bédaquiline permet de limiter la formation des cordes et d'abcès chez les larves et favorise leur survie (Dupont et al., 2017). Par ailleurs, l'effet de la bédaquiline peut être également potentialisé chez *M. abscessus* grâce à l'ajout de vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques approuvé par la FDA, qui provoque le blocage des pompes à efflux (Viljoen et al., 2019).

Finalement, l'utilisation de la bédaquiline dans la thérapie contre *M. abscessus* semble encourageante. En effet, il a été rapporté une réponse favorable à un schéma thérapeutique contenant de la bédaquiline chez des patients infectés par *M. abscessus* dont les traitements antibiotiques préalables avaient échoué (Philley et al., 2015). Toutefois, l'effet clinique chez les patients infectés reste pour l'instant très peu documenté.

C) Association d'antibiotiques

L'association d'antibiotiques est utilisée pour trois raisons principales : obtenir un spectre antibactérien plus large dans le cas d'infection polymicrobienne, éviter la sélection de bactéries résistantes à une classe d'antibiotique donnée, et augmenter l'activité antibactérienne. Lorsqu'on associe deux molécules antibiotiques, trois types d'interactions peuvent être observés :

- **(i)** L'indifférence dont l'activité antibactérienne d'un antibiotique n'est pas affectée par la présence de l'autre et inversement ;
- **(ii)** La synergie qui résulte d'une activité de l'association significativement supérieure à la somme des activités de chaque antibiotique étudié séparément ;
- **(iii)** L'antagonisme dont l'association diminue l'effet de l'un ou de l'autre des antibiotiques. L'activité de cette association est inférieure à la somme des effets de chaque antibiotique étudié individuellement (Gunnison et al., 1953).

L'effet d'une association d'antibiotiques peut être évalué *in vitro* grâce à la méthode de l'échiquier en milieu liquide en microplaque 96 puits (Martinez-Irujo et al., 1996). Cette technique consiste à réaliser une gamme de concentration d'un antibiotique A dans chaque ligne et d'un antibiotique B dans chaque colonne. Ainsi, chaque puits contient une combinaison unique en antibiotique A et B. L'effet de la combinaison est ensuite mesuré par inhibition de la croissance bactérienne (Bellio et al., 2021). L'index de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI) est le paramètre de référence pour quantifier l'interaction entre deux antibiotiques dans une combinaison (Odds, 2003).

Table 3 : Récapitulatif des études de synergie avec les macrolides sur *M. abscessus*.

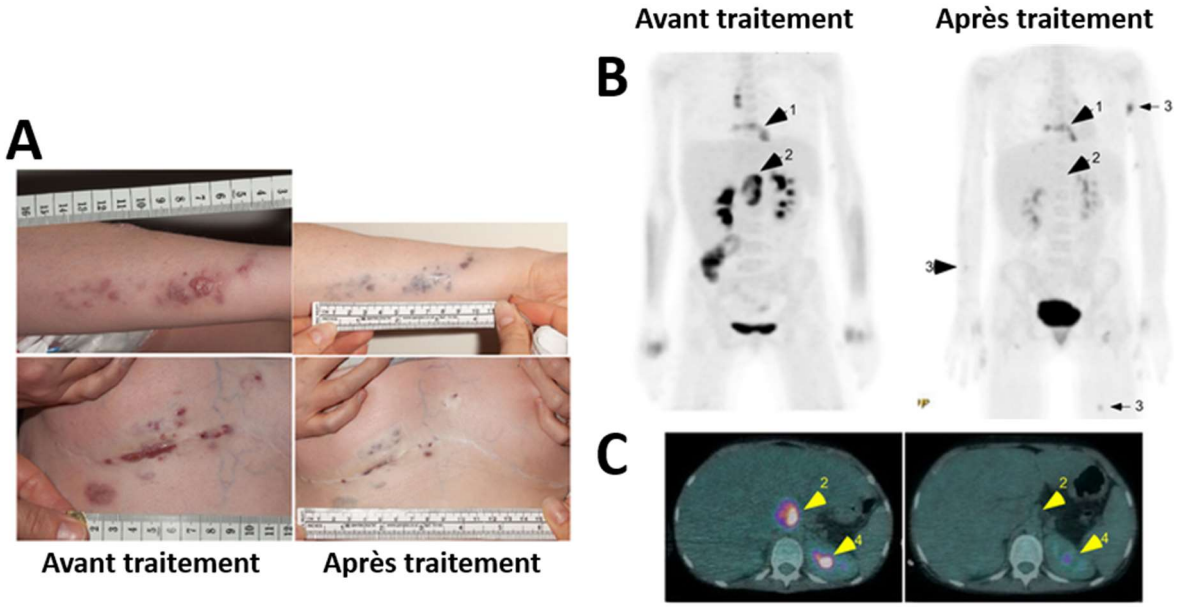
Associations	Type d'étude	Références
Clarithromycine + Imipénem	*In vitro*	(Miyasaka et al., 2007) (Takei et al., 2020)
Clarithromycine + Linézolide	*In vitro*	(Cremades et al., 2009)
Clarithromycine + Linézolide + Moxifloxacine/Lévofloxacine/Gatifloxacine	*In vitro*	(Cremades et al., 2009)
Clarithromycine + Rifabutine + Ciprofloxacine	*In vitro*	(Cremades et al., 2009)
Azithromycine + Moxifloxacine	*In vitro* *In vivo*	(Choi et al., 2012a)
Clarithromycine + Tigécycline	*In vitro*	(Zhang et al., 2017) (Huang et al., 2013)
Clarithromycine + Moxifloxacine	*In vitro* *In vivo*	(Zhang et al., 2017) (Choi et al., 2012a)
Clarithromycine + Vancomycine	*In vitro*	(Mukherjee et al., 2017)
Clarithromycine + Rifabutine + Tigécycline	*In vitro*	(Pryjma et al., 2018)
Clarithromycine + Tédizolide	*In vitro*	(Compain et al., 2018)
Clarithromycine + Rifabutine	*In vitro*	(Cheng et al., 2019)
Clarithromycine + Omadacycline	*In vitro* *In vivo*	(Bich Hanh et al., 2021)
Clarithromycine + Bédaquiline	*In vitro*	(Bich Hanh et al., 2021)
Clarithromycine + Oritavancine	*In vitro*	(Wang et al., 2021)
Clarithromycine + Rifaximine	*In vitro* *In vivo*	(Goh et al., 2023)

La concentration inhibitrice fractionnaire (FIC) de l'antibiotique A se définit comme la CMI de l'antibiotique A dans la combinaison divisée par la CMI de l'antibiotique A seul et inversement pour le FIC de l'antibiotique B. La somme des FIC_A et FIC_B donne le FICI. Une combinaison dont le FICI est inférieur à 0,5 est considérée comme synergique, compris entre 0,5 et 4, l'effet est considéré comme indifférent et lorsque le FICI est supérieur à 4 comme antagoniste (Odds, 2003). Les associations d'antibiotiques peuvent être également représentées sous forme d'un isobologramme, c'est-à-dire une représentation graphique du FIC_A en fonction du FIC_B. Ce mode de représentation permet de déterminer visuellement si une association a un effet synergique, indifférent ou antagoniste.

Il existe de nombreuses études *in vitro* qui testent le potentiel synergique d'antibiotiques déjà utilisés en clinique. Ces études permettent d'identifier les meilleures interactions entre les antibiotiques afin d'avoir une stratégie optimale. Beaucoup d'études se sont concentrées sur l'association de molécules avec les macrolides qui représentent le pilier dans l'antibiothérapie. L'ensemble de ces études synergiques a été compilé dans la **Table 3**. L'objectif était non seulement de potentialiser l'effet antibactérien des macrolides, mais également de trouver un moyen de lutter contre une résistance inductible aux macrolides présente chez *M. abscessus* (voir § **Chapitre II : III/ E) Protection de la cible**). Par exemple, lorsque la CLR est associée avec la vancomycine ou la rifabutine un effet synergique est observé sur *M. abscessus* ainsi que sur plusieurs isolats cliniques (Mukherjee et al., 2017 ; Cheng et al., 2019). Ces associations étaient également actives sur des souches préalablement exposées aux macrolides qui présentaient un phénotype de résistance à la CLR.

Cependant, les interactions entre les antibiotiques peuvent être différentes d'une souche à une autre. En effet, il a été montré que l'association de la CLR ou de l'AZM avec la moxifloxacine pouvait avoir un effet synergique sur certaines souches et un effet antagoniste sur d'autres souches *in vitro* (Choi et al., 2012a). En revanche, il a été rapporté que la combinaison CLR et moxifloxacine avait un effet bénéfique dans le traitement d'infections cutanées provoquées par *M. abscessus* par rapport à une combinaison CLR et AMK (Choi et al., 2011).

Le manque d'étude *in vivo* ne permet pas encore de prédire l'effet bénéfique d'une association d'antibiotique chez un patient présentant une infection. En effet, les tests *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte plusieurs paramètres comme la pharmacocinétique ou la pharmacodynamique. Ceci explique pourquoi certaines données sur les synergies peuvent être différentes entre les études *in vitro* et *in vivo*.



<u>Figure 32 :</u> Utilisation des bactériophages dans le traitement de *M. abscessus*. Le patient présentait une infection disséminée par une souche de *M. abscessus* multi-résistante. **(A)** Suivi des plaies cutanées sur le bras gauche et la poitrine avant et après traitement aux bactériophages **(B-C)** PET scan du corps entier **(B)** et coupe transversale **(C)** avant et après traitement. La flèche 1 montre la zone sternale et les tissus mous environnants ; la flèche 2, les ganglions lymphatiques abdominaux et la flèche 3 les nodules cutanés, respectivement. La flèche 4 indique une fonction rénale normale. Adaptée de (Dedrick et al., 2019).

D) Les mycobactériophages

L'émergence de bactéries multi-résistantes aux médicaments devient de plus en plus problématique et représente un défi de taille pour les cliniciens. La phagothérapie est devenue un candidat important en tant qu'alternative thérapeutique. Les bactériophages thérapeutiques sont des virus lytiques spécifiques aux bactéries qui peuvent être isolés à partir de plusieurs niches écologiques telles que le sol et l'eau (Summers, 2012). Les phages ont été découverts en 1897 par Félix d'Hérelle lors d'une étude épidémiologique de dysenterie hémorragique sévère chez des soldats français (Sulakvelidze et al., 2001). La première tentative d'utilisation des phages en thérapeutique a été réalisée chez un jeune patient de 12 ans atteint de dysenterie sévère. Suite à l'administration d'une préparation de phages, les symptômes ont disparu et l'état du patient s'est nettement amélioré sans que le traitement ne présente d'effet indésirable. L'efficacité du traitement par les phages a ensuite été validée par d'autres études (Schless, 1932 ; Summers, 1999). Avec l'avènement des antibiotiques, la phagothérapie a été progressivement abandonnée dans la majeure partie des pays occidentaux. Néanmoins, elle a continué à être utilisée dans l'ex-Union soviétique et en Europe de l'Est.

Les phages thérapeutiques sont des outils attractifs, car ils sont spécifiques de l'agent pathogène qu'ils infectent, n'infectent pas les cellules eucaryotes, et lysent les bactéries cibles au point d'infection (Azimi et al., 2019). Plusieurs mycobactériophages ont été étudié dans le cadre d'un traitement contre la tuberculose et en particulier pour des souches multi-résistantes et ultra-résistantes (Azimi et al., 2019). Ces études ont permis de montrer que les phages étaient capables de lyser efficacement la bactérie et lorsqu'ils sont formulés dans des liposomes, ils sont capables d'atteindre les bactéries intracellulaires.

Les phages ont été utilisés pour la première fois en 2019 pour traiter un patient atteint de mucoviscidose qui présentait une infection disséminée par une souche de *M. abscessus* multi-résistante et dont toutes les options thérapeutiques avaient été épuisées (Dedrick et al., 2019). Après six semaines de traitement avec un cocktail de phage, l'état clinique du patient s'est amélioré avec une diminution du nombre de nodules cutanés, une guérison des plaies cutanées et une amélioration de la fonction pulmonaire (**Figure 32**). Par la suite, l'utilisation de phages contre *M. abscessus* chez des patients en impasse thérapeutique a montré des résultats cliniques favorables sans aucune apparition de résistance (Dedrick et al., 2023). En outre, il existe une différence de sensibilité aux phages entre les différents isolats de *M. abscessus*, mais également entre les morphotypes S et R.

En effet, il a été montré que pour un phage donné le variant S n'est pas efficacement tué contrairement au morphotype R, suggérant que le morphotype est un élément important à prendre en compte dans la sensibilité aux phages (Dedrick et al., 2021).

Finalement, l'application des mycobactériophages dans le traitement des infections à *M. abscessus* est encore à l'étude et leur utilisation en tant que traitement compassionnel chez des patients en impasse thérapeutique permet de fournir des informations utiles pour un futur emploi comme alternative thérapeutique.

III/ Mécanismes de résistance aux antibiotiques

En raison de sa polyrésistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques couramment utilisés, incluant les antituberculeux classiques, *M. abscessus* est qualifiée de « cauchemar pour les antibiotiques » (Nessar et al., 2012). Les mécanismes de résistance sont divers et peuvent concerner : l'imperméabilité de la membrane, le polymorphisme génétique, l'inactivation ou le relargage des antibiotiques, et la modification de la cible.

A) Imperméabilité de l'enveloppe bactérienne

L'enveloppe mycobactérienne forme une barrière physique contre les molécules toxiques. Son rôle dans la résistance intrinsèque aux antibiotiques a été largement démontré. En 1990, Jarlier et Nikaido ont montré l'implication de la paroi dans la faible perméabilité des β-lactamines chez *M. chelonae*, espèce anciennement regroupée avec *M. abscessus* (Jarlier et al., 1990). En effet, les auteurs ont constaté que la pénétration de différentes β-lactamines était significativement réduite par rapport à la pénétration de ces molécules chez *E. coli* ou encore *P. aeruginosa*. Ce faible afflux peut expliquer la faible activité de ces antibiotiques contre cette espèce. De même, chez *M. abscessus* l'imperméabilité de la paroi serait également responsable de la résistance aux antibiotiques hydrophiles. Entre autres, elle serait également impliquée dans la résistance aux aminoglycosides et aux rifamycines, en plus des enzymes modificatrices (Nessar et al., 2012 ; Becker et al., 2017).

La haute teneur en lipides de la paroi mycobactérienne (voir § **Chapitre I : III/ La paroi mycobactérienne** et **Figure 6**) est considérée comme un des facteurs principaux responsables de sa faible perméabilité aux molécules extérieures hydrophiles. Un autre facteur impliqué dans le passage des solutés à travers la membrane est la présence de porines dans l'enveloppe bactérienne qui permettent le flux rapide des antibiotiques.

Espèces	Séquence ERDR	Phénotype
M. tuberculosis	– SDDY**IL**GMAR**V**A**D**HAGYM**S**N –	Sensible
M. abscessus	– SDDY**QM**GMAR**T**A**E**HAGYM**A**N –	Résistant
M. chelonae	– SDDY**QM**GMAR**T**A**E**HAGYM**A**N –	Résistant

Figure 33 : Résistance naturelle de *M. abscessus* à l'éthambutol. Comparaison de la séquence ERDR (« Ethambutol Resistance Determining Region ») de EmbB chez trois espèces mycobactériennes *M. tuberculosis*, *M. abscessus* et *M. chelonae*. Les résidus en rouge correspondent au polymorphisme présent chez *M. abscessus* responsable du phénotype résistant à l'éthambutol. Les résidus en bleu montrent les différences de séquence ERDR chez les trois espèces. Adaptée de (Sreevatsan et al., 1997).

Chez les mycobactéries, le nombre restreint de porines par rapport à *E. coli* qui sont moins permissives aux solutés réduit la perméabilité de la paroi aux antibiotiques. Toutefois, l'imperméabilité de l'enveloppe ne suffit pas à expliquer la grande résistance de *M. abscessus* aux antibiotiques.

B) Polymorphisme génétique et mutations acquises

L'étude de la résistance aux antibiotiques à l'échelle du génome a permis de rapporter une corrélation entre le génotype et la sensibilité aux antibiotiques. La résistance génotypique peut être due à deux mécanismes : le polymorphisme génétique ou à l'acquisition de mutation dans les gènes ciblés par les antibiotiques.

Les connaissances sur cette résistance reposent principalement sur l'analyse comparative de certains gènes dont les homologues sont déjà connus pour être impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez d'autres espèces bactériennes.

i. Résistance naturelle

Une des raisons pourquoi *M. abscessus* est résistant aux antituberculeux de première intention s'explique par la présence d'un polymorphisme génétique au niveau des gènes ciblés par les antibiotiques. La résistance à l'éthambutol et aux fluoroquinolones sont de bons exemples.

L'éthambutol est un antibiotique qui va agir sur l'enveloppe mycobactérienne en ciblant les arabinosyltransférases, codées par l'opéron *embCAB*, impliquées dans l'arabinosylation de l'AG et du LAM (Telenti et al., 1997). Par ailleurs, il a été rapporté que des mutations dans le gène *embB* sont associées à une résistance à cette molécule chez *M. tuberculosis* (Sreevatsan et al., 1997). *M. abscessus* présente un haut niveau de résistance à l'éthambutol avec une valeur de CMI supérieure à 64 µg/mL. Cette résistance est due à une variation de nucléotide au sein d'une séquence unique dans la région conservée ERDR (« Ethambutol Resistance Determining Region ») du gène *embB* (*MAB_0185c*) (Alcaide et al., 1997). Cette variabilité de séquence a pour conséquence qu'au niveau de la protéine, des différences dans les acides aminés sont observées entre *M. abscessus* et une souche sensible comme *M. tuberculosis* (**Figure 33**). En effet, les résidus isoleucine en position 303 et leucine en position 304 présents chez *M. tuberculosis* sont substitués par un résidu glutamine et méthionine respectivement chez *M. abscessus* (Alcaide et al., 1997). D'autant plus, il a été montré que la présence de ces deux résidus glutamine et méthionine à ces positions est associée à un phénotype résistant à l'éthambutol (Sreevatsan et al., 1997).

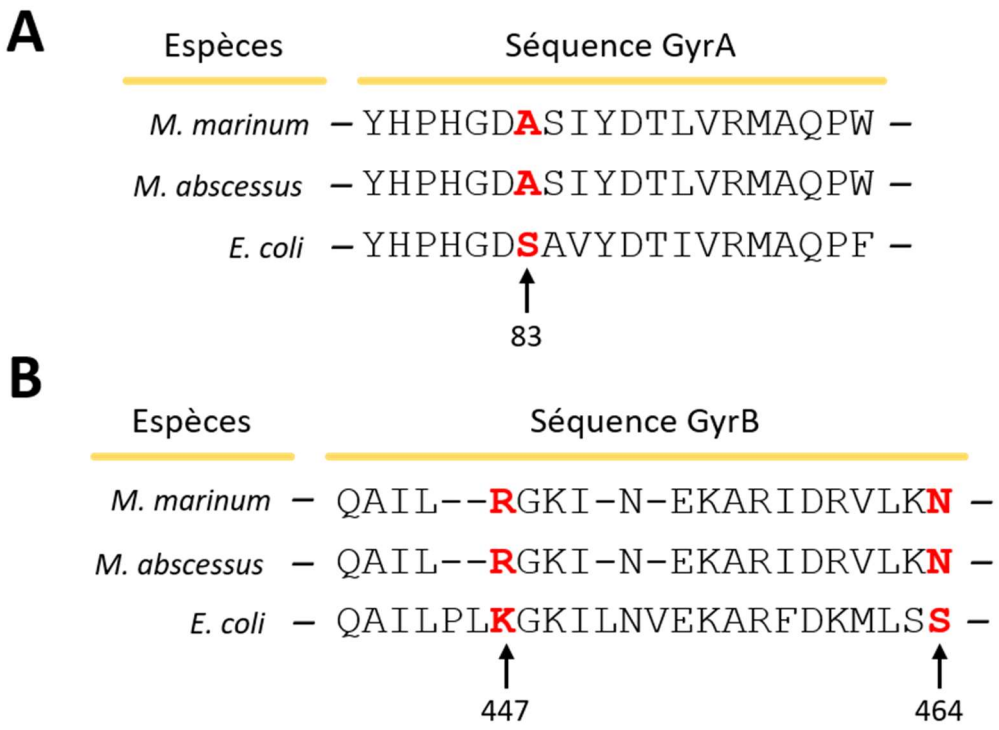


Figure 34 : Résistance aux fluoroquinolones. Comparaison de la séquence QRDR (« Quinolone Resistance Determining Region ») de GyrA **(A)** et GyrB **(B)** chez trois espèces bactériennes *M. marinum*, *M. abscessus* et *E. coli*. Le polymorphisme présent au niveau des résidus (en rouge) 83 de GyrA, 447 et 464 de GyrB est responsable de la résistance aux fluoroquinolones. Adaptée de (Guillemin et al., 1998 ; Nessar et al., 2012).

Un autre exemple de résistance dû à un polymorphisme génique est la résistance aux fluoroquinolones qui agissent sur l'ADN gyrase composé de deux sous-unités GyrA et GyrB. Guillemen *et al*. ont étudié la résistance intrinsèque aux fluoroquinolones chez plusieurs espèces mycobactériennes en analysant les différences de nucléotides au niveau des régions QRDR (« Quinolone Resistance Determining Region ») dans les gènes *gyrA* et *gyrB* qui codent pour les deux sous-unités de l'ADN gyrase (Guillemin et al., 1998). Les auteurs ont montré que la présence d'une alanine en position 83 dans GyrA et d'une arginine ainsi que d'une asparagine en position 447 et 464 respectivement dans GyrB est corrélée avec une résistance à ces molécules chez *M. abscessus*, mais également chez d'autres espèces comme *M. chelonae*, *M. marinum* et *M. avium* (**Figure 34**) (Guillemin et al., 1995 ; Guillemin et al., 1998).

ii. Résistance acquise

À la suite d'une exposition prolongée ou répétée aux antibiotiques, *M. abscessus* est capable d'acquérir une résistance génotypique grâce à l'apparition de mutations ponctuelles dans les gènes ciblés par les antibiotiques. Ces mutations surviennent lorsque la pression de sélection exercée par l'antibiotique est élevée, puis cette condition environnementale va sélectionner la population bactérienne devenue résistante. Ainsi, lors de la réplication bactérienne, les cellules filles garderont la mutation acquise par la cellule mère et conserveront leur phénotype de résistance.

En tout premier lieu, il a été montré que la résistance aux aminoglycosides est liée avec l'apparition d'une mutation unique dans le gène *rrs* (*MAB_r5051*) qui code pour l'ARNr 16S, cible de ces antibiotiques (Nessar et al., 2011b). À ce jour, plusieurs mutations par substitutions ont été rapportées chez *M. abscessus* et comptent aux totales quatre mutations : A1408G, T1406A, C1409T et G1491T (Prammananan et al., 1998 ; Nessar et al., 2011b). Ces résidus sont importants pour l'interaction des aminoglycosides avec l'ARNr 16S et la modification d'un de ces résidus va faire diminuer l'affinité de l'antibiotique pour sa cible. Sans compter que *M. abscessus* possède une seule copie du gène *rrs*. Finalement, la mutation d'un de ces résidus entraîne l'apparition d'une résistance aux aminoglycosides.

Comme pour les aminoglycosides, la résistance aux macrolides est associée à l'apparition d'une mutation unique dans le gène *rrl* (*MAB_r5052*) qui code pour l'ARNr 23S. La caractérisation de cette mutation responsable de la résistance chez *M. abscessus* a permis de montrer que le résidu adénine 2270 ou 2271 (**Figure 25**), correspondant aux résidus 2058 et 2059 dans l'annotation d'*E. coli* (voir § **Chapitre II : I/ C) Les macrolides**), peut être substitués par une guanine, une cytosine ou une thymine (Wallace et al., 1996 ; Lipworth et al., 2019). Ceci étant, ces deux positions ne sont pas exclusives puisqu'une autre mutation en position 2269 (soit 2057 chez *E. coli*), résidu proche du site d'interaction des macrolides, a été rapporté chez des isolats cliniques de *M. abscessus* résistants à la CLR (Luo et al., 2015 ; Rubio et al., 2015). La mutation des résidus à proximité du centre d'interaction des macrolides avec leur cible avait déjà été rapportée chez d'autres bactéries (Vester et al., 2001). L'ensemble de ces études a permis de montrer que les mutations à ces différentes positions pourraient modifier l'affinité du macrolide pour sa cible et diminuant ainsi l'activité de l'antibiotique.

Quant à la résistance acquise aux fluoroquinolones, différentes études ont rapporté des résultats contradictoires. En 2012, Monego *et al.* ont rapporté l'apparition de mutation dans GyrA (Ala90Val), tandis qu'aucune mutation dans *gyrB* n'a été caractérisée (Monego et al., 2012). En revanche, l'étude de Kim *et al.* en 2018 n'a pas détecté de mutation dans GyrA et GyrB chez des souches présentant un phénotype de résistance aux fluoroquinolones (Kim et al., 2018). Pris ensemble, les résultats de ces études semblent indiquer qu'il est possible que la résistance aux fluoroquinolones n'implique pas un, mais plusieurs mécanismes de résistance.

C) Export par les pompes à efflux

Le relargage des antibiotiques dans le milieu extracellulaire par les pompes à efflux est un des mécanismes responsables de la résistance intrinsèque bactérienne aux antimicrobiens qui est désormais bien connu (De Rossi et al., 2006 ; Louw et al., 2009). S'ajoute à cela que certains transporteurs ont la capacité d'extruder un large spectre de médicaments qui ne sont pas forcément structurellement apparentés. Tandis qu'il existe de nombreuses études sur les transporteurs impliqués dans l'export des antibiotiques chez *M. tuberculosis*, les connaissances sur les systèmes d'efflux chez *M. abscessus* restent encore limitées.

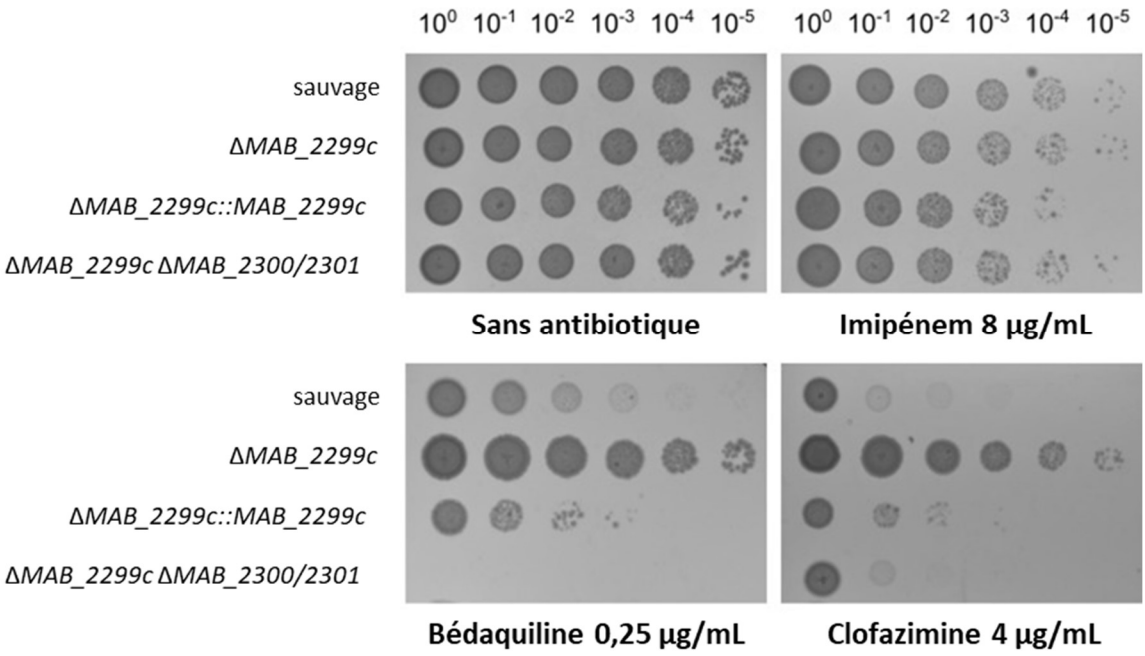


Figure 35 : Export de la bédaquiline et du clofazimine par le système MAB_2300/MAB_2301. Profil de sensibilité à l'imipénem, à la bédaquiline et à la clofazimine de la souche *M. abscessus* ATCC 19977 sauvage, le mutant de délétion Δ*MAB_2299* ainsi que son complément et le triple mutant de délétion Δ*MAB_2299* Δ*MAB_2300/2301*. La perte du régulateur MAB_2299c entraîne une augmentation de l'expression du système d'export MAB_2300/2301, qui permet l'efflux de la bédaquiline et du clofazimine provoquant ainsi l'apparition de la résistance à ces antibiotiques. Adaptée de (Richard et al., 2019).

Le génome de *M. abscessus* possède de nombreux gènes putatifs codants pour des pompes à efflux dont très peu ont été caractérisés (Ripoll et al., 2009). Comme chez *M. tuberculosis*, les transporteurs MmpL chez *M. abscessus* peuvent être également impliqués dans l'efflux des antibiotiques. Par exemple, le système MAB_2300/MAB_2301 (MmpS/MmpL) est un transporteur multi-substrat qui permet l'expulsion de la bédaquiline et de la clofazimine (Richard et al., 2019). Les gènes codants ces protéines forment un opéron qui est régulé par MAB_2299c, un régulateur appartenant à la superfamille des régulateurs TetR qui en absence de tétracycline va se fixer sur une séquence de 35 pb, *tetO*, au niveau de la région promotrice de l'opéron et réprimer ainsi la transcription du système (Gossen et al., 1992). Il a été montré que l'apparition de mutations ponctuelles ou la délétion de *MAB_2299c* entraîne une expression à la hausse du système d'efflux et provoque l'apparition d'une résistance à la bédaquiline et à la clofazimine (**Figure 35**).

À côté du système MAB_2300/MAB_2301, le transporteur MAB_1135c/MAB_1134c (MmpS/MmpL) a pu être identifié comme un second système d'export de la bédaquiline et de la clofazimine chez *M. abscessus* (Gutierrez et al., 2019). La délétion complète de ce système Δ*MAB_1135c/MAB_1134c* entraîne spécifiquement une diminution de la CMI de la bédaquiline et de la clofazimine par rapport à la souche sauvage. De plus, les deux systèmes d'efflux MAB_1135c/MAB_1134c et MAB_2300/MAB_2301 ont en fait un effet cumulatif et peuvent fonctionner simultanément pour exporter ces deux composés (Gutierrez et al., 2019).

Un autre exemple de transporteur MmpL est le système MAB_4383c/MAB_4382c (MmpS5/MmpL5) qui exporte la thiacétazone ainsi que ces dérivés générant un haut niveau de résistance à ces composés (Halloum et al., 2017). Ce système est également sous contrôle d'un régulateur TetR codé par *MAB_4384* (Richard et al., 2018). La sélection de résistants spontanés et leurs caractérisations ont permis d'identifier des mutations dans le régulateur provoquant ainsi la dérépression du système d'export et l'apparition de la résistance. De même, il a été montré, chez une souche sauvage transformée avec la construction pMV261-*MAB_4383c/MAB_4382c* dans lequel l'expression des gènes est sous le contrôle du promoteur constitutif *hsp60*, que la surexpression de ce système augmente de manière significative la CMI des dérivés de la thiacétazone (Halloum et al., 2017). De plus, des expériences de transcriptomique ont permis de montrer que chez des isolats cliniques, la surexpression de *MAB_4383c/MAB_4382c* semble être associé à une résistance à la bédaquiline (Li et al., 2018).

M. abscessus est hautement résistant à la spectinomycine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides, présentant une CMI supérieure à 1000 µg/mL, le rendant inutilisable en clinique. Cette résistance s'explique par la présence d'un transporteur MAB_2780c qui permet la détoxification de l'antibiotique (Hurst-Hess et al., 2023). En effet, un mutant de délétion Δ*MAB_2780c* est environ 150 fois plus sensible à la spectinomycine que la souche sauvage. Par ailleurs, ce même niveau de sensibilité peut être obtenu sur une souche sauvage qui a été incubée avec un inhibiteur de pompe, le vérapamil (Hurst-Hess et al., 2023).

De nombreuses études ont rapporté la surexpression de gènes codants pour des pompes à efflux lorsque la bactérie est exposée à des antibiotiques. Cependant, l'identification et la contribution de ces pompes dans les mécanismes de résistance sont encore mal comprises. L'utilisation d'inhibiteurs de pompes à efflux en association avec des antibiotiques permet d'apporter des preuves sur la potentielle implication des transporteurs dans le relargage de ces antibiotiques. En effet, il a été montré que l'ajout d'inhibiteur de pompes à efflux comme le vérapamil, le cyanure de carbonyle *m*-chlorophénylhydrazone (CCCP) ou la phénylalanine-arginine β-naphthylamide (PAβN) permet de diminuer significativement la CMI de la CLR sur des isolats résistants (Vianna et al., 2019 ; Guo et al., 2020). De plus, des expériences de transcriptomique ont montré que lorsque la bactérie est exposée à de la CLR l'expression de certains gènes codants pour des transporteurs est significativement augmentée. De même, l'utilisation de vérapamil, de PAβN ou de réserpine, un autre inhibiteur de pompes à efflux, associé avec du linézolide permet de faire diminuer la CMI de ce dernier montrant ainsi que des pompes à efflux sont également impliquées dans l'export et donc dans la résistance à ce composé (Ye et al., 2019).

Récemment, le criblage de la sensibilité à plusieurs antibiotiques (amikacine, CLR et céfoxitine) d'une bibliothèque de transposons de 2000 mutants « knock-out » a permis d'identifier une multitude de transporteurs putatifs impliqués dans la résistance intrinsèque de *M. abscessus* (Gorzynski et al., 2021). Au total, 7 gènes appartenant à la famille des ABC transporteurs (*MAB_1839*, *MAB_3384c*, *MAB_2435*, *MAB_2785*, *MAB_2787c*, *MAB_4036* et *MAB_4237c*) et 2 gènes appartenant à la famille des MmpL (*MAB_0937c* et *MAB_1137c*) étaient associés à une activité d'efflux. En effet, les mutants de délétion présentaient tous une plus grande sensibilité aux antibiotiques que la souche parentale.

Finalement, toutes ces études ont permis de mettre en avant le réservoir de transporteurs qui pourrait être impliqué dans la résistance intrinsèque de *M. abscessus* aux molécules antimicrobiennes. L'intérêt pour le rôle des pompes à efflux en tant que mécanisme de résistance conduit à l'exploration de la capacité des inhibiteurs d'efflux à potentialiser l'activité des antibiotiques comme future alternative thérapeutique. D'ailleurs, il a déjà été rapporté que le vérapamil était capable de potentialiser l'activité de la CLR (Vianna et al., 2019) ou encore de la bédaquiline (Viljoen et al., 2019) contre *M. abscessus*.

D) Modification/inactivation de l'antibiotique

M. abscessus a la capacité de produire des enzymes qui permettent la dégradation ou la modification de certains antibiotiques conduisant ainsi à leur inactivation. Ce mécanisme est à l'origine de la résistance à de nombreuses classes d'antibiotique comme les β-lactamines, les aminoglycosides, les tétracyclines ou encore les rifamycines.

i. Résistance aux β-lactamines

Les β-lactamases sont des enzymes produites par les bactéries qui ont la capacité d'hydrolyser le noyau β-lactame permettant l'inactivation de l'antibiotique. *M. abscessus* possède une β-lactamase de classe A à large spectre nommée Bla_{Mab} codée par le gène *MAB_2875*.

L'étude de l'expression de bla_{Mab} sur *M. abscessus in vitro* et au sein de macrophages infectés a permis de montrer que bla_{Mab} est plus surexprimée en condition d'infection du macrophage qu'en condition *in vitro* (Lefebvre et al., 2017). Sa caractérisation biochimique a également permis de montrer que cette enzyme était capable d'hydrolyser une grande variété de substrats incluant les pénicillines, les carbapénèmes et les céphalosporines (Soroka et al., 2014). Cette caractéristique de Bla_{Mab} peut expliquer pourquoi *M. abscessus* est résistante un large spectre de β-lactamines. En revanche, l'enzyme présentait une faible activité d'hydrolyse sur la céfoxitine et l'imipénem, permettant ainsi l'utilisation de ces antibiotiques en clinique. D'un autre côté, des études d'inhibition *in vitro* de Bla_{Mab} ont montré que le clavulanate, le tazobactam et le sulbactam, des inhibiteurs de β-lactamases, n'avaient aucun effet sur Bla_{Mab} (Soroka et al., 2014). En revanche, l'avibactam possédait une forte activité inhibitrice sur $Bla_{Mab,}$ et son association avec une β-lactamine a permis de diminuer la CMI de l'antibiotique à un niveau comparable à la CMI observée chez un mutant *M. abscessus* Δbla_{Mab} (Dubee et al., 2015). Dès lors, le développement d'inhibiteurs de β-lactamases en association avec des β-lactamines permettrait de contourner la résistance à cette classe d'antibiotique et fait déjà l'objet de nombreuses études.

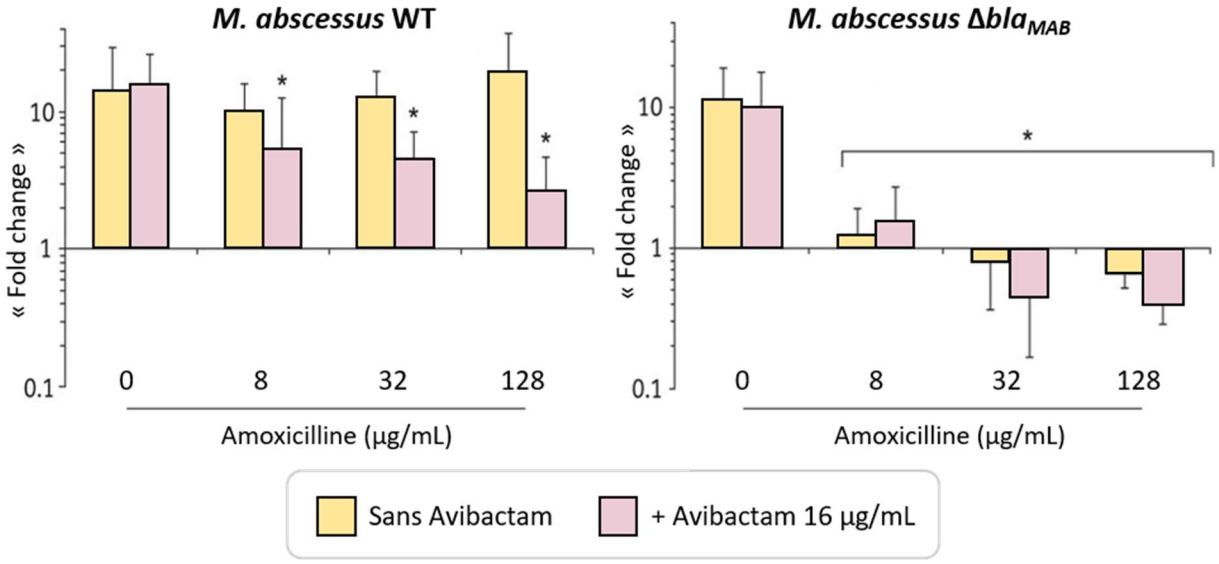


Figure 36 : Activité de l'association amoxicilline-avibactam sur la croissance intracellulaire de *M. abscessus*. « Fold change » des unités formant colonie entre le jour 0 et le jour 2 après l'infection des macrophages THP-1 par la souche *M. abscessus* CIP104536T S ou du mutant de délétion Δ*bla*$_{MAB}$ à plusieurs concentrations en amoxicilline en absence ou en présence d'avibactam. Le mutant est beaucoup plus sensible à l'amoxicilline que la souche parentale. Adaptée de (Dubee et al., 2015).

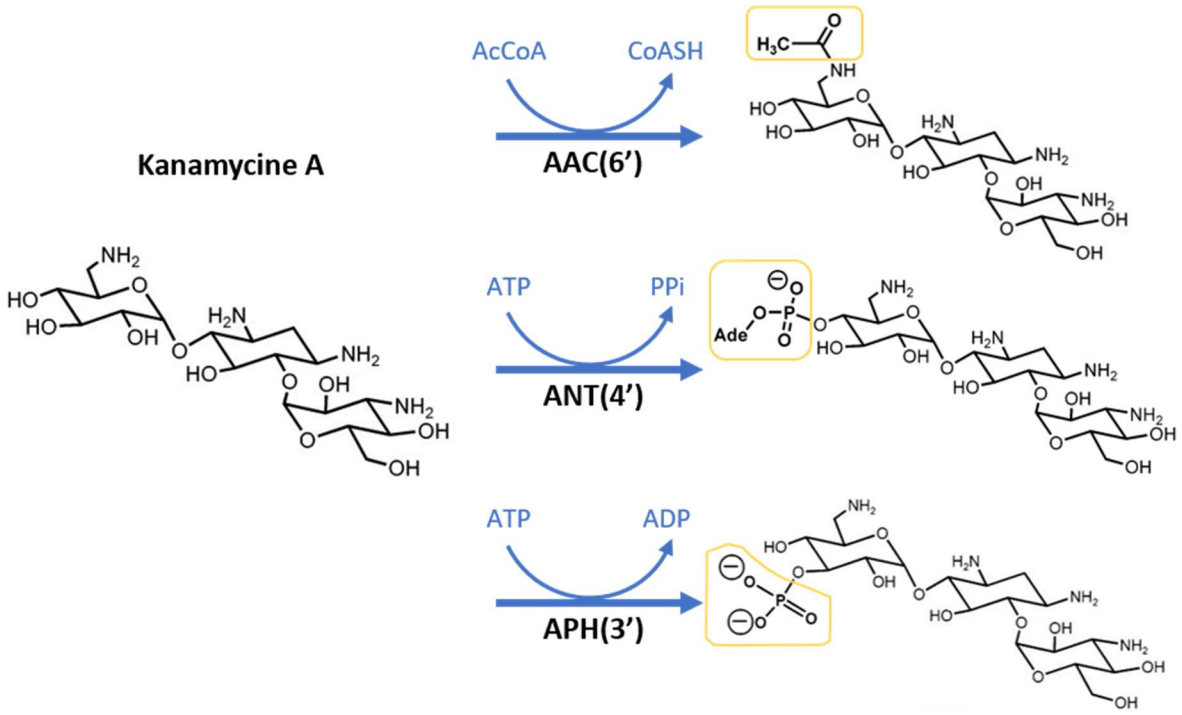


Figure 37 : Réactions catalysées par les enzymes qui modifient les aminoglycosides. L'AAC(6') va catalyser l'acétylation de la kanamycine A en position 6' en présence d'acétyl-coenzyme A. L'ANT(4') catalyse l'adénylation ATP-dépendante en position 4' de l'antibiotique alors que l'APH(3') va elle catalyser la phosphorylation ATP dépendante de la kanamycine A. Adaptée de (Magnet et al., 2005).

Dans ce contexte, l'avibactam associé à de l'amoxicilline a montré un effet synergique sur *M. abscessus* au sein de macrophages infectés (**Figure 36**) et dans le modèle du poisson-zèbre (Dubee et al., 2015). De manière similaire, cet inhibiteur a permis d'améliorer l'efficacité de l'imipénem aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Lefebvre et al., 2017). Enfin, plus récemment d'autres inhibiteurs comme le rélébactam et le durlobactam ont révélé des activités similaires sur *M. abscessus* en présence de β-lactamines permettant ainsi d'envisager une utilisation de cet antibiotique en clinique (Le Run et al., 2020 ; Dousa et al., 2022).

ii. Résistance aux aminoglycosides

Chez les bactéries, la modification chimique des groupes amino ou hydroxyle à des positions spécifiques de l'aminoglycoside par des enzymes permet de diminuer l'affinité de liaison de l'antibiotique à sa cible ce qui confère à la bactérie un phénotype de résistance. Les enzymes qui modifient les aminoglycosides peuvent être regroupées en trois classes en fonction du type de modification qu'elles apportent aux substrats (**Figure 37**) :

(i) les acétyltransférases (AAC(N')) qui catalysent la *N*-acétylation dépendante de l'acétyl-coenzyme A (CoA) d'un groupe amino ;

(ii) les nucléotidyltransférases (ANT(N')) qui vont catalyser le transfert d'un groupe adényle à un groupement hydroxyle ;

(iii) et les phosphotransférases (APH(N')) qui transfère le groupe γ-phosphoryle de l'ATP à un substituant hydroxyle (Magnet et al., 2005).

Ces enzymes sont largement retrouvées dans le monde bactérien et sont présentes chez de nombreuses espèces telles que *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou encore les mycobactéries (Garneau-Tsodikova et al., 2016). *M. abscessus* possède plusieurs enzymes putatives de modification des aminoglycosides incluant des membres des trois classes dont la majorité sont principalement des phosphotransférases (Ripoll et al., 2009 ; Luthra et al., 2018). À ce jour, trois protéines ont été caractérisées comme responsables de la résistance aux aminoglycosides par modification enzymatique chez *M. abscessus*.

Tout d'abord, la protéine AAC(2') (Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase), codée par le gène *MAB_4395*, est capable de modifier un large panel d'aminoglycosides comme la kanamycine B, l'hygromycine B, la gentamicine C ou encore la tobramycine en transférant un groupement acétyle sur le groupement amine situé en position 2' du cycle 1 (Maurer et al., 2015 ; Rominski et al., 2017b).

La délétion de ce gène dans *M. abscessus* conduit à une réduction de la CMI de ces antibiotiques de 4 à 64 fois par rapport à la souche sauvage suggérant clairement son implication dans la résistance à ces antibiotiques (Rominski et al., 2017b). En revanche, l'AMK est protégée de l'acétylation par AAC(2') en raison de la présence d'un groupe OH en position 2'.

Les protéines nommées Eis (pour « Enhanced in intracellular survival ») qui possèdent aussi une activité de N-acétyltransférase capable de modifier des aminoglycosides, ont été identifiées chez diverses mycobactéries incluant *M. abscessus*. *M. abscessus* possède deux protéines Eis, Eis1, codée par *MAB_4124*, et Eis2, codée par *MAB_4532c* (Rominski et al., 2017b). Seule la protéine Eis2 est impliquée dans la résistance aux aminoglycosides. En effet, la délétion d'*eis2* entraîne une sensibilité accrue à l'AMK, la kanamycine B, l'hygromycine B et à la capréomycine par rapport à la souche parentale. En revanche, la délétion d'*eis1* n'affecte pas la sensibilité aux aminoglycosides (Rominski et al., 2017b). La résolution de leur structure tridimensionnelle et leur caractérisation biochimique ont permis de montrer qu'Eis2 catalyse l'acétylation d'un large spectre d'aminoglycosides comme l'AMK, l'hygromycine B, la kanamycine A et B contrairement à Eis1 qui est capable d'acétyler de petits substrats, mais incapable de modifier les aminoglycosides testés (Ung et al., 2019 ; Ung et al., 2021). Cette différence s'expliquerait par la taille du site actif d'Eis1 qui est trop étroit pour accueillir les aminoglycosides (Ung et al., 2021). En plus de leur rôle dans la résistance aux aminoglycosides, les protéines Eis sont également impliquées dans l'interaction hôte pathogène. En effet, chez *M. tuberculosis* il a été montré que la protéine Eis_{Mtb} inhibe l'autophagie, la maturation des phagosomes, la production de cytokines et la production de ROS favorisant ainsi la survie intracellulaire de la bactérie (Samuel et al., 2007 ; Kim et al., 2012).

En plus des deux N-acétyltransférases modificatrices des aminoglycosides, *M. abscessus* possède une troisième enzyme qui modifie aussi cette classe d'antibiotiques. MAB_2385 est une 3"-O-phosphotransferase qui modifie spécifiquement la streptomycine responsable de la résistance intrinsèque de *M. abscessus* à cet antibiotique. Cette protéine est également un homologue proche de la protéine APH(3")-Ic responsable de la résistance à la streptomycine chez *M. fortuitum* (Ramon-Garcia et al., 2006). L'étude de Dal Molin *et al.* a montré que la délétion de *MAB_2385* chez *M. abscessus* diminuait la CMI de la streptomycine sans pour autant affecter la sensibilité aux autres aminoglycosides. De plus, la production hétérologue de MAB_2385 chez *M. smegmatis* provoque une augmentation du niveau de la CMI de la streptomycine (Dal Molin et al., 2018).

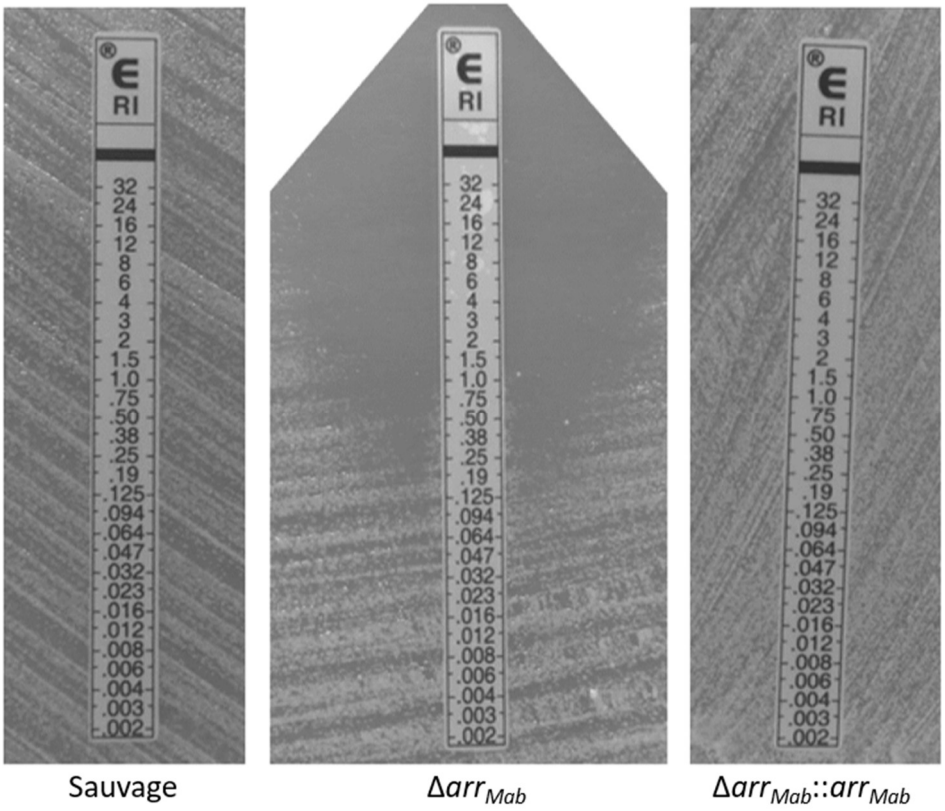


Figure 38 : Implication d'Arr$_{Mab}$ dans la résistance à la rifampicine. La sensibilité à la rifampicine chez *M. abscessus* ATCC 19977 sauvage, le mutant de délétion Δ*arr*$_{Mab}$ ainsi que le mutant complémenté, est évaluée par un Etest. L'Etest est une méthode de diffusion en gélose qui permet de mesurer la CMI d'un antibiotique à l'aide une bandelette contenant un gradient prédéfini et continu d'antibiotique. Une ellipse d'inhibition de la croissance se forme autour de la bandelette et la valeur lue à l'intersection de celle-ci et de la culture bactérienne correspond à la CMI. Adaptée de (Rominski et al., 2017a).

iii. Résistance aux rifamycines

La résistance aux rifamycines de *M. abscessus* est également due à la présence d'enzymes qui vont modifier ou inactiver l'antibiotique. La première est l'enzyme Arr_{Mab} codée par le gène *MAB_0591* qui possède une activité ADP-ribosyltransférase et qui va catalyser l'ajout d'un ADP-ribosyle au niveau du groupe hydroxyle du C23 de l'antibiotique (Dabbs et al., 1995 ; Rominski et al., 2017a). En effet, un mutant de délétion Δarr_{Mab} chez *M. abscessus* est beaucoup plus sensible à la rifampicine avec une valeur de CMI 64 fois inférieure à la CMI de la souche sauvage (**Figure 38**). Par ailleurs, la production hétérologue d'Arr_{Mab} chez *E. coli* et *M. tuberculosis* qui sont naturellement sensibles à la rifampicine a provoqué l'apparition d'une résistance à cet antibiotique (Rominski et al., 2017a). De plus, cette enzyme serait également responsable de l'inactivation d'autres rifamycines telles que la rifaximine, la rifapentine et la rifabutine (Schafle et al., 2021). L'optimisation structurale ou la synthèse de nouveaux dérivés de rifamycines pour contrer la résistance provoquée par Arr_{Mab} tout en maintenant une activité antibactérienne efficace est en cours de développement et semble prometteur (Lan et al., 2022 ; Paulowski et al., 2022).

Il existe un autre mécanisme d'inactivation des rifamycines chez les bactéries, médié par les protéines Rox qui sont des monooxygénases dépendantes de la flavine adénine dinucléotide (FAD). Ces protéines catalysent l'incorporation d'un groupe hydroxyle en position 2 du groupement naphtyle des rifamycines conduisant à l'ouverture du cycle et à la linéarisation de la molécule qui ne sera plus en mesure de se lier à l'ARN polymérase (Koteva et al., 2018). Ce mécanisme d'inactivation des rifamycines pourrait venir s'ajouter au précédent, car dans le génome de *M. abscessus* plusieurs monooxygénases dépendantes du FAD ont été identifiées. Cependant, aucune enzyme Rox capable de modifier les rifamycines chez *M. abscessus* n'a encore été caractérisée.

iv. Résistance aux tétracyclines

La faible activité des tétracyclines de première et deuxième générations sur *M. abscessus* est en partie due à l'existence d'un mécanisme d'inactivation enzymatique des tétracyclines qui a été récemment caractérisée. Cette résistance est médiée par une monooxygénase FAD-dépendante, la protéine MabTetX codée par le gène *MAB_1496c* dont la délétion chez *M. abscessus* entraîne une augmentation significative de la sensibilité à la tétracycline et la doxycycline en comparaison avec la souche sauvage (Rudra et al., 2018).

De plus, le mutant Δ*MAB_1496c* complémenté présentait des niveaux de résistance à ces deux antibiotiques plus élevés que la souche sauvage confortant l'idée que cette enzyme est principalement impliquée dans la résistance à cette classe d'antibiotique (Luthra et al., 2018 ; Rudra et al., 2018). MabTetX catalyse l'hydroxylation de la tétracycline et la doxycycline permettant leur dégradation. En revanche la tigécycline possède une chaîne 2-tert-butylglyculamido qui la protège de la monooxydation par MabTetX et ceci pourrait expliquer pourquoi la tigécycline est la seule tétracycline efficace sur *M. abscessus* (Wallace et al., 2002).

Ce mécanisme de résistance est un mécanisme de résistance inductible. En effet, la présence de tétracycline ou doxycycline induit la production de MabTetX contrairement à la tigécycline qui n'a aucun effet (Rudra et al., 2018). En fait, l'expression de *mabTetX* est régulée par un répresseur transcriptionnel, appartenant à la famille des régulateurs TetR, MabTetR$_x$ codée par le gène *MAB_1497c* qui forme un opéron avec le gène *MAB_1496c*. En présence de tétracycline ou de doxycycline, MabTetR$_x$ va subir un changement conformationnel qui va entraîner la libération de l'ADN au niveau de la région promotrice et permettre l'expression de l'opéron et donc de MabTetX. En revanche, la tigécycline n'altère pas la capacité de MabTetR$_x$ à se lier à l'ADN expliquant pourquoi elle n'induit pas la production de la monooxygénase (Rudra et al., 2018).

E) Protection de la cible

La capacité de *M. abscessus* à dégrader ou modifier certains antibiotiques pour les rendre inactifs n'est pas la seule option permettant à la bactérie de résister aux différents antibiotiques. En effet, elle est également capable, dans certains cas, de produire des enzymes qui vont agir directement sur la cible de l'antibiotique, protégeant ainsi la bactérie de l'antibiotique. À titre d'exemple, une exposition prolongée aux macrolides, des antibiotiques très actifs sur le MABSC qui représentent le pilier central dans la thérapie anti-*M. abscessus*, peut induire l'apparition d'une résistance au cours du temps limitant ainsi leur spectre d'action.

L'apparition de cette résistance induite par les macrolides reste problématique et peut conduire dans certains cas à un échec thérapeutique (Roux et al., 2015). Cette résistance induite peut être observée *in vitro* en prolongeant l'incubation du test de sensibilité aux macrolides jusqu'à 14 jours ou en incubant préalablement *M. abscessus* avec des concentrations subinhibitrices en macrolide (Nash et al., 2009 ; Maurer et al., 2014b).

Table 4 : Liste non exhaustive des protéines Erm présentes chez les bactéries.

Protéines	Organismes	Références
Erm(A)	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes*	(Malhotra-Kumar et al., 2009) (Thakker-Varia et al., 1987)
Erm(B)	*Streptococcus pneumoniae*	(Sutcliffe et al., 1996)
Erm(C)	*Staphylococcus aureus*	(Murphy, 1985)
Erm(E)	*Saccharopolyspora erythraea*	(Weber et al., 1988)
Erm(F)	*Bacteroides fragilis*	(Rasmussen et al., 1986)
Erm(T)	*Lactobacillus reuteri* *Enterococcus faecalis*	(Tannock et al., 1994) (Li et al., 2022)
Erm(X)	*Corynebacterium* sp.	(Rosato et al., 2001) (Tauch et al., 1995)
Erm(37)	*M. tuberculosis*	(Buriankova et al., 2004)
Erm(38)	*M. smegmatis*	(Nash, 2003)
Erm(39)	*M. fortuitum*	(Nash et al., 2005)
Erm(41)	*M. abscessus*	(Nash et al., 2009)
Erm(46) Erm(51)	*Rhodococcus equi*	(Anastasi et al., 2015) (Huber et al., 2020)
Erm(48)	*Staphylococcus xylosus*	(Wipf et al., 2017)
Erm(55)	*M. chelonae*	(Brown-Elliott et al., 2023)

En effet, lors d'un test de sensibilité à l'AZM ou la CLR par exemple, la CMI augmente au cours du temps jusqu'à atteindre des valeurs élevées à partir du 7ème jour (Nash et al., 2009 ; Maurer et al., 2014b ; Schildkraut et al., 2019). De plus, chez *M. abscessus*, cette résistance induite est réversible, car lorsque la bactérie n'est plus exposée aux macrolides, la CMI revient à un niveau basal, confirmant ainsi que la résistance n'est pas génotypique (Richard et al., 2020). À l'origine de cette résistance, la protection de l'ARNr 23S par modification enzymatique est catalysée par la protéine Erm(41), codée par le gène *MAB_2297*.

i. Généralités sur les protéines Erm

Les protéines Erm (« Erythromycin resistance methylase ») sont retrouvées chez de nombreuses bactéries incluant les Gram positif et négatif (**Table 4**). Plus de 80 protéines Erm ont été rapportées et sont principalement présentes chez les bactéries pathogènes, bien qu'il existe quelques exemples chez des bactéries environnementales comme *Saccharopolyspora erythraea,* une bactérie productrice d'érythromycine ou encore *Saccharopolyspora elongata*. On les retrouve également chez les mycobactéries et en particulier chez plusieurs MCR (Esteban et al., 2009). Les protéines Erm(38), Erm(37), Erm(39), Erm(41) et plus récemment Erm(55) identifiées chez *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* et *M. chelonae* respectivement, ont été étudiées au cours de ces dernières années (Nash, 2003 ; Buriankova et al., 2004 ; Nash et al., 2005 ; Nash et al., 2009 ; Brown-Elliott et al., 2023). Les gènes *erm* peuvent être retrouvés soit sur des plasmides, soit sur le chromosome bactérien où ils peuvent être associés à des transposons conjugatifs ou non conjugatifs (Roberts et al., 1999). Leur expression peut alors être soit constitutive ou soit induite par la présence de l'antibiotique comme c'est le cas chez *M. abscessus* (Leclercq et al., 1991).

Cette famille de protéines regroupe des monométhyltransférases ou des diméthyltransférases qui catalysent la méthylation spécifique du groupe N6-amino de l'adénine 2058 (annotation *E. coli*) de l'ARNr 23S grâce à un cofacteur, la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) (**Figure 39A**) (Skinner et al., 1983 ; Malone et al., 1995). Toutefois, il existe des exceptions comme Erm(37) de *M. tuberculosis* qui est capable de transférer un groupement méthyle sur le résidu adénine 2057 et 2059 en plus du résidu 2058 (annotation chez *E. coli*) (Madsen et al., 2005a). L'étude structurale de l'ARNr 23S diméthylé par une protéine Erm en présence d'érythromycine a permis de montrer que la modification de l'adénine 2058 n'entraîne pas de réarrangement structurel dans le NPET.

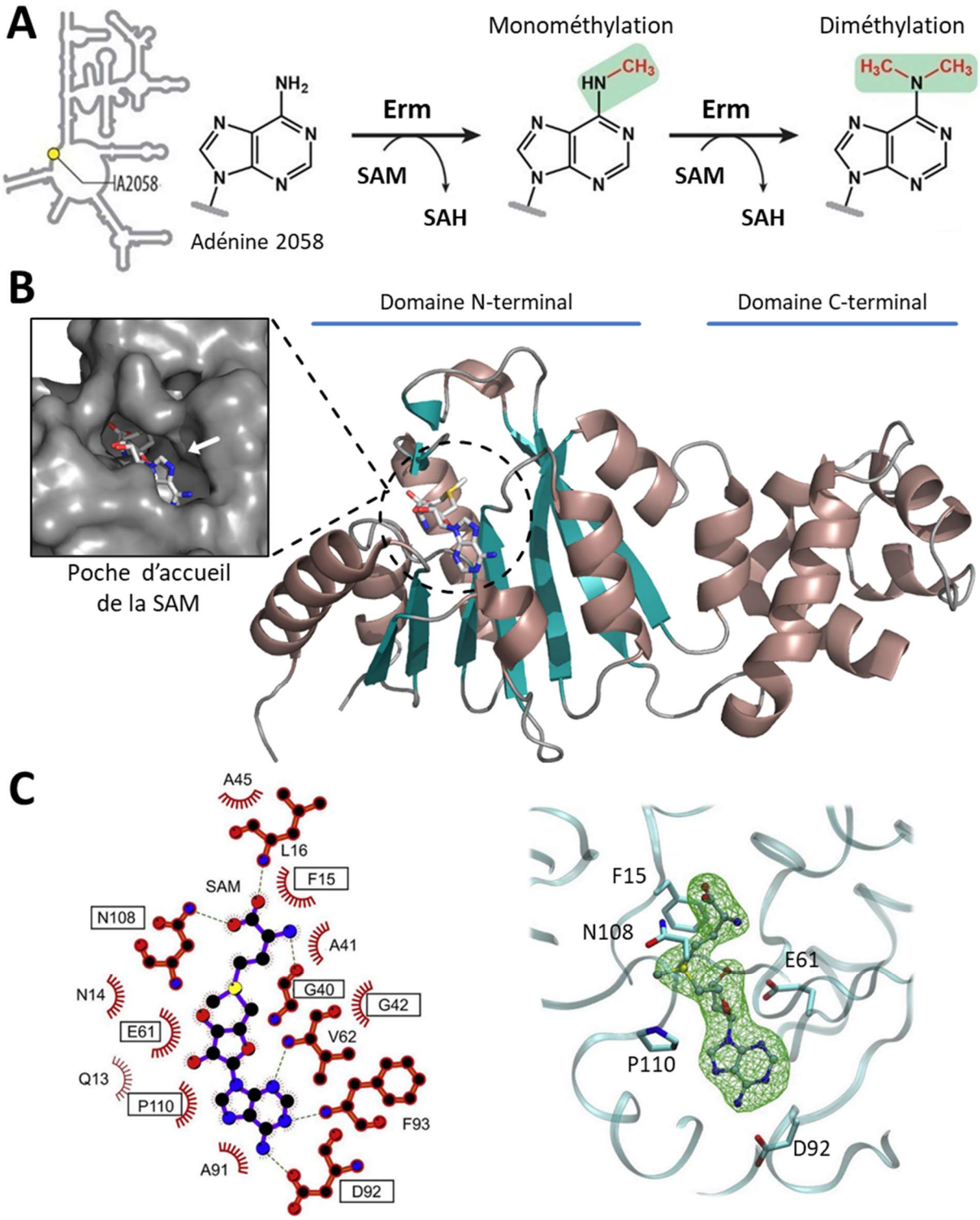


Figure 39 : Les protéines Erm. (A) Les protéines Erm catalysent le transfert d'un groupement méthyle à partir de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) transformée en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH). **(B)** Structure tridimensionnelle d'Erm(38) en présence de la SAM (PDB 7F8B). Les hélices α sont représentées en beige et les brins β en bleu. La flèche blanche indique la poche qui permet d'accueillir la SAM **(C)** Représentation des interactions entre la SAM et Erm(38) dans la poche grâce à un diagramme d'interaction généré sur Ligplot^{+} v2.2 (à gauche) et une carte de densité électronique (à droite). Adaptée de (Svetlov et al., 2021 ; Goh et al., 2022).

En revanche, la présence des groupements méthyles rend impossible l'interaction entre le groupe N6-amino et le groupe diméthyl-amino de la désosamine du macrolide (Svetlov et al., 2021). D'autre part, il a été montré que ces enzymes modifient leur cible lors de l'assemblage du ribosome, car lorsque le ribosome est mature, le résidu adénine est inaccessible (Pokkunuri et al., 2007). De plus, le processus de diméthylation nécessite, entre les deux méthylations successives, la dissociation de l'enzyme de son substrat (Maravic, 2004).

Les enzymes Erm possèdent généralement deux domaines, un domaine catalytique en N-terminal et un domaine de liaison supplémentaire à l'ARN en C-terminal (Maravic, 2004). Le domaine catalytique possède neuf motifs conservés et une poche chargée négativement permettant l'accueil de la SAM. Le domaine C-terminal lui contient un patch riche en charge positive nécessaire à l'interaction avec l'ARN. En outre, certaines protéines Erm ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ARN comme Erm(37). La résolution de la structure d'Erm(AM), Erm(C), Erm(E) et plus récemment Erm(38) a permis de montrer que ces protéines possèdent un pli Rossmann, composé d'un feuillet β entouré d'hélices α ; une poche qui permet d'accueillir la SAM généralement en forme de Y ; et un domaine hélicoïdal permettant l'interaction avec l'ARN (**Figure 39B**) (Yu et al., 1997 ; Bussiere et al., 1998 ; Stsiapanava et al., 2019 ; Goh et al., 2022). Il a été montré que les acides aminés présents dans la poche sont très conservés. En effet, chez Erm(38), plusieurs résidus ont été identifiés comme impliqués dans l'interaction avec la SAM. Il s'agit de Gly40, Gly42, Glu61, Asp92 et Pro110 qui sont strictement conservés chez Erm(A), Erm(B), Erm(C), Erm(E), Erm(37) et Erm(41) (**Figure 39C**) (Goh et al., 2022).

Les protéines Erm confèrent une résistance aux agents macrolides, lincosamides et streptogramine B à l'exception de certaines Erm mycobactériennes qui confèrent une résistance limitée à ces agents en particulier à la streptogramine B (Nash et al., 2005). Les monométhyltransférases déclenchent un phénotype de type I correspondant à une résistance élevée aux macrolides et une résistance modérée ou faible aux lincosamides et streptogramine B alors que les diméthyltransférases déclenchent un phénotype de type II, correspondant à une résistance élevée à ces trois composés (Madsen et al., 2005b).

i. Erm(41)

La résistance aux macrolides chez *M. abscessus* médiée par Erm(41) a été étudiée pour la première fois par Nash *et al.* en 2009. La présence d'une Erm(41) fonctionnelle permet d'avoir une résistance à plusieurs macrolides comme l'érythromycine, la CLR, l'AZM, mais également aux dérivés de macrolides comme les kétolides ainsi qu'aux lincosamides (clindamycine) et streptogramine B (quinupristine) (Nash et al., 2009). Grâce à ces résultats, les auteurs ont supposé qu'Erm(41) possédait une activité de diméthyltansférase.

Au niveau du complexe MABS, cette résistance induite se retrouve seulement chez les deux sous-espèces *M. abscessus* et *M. bolletii* qui possède une copie du gène *erm(41)* fonctionnelle contrairement à la sous-espèce *M. massiliense* qui possède un gène *erm(41)* tronqué et non fonctionnel (Nash et al., 2009). En effet, chez *M. massiliense* le cadre de lecture d'*erm(41)* est réduit en raison d'une perte d'un segment de 198 pb situé au centre du gène. Cependant, le séquençage du gène d'*erm(41)* chez un isolat clinique de *M. abscessus* et de *M. bolletii* sensibles aux macrolides a révélé la présence d'une mutation ponctuelle au niveau du codon 67 qui modifie l'arginine en codon stop générant ainsi une protéine tronquée non fonctionnelle et la présence d'un gène *erm(41)* tronqué, respectivement (Rubio et al., 2015 ; Jong et al., 2022). En conclusion d'un point de vue clinique, en plus de l'identification de la sous-espèce impliquée dans l'infection, il est important de réaliser le séquençage d'*erm(41)* afin de déterminer la sensibilité aux macrolides ainsi que la meilleure option thérapeutique (Brown-Elliott et al., 2015).

La résistance induite par les macrolides peut apparaître *in vitro* dans plusieurs milieux de culture, *ex vivo* dans le modèle des macrophages infectés, mais également *in vivo* chez la souris et le poisson zèbre (Choi et al., 2012b ; Richard et al., 2020). Ces observations montrent que ce mécanisme n'est pas dépendant de la composition du milieu, mais uniquement dépendant de la présence de l'antibiotique inducteur. Il a été montré que la délétion d'*erm(41),* chez *M. abscessus stricto sensu*, ne déclenche pas de résistance induite *in vitro* et *in vivo* lors d'une exposition prolongée et la souche reste totalement sensible aux macrolides (Choi et al., 2012b ; Richard et al., 2020). Au contraire, la surexpression d'*erm(41)* chez *M. massiliense* fait apparaître une résistance à la CLR au bout du 7ème jour. Ces résultats ont permis de confirmer qu'Erm(41) est le seul acteur impliqué dans cette résistance induite aux macrolides.

Les souches de *M. abscessus* peuvent être classées en deux groupes en fonction du résidu présent en position 28 au niveau du dixième codon de la séquence d'*erm(41)*. Les souches appartenant au sequevar T28 possèdent une thymine en position 28 correspondant à un codon tryptophane qui est associé à une résistance alors que les souches appartenant au sequevar C28 possèdent une cytosine en position 28 donnant un codon arginine et ne sont pas résistantes aux macrolides (Bastian et al., 2011). Néanmoins, une étude a pu montrer que lors d'une exposition prolongée à la CLR une augmentation de la CMI est visible, mais elle reste à des niveaux largement inférieurs à celle du sequevar T28 (Maurer et al., 2014b). Les auteurs ont supposé qu'il est probable que la substitution T28C ne rend pas totalement Erm(41) non fonctionnelle. Une autre mutation d'Erm(41) qui abroge la résistance a été également rapportée chez un isolat clinique issu d'un patient atteint de mucoviscidose. Il s'agit d'une mutation par substitution de l'acide aminé phénylalanine en position 34 remplacée par une leucine qui inactiverait vraisemblablement Erm(41) (Richard et al., 2020).

Il est admis que la production d'Erm(41) est induite par la présence de macrolides. En revanche, le niveau de résistance et d'expression du gène induit en fonction du macrolide utilisé fait l'objet d'un débat dans la communauté scientifique. De nombreuses études ont tenté d'apporter des informations sur la différence du niveau de résistance lorsque la CLR ou l'AZM est utilisée comme inducteur. En premier lieu, l'étude de Nash *et al.* a montré grâce à des expériences de transcriptomique par reverse transcription et PCR quantitative (RT-qPCR) qu'une exposition à la CLR *in vitro* induit fortement l'expression d'*erm(41)* en quelques heures pour atteindre son maximum au bout de 10 heures, puis, une diminution de l'expression est observée à 72 heures (Nash et al., 2009). On observe le même phénomène lors d'une exposition à l'érythromycine. De plus, les mêmes niveaux de transcrits ont été observés chez le sequevar T28 et le sequevar C28.

Par la suite Choi *et al.* ont montré que l'expression *in vitro*, quantifiée par RT-qPCR, augmente lorsque la bactérie est exposée à la CLR et que cette augmentation ne diminue pas au cours des 14 jours d'exposition. Les auteurs ont également constaté que l'expression est plus forte avec des concentrations inférieures ou égales à la CMI qu'avec des fortes concentrations. Cependant, il a été observé que l'AZM induit très faiblement l'expression d'*erm(41)* et reste à des niveaux de transcrits faibles au cours des 14 jours (Choi et al., 2012b).

Ensuite, l'étude de Maurer *et al.* et de Schildkraut *et al.* ont montré que l'augmentation des CMI au cours de l'induction de la résistance était similaire pour la CLR et l'AZM, mais ont constaté que les CMI de l'AZM étaient plus élevées que les CMI de la CLR (Maurer et al., 2014b ; Schildkraut et al., 2019). De plus, l'exposition à l'AZM et à la CLR induit l'expression d'*erm(41)* qui reste stable au cours du temps pendant 14 jours (Schildkraut et al., 2019).

Finalement, l'étude de Richard *et al.* a permis de montrer que la CMI de l'AZM augmentait plus rapidement que la CMI de la CLR. Le suivi de l'induction du promoteur d'*erm(41)* grâce à une souche rapportrice possédant une fusion transcriptionnelle du promoteur avec la β-galactosidase pendant 14 jours a montré qu'*in vitro* l'AZM induit plus rapidement l'expression d'*erm(41)* par rapport à la CLR (Richard et al., 2020). De plus, les faibles concentrations induisent également l'expression plus rapidement que les fortes concentrations.

Bien que toutes ces études divergent sur le pouvoir inducteur de la CLR ou de l'AZM, elles regroupent aussi quelques points communs. L'expression d'*erm(41)* est systématiquement induite en présence de l'antibiotique, les faibles concentrations semblent induire plus d'expression que les fortes concentrations et l'apparition de la résistance est indépendante du contexte environnemental. Néanmoins, le paramètre à prendre en compte lorsqu'on regroupe ces études, c'est que pour les expériences d'induction, chaque étude utilise des protocoles et des concentrations en macrolides différentes. On peut supposer que la mise en place de ce mécanisme de résistance est une réponse adaptative de *M. abscessus* à un stress qui est dépendante à la fois du macrolide utilisé, du temps d'induction, mais également de la dose à laquelle elle est exposée.

F) Régulateurs transcriptionnels de la famille WhiB

En présence d'un antibiotique, *M. abscessus* doit mettre en place une réponse adaptée, rapide pour permettre sa survie face à l'activité antimicrobienne de l'antibiotique. Leur diffusion dans le cytoplasme va induire une « reprogrammation transcriptionnelle massive » entraînant un changement métabolique pour permettre la résistance aux médicaments (Hurst-Hess et al., 2017). Cette adaptation métabolique nécessite une régulation fine des gènes impliqués dans la résistance comme ceux codants pour les pompes à efflux et les enzymes qui modifient l'antibiotique ou la cible. Les régulateurs transcriptionnels font partie des facteurs intrinsèques de résistance aux antibiotiques.

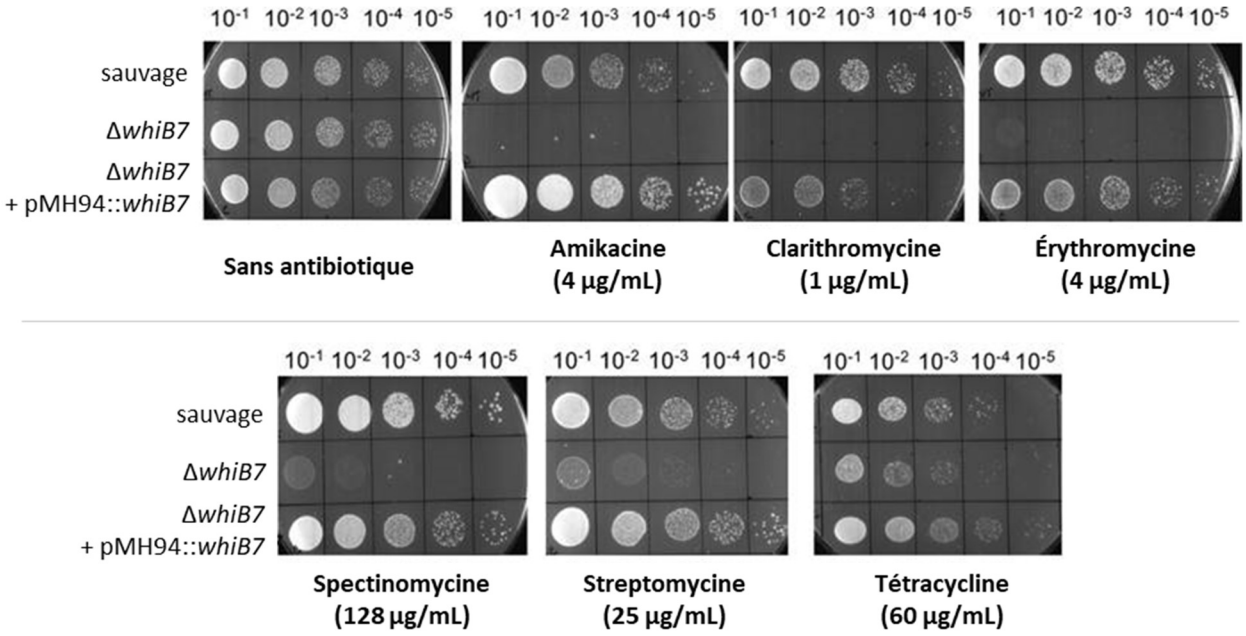
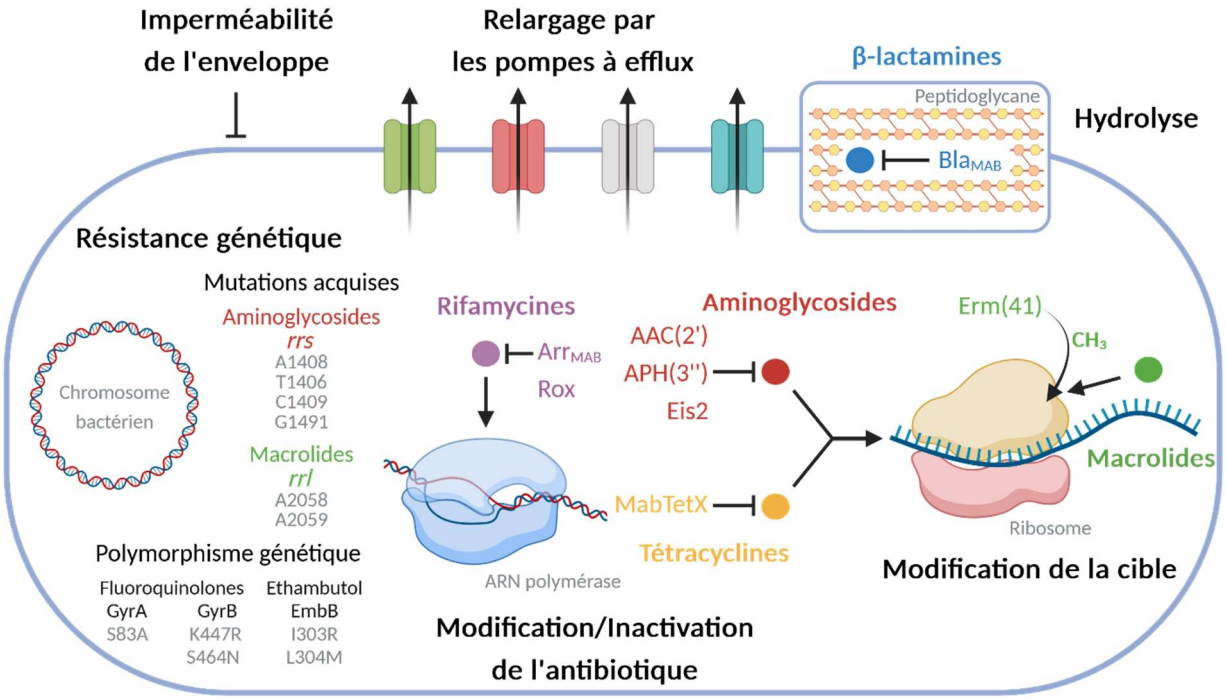


Figure 40 : Effet de WhiB7 sur la sensibilité aux antibiotiques chez *M. abscessus*. La sensibilité à l'AMK, la CLR, l'érythromycine, la spectinomycine, la streptomycine et la tétracycline chez *M. abscessus* ATCC 19977 sauvage, le mutant de délétion Δ*whiB7* ainsi que le mutant complémenté, est évaluée sur gélose 7H10. Adaptée de (Hurst-Hess et al., 2017).

La famille de régulateurs transcriptionnels WhiB est présente chez les actinomycètes et notamment chez le genre *Mycobacterium* et *Streptomyces* (Morris et al., 2005). Les protéines WhiB sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaire clés comme la division cellulaire, la réponse au stress et la pathogenèse (Nessar et al., 2012). Ces régulateurs possèdent un domaine de liaison à l'ADN qui va interagir avec une région riche en adénine/thymine en amont de la boîte -35 du promoteur et ainsi permettre l'induction de l'expression du gène cible (Burian et al., 2012). Chez *M. tuberculosis*, sept protéines WhiB ont été caractérisées (Geiman et al., 2006). Le régulateur WhiB7 est connu pour être impliqué dans la reprogrammation transcriptionnelle bactérienne à la suite d'un changement d'environnement, comme un stress antibiotique ou une carence en fer. Il a été montré que WhiB7 est un déterminant majeur dans la résistance multi-drogues chez *M. tuberculosis* (Burian et al., 2012). En effet, il régule l'expression de nombreux gènes qui pour certains sont impliqués dans le relargage, la biotransformation ou l'inactivation des antibiotiques.

Le génome de *M. abscessus* contient huit gènes codants pour des protéines WhiB, dont *MAB_3508c* un homologue proche de *whiB7* de *M. tuberculosis* (Ripoll et al., 2009). L'étude de Hurst-Hess *et al.* a montré que *whiB7* était fortement exprimé lorsque *M. abscessus* est exposée aux antibiotiques et en particulier aux molécules qui ciblent les ribosomes (Hurst-Hess et al., 2017). La délétion de *whiB7* (*MAB_3508c*) entraîne l'augmentation de la sensibilité à l'érythromycine, la CLR, la tétracycline, l'amikacine, la streptomycine et à la spectinomycine (**Figure 40**). Des expériences de « RNA-Sequencing » ont permis d'identifier 128 gènes dont l'expression est régulée par WhiB7 et parmi ce régulon, on retrouve des gènes codants pour des pompes à efflux, mais également des gènes étroitement impliqués avec la résistance aux antibiotiques dont *eis2* et *erm(41)* (voir § **Chapitre II : D) Modification/inactivation de l'antibiotique** et **E) Protection de la cible**).

WhiB7 (*MAB_3508c*) est un acteur essentiel dans la mise en place de la résistance induite aux macrolides médiée par Erm(41) chez *M. abscessus*. En effet, un mutant de délétion Δ*whiB7*, en plus d'être plus sensible aux macrolides que la souche sauvage, perd totalement la capacité de mettre en place cette résistance (Pryjma et al., 2017). Ce résultat n'est pas surprenant, car il a été montré que le gène *erm(41)* fait partie du régulon de WhiB7 (Hurst-Hess et al., 2017). Le promoteur d'*erm(41)* possède un motif de liaison directe à WhiB7, riche en adénine/thymine en amont de la boîte -35 qui est nécessaire pour l'induction de l'expression du gène (Richard et al., 2020).



<u>Figure 41 :</u> Schéma récapitulatif des différents mécanismes de résistance présents chez *M. abscessus*. Parmi ces mécanismes, on retrouve l'imperméabilité de l'enveloppe, la résistance génétique qui regroupe les mutations acquises et le polymorphisme génétique, la production d'enzymes modifiant/inactivant ou hydrolysant l'antibiotique ou modifiant directement la cible et l'export *via* les pompes à efflux.

D'ailleurs, la perte de ce motif entraîne l'abolition de l'expression d'*erm(41)* ne permettant plus à la résistance aux macrolides de se mettre en place. D'autre part, il a été montré que lors d'une exposition à un macrolide l'expression de *whiB7* est significativement augmentée (Pryjma et al., 2017). En fin de compte, l'exposition aux macrolides va entraîner l'augmentation de l'expression de *whiB7* qui va induire à son tour l'expression d'*erm(41)*. Ces résultats montrent que WhiB7 est un élément important pour la reprogrammation cellulaire lorsque la bactérie est exposée aux macrolides afin de permettre la mise en place sa résistance.

Pour conclure ce chapitre, le traitement actuel des infections à *M. abscessus* préconise une polythérapie particulièrement longue et pouvant provoquer des effets indésirables chez le patient. Les macrolides restent le pilier central dans la thérapie, car cette famille d'antibiotiques est très active sur le MABSC. Malheureusement, face aux antibiotiques *M. abscessus* est capable de développer une multitude de mécanismes permettant de résister à l'activité antimicrobienne de ces molécules. Parmi ces mécanismes, on retrouve l'imperméabilité de la paroi, le polymorphisme génétique, la production d'enzymes modifiant/inactivant l'antibiotique ou modifiant directement la cible et l'export par les pompes à efflux (**Figure 41**). Le « résistome » intrinsèque et impressionnant de cette mycobactérie reste très problématique en clinique et peut conduire dans certains cas à un échec thérapeutique. Aujourd'hui, le développement d'alternatives ou de nouveaux schémas thérapeutiques devient indispensable pour élaborer une thérapie efficace contre *M. abscessus*. Pour répondre à ce besoin, nous avons découvert au laboratoire une nouvelle famille de molécules, les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins (CyC), spécifiquement actives sur les souches mycobactériennes, y compris sur *M. abscessus* et qui pourraient ouvrir ainsi la voie à de nouveaux schémas thérapeutiques prometteurs.

Chapitre III :

Les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins

Comme exposé dans les précédents chapitres, il est clair que le développement de molécules antimicrobiennes efficaces pour traiter les infections causées par *M. abscessus* représente un besoin majeur dans la lutte contre cette mycobactérie. La nature représente une source importante pour la découverte de nouvelles molécules bioactives et en particulier pour la découverte de composés antimicrobiens. En effet, beaucoup d'antibiotiques utilisés en clinique sont issus de métabolites naturels produits par des organismes tels que les bactéries ou encore les champignons ou sont sous forme de dérivé. La recherche constante de nouvelles molécules antimicrobiennes s'inscrit dans un objectif de contourner l'apparition de bactéries multi-résistantes qui sont à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques.

Au laboratoire, nous étudions une famille de composés dérivés des Cyclophostines et Cyclipostins (CyC) naturelles qui comprend une quarantaine de molécules possédant des propriétés particulièrement intéressantes dans le cadre d'un futur développement en thérapeutique. Dans ce dernier chapitre, nous aborderons dans un premier temps la découverte des Cyclophostines et Cyclipostins naturelles ainsi que leur propriété chimique. Puis, nous nous pencherons sur l'obtention des molécules analogues et de leur mécanisme d'action. Enfin, nous évoquerons la propriété antibactérienne des CyC sur les mycobactéries pathogènes ainsi que l'identification et la caractérisation des cibles impactées par ces molécules.

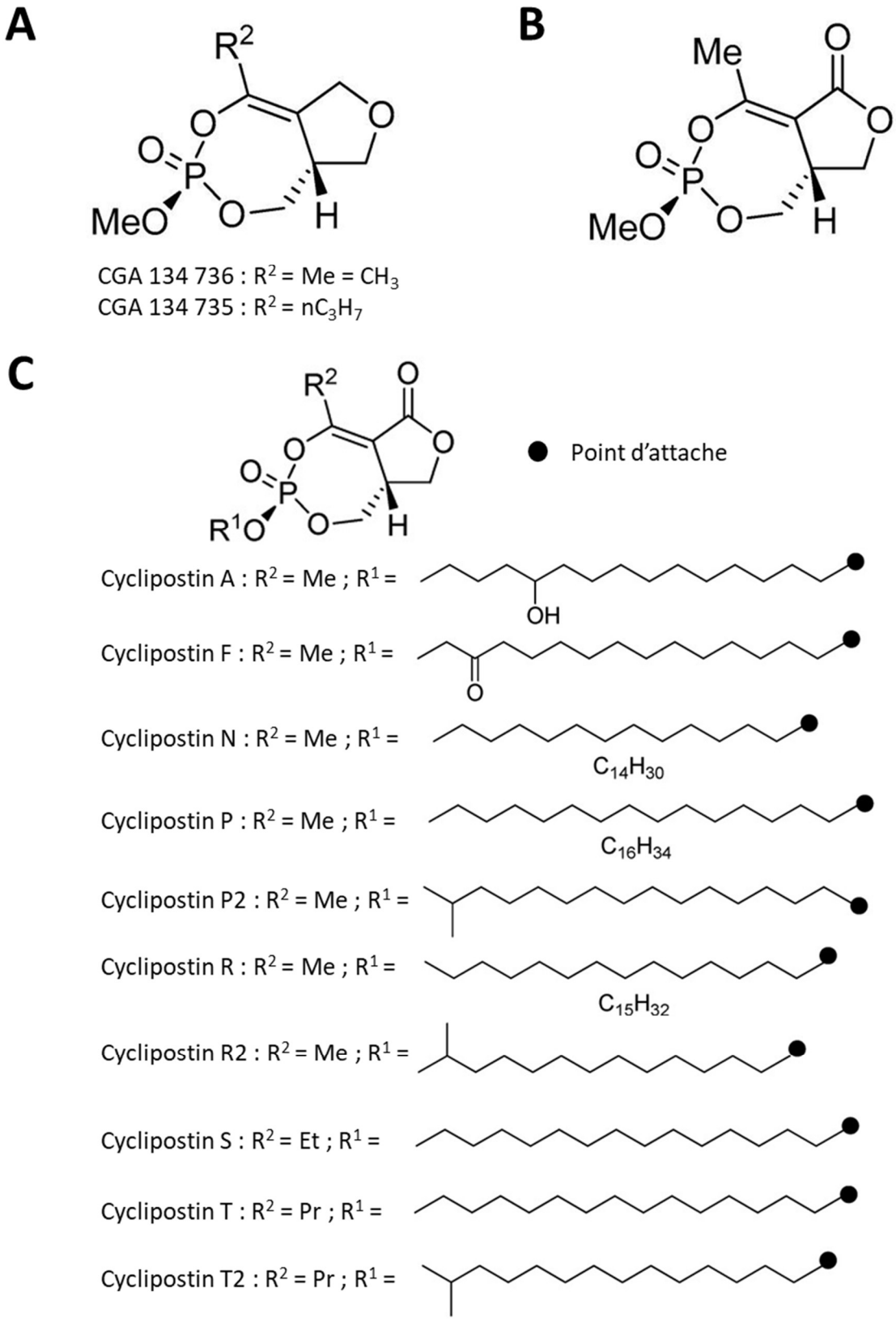


Figure 42 : Cyclophostines et Cyclipostins naturelles. (A) Structure chimique des deux Cyclophostines naturelles isolées à partir de *Streptomyces antibioticus* DSM1951. **(B)** Structure chimique de la Cyclophostine 1 naturelle isolée de la bactérie *Streptomyces lavendulae* NK901093. **(C)** Structures chimiques des Cyclipostins naturelles produites par *Streptomyces sp.* DSM13381. Adaptée de (Spilling, 2019).

I/ Découvertes des molécules naturelles

Les Cyclophostines et les Cyclipostins naturelles sont des molécules organophosphorées produites par des bactéries filamenteuses appartenant au genre *Streptomyces*. Ces molécules sont caractérisées par un phosphate énol cyclique constitué de sept atomes de carbone fusionné à un second cycle de cinq atomes de carbone de type γ-butyrolactone (**Figure 42**). Les Cyclophostines et les Cyclipostins sont des composés électrophiles qui ont la capacité de réagir avec des enzymes à sérine par phosphorylation du résidu (Dutta et al., 2010). Bien que les organophosphates soient essentiellement utilisés dans la composition des insecticides, la découverte de propriétés bioactives intéressantes des Cyclophostines et les Cyclipostins ont ouvert la voie à leur caractérisation comme alternative thérapeutique potentielle.

A) Les Cyclophostines

En tout premier lieu, dans les années 80, la recherche de nouvelles molécules insecticides naturelles a permis l'isolement de deux nouveaux composés organophosphorés bicycliques isolés à partir d'un microorganisme du sol, *Streptomyces antibioticus* DSM1951 (**Figure 42A**) (Neumann, 1987). Ainsi, les molécules CGA 134 736 et CGA 134 735 présentaient une toxicité *vis-à-vis* de plusieurs insectes grâce à leur activité inhibitrice sur l'acétylcholinestérase (AChE) de mouche avec une CI_{50} (concentration inhibitrice médiane) de l'ordre des 0,2 µM. De la même manière, quelques années plus tard, la Cyclophostine 1 est isolée à partir d'une solution de fermentation de *Streptomyces lavendulae* NK901093 (**Figure 42B**) et présentait une activité inhibitrice plus importante sur l'AChE de mouche avec une CI_{50} de 0,76 nM que les molécules précédemment isolées (Kurokawa et al., 1993). D'autre part, la résolution de la structure de la Cyclophostine 1 a permis de montrer qu'elle est composée d'un triester de phosphate cyclique unique fusionné à un cycle lactone (Spilling, 2019). Finalement, cette toute première caractérisation des Cyclophostines a mis en évidence que ces composés étaient de bons inhibiteurs de l'AChE et qu'elles pourraient avoir un intérêt pour une utilisation future comme agent insecticide.

B) Les Cyclipostins

Les Cyclipostins sont structurellement apparentées aux Cyclophostines, possédant une structure centrale similaire, et ont été isolées pour la première fois en 2001 à partir d'une solution de fermentation de *Streptomyces sp.* DSM13381 (Vertesy et al., 2002 ; Wink et al., 2002). Au total, 10 molécules ont pu être isolées (**Figure 42C**). Elles contiennent le même noyau bicyclique, mais varient au niveau de la nature de la chaîne présente sur l'ester de phosphate.

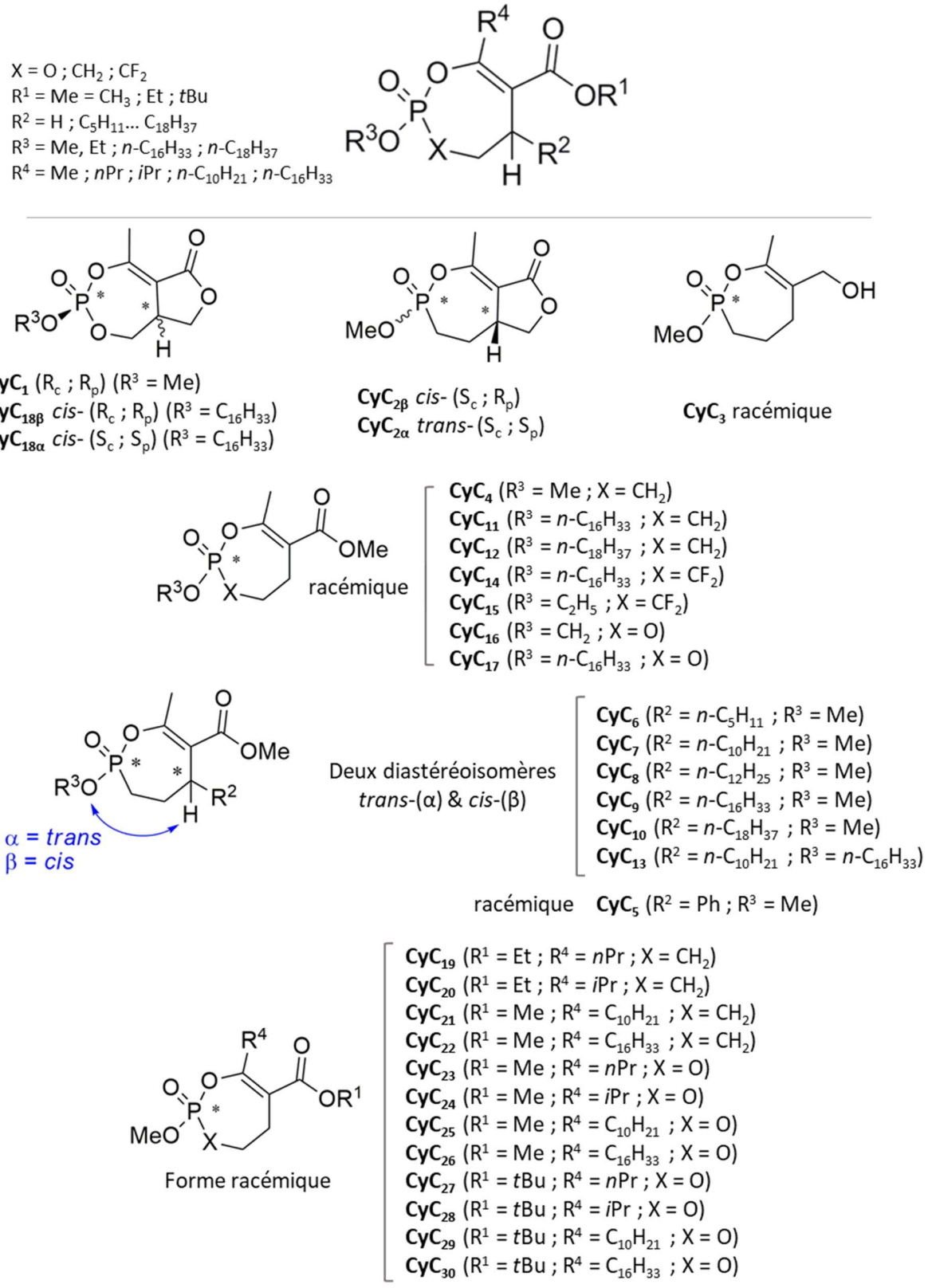


Figure 43 : Structure chimique des analogues de Cyclophostines et Cyclipostins. Adaptée de (Cavalier et al., 2021).

En effet, le phosphate est relié à un ester d'alcool d'une longueur de chaîne de 14 à 16 atomes de carbone (**Figure 42C**). Ces molécules présentent une forte activité inhibitrice sur la lipase hormono-sensible (HSL) de rat avec des CI_{50} comprises entre 20 et 40 nM (Vertesy et al., 2002). De plus, certaines Cyclipostins sont capables de bloquer la lipolyse d'adipocytes de rat suggérant que ces molécules peuvent passer la membrane plasmique des cellules. De ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que le blocage de l'activité de lipolyse des adipocytes était provoqué par l'inhibition de la HSL, enzyme présente dans le cytoplasme, par les Cyclipostins. Dès lors, Vertesy *et al.* ont proposé que ces nouvelles molécules représentaient des candidats attractifs pour le développement de traitements pour les troubles métaboliques tels que le syndrome métabolique ou le diabète de type II qui sont associés à l'augmentation de la lipolyse (Recazens et al., 2021).

En dernier lieu, la société Sanofi-Avantis a montré que les Cyclipostins possédaient une activité antimicrobienne sur deux souches mycobactériennes (*M. phlei*, *M. smegmatis*), deux souches de *Nocardia* (*Norcadia abscessus* et *Norcadia brasiliensis*), une souche de *Corynebacterium* (*Corynebacterium diphteriae*) avec des valeurs de CMI similaires à celles de la rifampicine et de la pénicilline G démontrant ainsi l'intérêt de l'utilisation de ces molécules dans le traitement de ces organismes dont certains sont des pathogènes (Seibert, 2009). De plus, la capacité de ces molécules à traverser les membranes cellulaires pourrait être un atout de choix afin de cibler des pathogènes intracellulaires comme les mycobactéries qui peuvent adopter lors d'une infection une forme extra ou intracellulaire.

Toutes ces propriétés bioactives que possèdent les Cyclophostines et Cyclipostins naturelles ont ouvert la voie à la synthèse de nouvelles molécules au cours de ces dernières années, dont des molécules analogues, afin d'optimiser leur activité inhibitrice et leur sélectivité.

II/ Les analogues de Cyclophostines et Cyclipostins

A) Synthèse des molécules analogues

En 2008, la synthèse chimique de la Cyclophostine 1 et de molécules analogues, par l'équipe du Dr Christopher Spilling, a permis d'obtenir deux nouveaux composés, $CyC2\alpha_{(trans)}$ et $CyC2\beta_{(cis)}$, qui sont des dérivés phosphonates où l'atome d'oxygène en position 5 a été substitué par un atome de carbone (**Figure 43**) (Bandyopadhyay et al., 2008). L'objectif de cette étude était d'obtenir des molécules qui ne peuvent pas être hydrolysées par des phosphatases afin d'augmenter leur durée de vie *in vivo*. L'activité inhibitrice de ces molécules a été ensuite testée sur l'AChE humaine et celle de l'anguille électrique.

Ces deux molécules présentaient une activité inhibitrice sur les deux enzymes avec une meilleure activité sur l'AChE humaine, avec des CI_{50} de 3 µM pour le $CyC_{2\alpha}$ et 30 µM pour le $CyC_{2\beta}$ (Bandyopadhyay et al., 2008). Cela a permis de montrer que la substitution de l'oxygène en carbone n'entraînait pas la perte de l'activité inhibitrice de ces molécules. De plus, l'isomère *trans* ($CyC_{2\alpha}$) était plus actif que l'isomère *cis* ($CyC_{2\beta}$). Cependant, ces nouvelles molécules analogues se sont montrées moins actives que la Cyclophostines 1 naturelle (CI_{50} = 0,76 nM).

À la suite de cette étude, d'autres analogues phosphonates monocycliques de Cyclophostines $CyC_{3\text{-}10\ ;19\text{-}22}$ et des analogues phosphates $CyC_{23\text{-}30}$ ont été synthétisés (Dutta et al., 2010 ; Malla et al., 2011 ; Point et al., 2012 ; Martin et al., 2015 ; Madani et al., 2019). Concernant les Cyclipostins, de nouvelles molécules ont pu être synthétisées comme la Cyclipostins P ($CyC_{18\beta}$) et son isomère *trans* ($CyC_{18\alpha}$) ainsi que les analogues phosphonates monocycliques $CyC_{11\text{-}13}$, les difluorophosphonates $CyC_{14\text{-}15}$ et les analogues phosphates $CyC_{16\text{-}17}$ (Point et al., 2012 ; Martin et al., 2015 ; Vasilieva et al., 2015 ; Nguyen et al., 2017).

Aujourd'hui, une quarantaine de molécules analogues phosphates et phosphonates sont disponibles au laboratoire et leurs structures sont compilées dans la **Figure 43**. Au cours de ces dernières années, la caractérisation de ces nouvelles molécules sur des enzymes purifiées (voir § **Chapitre III : II/ B) Activité inhibitrice : enzymes de mammifères *vs* enzymes microbiennes**) ou sur des bactéries entières (voir § **Chapitre III : III/ Activité antibactérienne des analogues**) a permis d'apporter des informations sur la relation structure et activité inhibitrice ainsi que sur leur mécanisme d'action, leur propriété antibactérienne et leur cible.

B) Activité inhibitrice : enzymes de mammifères *vs* enzymes microbiennes

À la suite de la synthèse des nouvelles molécules analogues, l'activité inhibitrice d'un panel de CyC a été caractérisée *in vitro* sur des enzymes à sérine qui appartiennent à la vaste famille des enzymes lipolytiques et ayant le même mécanisme d'action. Dans ce contexte, l'inhibition des CyC a été testée sur trois lipases digestives de mammifères ainsi que sur des enzymes mycobactériennes purifiées telles que LipY (Rv3097c) et Rv0183 présentes chez *M. tuberculosis*, et la cutinase de *Fusarium solani pisi* (Point et al., 2012 ; Point et al., 2013).

Pour les enzymes de mammifères, le choix s'est porté sur la lipase gastrique de chien et la lipase pancréatique humaine qui sont actives sur des triacylglycérides et des diacylglycérides ; mais également sur la lipase pancréatique apparentée de type 2 du cochon d'Inde qui possède une activité lipase ainsi qu'une activité de phospholipase A1 et de galactolipase (Withers-Martinez et al., 1996 ; Carriere et al., 1997 ; Eydoux et al., 2007).

Concernant les enzymes bactériennes, la cutinase est capable d'hydrolyser une grande variété de substrats comme de la cutine, mais aussi des phospholipides, des triacylglycérides ou des esters d'acides gras. La LipY, quant à elle, est une triacylglycéride lipase de la même famille que la HSL ; et la Rv0183 est une monoacylglycérol lipase (Longhi et al., 1997 ; Deb et al., 2006 ; Cotes et al., 2007).

Toutes ces enzymes ont été sélectionnées comme modèles représentatifs de la diversité des enzymes lipolytiques, car elles ont des propriétés structurelles distinctes, comme la présence ou non d'un couvercle qui contrôle l'accès au site actif, et des spécificités de substrats diverses. L'étude sur cette panoplie d'enzymes a permis d'apporter des informations sur la relation structure et activité notamment sur l'effet de la chaîne alkyle sur le phosphore (position R_3), l'influence du substituant R_2 sur le carbone 5 et l'effet de la fonction lactone ou du groupement ester libre.

La modification de la longueur de la chaîne alkyle soit au niveau de l'atome C5 en position R^2 ou soit au niveau de l'atome de phosphore en position R^3 a permis de montrer que la lipophilie du CyC avait un impact sur l'efficacité inhibitrice (Lenfant et al., 2013 ; Point et al., 2013). En effet, les CyC les plus hydrophobes présentaient une meilleure activité inhibitrice sur la LipY et la Rv0183 que les composés faiblement hydrophobes. D'ailleurs, ces résultats sont en accord avec la spécificité de substrat de ces enzymes qui hydrolysent des molécules hydrophobes (Deb et al., 2006 ; Cotes et al., 2007). Par conséquent, ce paramètre peut être exploité pour diminuer ou augmenter l'affinité du CyC sur une enzyme spécifique. Il a été également montré que le cycle butyrolactone n'est pas nécessaire à l'activité du CyC contrairement à la fonction ester conjuguée au phosphonate, car les CyC monocycliques présentaient une activité inhibitrice comparable aux CyC bicycliques.

Fait intéressant les molécules analogues étaient de puissants inhibiteurs des enzymes mycobactériennes testées, mais elles avaient perdu leur action sur les enzymes de mammifères ciblées par les molécules naturelles (Point et al., 2012 ; Martin et al., 2015 ; Vasilieva et al., 2015).

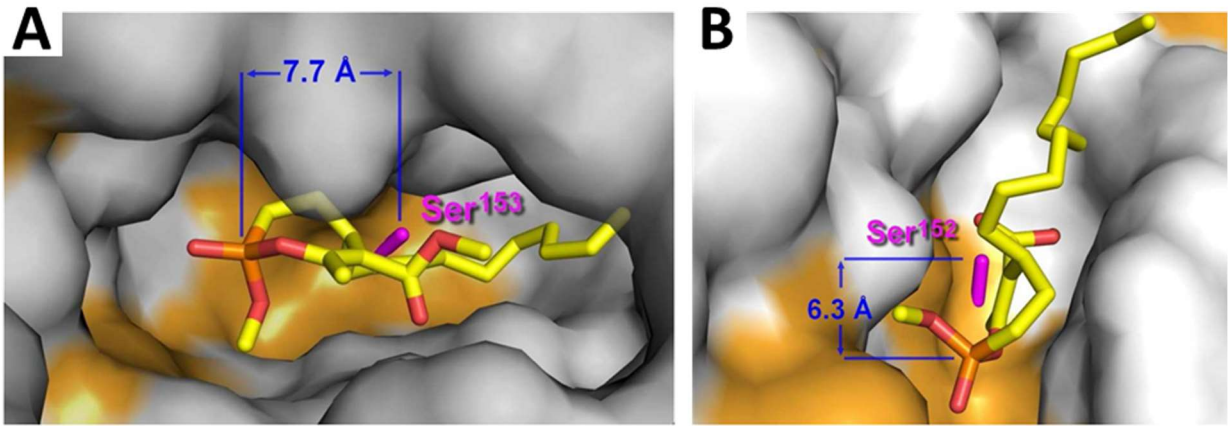


Figure 44 : Modélisation tridimensionnelle du CyC$_{7\alpha}$ dans le site actif d'enzymes de mammifères. « Docking *in silico* » du CyC$_{7\alpha}$ dans la structure **(A)** de la lipase gastrique de chien (PDB 1K8Q) et **(B)** de la lipase pancréatique humaine (PDB 1LPB). La sérine est représentée en magenta et les résidus hydrophobes en blanc. La distance calculée [Ser-Oγ / P] est indiquée en bleu. Adaptée de (Point et al., 2012).

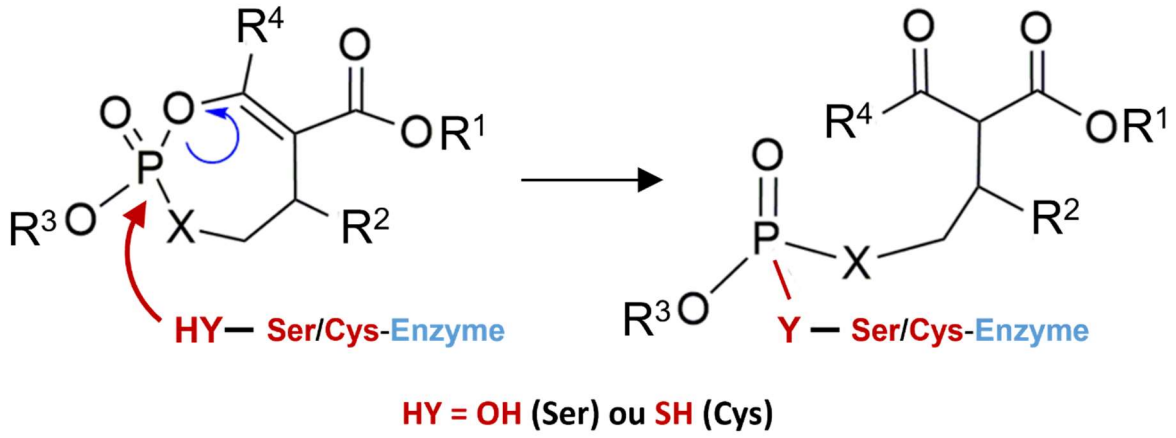


Figure 45 : Mécanisme d'action des CyC. Les CyC vont former une liaison covalente non hydrolysable entre le groupement phosphonate ou phosphate du CyC et le groupement OH de la sérine ou SH de la cystéine catalytique. Adaptée de (Point et al., 2012 ; Cavalier et al., 2021).

Ainsi, les modifications chimiques apportées aux analogues de CyC, notamment en termes de lipophilie, ont permis de supprimer leurs effets sur les enzymes de mammifère testées (Point et al., 2012). Afin de comprendre cette absence d'activité sur les enzymes de mammifère, le « docking *in silico* » du $CyC_{7\alpha}$ dans le site actif de la lipase gastrique de chien et de la lipase pancréatique humaine a permis de mettre en évidence que les CyC sont capables de se loger dans la poche catalytique (**Figure 44**). En revanche, l'atome de phosphore se retrouve du côté opposé à la sérine active empêchant ainsi la réaction avec le résidu catalytique (**Figure 44**) (Point et al., 2012).

C) Mécanisme d'action

Tout comme les molécules naturelles, les CyC sont capables d'agir spécifiquement sur les enzymes possédant une sérine ou une cystéine catalytique dans leur site actif. L'analyse par spectrométrie de masse de l'AChE, de la cutinase, de la LipY et de la Rv0183 préalablement incubée avec le $CyC_{2\alpha}$, CyC_4, $CyC_{7\beta}$, et CyC_{11} respectivement a permis de montrer que l'inhibition est due à une interaction covalente entre l'inhibiteur et l'enzyme (Dutta et al., 2010 ; Point et al., 2012). Ces composés inhibent l'activité des enzymes en formant une liaison covalente non hydrolysable entre le groupement phosphonate ou phosphate du CyC et le groupement OH de la sérine ou SH de la cystéine du site catalytique de l'enzyme (**Figure 45**) (Point et al., 2012). D'autant plus, la formation de cette liaison non hydrolysable entre l'enzyme et le CyC rend cette inhibition irréversible.

En conclusion, ces diverses études ont permis de montrer que les CyC peuvent être des inhibiteurs sélectifs des enzymes à sérine microbiennes et en particulier de la famille des enzymes lipolytiques. Les enzymes lipolytiques jouent un rôle central et essentiel dans le cycle de vie des mycobactéries notamment pour la croissance, la virulence ou la persistance (Dedieu et al., 2013). Leur implication dans divers processus biologiques les rend particulièrement attractifs en tant que cibles thérapeutiques. En partant du postulat que les CyC sont de bons inhibiteurs d'enzymes lipolytiques, il a été proposé que les CyC puissent être utilisés comme agent antimicrobien contre les mycobactéries.

Table 5 : Activité antibactérienne des CyC sur *M. abscessus*. La CMI_{50} correspond à la concentration minimale de CyC conduisant à 50 % d'inhibition de la croissance bactérienne. La CC_{50} correspond à la concentration de CyC qui provoque 50 % mortalité sur des macrophages Raw264.7. Le vert correspond aux CMI comparables aux antibiotiques de référence sur la croissance *in vitro* et l'orange correspond aux meilleurs CMI sur la croissance intramacrophagique. ND : non déterminée. Adaptée de (Madani et al., 2019).

Composés	Croissance *in vitro* CMI_{50} (µg/mL)		Croissance intramacrophagique *M. abscessus* S	
	Morphotype S	Morphotype R	CC_{50} µg/mL	$CMI_{50\ raw}$ µg/mL
Amikacine	2,3	4,3	> 50	ND
Imipénem	3,4	8,9	ND	8,47
CyC_{17}	5,6	0,16	> 50	Pas d'effet
CyC_{25}	30,8	5,0	> 50	Pas d'effet
CyC_{26}	26,8	3,1	> 50	Pas d'effet
$CyC_{7\alpha}$	55,0	55,0	> 50	10,9
$CyC_{7\beta}$	55,0	52,0	> 50	24,5
$CyC_{8\alpha}$	70,4	18,9	> 50	3,2
$CyC_{8\beta}$	50,7	28,6	> 50	0,8

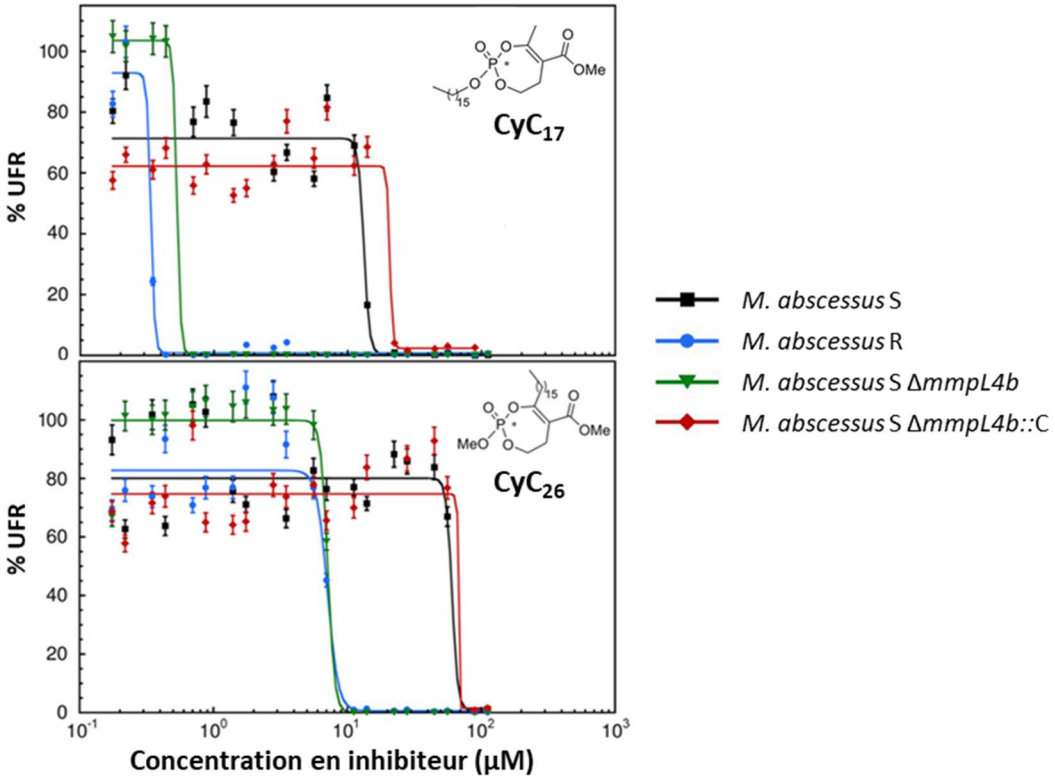
III/ Activité antibactérienne des analogues

La sélectivité des analogues envers les enzymes mycobactériennes ainsi que l'effet des CyC naturels sur la croissance de *M. smegmatis* et *M. phlei* (Seibert, 2009) suggéraient que les CyC étaient effectivement des candidats de choix pour inhiber la croissance des mycobactéries pathogènes et devenir de bons outils thérapeutiques. Au cours de ces dernières années, une série de 38 CyC a été synthétisée.

L'ensemble des études a permis de montrer que les CyC possèdent une activité antibactérienne sur plusieurs souches de mycobactéries incluant *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. bovis* BCG, *M. abscessus* S et R (les CMI sur *M. abscessus* sont compilées en **Table 5**), mais sont totalement inactifs sur des bactéries à Gram négatif et positif telles que *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* ou encore *Enterococcus faecalis* (Nguyen et al., 2018a). Ces résultats ont permis d'établir que l'activité antibactérienne des CyC était spécifique aux mycobactéries et ceci pourrait être lié à la nature de la paroi mycobactérienne, riche en lipides, qui permettrait ainsi l'entrée de composés hydrophobes comme les CyC.

Chez *M. tuberculosis*, huit CyC ont montré une bonne activité antibactérienne sur la croissance *in vitro* avec des valeurs de CMI_{50} (concentration minimale qui inhibe 50 % de la croissance bactérienne), qui varient de modérées (6-16 µg/mL), à excellentes (0,74 µg/mL pour le CyC_{17}) (Nguyen et al., 2017). Sur la totalité des CyC testés sur *M. abscessus*, incluant les trois sous-espèces, ainsi que sur plusieurs isolats cliniques, les CyC_{17}, CyC_{25} et CyC_{26} ont montré des valeurs de CMI_{50} similaires à celles des antibiotiques de référence utilisés en clinique pour traiter les infections à *M. abscessus* (**Table 5**) (Madani et al., 2019). Il faut également souligner que le CyC_{17} s'est montré particulièrement actif sur les mycobactéries et en particulier sur *M. abscessus*, avec des valeurs de CMI_{50} très proche des meilleurs antibiotiques de référence, voir pour le morphotype R, meilleures que les CMI_{50} de l'AMK et l'imipénem utilisés en clinique contre la bactérie (**Table 5**).

De façon intéressante, l'activité des CyC s'est révélée être plus efficace sur le morphotype R que le morphotype S. En effet, les CMI_{50} pour les CyC_{17}, CyC_{25} et CyC_{26} sont considérablement réduites chez le variant R (**Table 5**) (Madani et al., 2019). Ce résultat est fort intéressant, car le morphotype R est associé à la forme la plus virulente de *M. abscessus* et il est responsable des infections aiguës qui peuvent être particulièrement sévères chez les patients notamment chez les individus atteints de mucoviscidose.



<u>Figure 46 :</u> Profil de sensibilité de *M. abscessus* S et R aux CyC. Activité dose-réponse du CyC_{17} et CyC_{26} contre *M. abscessus* S et R, le mutant S Δ*mmpL4b* et le mutant complémenté (Δ*mmpL4b*::C). La croissance est exprimée en unités de fluorescence relative normalisée (% UFR). Adaptée de (Madani et al., 2019).

Il a été supposé que cette différence de sensibilité aux CyC entre le variant S et le R pourrait être due à la présence de GPL chez le variant S qui agirait comme une couche protectrice *vis-à-vis* des CyC contrairement au morphotype R.

Il a été montré qu'un mutant de délétion Δ*mmpL4b* de *M. abscessus* S, dépourvu de GPL, présentait le même profil de sensibilité aux CyC que le variant R (**Figure 46**) (Madani et al., 2019). La complémentation de *mmpL4b* chez la souche mutante permet de restaurer le profil de sensibilité de la souche lisse parentale (**Figure 46**). Ainsi, la présence ou l'absence des GPL à la surface cellulaire pourrait jouer un rôle essentiel dans l'efficacité des CyC, en modifiant la fluidité et la perméabilité de la paroi cellulaire.

En plus de l'activité antimicrobienne des CyC *in vitro*, ces composés sont également capables de bloquer la croissance bactérienne dans des macrophages infectés. En effet, il a été montré que la croissance intracellulaire de *M. abscessus* au sein de macrophages infectés peut être bloquée efficacement par les $CyC_{7(\alpha,\beta)}$, et les $CyC_{8(\alpha,\beta)}$ (**Table 5**). De plus, les composés ne présentent pas de toxicité sur les macrophages murins Raw 264.7, tout en ayant des concentrations cytotoxiques (CC_{50}) supérieures à 50 µg/mL (> 100 µM) (Nguyen et al., 2017 ; Madani et al., 2019).

Comme présenté dans le **Chapitre I**, *M. abscessus* peut se retrouver sous forme extra et intracellulaire au cours de l'infection. La capacité des CyC à agir spécifiquement sur la croissance *in vitro* ou intracellulaire est un atout particulièrement intéressant pour établir de nouveaux schémas thérapeutiques qui permettront de traiter à la fois les bactéries circulantes dans le milieu extracellulaire et les bactéries intracellulaires.

Il faut également souligner que les CyC qui ont une activité *in vitro*, comme le CyC_{17} ou le CyC_{26}, et qui sont des analogues possédant un phosphate sont inactifs en intracellulaire (**Table 5**) (Nguyen et al., 2017 ; Madani et al., 2019). De façon plus générale, il a été observé que seuls les analogues phosphonates se sont avérés actifs en intracellulaire contrairement aux analogues phosphates. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les composés phosphonates sont moins sensibles aux phosphatases, et leur durée de vie *in vivo* serait par conséquent augmentée par rapport aux analogues phosphates. Il est probable que les analogues phosphates soient hydrolysés par les phosphatases eucaryotes, inactivant ainsi la molécule. Ainsi, il a été supposé que la différence d'activité en intracellulaire entre les analogues phosphates et phosphonates, repose uniquement sur la présence ou non d'une liaison hydrolysable.

IV/ Identification des cibles

Afin d'identifier la ou les cibles impactées par les différents CyC, des études de génération de mutants de résistances ont été réalisées sans succès. En effet, quelle que soit la molécule CyC utilisée, aucune bactérie résistante n'a pu être générée. Cependant, le mécanisme d'action irréversible des CyC présenté précédemment (voir § **Chapitre III : II/ C) Mécanisme d'action**), a permis d'identifier les cibles impactées chez *M. tuberculosis* et chez *M. abscessus* grâce à la technique de « l'Activity Based Protein Profiling » (ABPP) couplée à la spectrométrie de masse (Nguyen et al., 2017 ; Madani et al., 2019). Les sondes basées sur l'activité permettent d'isoler des ensembles sélectifs d'enzymes à faible nombre de copies dans des mélanges protéomiques complexes par la reconnaissance chimique d'un mécanisme catalytique spécifique sans interférence avec les protéines les plus représentées (Cravatt et al., 2008). La technique de l'ABPP est approfondie dans la partie résultats dans le premier article de la thèse intitulé **« Deciphering the physiological role of serine enzymes involved in mycobacterial lipid metabolism using activity-based protein profiling »**.

L'ABPP a donc permis l'identification des cibles impactées par le CyC_{17} sur un lysat de *M. tuberculosis* et a montré que les CyC sont des molécules multi-cibles, ce qui pourrait expliquer pourquoi aucun mutant de résistance n'a pu être généré (Nguyen et al., 2017). De cette étude, 23 protéines ont pu être identifiées, dont la CaeA (Carboxylestérase A), la HsaD (2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate hydrolase), l'Ag85C (Antigène 85C), la TesA (Thioestérase A), etc…, impliquées dans plusieurs processus biologiques comme la synthèse ou le maintien de l'intégrité de la paroi, le métabolisme lipidique ou la virulence. Certaines de ces protéines sont avérées être essentielles pour la croissance extra, mais aussi intracellulaire de *M. tuberculosis* (Nguyen et al., 2017). L'interaction du CyC_{17} avec l'Ag85C, TesA ou encore la HsaD a pu même être validée à travers d'études biochimiques et structurales apportant ainsi des informations sur les paramètres d'inhibition, les spécificités des inhibiteurs, la stœchiométrie (x_{I50} : excès molaire d'inhibiteur conduisant à 50 % d'inhibition) ou même l'identification des résidus impliqués dans la stabilisation de l'inhibiteur (Viljoen et al., 2018 ; Nguyen et al., 2018b ; Barelier et al., 2023).

Afin de déterminer si la surexpression d'une cible impactait la sensibilité aux CyC, la CMI_{50} du CyC_{17} a été déterminée sur des souches surexprimant un des gènes préalablement identifiés comme l'*ag85C*, *tesA* ou *hsaD* (Nguyen et al., 2017). Cependant, dans aucun des cas, la CMI_{50} du CyC_{17} n'a été impactée par la surexpression d'un de ces gènes par rapport au contrôle.

Ces résultats suggèrent une nouvelle fois que la surproduction d'une seule enzyme n'est pas suffisante pour augmenter la résistance aux CyC et renforce l'hypothèse que les CyC sont des molécules multi-cibles. Cette caractéristique est particulièrement intéressante lorsqu'on veut développer des molécules thérapeutiques afin de prévenir l'apparition de bactéries résistantes.

De la même manière, la recherche de cibles du CyC_{17} chez *M. abscessus* a été réalisée sur des cellules entières de *M. abscessus* et a permis d'identifier 39 cibles potentielles, dont certaines possèdent des orthologues annotés comme essentiels chez *M. tuberculosis* (Madani et al., 2019). En plus de certains homologues déjà identifiés chez *M. tuberculosis*, une multitude d'hydrolases ont pu être identifiées, dont une amidase AmiC (MAB_2181c) impliquée dans la synthèse et le remodelage du PG ; les membres du complexe Ag85 intervenants dans la synthèse du TDM et des membres de la famille des lipases Lip (Madani et al., 2019). Également, plusieurs méthyltransférases ont été identifiées, dont la protéine Erm(41) responsable de la résistance induite aux macrolides (voir § **Chapitre II : III/ E) Protection de la cible**). La découverte d'Erm(41) comme cible potentielle des CyC est extrêmement attrayante et a ouvert la voie vers leur possible utilisation pour contrer la résistance induite aux macrolides dans le cadre d'une chimiothérapie lors d'infections à *M. abscessus*.

Objectifs

L'élaboration d'une stratégie de lutte efficace contre les infections à *M. abscessus* devient indispensable et fait l'objet de nombreuses études à travers le monde scientifique. Dès lors, les CyC représentent une famille de composés particulièrement attractifs dans le cadre d'une chimiothérapie anti-*M. abscessus*. Leur mécanisme d'action irréversible, leur absence de cytotoxicité ainsi que leur effet multi-cible sont des atouts majeurs qui pourraient offrir de nouvelles opportunités thérapeutiques aux patients infectés par *M. abscessus*. De plus, leur activité antibactérienne spécifique aux mycobactéries permettrait d'élaborer une thérapie ciblée chez ces patients. D'autre part, l'identification de la méthyltransférase Erm(41) responsable de la résistance induite aux macrolides, majoritairement à l'origine d'impasse thérapeutique, comme étant une des cibles des CyC est une découverte importante qui permettrait de restaurer efficacement la susceptibilité aux macrolides, et donc de mieux lutter contre les infections dues à *M. abscessus*. Ce travail qui s'inscrit dans un projet collaboratif financé par l'association Vaincre la Mucoviscidose et l'association Grégory Lemarchal en partenariat avec le Dr Laurent Kremer (IRIM, Montpellier) et le Pr Jean-Louis Herrmann **(**UVSQ, Versailles) s'est axé sur l'étude du potentiel thérapeutique et diagnostique de cette famille de composés pour lutter contre *M. abscessus*. Mon projet de thèse s'est articulé autour des objectifs suivants :

(i) Caractérisation du mécanisme de pénétration des CyC au niveau de la bactérie *in vitro* et au sein de macrophages infectés grâce à la synthèse de nouvelles sondes fluorescentes.

(ii) Etude de l'import et de l'export des CyC chez *M. abscessus*. Cette partie vise à comprendre la dynamique de pénétration, d'import et d'export de nos composés chez les mycobactéries et en particulier sur notre modèle d'étude (*M. abscessus*).

(iii) Évaluation de l'activité antibactérienne des CyC lorsqu'ils sont associés aux antibiotiques utilisés en clinique sur la croissance de *M. abscessus*.

(iv) Potentialisation de l'activité des macrolides par les CyC sur des souches résistantes aux macrolides médiée par Erm(41). Cette étude permettra de déterminer si l'effet du macrolide peut être potentialisé avec nos composés et s'il est possible de déterminer une combinaison CyC/macrolide efficace pour contrer la résistance induite.

(v) Caractérisation biochimique et structurale des interactions de la protéine Erm(41) avec les CyC dans le but de déterminer le meilleur inhibiteur pour cette méthyltransférase, et afin de mieux comprendre le mécanisme d'action d'Erm(41) sur sa cible.

RÉSULTATS

Article 1

« Deciphering the physiological role of serine enzymes involved in mycobacterial lipid metabolism using activity-based protein profiling »

Romain Avellan*, Morgane Sarrazin*, Christopher D. Spilling, Céline Crauste, Stéphane Canaan et Jean-François Cavalier

Biology of Mycobacterial Lipids

DOI : 10.1016/B978-0-323-91948-7.00001-4

* Contribution égale

Les lipides sont des macromolécules qui jouent un rôle clé dans la physiologie, le cycle de vie et la virulence des mycobactéries. Il est bien établi que les lipides sont importants dans divers processus cellulaires comme la croissance, la synthèse et le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, l'interaction hôte pathogène, ou encore la dormance. *M tuberculosis*, agent de la tuberculose, est capable de métaboliser les lipides de l'hôte et de les accumuler sous forme de lipides neutres dans des inclusions lipidiques intracytoplasmiques (Mallick et al., 2021). Ce stockage de lipide constitue un réservoir lipidique qui peut soit permettre à la bactérie d'arrêter sa réplication et d'entrer dans un état de persistance, soit servir de source de carbone en cas de carence nutritive. L'utilisation massive de lipides, requiert alors la synthèse de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme lipidique. Le séquençage et l'annotation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv a permis de rapporter qu'environ 250 gènes codent pour des enzymes qui sont impliquées dans le métabolisme des lipides soient environ 6 % du génome (Cole et al., 1998). C'est cinq fois plus que chez *E. coli* qui ne compte qu'une cinquantaine de gènes codants pour des enzymes dédiées au métabolisme des lipides. Parmi les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides, on retrouve un grand nombre d'hydrolases à sérine qui interviennent dans la biosynthèse de l'enveloppe et comprend également des lipases qui sont responsables de la dégradation des lipides de l'hôte (Johnson, 2017).

Le décryptage des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique est devenu une stratégie clé dans la lutte contre la tuberculose, mais également applicable pour d'autres mycobactéries pathogènes. En effet, le rôle majeur de ces enzymes dans la physiopathologie de la maladie lors des phases active et persistante de l'infection, en font de potentielles cibles thérapeutiques et ouvrirait la voie vers la découverte de nouveaux traitements. Le profilage protéique basé sur l'activité est apparu comme une stratégie chimioprotéomique intéressante pour identifier et caractériser les enzymes mycobactériennes responsables de la synthèse et de la dégradation de ces lipides. Grâce à l'ABPP, un sous-ensemble de protéines exprimées a pu être identifié en fonction de leur activité spécifique pour une molécule chimique utilisée comme sonde chimique sélective appelée sonde basée sur l'activité.

Dans cette revue, nous avons fait une rétrospective bibliographique qui relate l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes à sérine comme sondes basées sur l'activité pour l'identification et la caractérisation des hydrolases à sérine impliquées dans le métabolisme des lipides de *M. tuberculosis*.

Cette revue a pour objectif de montrer une autre facette des CyC qui sont non seulement des molécules à intérêt thérapeutique, mais également les CyC peuvent être utilisés comme des outils puissants pour fournir de nouvelles informations sur un mécanisme particulier. La recherche et l'identification des cibles impactées par les CyC chez *M. abscessus* ont été le point de départ de tout mon travail de thèse et a permis d'ouvrir la voie aux études présentées dans ce manuscrit, c'est pourquoi il m'est apparu important d'inclure un récapitulatif sur cette thématique.

CHAPTER

11

Deciphering the physiological role of serine enzymes involved in mycobacterial lipid metabolism using activity-based protein profiling

Romain Avellan[1,a], *Morgane Sarrazin*[1,a], *Christopher D. Spilling*[2], *Céline Crauste*[3], *Stéphane Canaan*[1] *and Jean-François Cavalier*[1]

[1]**Aix-Marseille University, CNRS, LISM, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille, France;** [2]**Department of Chemistry and Biochemistry, University of Missouri—St. Louis, One University Boulevard, St. Louis, MO, United States;** [3]**IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France**

Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), is an ancient disease that is one of to the top-ten causes of death worldwide and still remains in 2021, the leading cause of death by a bacterial pathogen. Every year, TB claims the lives of nearly 1.4 million people, despite being curable with affordable and accessible antibiotics to treat the infection [1]. The increasing global health burden of TB is further aggravated by the alarming increase of multi- and extensively drug-resistant *M. tb* strains, which requires longer and more costly therapeutic regimens.

A hallmark of *M. tb*, as well as other pathogenic mycobacteria, is its ability to not only synthetize its own lipids, but also to metabolize host lipids. Indeed, upon infection, *M. tb* exploits metabolic pathways to import and process host-derived free fatty acids, subsequently stored

[a] Both authors should be considered as equal first authors, and are listed in alphabetical order.

Biology of Mycobacterial Lipids
https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91948-7.00001-4

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

as TAG in its own cytoplasm in the form of intracytoplasmic lipid inclusions (ILI). Under nutrient-starvation, these ILI serve as carbon source and energy promoting bacterial survival. At this stage, lipid-loaded mycobacteria could stop their replication and enter in a persistent and nondividing state. During the reactivation phase, the bacilli hydrolyze the lipids contained inside the ILI and the fatty acids thus released are used to fuel the regrowth leading to its exit from the nonreplicating state [2]. These findings therefore emphasize the essential role of central lipid metabolism in long-term survival and persistence of the bacilli [3]; and consequently, that of mycobacterial lipid hydrolyzing and synthesizing enzymes, most of which possess a catalytic serine or cysteine residue in their catalytic site (i.e., (Ser/Cys)-based enzymes).

Accordingly, Serine enzymes (SEs) can catalyze a large variety of reactions: ester hydrolysis, trans- or interesterification, alcoholysis, acidolysis, or aminolysis; and have been shown to play critical roles in the physiopathology of the disease, being involved in various crucial processes, including lipid storage and degradation, in addition to cell wall biosynthesis and maintenance [4]. Accordingly, SEs represent a promising class of potential therapeutic enzyme targets in the fight against this pathogenic mycobacterium [5]. Therefore, finding ways to identify, inhibit, or control the activity of such mycobacterial SEs may open the way to new chemotherapeutic developments against pathogenic mycobacterial-related infections, especially against *M. tb*.

In this context, the use of small molecule inhibitors that covalently bind the active site of their protein targets has led to the development of a powerful chemoproteomic technique, termed activity-based protein profiling (ABPP), allowing the identification of bacterial SEs in complex proteome [6].

In this chapter, we will highlight the use of SE inhibitors as activity-based probes (ABP) for the identification and characterization of the functional state of mycobacterial SEs specifically involved in lipid synthesis or lipid degradation within *M. tb*.

Serine enzymes in M. *tb*—the fundamental of a new drug family development

Serine enzymes from M. *tb*

Genome sequencing of *M. tb* H37Rv strain, composed of 4.4 million base pairs and encoding about 4000 proteins, revealed that this bacterium possesses 250 enzymes involved in lipid metabolism, representing 6% of the full genome [7]. Among these enzymes, SEs play many roles in the assembly, the modification, and the maintenance of the waxy mycobacterial cell envelope.

SEs are characterized by a common α/β-hydrolase fold as secondary structure, and a conserved catalytic triad (Fig. 11.1). This fold is composed of 5–13 β-strands, usually eight, forming a parallel β-sheet and one antiparallel β-strand surrounded on both sides by α-helices (Fig. 11.1A) [8]. The catalytic triad is formed by a histidine, a nucleophilic serine, and an acidic residue (Asp or Glu). The nucleophilic serine is mainly present in the consensus pentapeptide motif Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly and located at the center of a structural moiety called nucleophilic elbow at the terminal end on an α-helix and the beginning of the following β-sheet. This unique α/β-hydrolase fold structure therefore brings the serine, glutamic/aspartic acid, and histidine in close proximity allowing the formation of the correct

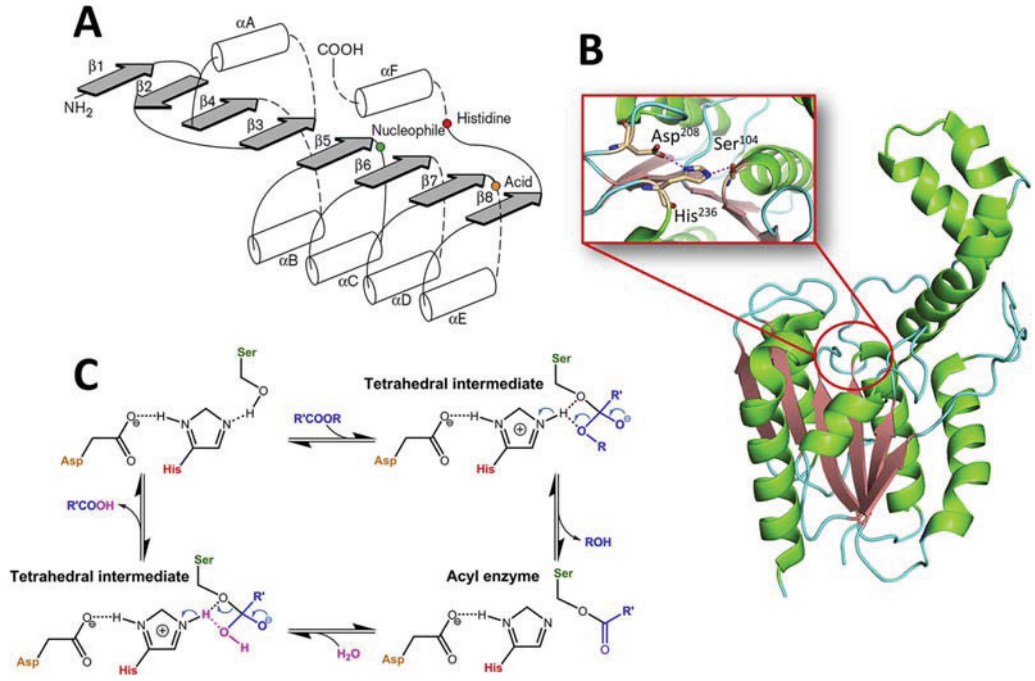


FIGURE 11.1 **(A) Secondary structure diagram of α/β-hydrolase**. α-helices and β-strands are represented by cylinders and arrows, respectively. Dashed lines indicate the location of possible insertions. The catalytic triad is composed of nucleophilic (green), acidic (orange), and histidine (red) residues. **(B) Ribbon view of overall structure of the *M. tb* thioesterase TesA (Rv2928)**. The α-helices are colored green and the β-strands salmon. The TesA catalytic triad Ser^{104}–His^{236}–Asp^{208} side chains are colored by atom type (N: blue, O: red, C: wheat) with black labels. The hydrogen bonds are colored magenta. **(C) Mechanism of action of serine enzymes**. *(A) Adapted from M. Nardini, B.W. Dijkstra, Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (1999) 732–737. (B) Adapted from PDB id: 6fw5 P.C. Nguyen, V.S. Nguyen, B.P. Martin, P. Fourquet, L. Camoin, C.D. Spilling, J.F. Cavalier, C. Cambillau, S. Canaan, Biochemical and structural characterization of TesA, a major thioesterase required for outer-envelope lipid biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis, J. Mol. Biol. 430 (2018) 5120–5136. (C) Adapted from S. Raza, L. Fransson, K. Hult, Enantioselectivity in Candida Antarctica lipase B: a molecular dynamics study, Protein Sci. 10 (2001) 329–338.*

hydrogen-bond network to create the catalytic triad for catalysis (Fig. 11.1A–B) [9]. The spatial arrangement of these residues decreases the acid-ionization constant of the serine hydroxyl group, enabling the nucleophilic attack on the carbonyl group of the substrate, leading to a tetrahedral intermediate stabilized by coordination by the so-called oxyanion hole (Fig. 11.1C). The geometry of the nucleophile elbow also contributes to the formation of the oxyanion-binding site, which is needed to stabilize the negatively charged transition state that occurs during hydrolysis. Finally, a nucleophile (either a water molecule or an alcohol) further attacks this acyl-enzyme intermediate via hydrolysis or alcoholysis and releases the product, thus regenerating the enzyme (Fig. 11.1C) [10,11].

The active site is usually located inside a pocket surrounded by hydrophobic residues which interact with their hydrophobic substrates. The binding site of SEs differs, however, in their hydrophobic interaction area, shape, size, deepness of the catalytic pocket, and physicochemical characteristics of their amino acids. Such characteristics are indeed responsible

for their difference in substrate specificity, and therefore for their enzyme activity. Some subclasses like amidases and patatin-like proteins possess, however, a different catalytic mechanism involving either a triad formed by Ser-Ser-Lys or a Ser-Asp dyad, respectively [12,13].

In *M. tb* H37Rv genome, 105 proteins predicted to be α/β-hydrolases have been identified; among which, approximately 30 enzymes possess the consensus sequence Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly most of them belonging to the Lip family [4]. Globally, although α/β-hydrolase enzymes vary in their amino acid sequences as well as in their broad range of substrates, they, however, share a conserved fold architecture and display a similar mechanism of action between all members of this superfamily. This point can be considered as a key to design efficient inhibitors. SEs obviously represent a gold mine awaiting to be exploited as new therapeutic targets against TB.

The following paragraphs will depict some mycobacterial SEs based on the nature and the specificity of their corresponding lipidic substrates.

Physiological role

True lipases

Lipases are lipolytic enzymes capable of hydrolyzing long-chain fatty acids from natural water-insoluble carboxylic esters, mainly triacylglycerols (TAG). Among the 12 genes in the so-called *M. tb* Lip family (LipC to LipZ) [14] only the *rv3097c* gene, named LipY, exhibited a lipase activity on long-chain TAG allowing the release of fatty acids which can be further used as a source of energy [15]. Moreover, an *M. tb* lipY-deficient mutant failed to escape from dormancy in an in vitro granuloma model [16]. LipY possesses a Pro-Glu (PE) signature motif at its N-terminus and is found either as a full-length intracytosolic form or as a mature extracellular form lacking its N-terminal PE domain and associated with the mycobacterial cell surface. LipY is indeed exported to the cell wall via the type VII secretion system ESX-5 after recognition of the specific amino acid sequence YxxxD/E, contained in this N-terminal PE domain [17–19]. Biochemical characterization suggested that due to its dual location, LipY is a major contributor to the breakdown of host and bacterial TAG, thus playing an essential role in *M. tb* intracytosolic lipid catabolism and exit from dormancy state [2].

In addition to LipY, the monoacylglycerol (MAG) lipase annotated Rv0183 has been reported to display true lipase activity by catalyzing the hydrolysis of MAG into free glycerol and fatty acid, which can be further reprocess by the bacteria [20]. Immunolocalization studies revealed that this enzyme is present either in culture medium, or in bacterial cell wall. Drastic changes in colony morphology, together with important antibiotic susceptibility modifications, were observed with a disrupted mutant of its ortholog MSMEG_0220 in *M. smegmatis*, which were partly restored in the complemented mutant [21]. These results point out the critical structural role of Rv0183 in mycobacterial cell wall architecture, in addition to its contribution to the hydrolysis of host cell lipids.

(Thio)Esterase family

Esterases catalyze the hydrolysis of soluble ester substrates rather than water-insoluble substrates like long-chain TAG. Among *M. tb* proteome, around 20 esterases have been biochemically characterized, but their physiological roles are not yet clearly elucidated. The

thioesterases LipG (Rv0646c) and TesA (Rv2928) have been showed to be involved in the synthesis and remodeling of the membrane [22,23]. LipG has also been proposed to be involved in mycobacterial phospholipid metabolism and was found to induce a high production of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF-α, IL-1, and reactive oxygen species in THP-1 cells [24]. Since cytokines are important actors in the establishment of the immune response and macrophage activation to kill bacteria [25], LipG may thus participate in the regulation of the host's immune responses favoring bacterial survival.

Localized in the membrane fraction of the bacteria, TesA is non-essential for the in vitro growth of *M. tb*. However, a Δ*tesA* deletion mutant strain of *M. tb* was found more susceptible to antibiotics, due to the fact that this Δ*tesA* mutant was defective in phthiocerol dimycocerosate (PDIM) [26]. Moreover, TesA has also been shown to plays a crucial role in the production of phenolic glycolipids (PGL) [23]. These two lipids, PDIM and PGL, are noncovalently bound to the outer cell wall in pathogenic mycobacteria and are required for *M. tb* virulence and pathogenesis [27,28]. Consequently, TesA represents a major contributing partner in the synthesis of both PDIM and PGL and is believed to play an important role in vivo by increasing the virulence of pathogenic mycobacteria.

Another interesting SE is CaeA (Rv2224c) also named Hip1 (Hydrolase important for pathogenesis 1). This cell wall-associated carboxylesterase was initially reported as being involved in cell wall biosynthesis and/or integrity [29]. CaeA was also found to be important for survival and growth during infection and virulence by modulating cytokines balance to promote *M. tb* survival and growth within macrophages [30]. Accordingly, deletion of the *caeA* gene in *M. tb* resulted in a reduction of mycobacterial load in mouse's lung and spleen, and reduced mycobacterial virulence in infected mice [29]. Recent studies in *M. tb* revealed that this enzyme exhibited more a serine protease activity rather than a carboxylesterase one [31]. CaeA was indeed found to cleave GroEL2 protein both in vitro and in vivo, a proteolytic activity responsible for the immunomodulation of host inflammatory responses.

Lastly, among the 12 proteins belonging to the "Lip" family, LipC (Rv0220), LipH (Rv1399c) and LipI, −N, −R, −U, and −W were identified as esterases [14], while LipF (Rv3487c) displays an esterase [14] as well as a phospholipase C activity [32]. This latter enzyme would also be important for *M. tb* intracellular survival and growth during infection. Indeed, the *lipF* gene was upregulated by acidic stress [33], and a transposon insertion between the promoter and the *lipF* gene resulted in a decrease of bacterial growth in mouse's lung [34]. These results suggest that this protein might contribute to the survival of the tubercle bacilli under acidic environment of the phagosome.

Cutinase-like family proteins

Cutinases belong to a family of SEs able to degrade a large panel of substrates such as cutin, TAG and phospholipids. In the *M. tb* genome, seven proteins homologous to the *Fusarium solani pisi* cutinase have been identified and named cutinase-like proteins with the following correspondence: Cut1 (Rv1758 or Culp5), Cut2 (Rv2301 or Culp2), Cut3 (Rv3451 or Culp3), Cut4 (Rv3452 or Culp4), Cut5b (Rv3724B or Culp7), Cut6 (Rv3802 or Culp6), and Cfp21 (Rv1984c or Culp1) [7,35]. They all belong to the α/β-hydrolase fold family proteins and contain the conventional Ser-His-Asp catalytic triad, with Ser also located in a conserved Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly sequence. Enzymatically, Cut1, Cut2, Cut3, and Cut5b

displayed weak or no activity at all toward the various substrates tested, in contrast to Cfp21, Cut4, and Cut6 which exhibited various enzymatic activities [35,36].

In one hand, Cfp21 and Cut4 are two secreted proteins which showed distinct substrate specificities, despite their 50% amino acid sequences identity and their similar overall predicted structures. Cfp21 preferentially hydrolyzes medium-chain carboxylic esters and MAGs with a preference for C8 fatty acid chains, whereas Cut4 behaves like a phospholipase A2 and is able to induce macrophage lysis [36]. These later data suggest a role of these both enzymes in the host–pathogen interactions. On the other hand, Cut6 which is located in the cell wall fraction exhibits a phospholipase and thioesterase activity [37]. Moreover, the *cut6* gene which has been found to be essential for *M. tb* growth is located in a gene cluster involved in mycolic acid biosynthesis. These observations therefore support the fact that this enzyme would participate in mycolic acids biosynthesis by maintaining the integrity of the cell wall [37].

Overall, these features suggest that Cfp21, Cut4, and Cut6 might interact with the host membranes and participate in the virulence/infection process by degrading host lipids.

Mycolyltransferases

Mycolic acids are composed of very long chain fatty acids (C70–90) that are either covalently attached to the arabinan moiety of the arabinogalactan (AG) polymer forming the mycolylarabinogalactan (mAG), or form the lipophilic tails of extractable glycolipids, such as trehalose dimycolate (TDM), that are located predominantly in the mycomembrane outer leaflet.

The synthesis of TDM and mAG is catalyzed by the *M. tb* encoded antigen 85 (Ag85) complex, which includes three homologous secreted transferases named Ag85A (FbpA or Rv3804c), Ag85B (FbpB or Rv1886c), and Ag85C (FbpC2 or Rv0129c). These enzymes catalyze a transesterification reaction that transfers a mycolic acid from one molecule of trehalose monomycolate (TMM) to another thereby synthesizing TDM, as well as the covalent attachment of mycolic acids from TMM to the mAG [38].

These enzymes belong to the α/β-hydrolase superfamily and share a 68%–79% sequence identity. The resolution of their tridimensional structure shows that the three proteins possess the same catalytic triad, with the active site Ser124 within the Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly consensus sequence, and the same substrate specificity [39]. Whereas the hydrolytic mechanism of SEs usually uses a water molecule to hydrolyze the bond between the enzyme and the acyl chain, the transfer mechanism of the Ag85 enzymes likely uses a hydroxyl group of a terminal arabinose on the mycobacterial cell wall [39]. In addition, more recent work demonstrates that all three members of the Ag85 complex mediate the transesterification of diacylglycerol using long-chain acyl-CoA to produce TAG, with Ag85C exhibiting the most pronounced diacylglycerol acyltransferase activity. This suggests that Ag85C, as well as Ag85A and Ag85B, may also make an important contribution in TAG synthesis in *M. tb* [38].

Finally, members of Ag85 complex are conserved in mycobacterial species and play an essential role in the maintenance of the highly hydrophobic cell wall which is central to the survival of *M. tb* within its host environment. Accordingly, the Ag85 proteins therefore represent prime targets for the development of anti-TB drugs.

Overall, all the data collected from the last decades on *M. tb*'s SEs have clearly emphasized their major role in the life cycle of the bacilli [4,5]. Consequently, development of novel tools to investigate and modulate such mycobacterial SEs remains of great interest.

Activity-based protein profiling, a powerful versatile chemical proteomic platform applied to characterize the functional state of serine enzymes in mycobacteria

In the last decades, chemoproteomic strategy such as ABPP has emerged as a major approach to profile enzymes activities and evaluate their functions directly in native biological systems. Using ABPP, a subset of expressed proteins can be identified based on their specific activity for a chemical warhead used as a selective chemical probe called ABP (Fig. 11.2A). This strategy has been successfully used to identify and characterize mycobacterial SEs by the use of enzyme inhibitors as ABP. Those probes allow the identification and characterization of the functional state of mycobacterial SEs within mycobacteria [40] taking advantage of the existing inventory of predicted gene products of mycobacteria and their host, as well as development of mass spectroscopy, used to analyze complex biological samples. The core elements of such ABP remain constant and are composed of an electrophile "warhead" which covalently reacts with the catalytic serine residue in the active site of targeted SEs; an extended saturated lipid linker; and a tag for either visualization (e.g., TAMRA group) or affinity purification (e.g., biotin group) of targets (Fig. 11.2A) [6,40,41].

The work flow of a typical ABPP experiment is depicted in Fig. 11.2. In a classical experiment, the ABP-labeled proteome can be capture and enriched by affinity purification using an affinity tag and further digested, so that targets can be identified by LC-MS/MS (Fig. 11.2B). In contrast, competitive ABPP involves pretreating a biological system with a first small molecule inhibitor followed by labeling with an efficient ABP inhibitor (Fig. 11.2C) that will be enable to interact with the active site serine residue of the enzymes covalently linked to the first compound. Comparison of labeling patterns of the untreated proteome with the inhibitor-pretreated proteome allows identification of the targeted enzymes. Finally, a variant of ABPP known as click-chemistry ABPP (CC-ABPP) can be applied for covalent inhibitors (Fig. 11.2D). This strategy involves converting the inhibitor of interest into a "clickable" probe through incorporation of an alkyne (or an azide) group. After inhibitor probe labeling, an azide (or alkyne)-containing fluorophore or biotin can be added via copper-free or copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC), allowing the direct capture of the target enzymes [41].

A wide range of electrophilic warhead has been developed for ABP that allows for covalent binding with the catalytic nucleophilic site of SEs. These included fluorophosphonates (FP), β-lactones, 1,2,3-triazole ureas, carbamates, and oxadiazolones (Fig. 11.3). Since these compounds differ in their nucleophile and enzyme class specificity, the choice of an optimal warhead must be carefully considered. In this case, a balance must indeed be reached between a high reactivity leading to a large number of off-target results, and a low reactivity leading to potentially ineffective labeling.

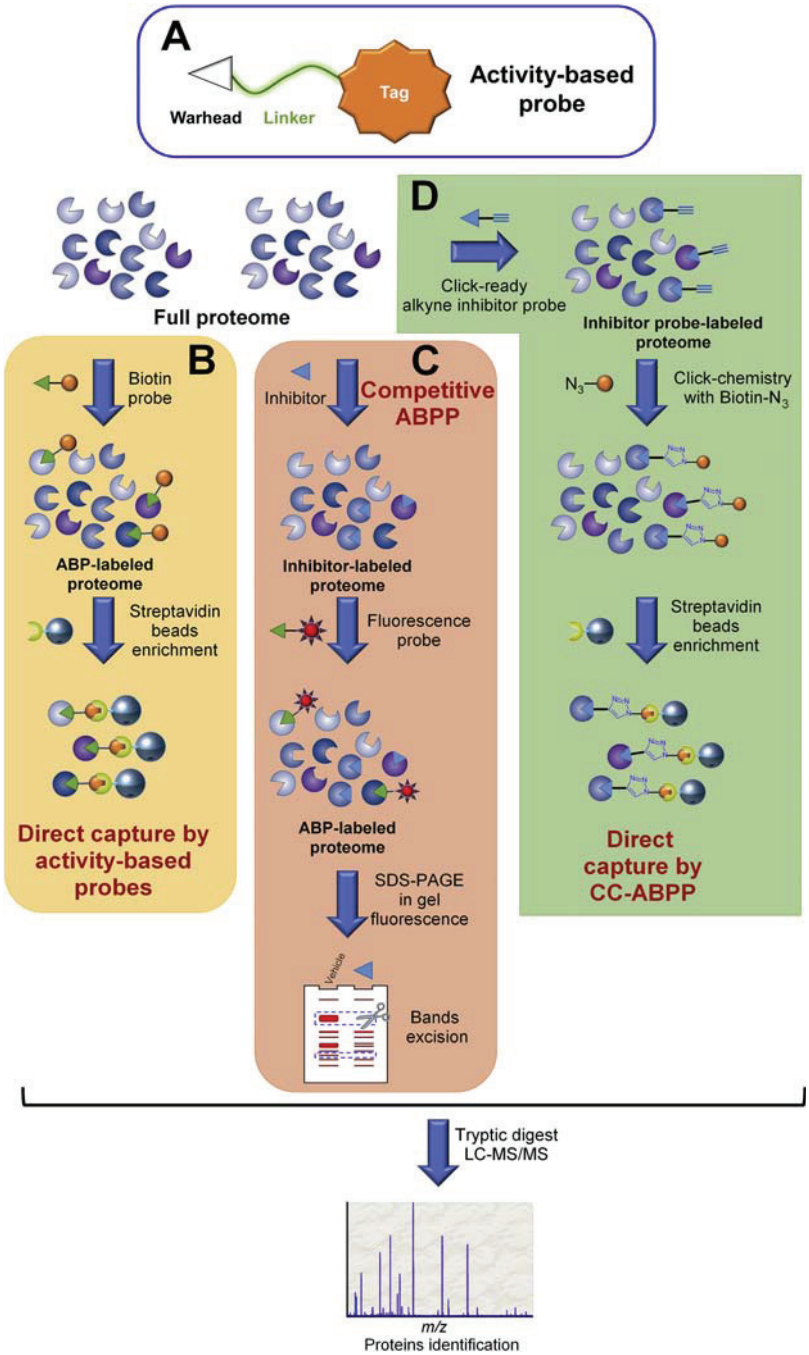


FIGURE 11.2 **(A) General design of an ABP**. Such probes are typically composed of a reactive warhead (triangle representation) responsible for the specificity of the probe for the desire subset of expressed proteins; a linker (in green) which can also add some specificity to the probe; and a tag (in orange) which allows for the identification of targeted proteins by mass spectrometry analysis. This tag can either be a fluorophore for direct visualization, an affinity group such as biotin to perform affinity purification of the targets, or an alkyne or an azide allowing coupling via click-chemistry with any desire tag. **(B–D) Work flow of a typical activity-based protein profiling (ABPP)**

This part will present some of the most significant ABPs that has been used to study mycobacterial SEs and their relative specificity.

Fluorophosphonates as classical ABPs for SEs

FP-ABP is the most widely used SE reactive warhead for ABPP. FP indeed shows a high inhibitory selectivity for nucleophilic serine while showing no reactivity for free hydroxyl groups. Initially developed to target fatty acid amide hydrolase, FP turned out to exhibit a wide spectrum of activity toward SEs, ranging from lipid esterase's to proteases by forming an irreversible covalent bond with the nucleophilic active site serine. Consequently, FP has thus become a classical benchmark for studying SEs.

This type of probe has been used to capture *M. tb*'s SEs in several culture conditions [42,43]. Accordingly, using the **alkyne-PEG-FP** probe and click chemistry ABPP in replicating and nonreplicating *M. tb*, Ortega et al. have identified 78 proteins annotated as hydrolase and hypothetical proteins; among which 34 SEs were found active in both conditions, 41 only active in aerated culture, and three only active in hypoxic culture [43]. Under hypoxia, the activities of the antigen 85 complex and the thioesterase TesA were reduced by around threefold to 10-fold, while the carboxylesterase CaeA retains active in both conditions. Together, these activity changes are consistent with reduced metabolism related to cell-wall biosynthesis during dormancy. In a similar study, Tallman et al. identified 52 SEs with **Desthiobiotin-FP** probe [42], with five esterases active in both normoxic and hypoxic states, including CaeA, suggesting that these enzymes may be promising targets to treat both active and latent TB (Table 11.1).

Competitive ABPP with selective SE inhibitors

Competitive ABPP is a way of performing target identification for a given small molecule inhibitor that is neither an ABP nor possesses any tag to visualize or enrich its targets, as depicted in Fig. 11.2C. The main drawback of this approach resides in the fact that it is mostly an indirect identification by measuring reductions in probe-labeling signals for assessing an inhibitor's target(s). Consequently, competitive ABPP requires additional formal validation to confirm the identified enzymes as effective targets of the tested inhibitor.

This strategy has been successfully applied by Nguyen et al. with two multitarget SE inhibitors: **CyC$_{17}$**, a Cyclipostins analog [44], and **HPOX**, an oxadiazolone-core derivative

experiment. **(B)** Cells or lysate is incubated with a biotin ABP for the **direct capture** of target enzymes through streptavidin affinity enrichment followed by Tryptic digestion and mass spectroscopy analysis. **(C)** When performing **competitive ABPP**, cells or lysate is first pretreated with a covalent inhibitor before incubation with a broad-spectrum fluorescent ABP. Protein targets are further visualized via in gel fluorescence. Bands exhibiting a lower or no fluorescence as compared to the vehicle control lane are excised and the proteins identified by mass spectroscopy. **(D)** Alternatively, **click chemistry ABPP (CC-ABPP)** provides a direct capture of probe-labeling enzymes, by incubating cells or lysate with the click-ready alkyne inhibitor probe prior to perform click-reaction with an azide reporter tag. *Adapted from M.J. Niphakis, B.F. Cravatt, Enzyme inhibitor discovery by activity-based protein profiling, Annu. Rev. Biochem. 83 (2014) 341–377.*

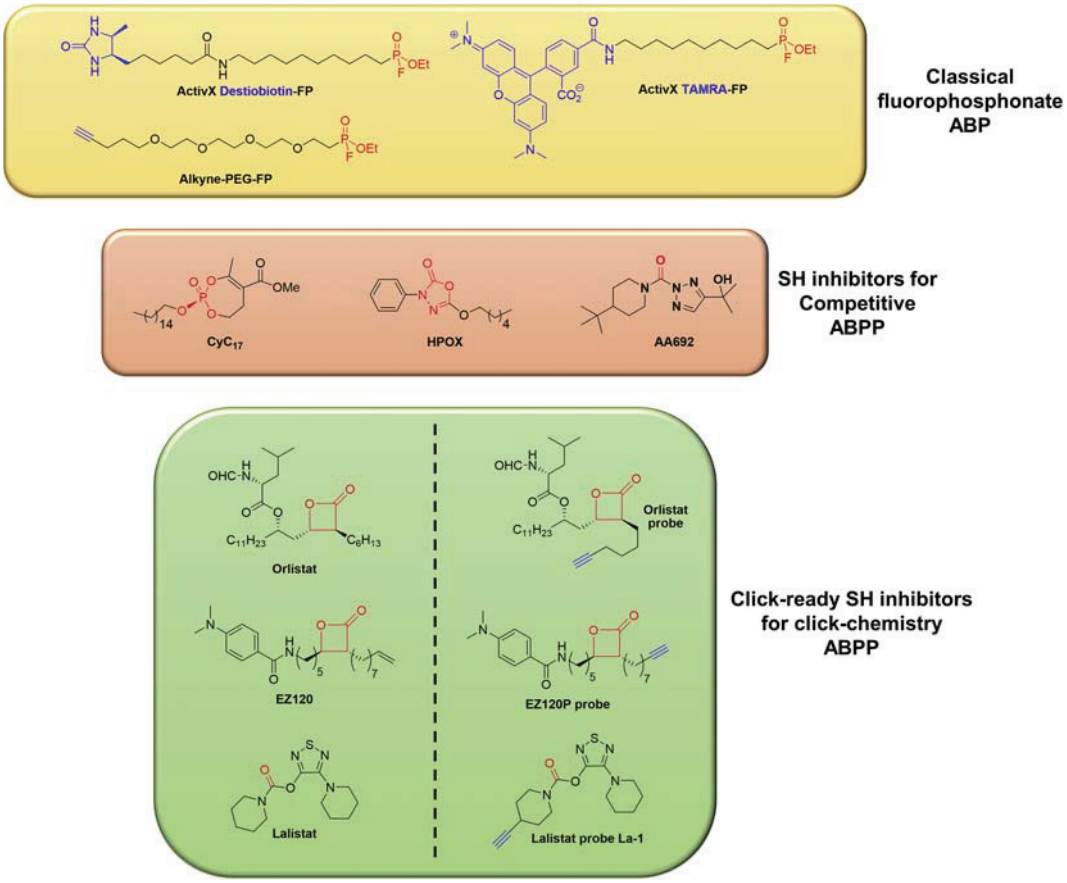


FIGURE 11.3 **Chemical structures of several compounds targeting SEs**. The warhead is colored red, and the reactive tag is colored blue. **TAMRA-FP** and **Desthiobiotin-FP** have been used in regular ABPP on *M. tb* [42]; **HPOX**, **CyC_{17}** and **AA692** have been used in competitive ABPP on *M. tb* [44,45,48]; **Alkyne-Peg-FP**, **Orlistat**, **EZ120**, and **Lalistat** probes have been used in click-chemistry ABPP on *M. tb* or *M. bovis* BCG [43,53,54,57].

[45] (Fig. 11.3) which selectively inhibit *M. tb* growth in culture broth medium with minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.5 and 44.6 μM, respectively. Both compounds inhibit SE enzymatic activity by formation of a covalent bond with the catalytic serine residue in the enzyme active site [46]. The comparative proteomic analysis between the control sample and the **HPOX**- or **CyC_{17}**-pretreated sample prior to either **TAMRA-FP** or **Desthiobiotin-FP** labeling, resulted in mass spectrometry identification of a panel of 18 and 23 distinct proteins, respectively (Table 11.1). Remarkably, most of these identified proteins were involved in *M. tb* lipid metabolism and in cell wall biosynthesis. Among them, the bifunctional thioesterase-phospholipase enzyme LipG, the antigen 85 complex and TesA have been further validated as effective targets, and the respective crystal structures of the latter two enzymes in complex with **CyC_{17}** were also solved [46].

TABLE 11.1 Proteins targeted by at least three of the serine enzyme inhibitors as determine by ABPP.

Protein name	Rv number	Alkyne-PEG-FP[a]	Desthiobiotin-FP[b]	HPOX[c]	CyC_{17}[d]	AA692[e]	EZ120[f]	Orlistat[g]	Lalistat[h]
Cfp21	Rv1984c		■	■	■				■
Cut2	Rv2301	■	■	■		■			
LipD	Rv1923	■	■			■		■	
LipE	Rv3775		■		■	■			
LipG	Rv0646c		■		■	■		■	■
LipH	Rv1399c	■	■	■	■			■	■
LipI	Rv1400c	■	■					■	■
LipM	Rv2284	■	■		■	■	■	■	■
LipN	Rv2970c	■	■		■	■		■	■
LipO	Rv1426c		■					■	■
LipV	Rv3203	■	■	■	■			■	
LipW	Rv0217c		■			■		■	
Rv0045c		■	■		■				■
Rv0183		■	■	■	■				■
BpoC	Rv0554			■	■	■			
TesA	Rv2928			■	■	■	■	■	
Ag85A	Rv1886c			■	■	■	■		
Ag85B	Rv3804c			■		■	■		
Ag85C	Rv0129c			■	■	■	■	■	
LH57_07490	Rv1367c			■	■				■
AmiC	Rv2888c			■	■				■
CaeA	Rv2224c	■	■	■	■				
Total hits identified		17	22	18	23	18	5	14	20

Data from [a] [43]; [b] [42]; [c] [45]; [d] [44]; [e] [48]; [f] [57]; [g] [53]; [h] [54]

Compounds 1,2,3-triazole ureas also represent potent and selective inhibitors of SEs through covalent inhibition of their active site serine [47]. More recently and given its ability to restrict *M. tb* growth with a MIC of 12 μM, a competitive ABPP study was conducted with the 1,2,3-triazole urea SE inhibitor **AA692** (Fig. 11.3) [47,48]. By comparing compound- and vehicle-treated *M. tb* with **Desthiobiotin-FP** probe [48], 56 predicted SEs were identified of which 44 have been also detected in previous studies [42,43]. The difference in percent inhibition between **AA692** *versus* an inactive 1,2,3-triazole urea for each detected SE, narrowed the results to 11 prioritized targets (Table 11.1) including Ag85A and Ag85B, TesA and Rv3802, four enzymes involved in cell wall biosynthesis.

Overall, these studies strengthen the fact that such multitarget SE inhibitors preferentially inhibit several key SEs involved in lipid metabolism and in cell wall biosynthesis and thus mainly exert their antibacterial activity by disrupting the mycobacterial cell wall.

Direct capture of SEs *via* click-chemistry ABPP

One limitation of traditional ABPP is due to the size of the tag used, which is typically around 700−1000 Da. This can cause uptake and distribution limitation of the probe when performing target capture in whole cells. By changing the shape and affinity for the targeted proteins, a large tag can also modify the reactivity of the chemical warhead compared to its parent molecule.

To overcome these issues, a label free probe can be used through click-chemistry ABPP (CC-ABPP—Fig. 11.2D) strategy. CC-ABPP consists in using an ABP bearing a smaller clickable group such as an alkyne or an azide, allowing the formation of a stable triazole cycle

between the (enzyme-)probe and a chosen reporter (i.e., a fluorophore, a biotin or another enrichment group or directly with agarose beads) using the copper(I)-catalyzed Huisgen's 1,3-dipolar cycloaddition reaction [49]. Such bio-orthogonal reaction can be performed in aqueous solvent with no harmful byproduct, and all reagents can be purified through non-chromatographic methods like protein precipitation in acetone. CC-ABPP allows the direct capture of enzyme by labeling the same compound. Indeed, it is possible to "click" a biotin or an enrichment group to make affinity purification; or alternatively a fluorophore that allows for protein visualization on an SDS PAGE gel and for fluorescent microscopy to study target repartition and uptake of the probe in whole cell.

Since most of the SE inhibitors characterized in *M. tb* likely act by inhibiting the cell wall biosynthesis, several potent and covalent SEs inhibitors have been chemically modified and further used in CC-ABPP, not only to discover their corresponding targets in *M. tb* but also to delineate key pharmacologically targetable SEs and their associated pathways.

β-Lactones ABPs

Among the potent SE inhibitors, β-Lactones represent an important class of compounds bearing the strained 2-oxetanone 4-membered ring that presents potent inhibitory activity against SEs. The most representative member of this family of inhibitors is the FDA approved antiobesity drug **Orlistat** (Fig. 11.3). **Orlistat** is an active site-directed inhibitor that forms a stoichiometric long-lived acyl-enzyme complex with SE after the nucleophilic attack of the catalytic serine residue on the β-lactone group [50]. Functioning as a versatile SE inhibitor, **Orlistat** was indeed found to inhibit the Cut family including the mycobacterial phospholipase/thioesterase Cut6 [37], as well as the Lip family enzymes [14]. Consequently, when tested as a possible anti-mycobacterial agent, **Orlistat** was found to block *M. tb* growth with MIC ranging from 25 to 50 μM [14,51]. Other work confirmed the ability of **Orlistat** to destabilize the outer membrane of the cell envelope by reducing the amount of PDIM content in the mycobacterial cell wall, facilitating the action of Vancomycin; and thus, highlighted its synergetic antimycobacterial action in combination with Vancomycin to inhibit *M. bovis* BCG and *M. tb* growth [52]. Based on this result, a CC-ABPP approach on whole cell lysates of *M. bovis* BCG culture using an **Orlistat-probe** resulted in identifying 14 enzymes targeted, in which 10 were SEs. These included nine Lip-enzymes and TesA. Cellular overexpression of TesA further led to a decreased susceptibility of the *M. bovis* BCG to **Orlistat**, thus providing target validation [53].

In an attempt to improve the effect of **Orlistat** toward *M. tb* growth, a collection of β-lactones was examined for their antibacterial activity and compound **EZ120** (Fig. 11.3) has emerged as a potent effective and exclusive antibacterial inhibitor against *M. tb* H37Rv with MIC value of 1.6 μM and low cytotoxicity to mouse macrophages [54]. CC-ABPP approach with the alkyne-modified **EZ120P** probe allows identification of Ag85A and the C-terminal thioesterase domain of polyketide synthase 13 (TE-Pks13) as the two main targets of this inhibitor (Table 11.1). Since TE-Pks13 and Ag85 enzymes catalyze essential steps in mycolic acid biosynthesis, additional experiments demonstrated that **EZ120** was capable of decreasing the pool of mycolate α-chains. Moreover, and similar to **Orlistat**, the combined application of **EZ120** and Vancomycin led to a 100-fold and fourfold reduced MIC, respectively, compared to individual treatment. All together, these results support that **EZ120** inhibits mycolic acid biosynthesis.

Lalistat ABP

Similar to **Orlistat**, **Lalistat** (Fig. 11.3), a thiadiazole carbamate initially designed to inhibit the human lysosomal acid lipase [55], binds covalently to the active site serine of SEs and thereby inhibits their activity. Given the structural and electronic properties of **Lalistat**, it was anticipated that such inhibitor will react with diverse mycobacterial enzymes which may deviate from the Orlistat target spectrum. When tested on *M. tb* growth, **Lalistat** exhibited a MIC of 25−50 μM [54]. Interestingly, **Lalistat** displayed a strong synergetic effect in combination with Vancomycin resulting in a MIC dropt of around four- and 16-times for **Lalistat** and Vancomycin, respectively. Again, when tested on *M. tb* infected human macrophages, **Lalistat** was found to substantially reduce bacterial load by 55% compared to the untreated control suggesting that it could even address intracellular bacteria [54]. Target identification experiments via CC-ABPP using a **Lalistat** probe analog bearing a terminal alkyne tag (**La-1**, Fig. 11.3) on *M. tb* cells provided 20 target enzymes, including eight Lip-enzymes as well as the MAG lipase Rv0183, the Cutinase-like protein Cfp21 and the esterase Rv0045c (Table 11.1). Interestingly, comparison of these results with those previously reported with **Orlistat** proteome labeling studies in *M. bovis* BCG revealed LipM, −O, −N, −I and -G as shared targets [53], while LipR and -T were additionally captured by **Lalistat** [54].

Conclusion and prospects

M. tb produces more than 100 major lipid end products [28,56], most of them being involved in the architecture of the cell wall. The complexity of these mycobacterial lipids is reflected by the large number of *M. tb* genes encoding for proteins participating in these processes. Among these latter enzymes, mycobacterial SEs play a central role in lipid metabolism and represent thus essential key players in survival, persistence, and virulence of the bacilli [3,4].

To date, all reported SE inhibitors displaying antimycobacterial activity, target multiple enzymes, mainly involved in cell wall biosynthesis. Interestingly, the Ag85 A/B/C proteins have been captured and validated as effective targets of most of tested SE inhibitors in *M. tb* [38,45,48,57], but also in *M. abscessus* [58,59] an opportunistic pathogen responsible for chronic lung infection in patients with respiratory diseases such as cystic fibrosis [60]. Indeed, since the Ag85 A/B/C proteins are among the most abundantly secreted enzymes in *M. tb* [61], they may thus be easily accessible to the inhibitor probe, suggesting that these mycolyltransferases would be a common primary target of the SE inhibitors, regardless of the mycobacterial strain tested. Moreover, as highlighted in the case of **Lalistat** and β-lactone derivatives, their use in combination with known anti-TB drugs may offer a great opportunity to improve and shorten antibiotics therapy.

All these findings clearly state that SEs represent a broad, but biologically significant, enzyme superfamily with promising therapeutic applications against *M. tb*, but also toward all mycobacterial-related diseases.

More particularly, the use of selective click-ready SE inhibitor probes is a major asset for the in vivo identification of mycobacterial SEs together with their respective associated

physiological pathways, notably focusing on the accumulation and consumption of ILI at key stages of the bacterial infection [2] (for an extensive review on this topic, refer to the chapter entitled "***Intrabacterial Lipid Inclusions: overview of an amazing organelle***"). Indeed, to date, no ABPP experiments have been conducted on *M. tb* under conditions stimulating the import and process of host-derived free fatty acids which are subsequently resynthesized into TAG and stored in the form of ILI. Under such nutrient-limiting conditions, ILI constitutes an essential source of carbon and nutrients required for *M. tb* survival and persistence for extensive periods of time. A critical link between such lipid accumulation and the development of phenotypic drug-resistance in *M. tb* has also been established, therefore suggesting that lipid biosynthetic genes might be appropriate targets for novel drugs that could kill *M. tb* in latent phase [62].

Using ABPP approach, more than 80 SEs have been identified so far. Among these enzymes, a shift in the activity of over 30% was observed in relation to dormant growth conditions, including hypoxia and carbon starvation [42,43,53]. Accordingly, small molecule inhibitors represent interesting chemical tools that allow simultaneous and selective detection/inhibition of SEs in living mycobacteria.

In this context, the use of ABPP will provide a comprehensive map of the SEs involved in ILI formation (i.e., entry into dormancy) and degradation (i.e., reactivation step). Deciphering the physiological role of the mycobacterial SEs involved in these processes will generate results that are directly relevant for better understanding the pathogenesis of actively replicating and latent bacilli and will contribute to discover new chemotherapeutic targets in the fight against *M. tb*.

Acknowledgments

This work was supported by the Center National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille University (AMU), the Association Grégory Lemarchal and Vaincre la Mucoviscidose (project N° RF20190502466), and the Agence Nationale de la Recherche (LipInTB project N°ANR-19-CE44-0011).

References

[1] WHO, Global Tuberculosis Report, 2021. https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data.
[2] I. Mallick, P. Santucci, I. Poncin, V. Point, L. Kremer, J.F. Cavalier, S. Canaan, Intrabacterial lipid inclusions in mycobacteria: unexpected key players in survival and pathogenesis? FEMS Microbiol Rev (2021) fuab029. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab029.
[3] G. Singh, G. Singh, D. Jadeja, J. Kaur, Lipid hydrolizing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system, Crit. Rev. Microbiol. 36 (2010) 259–269.
[4] G. Johnson, The alpha/beta hydrolase fold proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, with reference to their contribution to virulence, Curr. Protein Pept. Sci. 18 (2017) 190–210.
[5] L. Dedieu, C. Serveau-Avesque, L. Kremer, S. Canaan, Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research, Biochimie 95 (2013) 66–73.
[6] L.J. Keller, B.M. Babin, M. Lakemeyer, M. Bogyo, Activity-based protein profiling in bacteria: applications for identification of therapeutic targets and characterization of microbial communities, Curr. Opin. Chem. Biol. 54 (2020) 45–53.
[7] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger,

J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, Nature 393 (1998) 537–544.
[8] M. Nardini, B.W. Dijkstra, Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (1999) 732–737.
[9] J.D. Schrag, M. Cygler, Lipases and alpha/beta hydrolase fold, Methods Enzymol. 284 (1997) 85–107.
[10] M. Holmquist, Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms, Curr. Protein Pept. Sci. 1 (2000) 209–235.
[11] S. Raza, L. Fransson, K. Hult, Enantioselectivity in Candida Antarctica lipase B: a molecular dynamics study, Protein Sci. 10 (2001) 329–338.
[12] S. Shin, T.H. Lee, N.C. Ha, H.M. Koo, S.Y. Kim, H.S. Lee, Y.S. Kim, B.H. Oh, Structure of malonamidase E2 reveals a novel Ser-cisSer-Lys catalytic triad in a new serine hydrolase fold that is prevalent in nature, EMBO J. 21 (2002) 2509–2516.
[13] A. Dessen, J. Tang, H. Schmidt, M. Stahl, J.D. Clark, J. Seehra, W.S. Somers, Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism, Cell 97 (1999) 349–360.
[14] V. Delorme, S.V. Diomande, L. Dedieu, J.F. Cavalier, F. Carriere, L. Kremer, J. Leclaire, F. Fotiadu, S. Canaan, MmPPOX inhibits *Mycobacterium tuberculosis* lipolytic enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family and alters mycobacterial growth, PLoS One 7 (2012) e46493.
[15] C. Deb, J. Daniel, T.D. Sirakova, B. Abomoelak, V.S. Dubey, P.E. Kolattukudy, A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*, J. Biol. Chem. 281 (2006) 3866–3875.
[16] N. Kapoor, S. Pawar, T.D. Sirakova, C. Deb, W.L. Warren, P.E. Kolattukudy, Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation, PLoS One 8 (2013) e53657.
[17] M.H. Daleke, A. Cascioferro, K. de Punder, R. Ummels, A.M. Abdallah, N. van der Wel, P.J. Peters, J. Luirink, R. Manganelli, W. Bitter, Conserved Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE) protein domains target LipY lipases of pathogenic mycobacteria to the cell surface via the ESX-5 pathway, J. Biol. Chem. 286 (2011) 19024–19034.
[18] P. Santucci, S. Diomande, I. Poncin, L. Alibaud, A. Viljoen, L. Kremer, C. de Chastellier, S. Canaan, Delineating the physiological roles of the PE and catalytic domains of LipY in lipid consumption in mycobacterium-infected foamy macrophages, Infect. Immun. 86 (2018).
[19] P. Santucci, N. Smichi, S. Diomande, I. Poncin, V. Point, H. Gaussier, J.F. Cavalier, L. Kremer, S. Canaan, Dissecting the membrane lipid binding properties and lipase activity of *Mycobacterium tuberculosis* LipY domains, FEBS J. 286 (2019) 3164–3181.
[20] K. Cotes, R. Dhouib, I. Douchet, H. Chahinian, A. de Caro, F. Carriere, S. Canaan, Characterization of an exported monoglyceride lipase from *Mycobacterium tuberculosis* possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids, Biochem. J. 408 (2007) 417–427.
[21] R. Dhouib, F. Laval, F. Carriere, M. Daffe, S. Canaan, A monoacylglycerol lipase from Mycobacterium smegmatis Involved in bacterial cell interaction, J. Bacteriol. 192 (2010) 4776–4785.
[22] P. Santucci, V. Point, I. Poncin, A. Guy, C. Crauste, C. Serveau-Avesque, J.M. Galano, C.D. Spilling, J.F. Cavalier, S. Canaan, LipG a bifunctional phospholipase/thioesterase involved in mycobacterial envelope remodeling, Biosci. Rep. 38 (2018).
[23] P.C. Nguyen, V.S. Nguyen, B.P. Martin, P. Fourquet, L. Camoin, C.D. Spilling, J.F. Cavalier, C. Cambillau, S. Canaan, Biochemical and structural characterization of TesA, a major thioesterase required for outer-envelope lipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, J. Mol. Biol. 430 (2018) 5120–5136.
[24] R. Rastogi, A. Kumar, J. Kaur, V. Saini, J. Kaur, A. Bhatnagar, Rv0646c, an esterase from *M. tuberculosis*, up-regulates the host immune response in THP-1 macrophages cells, Mol. Cell. Biochem. 447 (2018) 189–202.
[25] Y.V. Cavalcanti, M.C. Brelaz, J.K. Neves, J.C. Ferraz, V.R. Pereira, Role of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis, Pulm. Med. 2012 (2012) 745483.
[26] L. Alibaud, Y. Rombouts, X. Trivelli, A. Burguiere, S.L. Cirillo, J.D. Cirillo, J.F. Dubremetz, Y. Guerardel, G. Lutfalla, L. Kremer, A Mycobacterium marinum TesA mutant defective for major cell wall-associated lipids is highly attenuated in *Dictyostelium discoideum* and zebrafish embryos, Mol. Microbiol. 80 (2011) 919–934.
[27] J. Yu, V. Tran, M. Li, X. Huang, C. Niu, D. Wang, J. Zhu, J. Wang, Q. Gao, J. Liu, Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*, Infect. Immun. 80 (2012) 1381–1389.
[28] M. Jackson, The mycobacterial cell envelope—lipids, Cold Spring Harbor Perspecti. Med. 4 (2014).

[29] S. Lun, W.R. Bishai, Characterization of a novel cell wall-anchored protein with carboxylesterase activity required for virulence in *Mycobacterium tuberculosis*, J. Biol. Chem. 282 (2007) 18348–18356.
[30] J. Rengarajan, E. Murphy, A. Park, C.L. Krone, E.C. Hett, B.R. Bloom, L.H. Glimcher, E.J. Rubin, *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 264–269.
[31] J.L. Naffin-Olivos, M. Georgieva, N. Goldfarb, R. Madan-Lala, L. Dong, E. Bizzell, E. Valinetz, G.S. Brandt, S. Yu, D.E. Shabashvili, D. Ringe, B.M. Dunn, G.A. Petsko, J. Rengarajan, *Mycobacterium tuberculosis* Hip1 modulates macrophage responses through proteolysis of GroEL2, PLoS Pathog. 10 (2014) e1004132.
[32] M. Srinivas, S. Rajakumari, Y. Narayana, B. Joshi, V.M. Katoch, R. Rajasekharan, K.N. Balaji, Functional characterization of the phospholipase C activity of Rv3487c and its localization on the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Biosci. 33 (2008) 221–230.
[33] L. Richter, B. Saviola, The lipF promoter of *Mycobacterium tuberculosis* is upregulated specifically by acidic pH but not by other stress conditions, Microbiol. Res. 164 (2009) 228–232.
[34] L.R. Camacho, D. Ensergueix, E. Perez, B. Gicquel, C. Guilhot, Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis, Mol. Microbiol. 34 (1999) 257–267.
[35] N.P. West, F.M. Chow, E.J. Randall, J. Wu, J. Chen, J.M. Ribeiro, W.J. Britton, Cutinase-like proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization of their variable enzymatic functions and active site identification, Faseb. J. 23 (2009) 1694–1704.
[36] M. Schue, D. Maurin, R. Dhouib, J.C. Bakala N'Goma, V. Delorme, G. Lambeau, F. Carriere, S. Canaan, Two cutinase-like proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis* show very different lipolytic activities reflecting their physiological function, Faseb. J. 24 (2010) 1893–1903.
[37] S.K. Parker, R.M. Barkley, J.G. Rino, M.L. Vasil, *Mycobacterium tuberculosis* Rv3802c encodes a phospholipase/thioesterase and is inhibited by the antimycobacterial agent tetrahydrolipstatin, PLoS One 4 (2009) e4281.
[38] A. Viljoen, M. Richard, P.C. Nguyen, P. Fourquet, L. Camoin, R.R. Paudal, G.R. Gnawali, C.D. Spilling, J.F. Cavalier, S. Canaan, M. Blaise, L. Kremer, Cyclipostins and cyclophostin analogs inhibit the antigen 85C from *Mycobacterium tuberculosis* both in vitro and in vivo, J. Biol. Chem. 293 (2018) 2755–2769.
[39] D.R. Ronning, V. Vissa, G.S. Besra, J.T. Belisle, J.C. Sacchettini, *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity, J. Biol. Chem. 279 (2004) 36771–36777.
[40] F. Faucher, J.M. Bennett, M. Bogyo, S. Lovell, Strategies for tuning the selectivity of chemical probes that target serine hydrolases, Cell Chem. Biol. 27 (2020) 937–952.
[41] M.J. Niphakis, B.F. Cravatt, Enzyme inhibitor discovery by activity-based protein profiling, Annu. Rev. Biochem. 83 (2014) 341–377.
[42] K.R. Tallman, S.R. Levine, K.E. Beatty, Small molecule probes reveal esterases with persistent activity in dormant and reactivating *Mycobacterium tuberculosis*, ACS Infect. Dis. 2 (2016) 936–944.
[43] C. Ortega, L.N. Anderson, A. Frando, N.C. Sadler, R.W. Brown, R.D. Smith, A.T. Wright, C. Grundner, Systematic survey of serine hydrolase activity in *Mycobacterium tuberculosis* defines changes associated with persistence, Cell Chem. Biol. 23 (2016) 290–298.
[44] P.C. Nguyen, V. Delorme, A. Bénarouche, B.P. Martin, R. Paudel, G.R. Gnawali, A. Madani, R. Puppo, V. Landry, L. Kremer, P. Brodin, C.D. Spilling, J.-F. Cavalier, S. Canaan, Cyclipostins and Cyclophostin analogs as promising compounds in the fight against tuberculosis, Sci. Rep. 7 (2017) 11751.
[45] P.C. Nguyen, V. Delorme, A. Bénarouche, A. Guy, V. Landry, S. Audebert, M. Pophillat, L. Camoin, C. Crauste, J.-M. Galano, T. Durand, P. Brodin, S. Canaan, J.-F. Cavalier, Oxadiazolone derivatives, new promising multitarget inhibitors against *M. tuberculosis*, Bioorg. Chem. 81 (2018) 414–424.
[46] J.F. Cavalier, C.D. Spilling, T. Durand, L. Camoin, S. Canaan, Lipolytic enzymes inhibitors: a new way for antibacterial drugs discovery, Eur. J. Med. Chem. 209 (2021) 112908.
[47] A. Adibekian, B.R. Martin, C. Wang, K.L. Hsu, D.A. Bachovchin, S. Niessen, H. Hoover, B.F. Cravatt, Click-generated triazole ureas as ultrapotent in vivo-active serine hydrolase inhibitors, Nat. Chem. Biol. 7 (2011) 469–478.
[48] M. Li, H.V. Patel, A.B. Cognetta, T.C. Smith, I. Mallick, J.-F. Cavalier, S. Canaan, B.B. Aldridge, B.F. Cravatt, J.C. Seeliger, A competitive activity-based protein profiling platform yields cell wall synthesis inhibitors active against replicating and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*, bioRxiv (2021), 2021.2004.2016.440156.
[49] S. Díez-González, Chapter three - Copper(I)–Acetylides: access, structure, and relevance in catalysis, in: P.J. Pérez (Ed.), Advances in Organometallic Chemistry, Academic Press, 2016, pp. 93–141.

[50] P. Hadváry, W. Sidler, W. Meister, W. Vetter, H. Wolfer, The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase, J. Biol. Chem. 266 (1991) 2021–2027.
[51] P. Santucci, C. Dedaki, A. Athanasoulis, L. Gallorini, A. Munoz, S. Canaan, J.F. Cavalier, V. Magrioti, Synthesis of long-chain beta-lactones and their antibacterial activities against pathogenic mycobacteria, ChemMedChem 14 (2019) 349–358.
[52] C. Rens, F. Laval, M. Daffe, O. Denis, R. Frita, A. Baulard, R. Wattiez, P. Lefevre, V. Fontaine, Effects of lipid-lowering drugs on Vancomycin susceptibility of mycobacteria, Antimicrob. Agents Chemother. 60 (2016) 6193–6199.
[53] M.S. Ravindran, M.R. Wenk, Activity-based lipid esterase profiling of M. Bovis BCG at different metabolic states using tetrahydrolipstatin (THL) as bait, in: H.S. Overkleeft, B.I. Florea (Eds.), Activity-Based Proteomics: Methods and Protocols, Springer New York, New York, NY, 2017, pp. 75–85.
[54] J. Lehmann, J. Vomacka, K. Esser, M. Nodwell, K. Kolbe, P. Ramer, U. Protzer, N. Reiling, S.A. Sieber, Human lysosomal acid lipase inhibitor lalistat impairs *Mycobacterium tuberculosis* growth by targeting bacterial hydrolases, MedChemComm 7 (2016) 1797–1801.
[55] A.I. Rosenbaum, C.C. Cosner, C.J. Mariani, F.R. Maxfield, O. Wiest, P. Helquist, Thiadiazole carbamates: potent inhibitors of lysosomal acid lipase and potential Niemann-Pick type C disease therapeutics, J. Med. Chem. 53 (2010) 5281–5289.
[56] E. Layre, R. Al-Mubarak, J.T. Belisle, D. Branch Moody, Mycobacterial lipidomics, Microbiol. Spectr. 2 (2014), 2.3.03.
[57] J. Lehmann, T.Y. Cheng, A. Aggarwal, A.S. Park, E. Zeiler, R.M. Raju, T. Akopian, O. Kandror, J.C. Sacchettini, D.B. Moody, E.J. Rubin, S.A. Sieber, An antibacterial beta-lactone kills *Mycobacterium tuberculosis* by disrupting mycolic acid biosynthesis, Angew. Chem. Int. Ed. 57 (2018) 348–353.
[58] A. Madani, I. Mallick, A. Guy, C. Crauste, T. Durand, P. Fourquet, S. Audebert, L. Camoin, S. Canaan, J.F. Cavalier, Dissecting the antibacterial activity of oxadiazolone-core derivatives against *Mycobacterium abscessus*, PLoS One 15 (2020) e0238178.
[59] A. Madani, J.N. Ridenour, B.P. Martin, R.R. Paudel, A. Abdul Basir, V. Le Moigne, J.L. Herrmann, S. Audebert, L. Camoin, L. Kremer, C.D. Spilling, S. Canaan, J.F. Cavalier, Cyclipostins and cyclophostin analogues as multi-target inhibitors that impair growth of *Mycobacterium abscessus*, ACS Infect. Dis. 5 (2019) 1597–1608.
[60] M.D. Johansen, J.-L. Herrmann, L. Kremer, Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*, Nat. Rev. Microbiol. 18 (2020) 392–407.
[61] G. Harth, B.Y. Lee, J. Wang, D.L. Clemens, M.A. Horwitz, Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*, Infect. Immun. 64 (1996) 3038–3047.
[62] C. Deb, C.M. Lee, V.S. Dubey, J. Daniel, B. Abomoelak, T.D. Sirakova, S. Pawar, L. Rogers, P.E. Kolattukudy, A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen, PLoS One 4 (2009) e6077.

Article 2

« Synthesis and Biological characterization of Fluorescent Cyclipostins & Cyclophostin Analogs: new Insights for the Diagnosis of Mycobacterial-related Diseases. »

Morgane Sarrazin, Benjamin P. Martin, Romain Avellan, Giri Raj Gnawali, Isabelle Poncin, Hugo Le Guenno, Christopher D. Spilling, Jean-François Cavalier et Stéphane Canaan

ACS Infectious Diseases

DOI : 10.1021/acsinfecdis.2c00448

Les travaux antérieurs ont permis de montrer que les CyC sont de puissants d'inhibiteurs de la croissance mycobactérienne *in vitro*, ainsi que de la croissance intracellulaire au sein de macrophages infectés et ne présentent pas de toxicité sur les cellules de mammifères (Nguyen et al., 2017 ; Nguyen et al., 2018a ; Madani et al., 2019). Il a été démontré que certains CyC avaient uniquement un effet sur la croissance *in vitro* alors que d'autres présentaient strictement une activité sur la croissance intracellulaire (Madani et al., 2019). En revanche, les CyC sont totalement inactifs sur des bactéries à Gram positif et négatif telles que *S. aureus*, *P. aeruginosa* ou encore *E. coli* (Nguyen et al., 2018a). D'autre part, l'identification des cibles a permis de montrer que les CyC pouvaient se retrouver dans les différents compartiments cellulaires incluant la paroi, la membrane plasmique et le cytoplasme, suggérant que ces composés sont capables de traverser la membrane mycobactérienne (Nguyen et al., 2017 ; Madani et al., 2019).

Dans ce contexte, nous avons tenté d'apporter de nouvelles informations sur le mécanisme de pénétration des CyC à l'échelle cellulaire sur la bactérie *in vitro*, mais également dans un contexte d'infection du macrophage. Nous avons voulu comprendre pourquoi les CyC ont une spécificité sur les mycobactéries, alors qu'ils ne sont pas actifs sur les bactéries à Gram positif et négatif et comprendre pourquoi certains CyC sont actifs *ex vivo*, mais pas *in vitro* et inversement. Nos collaborateurs, le Dr. Christopher Spilling, Benjamin P. Martin et Giri Raj Gnawali, (Univ. St Louis-Missouri, USA) ont synthétisé quatre nouveaux CyC ($CyC_{31\text{-Dansyl}}$, $CyC_{32\text{-Dansyl}}$ et $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$) de structure identique aux molécules mères, mais possédant en plus une sonde fluorescente, le dansyl (Spilling et al., 2015). La présence de ce groupement fluorescent nous permettra ainsi de suivre la localisation exacte des inhibiteurs dans le modèle *in vitro* et en intracellulaire. De plus, ces nouvelles molécules présentaient une CMI similaire aux molécules mères, confirmant que l'ajout du groupement dansyl n'affectait pas l'activité du CyC et validant ainsi leur utilisation comme sonde, permettant de suivre leur pénétration sur des cellules vivantes.

Tout d'abord, nous avons étudié la pénétration des CyC fluorescents sur plusieurs souches mycobactériennes et sur des bactéries à Gram positif et négatif comme *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* DH10B et *S. aureus* (isolat clinique). Nous avons montré que les CyC sont capables de pénétrer chez toutes les espèces mycobactériennes testées avec une fluorescence diffuse, suggérant que les composés se répartissent de façon plus ou moins homogène dans la cellule et qu'ils seraient présents à la fois dans l'enveloppe et le cytoplasme.

Ces observations sont en accord avec les protéines cibles de ces composés préalablement identifiées, présentes dans les deux compartiments cellulaires. De façon surprenante, les $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$ qui ne présentent aucune activité *in vitro* sont également capables d'entrer chez les mycobactéries. Il est possible que l'effet du CyC chez les mycobactéries soit dépendant des cibles qui sont impactées par le composé et non par sa pénétration chez la bactérie. En revanche, aucune fluorescence n'a été détectée chez *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* contrairement au genre *Mycobacterium*. Néanmoins, nous avons pu montrer qu'à partir d'un lysat de chaque espèce bactérienne, les CyC sont capables d'interagir avec les enzymes présentes, ce qui prouve la présence de cibles de nos inhibiteurs chez les bactéries à Gram positif et négatif. L'absence d'activité semble clairement due au fait que les CyC sont incapables de franchir la paroi de ces bactéries.

Nous avons ensuite montré qu'il est possible de détecter *M. abscessus* dans un mélange bactérien même avec un ratio de 1/1000. Cette spécificité des CyC envers les mycobactéries, nous a permis de proposer que ces molécules fluorescentes pourraient être utilisées comme outils diagnostiques permettant de détecter des mycobactéries au sein d'échantillons cliniques complexes et peut être particulièrement intéressant dans les cas d'infections que l'on peut retrouver chez les patients atteints de mucoviscidose.

M. abscessus étant également un pathogène intracellulaire, nous avons étudié la pénétration de nos molécules dans des macrophages non infectés et infectés par *M. abscessus*. En condition d'infection, chaque CyC était co-localisé avec les bactéries et ceux, quelles que soient leurs valeurs respectives de CMI_{Raw} intracellulaire. Cependant, en condition non infectée, le profil de fluorescence était différent en fonction des composés utilisés. En effet, nous avons pu observer que le $CyC_{31/32\text{-Dansyl}}$ est réparti de façon homogène dans le macrophage contrairement au $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$ qui semble être préférentiellement localisé dans des organites spécifiques du macrophage. Comme les $CyC_{7(\alpha,\beta)}$ sont uniquement actifs en intracellulaire contrairement aux $CyC_{31/32}$, nous avons voulu caractériser leur localisation particulière à l'intérieur du macrophage afin d'apporter de nouvelles informations sur leur mécanisme d'action. Les lysosomes sont des organites acides qui permettent la dégradation des molécules étrangères par le macrophage et pourraient très bien servir d'intermédiaire pour délivrer le CyC lors de la fusion phagosome-lysosome. Suite au marquage des organites acides avec le BioTracker, nos résultats montrent clairement que le $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$, co-localise avec le BioTracker suggérant que le composé s'accumule préférentiellement dans les compartiments acides contrairement au $CyC_{31/32\text{-Dansyl}}$.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons utilisé de la concanamycine A, un inhibiteur de la V-ATPase vacuolaire (Huss et al., 2002), qui a permis d'induire une perturbation du phénotype d'accumulation intracellulaire du $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$, abolissant ainsi leur colocalisation avec *M. abscessus* intracellulaire à l'intérieur des macrophages infectés. La perte de l'accumulation du CyC dans les compartiments acides a altéré l'efficacité antibactérienne du CyC sur la croissance intracellulaire. À l'inverse, la présence de concanamycine A n'a pas modifié de manière significative le profil de fluorescence du $CyC_{31/32\text{-Dansyl}}$ à l'intérieur des macrophages. Ces résultats suggèrent que le blocage de l'acidification des compartiments acides empêche la capacité du $CyC_{7(\alpha,\beta)}$ à s'accumuler dans ces compartiments permettant le blocage de la réplication intramacrophagique de *M. abscessus* par le composé. De plus, nous avons pu montrer qu'*in vitro* la diminution du pH ne permet pas de rendre le $CyC_{7(\alpha,\beta)}$ actif. Ces résultats suggèrent que l'activité n'est pas pH-dépendante, ce qui laisse supposer que la répartition et l'accumulation des $CyC_{7(\alpha,\beta)}$ dans les compartiments acides représentent l'étape cruciale conduisant leur délivrance aux phagosomes qui contiennent les mycobactéries.

Il est probable que les compartiments acides des cellules hôtes puissent constituer un réservoir pour les $CyC_{7(\alpha,\beta)}$. De manière similaire, la bédaquiline s'accumule dans les corps lipidiques de l'hôte et est transférée à *M. tuberculosis* au fur et à mesure de leur consommation entraînant ainsi une activité antibactérienne accrue (Greenwood et al., 2019). Par conséquent, même si l'acidification endo-lysosomale semble être un déterminant important contribuant à l'efficacité intracellulaire des $CyC_{7(\alpha,\beta)}$, leur mode d'action serait radicalement différent de celui du pyrazinamide (Santucci et al., 2021) ou de la clofazimine (Schump et al., 2017) pour lesquels le pH est le point critique pour l'activation du médicament contre les macrophages infectés par *M. tuberculosis*.

En conclusion, cette étude a permis de caractériser de nouveaux CyC fluorescents qui peuvent être utilisés comme sonde afin de suivre leur pénétration sur des bactéries vivantes en solution ou en conditions d'infection. Les résultats *in vitro* que j'ai obtenus associés aux résultats *ex vivo* générés par Romain Avellan ont donc permis d'apporter de nouvelles informations sur le mécanisme de pénétration des CyC au niveau cellulaire. Nous avons pu montrer que les CyC sont des molécules sélectives des mycobactéries, car ils sont incapables de franchir la paroi des bactéries à Gram positif et négatif. D'ailleurs, le marquage sélectif des mycobactéries par les CyC pourrait être un paramètre à exploiter pour une utilisation future de ces composés comme outil de diagnostic. En effet, nous avons pu valider notre hypothèse par une preuve de concept en marquant spécifiquement *M. abscessus* à partir d'un mélange polymicrobien.

ACS Infectious Diseases

pubs.acs.org/journal/aidcbc

Article

Synthesis and Biological Characterization of Fluorescent Cyclipostins and Cyclophostin Analogues: New Insights for the Diagnosis of Mycobacterial-Related Diseases

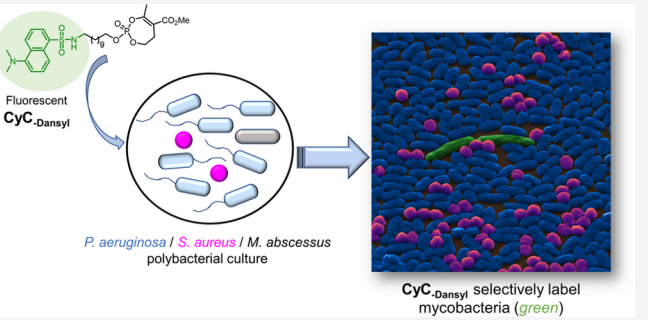
Morgane Sarrazin, Benjamin P. Martin, Romain Avellan, Giri Raj Gnawali, Isabelle Poncin, Hugo Le Guenno, Christopher D. Spilling,* Jean-François Cavalier,* and Stéphane Canaan*

Cite This: *ACS Infect. Dis.* 2022, 8, 2564−2578

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Patients with cystic fibrosis (CF) have a significantly higher risk of acquiring nontuberculous mycobacteria infections, predominantly due to *Mycobacterium abscessus*, than the healthy population. Because *M. abscessus* infections are a major cause of clinical decline and morbidity in CF patients, improving treatment and the detection of this mycobacterium in the context of a polymicrobial culture represents a critical component to better manage patient care. We report here the synthesis of fluorescent Dansyl derivatives of four active cyclipostins and cyclophostin analogues (**CyCs**) and provide new insights regarding the **CyC**'s lack of activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, and above all into their mode of action against intramacrophagic *M. abscessus* cells. Our results pointed out that the intracellularly active **CyC** accumulate in acidic compartments within macrophage cells, that this accumulation appears to be essential for their delivery to mycobacteria-containing phagosomes, and consequently, for their antimicrobial effect against intracellular replicating *M. abscessus*, and that modification of such intracellular localization via disruption of endolysosomal pH strongly affects the **CyC** accumulation and efficacy. Moreover, we discovered that these fluorescent compounds could become efficient probes to specifically label mycobacterial species with high sensitivity, including *M. abscessus* in the presence several other pathogens like *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Collectively, all present and previous data emphasized the therapeutic potential of unlabeled **CyCs** and the attractiveness of the fluorescent **CyC** as a potential new efficient diagnostic tool to be exploited in future diagnostic developments against mycobacterial-related infections, especially against *M. abscessus*.



KEYWORDS: *drug susceptibility, fluorescence microscopy, M. abscessus, probes*

Downloaded via INIST-CNRS on December 18, 2023 at 08:19:38 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

Pulmonary diseases caused by mycobacterial species still continue to result in significant morbidity and mortality to human health. In addition to *Mycobacterium tuberculosis* the ethiologic agent of tuberculosis (TB),[1] nontuberculous mycobacteria (NTM) are opportunistic pathogens responsible for a wide spectrum of clinical syndromes, ranging from skin infections (i.e., *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum*[2]) to pulmonary infections (*Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* complexes) in humans with compromised natural defenses.[3,4] Although the NTM group comprises more than 200 different species,[5] *M. avium* and *M. abscessus* complexes are the most frequently encountered pathogenic species. They are associated with pulmonary diseases, accounting for >90% of all reported cases of NTM-pulmonary infection.[6,7] *M. abscessus* causes TB-like pulmonary diseases in immunocompromised[8] and vulnerable individuals, including cystic fibrosis (CF) and bronchiectasis patients.[9−11] *M. abscessus* exists as two distinct colony morphotypes, smooth (S) and rough (R), which may evolve differently in response to host immunity, resulting in different fates for the mycobacteria in its host.[12−14] The R variant is often associated with severe pulmonary infections[15,16] and is likely to persist for years, especially in infected CF patients.[17] Moreover, the lung infection of CF patients is usually polybacterial[18,19] including combinations of Gram-negative (i.e., *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, and *Burkholderia cepacia* complex) and Gram-positive bacteria (i.e., *Staphylococcus aureus*), as well as NTM species where *M. abscessus* represents up to 68% of all isolated NTM.[9,20,21] Furthermore, because this mycobacterium is one of the most drug-resistant mycobacterial species, often

Received: September 1, 2022
Published: November 15, 2022



© 2022 American Chemical Society

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

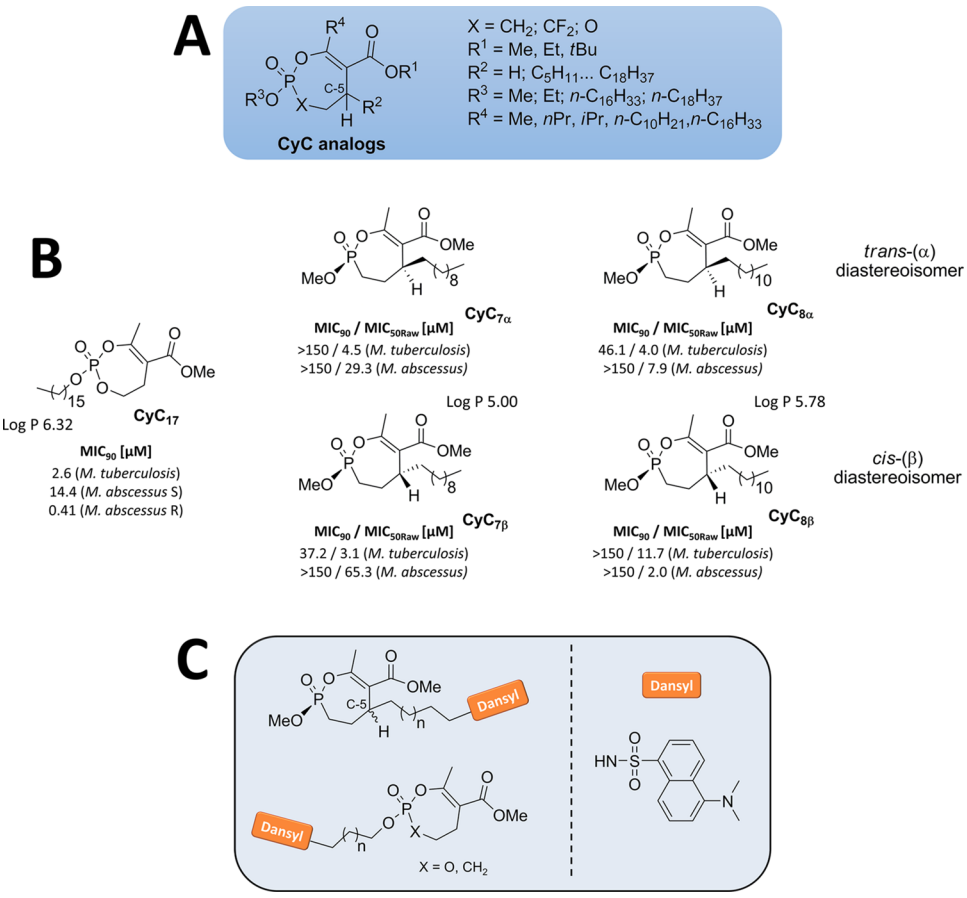


Figure 1. (A) Chemical structure of cyclipostins and cyclophostin analogues (**CyC**),[25,27] with (B) best **CyC** growth inhibitors. MIC_{90}, compound concentration leading to 90% bacterial growth inhibition in culture medium; MIC_{50Raw}, compound concentration leading to a 50% decrease in CFU count in infected Raw264.7 macrophages as compared to untreated cells. Log P-values were computed using the ALOGPS 2.1 applet (http://www.vcclab.org). (C) Chemical structure of fluorescent **CyC** affinity probes.

referred to as an "antibiotic nightmare",[22] its presence prior to lung transplantation is a major risk factor for developing a pulmonary infection or a disseminated disease postsurgery.[23] Therefore, there is an emergency to discover new efficient antibiotics, and in the context of polybacterial infections involving mycobacteria, it is of utmost importance to discriminate between the various species and in particular to quickly detect the presence of *M. abscessus* to rapidly determine a specific therapeutic course.

To reach this objective, the cyclipostins and cyclophostin analogues (namely the **CyCs** − Figure 1) are useful and powerful tools.[24] Indeed, a series of 38 monocyclic enol-phosphate (X = O, Figure 1A) and -phosphonate (X = CH_2, CF_2, Figure 1A) derivatives have been found to efficiently inhibit the growth of *M. tuberculosis* both in vitro and in infected macrophages with very low toxicity toward the host cells.[25] Furthermore, susceptibility testing conducted on various mycobacterial clinical isolates and bacteria responsible for nosocomial infections including six Gram-negative and five Gram-positive bacteria, 29 rapid-growing mycobacteria belonging to the *M. chelonae*−*abscessus* clade, and two slow-growing mycobacteria (*M. marinum*, *M. bovis* BCG) revealed that some **CyCs** exhibited very promising minimal inhibitory concentration (MIC) values, but also that their antibacterial activity was exclusively restricted to mycobacteria.[26] Notably, the enolphosphate $\mathbf{CyC}_{17}$ was found as the most potent extracellular inhibitor (Figure 1) with MICs comparable to those of most classical antibiotics used to treat either *M. tuberculosis* or *M. abscessus* infections.[25,26] Interestingly, its phosphonate analogue (i.e., $\mathbf{CyC}_{11}$) was inactive against the latter two mycobacteria with MIC > 100 μM.[25,27] Moreover, among all tested **CyC** analogues, only $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)}$ and $\mathbf{CyC}_{8(\alpha,\beta)}$ (Figure 1) were able to impair intracellular replication of *M. tuberculosis*[25] and *M. abscessus*[27] inside Raw264.7 macrophages, with MIC_{50Raw} values better than those of the reference antibiotics rifampicin and imipenem, respectively.

Because these inhibitors act via the formation of a covalent bond between the enol-phosphorous atom and the catalytic Ser or Cys residue,[26,28−30] by using activity-based protein profiling, the target enzymes impacted by the **CyCs** were next identified, demonstrating that these compounds are multitarget inhibitors. Indeed, the **CyCs** impair various mycobacterial (Ser/Cys)-base enzymes mostly involved in the whole bacterial lipid metabolism or cell wall synthesis processes.[27]

Collectively, all these results emphasized the attractiveness of the **CyCs** that are nontoxic toward mammalian cells and specific to mycobacteria, to be exploited in future therapeutic developments against mycobacterial-related infections, especially against *M. abscessus*.[26]

In this context, the modification of the **CyC** core-structure by the direct introduction of a fluorescent moiety (Figure 1) could result in an activity-based probe (ABP), as a means to specifically label living mycobacterial species through the covalent binding to (Ser/Cys)-based enzymes. Such a fluorescent **CyC**-ABP

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

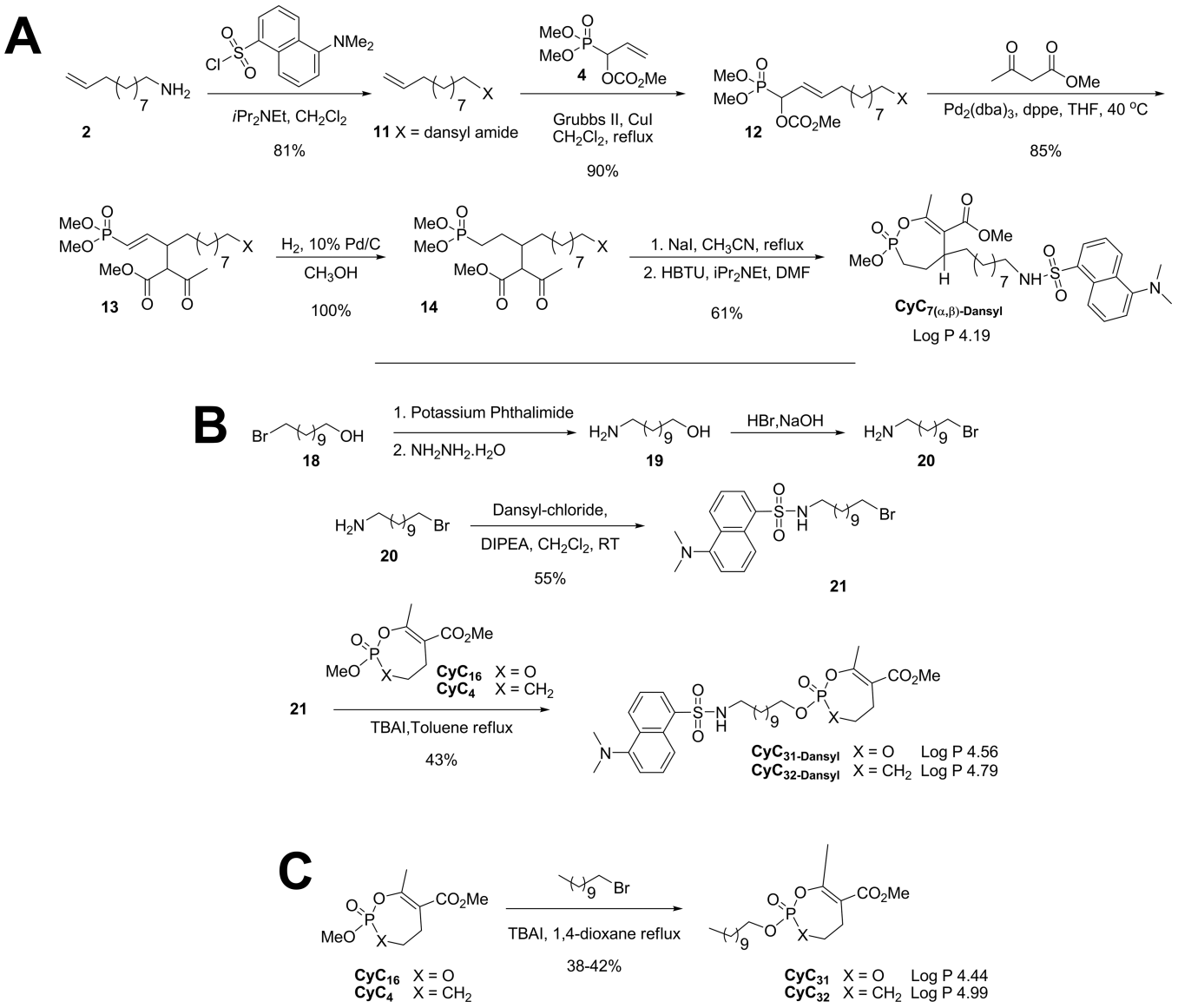


Figure 2. Synthesis of the Dansyl-labeled (A) enolphosphonate $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$; (B) phosphate $\mathbf{CyC}_{31\text{-Dansyl}}$ and phosphonate $\mathbf{CyC}_{32\text{-Dansyl}}$ analogues of cyclipostins as well as (C) corresponding $\mathbf{CyC}_{31}$ and $\mathbf{CyC}_{32}$ unlabeled compounds. The 11-bromo-1-undecanamine **20** was prepared according to the literature procedure.[39] Log *P*-values were computed using the ALOGPS 2.1 applet (http://www.vcclab.org).

would also help monitoring and quantifying the **CyC** penetration inside the bacterial cells based on the fluorescent signal.[31,32]

By synthesizing several selected fluorescent **CyCs** that displayed potent antibacterial activity against either extracellular or intracellular replicating mycobacteria, we not only evaluated their penetration properties, but above all developed a new, powerful, and efficient diagnostic tool to specifically identify *M. abscessus* in a polybacterial mixture to help in the treatment of diseases related to mycobacterial infections.

RESULTS

Synthesis of New Fluorescent CyC Affinity Probes. The $\mathbf{CyC}_{7\alpha}$ and $\mathbf{CyC}_{7\beta}$ active against intramacrophagic mycobacteria and the $\mathbf{CyC}_{17}$ active against extracellular replicating mycobacteria as well as its inactive phosphonate counterpart $\mathbf{CyC}_{11}$ were chosen for incorporation of a fluorescent tag. Moreover, with regard to the mechanism of action of these three **CyCs** toward Ser-/Cys-based enzymes,[26,28−30] the fluorophore would be placed either on the terminal R^2 chain at the C-5 carbon atom for the *cis* and *trans* isomers of $\mathbf{CyC}_7$ (n = 6, Figure 1C) or on the phosph(*on*)ate ester moiety for the $\mathbf{CyC}_{17}$ and $\mathbf{CyC}_{11}$ (n = 13, Figure 1C) by adaption of the chemistry already developed for the synthesis of such derivatives.[25,27,33−35] Based upon its spectral properties such as a large Stokes shift, its wide usage in such areas as pharmacology, toxicology, organic synthesis, and biochemistry,[36,37] and because it is the smallest available fluorophore, the Dansyl group was chosen as a fluorescent probe.

Introduction of a Fluorescent Group at the C-5 Carbon Atom. The initial approach to introduce a label at C-5 employed late-stage installation of the fluorescent group via coupling to a primary amine, an approach biologically compatible with fluorescent Dansyl molecules. This chemical route (Figure S1) involved the application of the phthalimide protecting group at the terminal alkyl chain on the C-5 of the enolphosphonate **9**, which after removal would react with Dansyl-chloride, therefore giving the desired $\mathbf{CyC}_{7\text{-Dansyl}}$ derivative. However, despite all

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

Table 1. Antibacterial Activities of the Selected CyC Compounds against Various Bacterial Strains[a]

	MIC$_{90}$ (μM)								
					M. abscessus CIP 104536^T				
Cpds	*M. smegmatis* mc^{2}155	*M. marinum* ATCC BAA-535/M	*M. bovis* BCG	*M. tuberculosis* mc^2 6230	S variant	R variant	*E. coli* DH10B	*P. aeruginosa* PAO1	*S. aureus*
AMK		2.9 ± 0.17	0.82 ± 0.05	0.63 ± 0.03	5.8 ± 0.20	10.1 ± 0.45			
INH	29.8 ± 1.0	67.6 ± 3.5	1.7 ± 0.07	1.5 ± 0.07	>100	>100			
CyC$_{17}$[b]	1.6 ± 0.02	1.7 ± 0.05	0.80 ± 0.03	2.6 ± 0.13	14.4 ± 0.73	0.41 ± 0.01	|←	*No effect*	→|
CyC$_{31}$	35.1 ± 0.46	16.5 ± 2.3	0.87 ± 0.06	5.3 ± 0.15	1.2 ± 0.30	27.1 ± 1.6	|←	*No effect*	→|
CyC$_{31\text{-Dansyl}}$	32.1 ± 1.7	25.1 ± 1.3	5.8 ± 0.31	10.0 ± 0.59	6.1 ± 0.40	63.4 ± 2.9	|←	*No effect*	→|
CyC$_{32}$	55.5 ± 1.6	37.0 ± 0.56	1.1 ± 0.15	5.4 ± 0.70	168 ± 2.0	>200	|←	*No effect*	→|
CyC$_{32\text{-Dansyl}}$	55.7 ± 2.4	37.3 ± 0.90	7.4 ± 0.89	13.3 ± 0.57	>200	>200	|←	*No effect*	→|
CyC$_{7\alpha}$[b]	119 ± 7.2	31.5 ± 0.77	69.3 ± 2.5	>200	>200	154 ± 3.9	|←	*No effect*	→|
CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$	>200	44.4 ± 2.0	62.3 ± 1.8	>200	>200	>200	|←	*No effect*	→|
CyC$_{7\beta}$[b]	164 ± 3.4	6.0 ± 0.40	47.2 ± 2.0	37.2 ± 3.9	>200	142 ± 2.0	|←	*No effect*	→|
CyC$_{7\beta\text{-Dansyl}}$	>200	19.5 ± 1.2	32.0 ± 1.1	60.5 ± 3.0	>200	>200	|←	*No effect*	→|

[a]MIC$_{90}$, compound minimal concentration leading to 90% of bacterial growth inhibition as determined by the REMA assay. Values are mean ± SD of two independent assays performed in triplicate. [b]Data for **CyC$_{17}$** and **CyC$_{7(\alpha,\beta)}$** are from refs 25−27. AMK, amikacin; INH, isoniazid.

our efforts, the desired molecule was only obtained in very low overall 4% yields.

Given the difficulties experienced with the late-stage introduction of the fluorescent label, an alternative approach was devised in which the fluorescent tag is introduced earlier in the synthesis. The amine **2** was first reacted with Dansyl-chloride under stirring at room temperature in CH_2Cl_2, giving alkenyl sulfonamide **11** in 81% yields. Further coupling reaction with phosphonate **4** via cross-metathesis using Grubb's second-generation catalyst afforded carbonate **12** in 90% yields. Then the fluorescent monocyclic enolphosphonate **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** was obtained in racemic form following a classical route (Figure 2A): (i) palladium(0)-catalyzed reaction of carbonate **12** with methyl acetoacetate, (ii) reduction with hydrogen over palladium on carbon in methanol, and (iii) selective mono-demethylation with sodium iodide followed by cyclization with HBTU.

As previously demonstrated in the synthesis of racemic bicyclic phosphonate analogues,[28] the **CyC$_7$** compound was characterized by the relationship between the OMe on phosphorus and the H-substituent on the C-5 carbon atom as being either in a *trans* (α-isomer) or *cis* (β-isomer) relationship (Figure 1B). Accordingly, the two racemic diastereoisomers **CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{7\beta\text{-Dansyl}}$** were further separated by careful silica gel column chromatography.

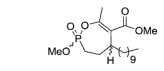
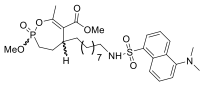
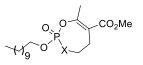
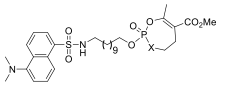
Introduction of a Fluorescent Label at Phosphorus. To introduce the Dansyl group on the alkyl chain at the phosphorus atom, we first examined the use of cross metathesis to build the required functionalized alkane chain with **CyC$_{11}$**, the phosphonate analogue of **CyC$_{17}$**. Two alternative routes were used (Figure S2). The first one involved metathesis of 6-bromohex-1-ene and Dansyl-amide alkene **11** using Grubb's second-generation catalyst, followed by the coupling reaction of resulting alkyl bromide **15** with **CyC$_4$**,[24,33] and finally, hydrogenation of the resulting phosphonate ester **16** (Figure S2A). Alternatively, the **CyC$_{11\text{-Dansyl}}$** was obtained by trans-esterification of **CyC$_4$** with 6-bromo-1-hexene, followed by a cross-metathesis reaction with the Dansyl-amide alkene **11** and subsequent hydrogenation (Figure S2B). In both cases, high-resolution mass spectrometry data and liquid chromatography−mass spectrometry spectra showed the presence of a mixture of compounds with various chain lengths (i.e., M-CH_2, M, and M + CH_2 − Figure S2C,D). Similar variation of the ring size from the ring closing metathesis reaction had previously been observed in the total synthesis of Dolabelide C.[38] These later byproducts were presumed to occur from double-bond isomerization followed by ring-closing metathesis, resulting in smaller macrocycles. Here, the chain length variation may also result from the isomerization of the terminal double bond during the cross metathesis (Figure S2C).

To overcome such product heterogeneity, two new Dansyl-labeled **CyCs** were synthesized starting from commercially available 11-bromo-1-undecanol **18** (Figure 2B). The enol-phosphonate **CyC$_{31}$** analogue of **CyC$_{17}$** and its phosphate derivative **CyC$_{32}$** analogue of **CyC$_{11}$** were then obtained with a shorter $C_{11}H_{23}$ alkyl chain on the phosphorus atom *versus* a $C_{16}H_{33}$ chain for the **CyC$_{17}$** and **CyC$_{11}$**. Briefly, following a published procedure,[39] compound **18** was first converted to the 11-amino-1-undecanol **19**[40] in a Gabriel synthesis employing the Ing-Mansk[41] variation. Treatment with boiling HBr[42] converted the alcohol group of **19** to the bromine **20**, which was reacted with Dansyl-chloride to give the Dansyl-labeled bromide compound **21** in 55% yields. The ester exchange reaction process with either the phosphate **CyC$_{16}$**[24,35] or the phosphonate **CyC$_4$** in the presence of an excess Dansyl-bromide **21** and TBAI in refluxing toluene yielded the corresponding fluorescent labeled alkyl phosphate **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** or phosphonate **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** derivative in 43% yields (Figure 2B). In parallel, the respective unlabeled analogues, that is, **CyC$_{31}$** and **CyC$_{32}$**, were also synthesized in 38−42% yields using the one-pot ester exchange process from **CyC$_{16}$** and **CyC$_4$**, respectively, and the commercial 1-bromoundecane (Figure 2C).

New CyC-Dansyl Affinity Probes Retain Antibacterial Activity Similar to That of Their Parent Molecules. The antimicrobial potency of the selected **CyCs** [**CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$**, **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$**, and **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** as well as **CyC$_{31}$** and **CyC$_{32}$**] was next evaluated toward the nonpathogenic *M. smegmatis* strain, four pathogenic mycobacterial species (i.e., *M. marinum*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* mc^{2}6230, and both S/R variants of *M. abscessus*), two Gram-negative bacteria (i.e., *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), and one Gram-positive (i.e., *Staphylococcus aureus*) bacteria. The corresponding **CyCs** minimal concentration leading to 90% bacterial growth inhibition (i.e., MIC$_{90}$), as determined by the resazurin microtiter assay (REMA),[25−27] is reported in Table 1.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

Table 2. Antibacterial Activities of the New CyC Analogues against *M. abscessus* S Infected Macrophages

Cpds		CC_{50} (μM)[a]	MIC_{50Raw} (μM)[b]
IMP[c]		ND	28.3±4.7
$CyC_{7\alpha}$[c]		>100	29.3±2.9
$CyC_{7\beta}$[c]		>70	65.3±6.2
$CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$		>100	39.9±6.2
$CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$		>100	80.6±7.1
CyC_{31} (X=O)		>100	*No effect*
CyC_{32} (X=CH_2)		>100	*No effect*
$CyC_{31\text{-Dansyl}}$ (X=O)		>100	*No effect*
$CyC_{32\text{-Dansyl}}$ (X=CH_2)		>100	*No effect*

[a]CC_{50}, compound concentration leading to 50% Raw264.7 macrophages toxicity. [b]MIC_{50Raw}, minimal compound concentration leading to a 50% decrease in CFU count as compared to untreated cells. Raw264.7 macrophages were infected by *M. abscessus* S-LuxAB at a MOI of 10, and further treated with each **CyC** or IMP for 24 h. The viable mycobacteria were quantified by measurement of luminescence which was further correlated to CFU. Untreated infected macrophages were used as the control representing 100% of bacterial viability. MIC_{50Raw} valyes were calculated from curve fitting of CFU% as a function of the inhibitor concentration and are expressed as mean values of three independent assays. [c]Data from ref 27. IMP, imipenem; ND, not determined.

As previously reported with the other **CyCs**[26,27] the in vitro growth of *E. coli*, *P. aeruginosa,* and *S. aureus* was not impacted. Satisfyingly, the *trans*-(α)- and *cis*-(β)-isomers of the $CyC_{7\text{-Dansyl}}$ retained extracellular activity comparable to the parent unlabeled molecules, with a fold change in MIC_{90} ranging from 0.7−3.2 μM (Table 1). In addition, each respective labeled and unlabeled pair of the new phosphate and phosphonate esters bearing a medium lipophilic C11 alkyl chain at the R^3 position, that is, CyC_{31}/$CyC_{31\text{-Dansyl}}$ and CyC_{32}/$CyC_{32\text{-Dansyl}}$ (Figure 2B,C), displayed similar antibacterial activity against the five mycobacteria, respectively. Interestingly, CyC_{31} and CyC_{32} exhibited similar MIC_{90} values to CyC_{17} against *M. bovis* BCG (MIC_{90} = 0.87−1.1 vs 0.80 μM) and *M. tuberculosis* (MIC_{90} = 5.3 vs 2.6 μM). Surprisingly, in the case of *M. abscessus*, although the CyC_{32}/$CyC_{32\text{-Dansyl}}$ phosphonate analogues were almost inactive, the CyC_{31} and $CyC_{31\text{-Dansyl}}$ phosphate esters displayed very good (MIC_{90} = 1.2−6.1 μM) to moderate (MIC_{90} = 27.1−63.4 μM) antimycobacterial activity against the S and R variant, respectively (Table 1).

The cytotoxicity of the 6 new **CyCs** was also assessed using murine Raw264.7 macrophages.[43] As expected from previous toxicity results obtained with the CyC_{1-30},[25,27] these new **CyCs** showed again a very low toxicity toward host mammalian cells with CC_{50} > 100 μM (Table 2), similarly to AMK ($CC_{50} \geq 150$ μM).[44] Given these results, the ability of the **CyC** analogues to inhibit *M. abscessus* intramacrophagic growth was investigated as reported previously.[27] Murine Raw264.7 macrophage cells were infected with *M. abscessus* S-LuxAB[45] at a multiplicity of infection (MOI) of 10 and then incubated for 24 h with various concentrations of each $CyC_{\text{-Dansyl}}$, or imipenem (IMP; 267 μM; 43 × MIC_{90}) used as the positive drug control. First, whatever the concentration used, the $CyC_{31\text{-Dansyl}}$, $CyC_{32\text{-Dansyl}}$, and the unlabeled CyC_{31} and CyC_{32} remained fully inactive toward infected macrophages (Table 2). Conversely, and in agreement with previous work,[27] both (α)- and (β)-isomers of $CyC_{7\text{-Dansyl}}$, inactive against extracellular bacilli, displayed a moderate activity against intracellular *M. abscessus* S with a calculated MIC_{50Raw} of 39.9 and 80.6 μM, respectively, similar to that of unlabeled $CyC_{7\alpha}$ and $CyC_{7\beta}$ (Table 2).

Overall, these results indicate that incorporation of a fluorescent Dansyl group either at the C5 carbon atom (i.e., $CyC_{7\text{-Dansyl}}$) or at the R^3 chain on the phosphorus (i.e., $CyC_{31\text{-Dansyl}}$ & $CyC_{32\text{-Dansyl}}$) does not affect the extracellular or intracellular antibacterial activity of the resulting $CyC_{\text{-Dansyl}}$ fluorescent affinity-based probes, as compared to the unlabeled parent molecules.

$CyC_{\text{-Dansyl}}$ Analogues Label Mycobacterial Strains Whatever Their Antibacterial Activity. To further investigate whether the fluorescent **CyCs** were able to penetrate into the above-mentioned bacteria, each strain was preincubated with the $CyC_{\text{-Dansyl}}$. The obtained $CyC_{\text{-Dansyl}}$-treated bacteria were visualized by fluorescence microscopy, and total fluorescence related to the Dansyl group was quantified using a Tecan Spark 10 M multimode microplate reader (Figures 3 & S3).

Surprisingly, each of the four $CyC_{\text{-Dansyl}}$ was found to penetrate efficiently and label all mycobacterial species tested, regardless of their respective MIC values (Figure 3A). In particular, the $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ and $CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$ almost exclusively active against intracellular bacterial growth are also able to efficiently tag mycobacteria in vitro. Quantification of total fluorescence intensity of the four $CyC_{\text{-Dansyl}}$ incubated with the mycobacterial strains revealed a similar overall profile (Figure S3). However, significant variations in the fluorescence level were obtained between each **CyC** (Figure 3B). Indeed, the mean fluorescence values of the $CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$-treated *M. smegmatis* (23,000 ± 8756 au) and both the $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$-treated *M. abscessus* S (34,874 ± 5363 au) and *M. abscessus* R (18,066 ± 2279 au) were found significantly 1.2- to 2.8-fold higher (*p*-value <0.001, Figure 3B) than those of the respective $CyC_{31\text{-Dansyl}}$ and $CyC_{32\text{-Dansyl}}$-treated mycobacteria. In contrast, no significant difference was observed with *M. marinum*, *M. bovis* BCG, or *M. tuberculosis* labeled strains whatever the $CyC_{\text{-Dansyl}}$ used (Figure 3B). When $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$- (*data not shown*) or $CyC_{31\text{-Dansyl}}$-treated *M. abscessus* S cells were subjected to cellular fractionation followed by in-gel fluorescence scanning, the inhibitor was found within both the insoluble (i.e., cell wall/membrane) and soluble (i.e., cytoplasm) fractions (Figures 3C

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

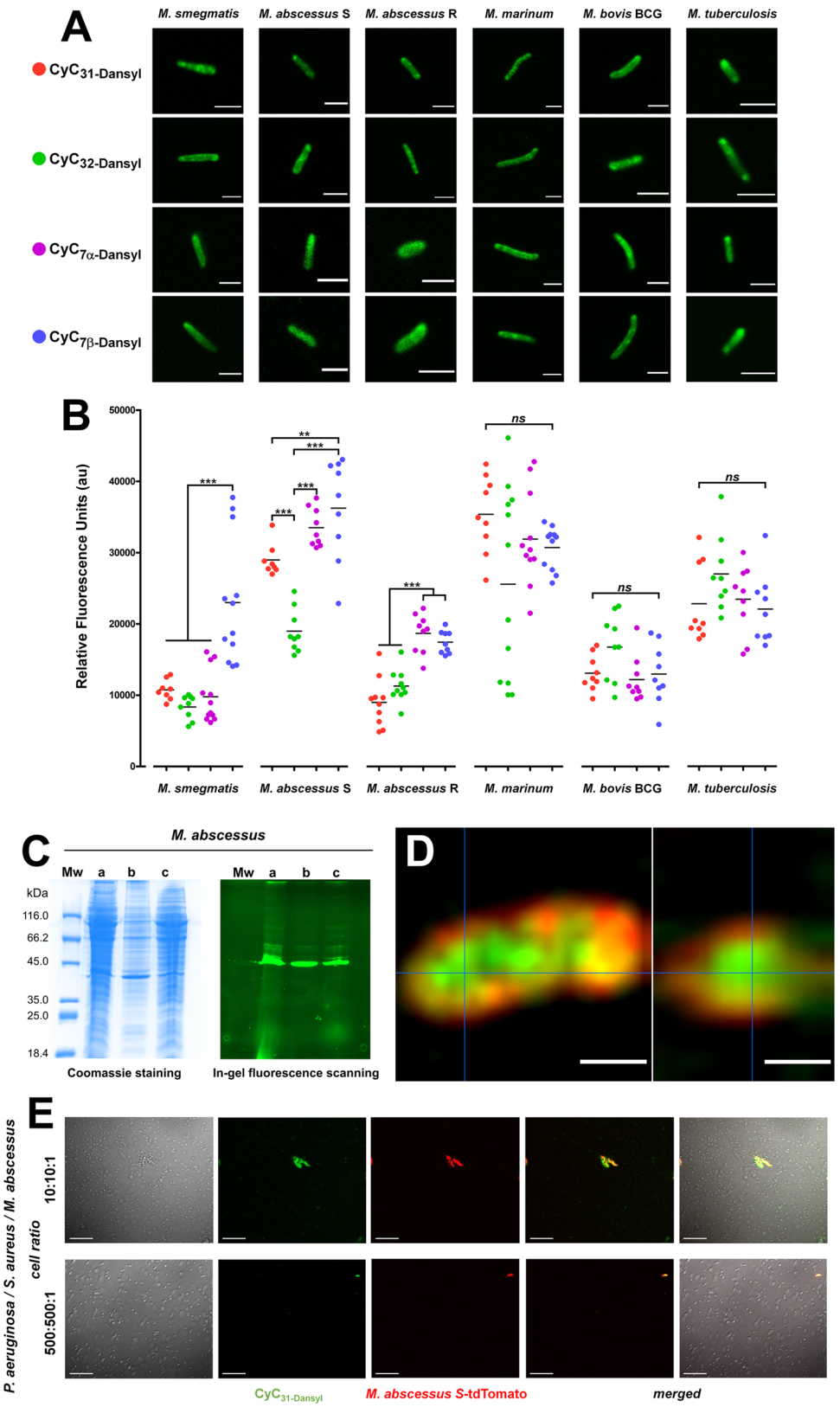


Figure 3. CyC$_{\text{-Dansyl}}$ probes are able to label all mycobacterial strains regardless of their antibacterial activity. (A) Representative fluorescence images of *M. smegmatis*, *M. abscessus* S and R, *M. marinum*, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis* mc^{2}6230 strains in presence of fluorescent **CyC**. The mycobacteria were exposed to 200 μM **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** for 3 h, washed and fixed with 4% paraformaldehyde. Fixed bacteria were imaged using an Olympus IX81 confocal microscope. Scale bars: 2 μm. (B) Total fluorescence intensity of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$**-treated mycobacteria expressed as arbitrary units (au) recorded at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 400/535 ± 10 nm using a Tecan Spark 10 M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., France). Compound color code is indicated in panel (A). Statistical significance was assessed with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test using Prism 4.0 (Graphpad, Inc): ** *p*-value <0.01; *** *p*-value <0.001; *ns*, not significant (*p*-value >0.05). Results are corresponding to n = 3 biologically independent experiments performed in triplicate. (C) Cellular localization of the CyC$_{31\text{-Dansyl}}$ in *M. abscessus* S. The bacteria were exposed to 200 μM **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** for 3 h, then washed, and

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

Figure 3. continued

lysed. Equal amounts of proteins (50 μg) from total lysate (**a**), insoluble (**b**), and soluble (**c**) fractions recovered after centrifugation were separated by 12% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining (*left*) or in-gel fluorescence (*right*). The **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$**-labeled proteins were detected by fluorescent gel scanning using trans-UV illumination (λ_{ex} 302 nm) as excitation source, and as emission the 530/28 filter of a ChemiDoc MP Imager (Bio-Rad) before staining of the gels with Coomassie Brilliant Blue dye. (D) 3-D reconstruction of a stack of deconvoluted images of CyC$_{31\text{-Dansyl}}$-treated *M. abscessus* S cells from an epi-fluorescence microscope. XY (*left panel*) and YZ (*right panel*) orthogonal views. The bacterium was incubated with **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** (green fluorescence) and the bacterial membrane was further stained with Nile Red (red fluorescence). The orange color results from merge fluorescence between the Dansyl and the Nile Red (see also Movie S1). Scale bars: 0.5 μm. (E) The CyC$_{\text{-Dansyl}}$ probes specifically label *M. abscessus* cells in polybacterial cultures. Fluorescence micrographs of polybacterial cultures formed by *M. abscessus* -tdTomato, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* stained by **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** after overnight culture in 7H9 media for mycobacterial enrichment. Scale bars: 20 μm.

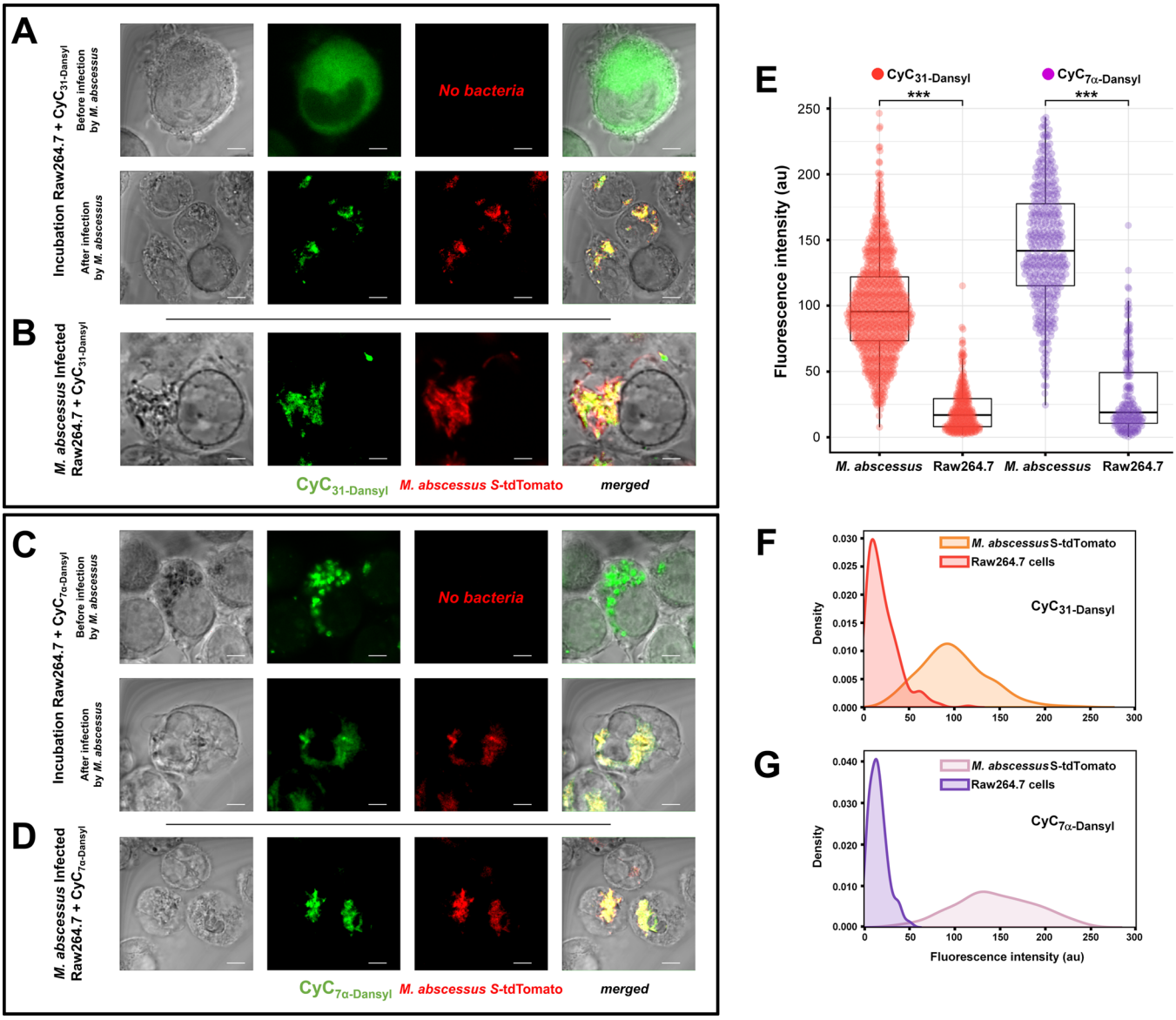


Figure 4. CyC$_{31\text{-Dansyl}}$ and CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ specifically localized on *M. abscessus* S inside infected Raw264.7 macrophages. Representative images of the **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$** distribution in intracellular *M. abscessus* S-dtTomato strains. (A, C) Raw264.7 macrophages were preincubated with 100 μM **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** (A) or **CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$** (C) for 24 h prior to be infected with *M. abscessus* S-tdTomato (MOI 10) for another 24 h. (B, D) Alternatively, *M. abscessus* S-dtTomato infected Raw264.7 were treated with each inhibitor for 24 h before chemical fixation and confocal fluorescence imaging. Scale bars: 5 μm. Micrographs are representative of two independent experiments. (E) Quantitative analysis of the Dansyl fluorescence signal per bacterium and Raw264.7 cell positive area shown as a sinaplot-boxplot and expressed as arbitrary units (au). Results are from two biologically independent experiments; 122 to 258 cells were observed resulting in 389 to 808 segmented intracellular *M. abscessus* S-dtTomato positive regions. The *p*-values were calculated by using a two-tailed *t*-statistic test with Prism 4.0 (Graphpad, Inc): *** *p*-value <0.001. (F, G) Density plot of the Dansyl fluorescent signal profile of *M. abscessus* S-tdTomato and Raw264.7 positive cells.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

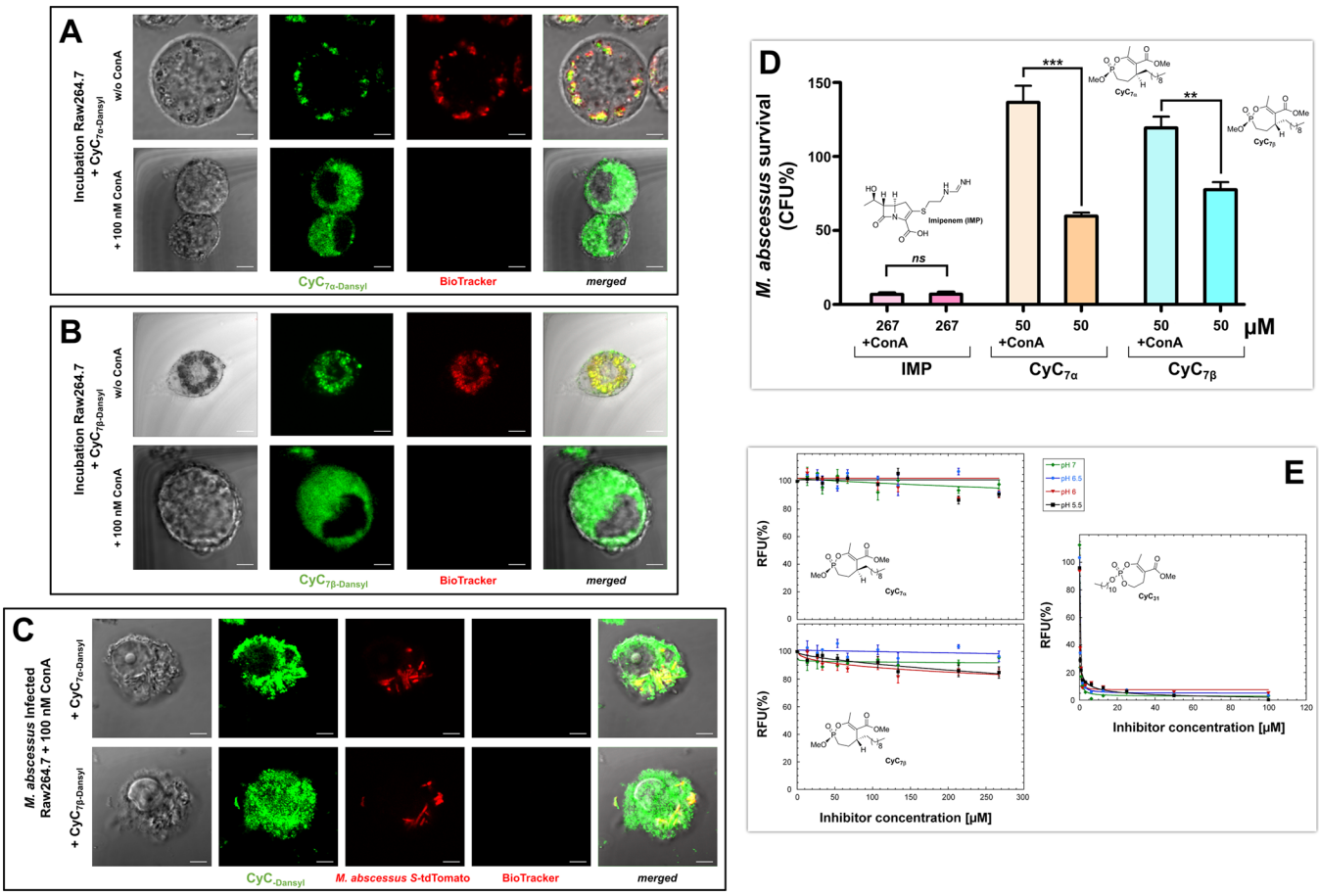


Figure 5. $\mathbf{CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}}$ accumulate in acidic compartments inside Raw264.7 macrophages. Raw264.7 macrophages were preincubated with 100 μM $\mathbf{CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}}$ (A) or $\mathbf{CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}}$ (B) for 24 h in the presence or absence of 100 nM Concanamycin A (ConA) prior to be stained with 1× BioTracker NIR633 dye and processed for confocal fluorescence imaging. Micrographs are representative of 106 to 136 observed cells from two biologically independent experiments. Scale bars: 5 μm. (C) Disruption of endolysosomal acidification impairs $\mathrm{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ colocalization with *M. abscessus* cells inside infected Raw264.7 macrophages. *M. abscessus* S-dtTomato infected Raw264.7 macrophages treated with 100 nM Concanamycin A (ConA) were preincubated with 100 μM $\mathbf{CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}}$ or $\mathbf{CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}}$ for 24 h prior to be stained with 1× BioTracker NIR633 dye and processed for confocal fluorescence imaging. Micrographs are representative of around 120 observed cells from two biologically independent experiments. Scale bars: 5 μm (D) Addition of ConA suppresses the intracellular antibacterial activity of $\mathrm{CyC_{7\alpha}}$ and $\mathrm{CyC_{7\beta}}$ against *M. abscessus* in infected Raw264.7 murine macrophages. Cells were infected at an MOI of 10 with *M. abscessus* S-LuxAB and treated for 24 h with 50 μM $\mathbf{CyC_{7\alpha}}$/$\mathbf{CyC_{7\beta}}$, or 267 μM IMP as the positive drug control, in the presence or absence of 100 nM ConA. Surviving bacteria were next quantified from macrophage lysates by measurement of luminescence, which was further correlated to CFU. Untreated infected macrophages in presence (i.e., $0.97 \pm 0.21 \times 10^6$ CFU) or absence (i.e., $1.04 \pm 0.11 \times 10^6$ CFU) of ConA were used as control representing 100% of bacterial viability. Results are shown as mean ± standard error of the mean of three independent assays. The *p*-values were calculated by using a two-tailed *t*-statistic test with Prism 4.0 (Graphpad, Inc): ***, *p*-value <0.001. **, *p*-value <0.01. *ns*, not significant (*p*-value >0.05). (E) Antibacterial activity of the CyC against extracellular *M. abscessus* S growth is not pH-dependent. Activity of $\mathbf{CyC_{7\alpha}}$, $\mathbf{CyC_{7\beta}}$, and $\mathbf{CyC_{31}}$ against *M. abscessus* S replicating in broth medium, expressed as normalized relative fluorescence units (RFU%). *M. abscessus* S strains were grown until reaching mid-exponentially growing phase in 7H9-S medium, inoculated in fresh media adjusted at pH 7.0, 6.5, 6.0, or 5.5, and further used in susceptibility testing using the REMA assay toward the three **CyC** compounds. Each value is the mean ± SD of two independent assays.

& S4). Moreover, 3-D reconstruction of confocal laser scanning microscopy images of $\mathbf{CyC_{31\text{-Dansyl}}}$-treated *M. abscessus* S cells confirmed that the diffuse fluorescence (i.e., green and orange resulting colors) observed with the $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$-treated strains would result from a homogeneous distribution of these inhibitors in the cell wall and in the cytoplasm (Figure 3D and Movie S1). Such observations agree with our all previous studies, where identified protein targets of the **CyCs** in *M. abscessus* ($\mathbf{CyC_{17}}$ and $\mathbf{CyC_{26}}$) and *M. tuberculosis* ($\mathbf{CyC_{17}}$) originated from both cellular compartments.[25,27]

$\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ Analogues Are Unable to Label Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, but Can React with Their Respective Lysates. Conversely and in good agreement with MIC data and previously published work with the **CyC**,[26] no significant fluorescence signal was detected when treating *E. coli*, *P. aeruginosa* or *S. aureus* with the four $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ probes (Figure S5), thus suggesting that the **CyCs** would not be able to cross the cell wall of these latter bacteria. To check if these inhibitors would however be able to react with bacterial enzymes, a lysate of each of the three above-mentioned bacteria was incubated with each $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$, and then equal amounts of the obtained labeled proteome were separated by 12% SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining or in-gel fluorescence for Dansyl detection using a ChemiDoc MP Imager (Bio-Rad) (Figure S6). In each treated lysate, clear distinct fluorescent bands were detected corresponding to bacterial (Ser/Cys)-enzymes that presumably had reacted with the $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ probes. Given together, these findings confirm

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

that the absence of antibacterial activity of the **CyCs** clearly results from their inability to cross the cell wall of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

In the context of CF patients, the presence of numerous Gram-negative and Gram-positive bacteria from the microbiota represents a significant challenge for detecting mycobacteria in sputum.[46] Therefore, we examined the ability of the **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** to specifically label *M. abscessus* in polymicrobial cultures. Exponential cultures of *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *M. abscessus* S harboring a tdTomato fluorophore were mixed at a 10:10:1 cell ratio, incubated overnight in a 7H9-S medium for mycobacteria enrichment, and then stained with **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** probe. In line with our results, we observed the selective staining of *M. abscessus* in this mixed microbial culture (Figure 3E). To assess the sensitivity of the **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$**, different ratios of the polymicrobial culture were tested. Imaging results showed that the **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** could detect a single mycobacterium in the presence of 1000 other bacteria (Figure 3E). Taken together, these results confirm that the **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** are highly specific and selective for mycobacteria with high sensitivity.

CyC$_{\text{-Dansyl}}$ Affinity Probes Efficiently Label Intramacrophagic *M. abscessus*. In parallel, we investigated the ability of the **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** analogues to interact with *M. abscessus* S-tdTomato within infected Raw264.7 macrophage cells. Raw264.7 macrophages were first incubated with each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** probe at a 100 μM final concentration for 24 h and then processed for fluorescent microscopy (Figures 4 & S7). At this stage, and despite a similar hydrophobicity between all **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** (i.e., mean Log P = 4.51 ± 0.24), two different fluorescence profiles were observed depending on the compounds used (Figures 4A,C and S7A,C).

With the **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** (Figure 4A) and **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** (Figure S7A), a large and diffuse fluorescence was observed inside the macrophage. Remarkably, and despite the absence of intracellular antibacterial activity, infection of the latter **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$**-treated cells with *M. abscessus* S-dtTomato resulted in a clear re-colocalization of the Dansyl inhibitors with the mycobacteria. Moreover, when the Raw264.7 were infected prior to incubation with **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$**, the same final colocalization was also observed. A quantitative analysis of **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$** accumulation in *M. abscessus* S-tdTomato-infected macrophages revealed a higher level of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** associated with the mycobacteria than the Raw264.7 cells (average mean intensity [au] of 99.38 ± 1.32 vs 21.29 ± 1.10 and 156.9 ± 1.91 vs 25.41 ± 1.19 for **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** positive bacteria *vs* positive Raw264.7 cells, respectively; *p-value* <0.001) (Figures 4E & S7E). Analysis of the distribution of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** mean intensity between intracellular *M. abscessus* S-tdTomato and Raw264.7 cells areas by the density plot confirms that *M. abscessus* bacteria displayed a higher **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** signal enrichment than macrophage cells (Figures 4F & S7F). These findings are consistent with a dynamic relocation process of the **CyC** inside the macrophage and leading to a clear tropism of both **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$** for intracellular *M. abscessus* S.

In contrast, when macrophages were treated with the **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$**, which are active mainly in intracellular conditions, a totally different behavior from the other two **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$** compounds was reached (Figures 4C & S7C). Indeed, their fluorescence was mainly localized into foci as if these two inhibitors accumulated in specific cell compartments. Interestingly, after infection both **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** colocalized with the intracellular mycobacteria (Figures 4C,D & S7C,D), as also observed with the **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$** inhibitors. In addition, the quantitative analysis of **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** accumulation in *M. abscessus* S-tdTomato-infected macrophages revealed a higher level of each **CyC$_{7\text{-Dansyl}}$** associated with the mycobacteria than the Raw264.7 cells (average mean intensity [au] of 144.6 ± 2.25 vs 31.85 ± 2.34, and 137.2 ± 2.13 vs 48.78 ± 2.25 for **CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{7\beta\text{-Dansyl}}$** positive bacteria vs positive Raw264.7 cells, respectively; *p-value* <0.001) (Figures 4E & S7E). Such tropism was further confirmed by analysis of the distribution of **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** fluorescence intensity between intracellular *M. abscessus* S-tdTomato and Raw264.7 cells by the density plot (Figures 4G & S7G).

CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$ Analogues Accumulate in Acidic Intracellular Compartments. Among the four **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** analogues tested, the fact that only the **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** is active against intramacrophagic replicating bacteria (Table 2) prompted us to investigate further their particular localization as foci-like inside macrophages. More precisely, the fact that lysosomes are acidic and hydrolytic organelles responsible for the degradation of macro and small molecules inside macrophages,[47] we tested whether these two compounds accumulate in acidic compartments. Raw264.7 macrophages were then treated with 100 μM of each of the four **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** compounds, and acidic compartments were labeled using BioTracker NIR633, a deep red fluorescent dye that labels acidic organelles in live cells. First, in agreement with our previous observation (Figures 4 and S7), the **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** exhibited a diffuse fluorescence and only few colocalization between the Dansyl and the BioTracker signals were observed inside Raw264.7 cells (Figure S8). Conversely, the **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** displayed a clear colocalization with BioTracker positive regions (Figure 5A,B). Quantitative analysis of the Dansyl fluorescence signal in these BioTracker positive regions showed a significant 1.5 to 1.8-fold change in the average mean intensity for **CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$** (85.5 ± 0.76 au) and **CyC$_{7\beta\text{-Dansyl}}$** (79.8 ± 0.89 au) vs **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** (48.2 ± 0.85 au) and **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** (51.8 ± 0.89 au) (Figure S9), therefore confirming the preferential colocalization of the **CyC$_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$** within acidic compartments.

From these findings, **CyC$_{7\text{-Dansyl}}$**-treated macrophages were next incubated in the presence of the vacuolar-type H^+-ATPase inhibitor Concanamycin A (ConA) (i.e., an inhibitor of endolysosomal acidification).[48] Indeed, ConA inhibited endolysosomal acidification resulting in the loss of BioTracker staining, but unexpectedly also impaired the **CyC$_{7\text{-Dansyl}}$** accumulation phenotype resulting in a diffuse Dansyl fluorescence all around the cell, similar to those reached with both **CyC$_{31/32\text{-Dansyl}}$** (Figures 5A,B and S8A,B). Furthermore, with infected macrophages the presence of ConA results mainly in the loss of the strict colocalization of the **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** with the intracellular mycobacteria (Figures 5C & S8C), as observed above in Figures 4 and S7. Finally, intracellular antibiotic activity assays performed with 100 nM ConA led to a complete abrogation of the **CyC$_{7(\alpha,\beta)}$** inhibitory effects, without altering intramacrophage *M. abscessus* growth or intracellular efficacy of imipenem used as drug control (Figure 5D). Because the intracellular activity of the compounds appears to be correlated with acidic compartments, we investigated whether low pH was needed for activating the **CyC** in extracellular conditions. Then, we conducted susceptibility testing at various pH in the 5.5−7.0 range and showed that **CyC$_{7(\alpha,\beta)}$** or **CyC$_{31}$** MIC values against extracellular *M. abscessus* S growth were not modified, thus

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

suggesting that the antibacterial activity of these compounds is not pH-dependent (Figure 5E).

DISCUSSION

The continuous and rapid emergence of drug-resistant mycobacteria, associated with the lack of new antibiotics entering the market, has become a global public health concern that threatens the effective diagnosis and treatment of pulmonary infectious diseases. Infections caused by NTM have now become clinically relevant and are extremely difficult to treat due to the intrinsic resistance of such mycobacteria to many common antibiotics. Among NTM, *M. abscessus* is the most antibiotic-resistant mycobacterial species responsible for severe respiratory, skin and mucosal infections in humans, frequently found in immunocompromised patients or patients with CF or chronic obstructive pulmonary disease.[49,50] In the case of CF patients, *M. abscessus* infection may also be exacerbated by polybacterial lung infections with other microorganisms, such as *P. aeruginosa* and/or *S. aureus*.[46] In this context of coinfection, *M. abscessus* would be missed in the absence of effective microbiological surveillance, whereas it is of great importance to accurately detect its presence in patient's sputum in order to adapt the antimicrobial treatment.[22,49]

Toward the generation of new antibacterial leads, the **CyC** analogues are not only nontoxic for mammalian cells, but above all represent a novel class of selective and efficient multitarget inhibitors leading to the arrest of *M. abscessus* extracellular and/or intracellular growth through the inhibition of various mycobacterial enzymes involved in important physiological processes.[24] Herein, we report an optimized and efficient total synthesis of fluorescent Dansyl derivatives of four active **CyC** analogues and their use as efficient probes. We demonstrated that these fluorescent $\mathbf{CyC}_{\text{-Dansyl}}$ not only behave similarly to their parent molecules in terms of antibacterial activity and toxicity toward host cells, but also specifically label all mycobacterial species tested, including *M. abscessus* in the context of a polybacterial mixture with *P. aeruginosa* and *S. aureus*, with high sensitivity because a single mycobacterium in the presence of 10^3 other bacteria can be detected. Moreover, we provide compelling evidence that the absence of the antibacterial effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria results from the inability of these **CyCs** to cross the bacterial membrane of the latter microorganisms. The most likely hypothesis is that the hydrophobic nature of the **CyCs** would favor their diffusion across the waxy and lipid-rich mycobacterial membrane, unlike that of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Such property could be used for the rapid detection of *M. abscessus* in patient's sputum thus paving the way for new promising applications of the **CyCs** in diagnostics.

Another important issue resides in the fact that the penetration of the fluorescent **CyC** inside the mycobacteria was not correlated with their respective MIC values (Table 1 and Figure 3). Accordingly, $\mathbf{CyC}_{\text{32-Dansyl}}$ and $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$ which are ineffective against *M. abscessus* extracellular growth behave similarly to $\mathbf{CyC}_{\text{31-Dansyl}}$ in terms of bacterial fluorescence labeling (Figure 3B). This unexpected feature implies that the antibacterial activity of the **CyC** against the extracellular growth of *M. abscessus* would result from the inhibition of mycobacterial target enzymes specific to each compound, as recently demonstrated in the case of *M. tuberculosis*,[51] independent of their penetration properties because they are all capable to enter the mycobacteria. In other words, the discrepancy in terms of extracellular activity between the four **CyC** might simply rely on relative chemical reactivity between the phosphate (i.e., potent $\mathbf{CyC}_{17}$ & $\mathbf{CyC}_{31}$) and phosphonate (i.e., inactive $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)}$ & $\mathbf{CyC}_{32}$) chemical groups.

When tested against *M. abscessus* infected macrophages, each $\mathbf{CyC}_{\text{-Dansyl}}$ probe also perfectly colocalized with intracellular bacterial cells, regardless of their respective intracellular MIC_{Raw} values (Table 2). A distinct fluorescent profile inside Raw264.7 macrophages was however obtained, depending on the compounds. Following BioTracker labeling, our results clearly suggest that the $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$, only active against intramacrophagic *M. abscessus* growth, would accumulate preferentially in acidic compartments contrary to $\mathbf{CyC}_{\text{31/32-Dansyl}}$ for which a predominantly diffuse fluorescence was observed within the cells (Figures 5 & S8). The inhibitor of the vacuolar-type H^+-ATPase Concanamycin A (ConA) disrupted the intracellular accumulation phenotype of $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$, drastically abolished their colocalization with intracellular *M. abscessus* inside infected macrophages, and impaired their antibacterial efficacy as shown by intracellular antibiotic susceptibility assays (Figures 4 and 5). Conversely, the presence of ConA did not significantly alter $\mathbf{CyC}_{\text{31/32-Dansyl}}$ fluorescent profile inside Raw264.7 cells. These novel results support the idea that in conditions where acidification is suppressed, the ability of the $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)}$ to accumulate in specific acidic compartments and restrict intramacrophagic *M. abscessus* replication would be limited.

Moreover, the fact that the extracellular antibacterial activity of the **CyC** is not pH-dependent (Figure 5E) also presumes that the partitioning and accumulation of $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)}$ in acidic compartments represents the crucial step that drives their delivery to the mycobacterial containing phagosomes. In a similar way to bedaquiline which accumulates in host lipid bodies (LB) and is transferred to *M. tuberculosis* as LBs are consumed thus leading to enhanced antibacterial activity,[52] host-cell acidic compartments constitute a transferable reservoir responsible for the $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)}$ antimicrobial efficacy against intracellularly replicating *M. abscessus*. Consequently, even though endolysosomal acidification appears to be an important determinant contributing to the $\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)}$ intracellular efficacy, their mode of action would differ drastically from that of pyrazinamide[53] or clofazimine[54] for which the pH is the critical issue for the activation of the drug against *M. tuberculosis*-infected macrophages. Given all these findings, it is also tempting to hypothesize that the mostly diffuse localization of $\mathbf{CyC}_{31/32}$ inside the cells may be responsible for the lack of intracellular activity.

CONCLUSIONS

Diseases caused by pathogenic mycobacterial species continue to cause significant morbidity and mortality to human health. In this context, the discovery few years ago of a very promising family of multitargeted inhibitors, called cyclipostins and cyclophostin analogues (**CyCs**), with potent antimycobacterial activities has opened the way to new therapeutic strategies in the fight against mycobacterial-related diseases. These include *M. tuberculosis* and *M. abscessus*, two major human pathogens responsible for severe lung infections. Moreover, these **CyCs** do not alter the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria and do not exhibit significant toxicity toward mammalian cells. In this work, using several selected fluorescent **CyCs**, we brought new insights into their mode of action against both extracellular and intracellular mycobacterial growth. All these studies have not only reinforced the great interest of the

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

CyC compounds, but above all our results provide a first set of explanations related to the antibacterial activity of the **CyC**, both in vitro and ex vivo, underlining the huge and combined effect of the host-cell environment with antibiotics during mycobacterial infection, and particularly here in the case of *M. abscessus* infections. Apart from the therapeutic potential of unlabeled **CyC** compounds, thanks to their multitargeted covalent mechanism of action, fluorescent **CyC** probes could be used to specifically label pathogenic mycobacteria in polybacterial mixtures thus leading to new efficient, selective, and sensitive diagnostic markers. This is of particular importance to patients with CF for whom identification of *M. abscessus* is crucial, especially for transplantation purposes.[23]

METHODS

Chemistry. Detailed procedures and the full chemical characterization (^{1}H, ^{13}C, and ^{31}P NMR spectra) of each new analogue (i.e., the four $\mathbf{CyC}_{\text{-Dansyl}}$ and $\mathbf{CyC}_{31/32}$) are reported in the Supporting Information.

Stock solutions (10 mM) in which the **CyC** compounds (purity of ≥95%) were found to be completely soluble in dimethyl sulfoxide (DMSO) were prepared and stored at 4 °C.

Bacterial Culture. *Escherichia coli* DH10B, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, and *Staphylococcus aureus* (clinical isolate) cells were grown in Luria−Bertani broth (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) at 37 °C under shaking at 200 rpm. *M. smegmatis* was cultured in Middlebrook 7H9 liquid media (BD Difco) supplemented with 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 0.2% glycerol (Euromedex, France) (7H9-S). *M. abscessus* CIP104536^{T} with either a smooth (S) or a rough (R) morphotype, *M. marinum* ATCC BAA-535/M, *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, and *M. tuberculosis* mc^{2}6230 (H37Rv Δ*RD1* Δ*panCD*[55]) were cultured in 7H9-S supplemented with 10% oleic albumin dextrose catalase (OADC enrichment, BD Difco) (7H9-S^{OADC}). In the case of *M. tuberculosis* mc^{2}6230, 24 μg/mL D-pantothenate (Sigma-Aldrich) was also added in the 7H9-S^{OADC} medium. Recombinant *M. abscessus* S carrying pTEC27 (Addgene, plasmid 30182) expressing red fluorescent tdTomato protein was grown in 7H9-S^{OADC} with 500 μg/mL hygromycin B (Euromedex, France).[56] Recombinant *M. abscessus* S carrying the pSMT3-GFP-LuxAB plasmid allowing luminescence and fluorescence was grown in 7H9-S^{OADC} with 1000 μg/mL hygromycin B (Euromedex, France).[45] The latter *M. abscessus* S-LuxAB strain was a generous gift from Prof. Jean-Louis Herrmann (Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and was used for measurement of bacterial load inside infected macrophages. All cultures were incubated at 37 °C, except *M. marinum* which was cultured at 32 °C. *M. smegmatis* and *M. abscessus* were stirred at 200 rpm; *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* mc^{2}6230, and *M. marinum* at 50 rpm.

Determination of MICs. Susceptibility testing for mycobacteria was performed using the Middlebrook 7H9 broth microdilution method. MICs of the **CyCs** were determined in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid (Thermo-Fisher Scientific, ref. 167008) using REMA as described previously.[26,27,57] Briefly, log-phase bacteria were diluted to a cell density of 5×10^{6} cells/mL in appropriate 7H9-S medium. Then, 100 μL of this bacterial suspension (5×10^{5} cells per well) was added to each well containing 100 μL of the appropriate 7H9-S medium, serial twofold dilutions of the selected **CyCs** or controls to a final volume of 200 μL. Plates were incubated at 37 °C (32 °C for *M. marinum*) for either 3−5 days (*M. smegmatis* and *M. abscessus*) or 7−14 days (*M. marinum*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* mc^{2}6230). Then, 20 μL of 0.025% (w/v) resazurin solution was added, and incubation was proceeded for color change (from blue to pink) in the control well (bacteria without antibiotic). Fluorescence of the resazurin metabolite resorufin ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 530/590 ± 10 nm) was quantified using a Tecan Spark 10 M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., France). Relative fluorescence units were defined as: RFU% = (test well FU/mean FU of growth control wells) × 100. MIC values were determined by fitting the RFU% sigmoidal dose−response curves[25,58] in Kaleidagraph 4.2 software (Synergy Software). The lowest compound concentration leading to 90% bacterial growth inhibition was defined as the MIC_{90}.

In parallel, MICs of *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* were assessed using the broth microdilution method.[59] Log-phase bacteria were diluted in Luria−Bertani medium to around 5×10^{5} cells/mL. Then 100 μL of this latter inoculum were added into each well containing serial dilution of the **CyCs**, and the plates were incubated at 37 °C for 18−24 h. After incubation, OD_{600nm} was recorded using a Tecan Spark 10 M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., France). The MIC was defined as the lowest concentration of **CyC** that inhibited visible growth of the bacteria.

Each assay for each strain was carried out at least in triplicate.

Determination of Cytotoxic Activity for New CyCs. The cytotoxicity of each new synthesized **CyC** against eukaryotic cells was measured based on the reduction of resazurin as a value of cellular viability by metabolic activity.[27,60] Murine (Raw264.7) macrophages (American Type Culture Collection TIB-71) were cultured from a freezer stock in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FBS, Invitrogen) (DMEM^{FBS}). Cells were grown at 37 °C and 5% CO_2 to subconfluent concentrations. Then 5×10^{4} cells/well were seeded in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid (ThermoFisher Scientific) in a final volume of 200 μL per well and incubated for additional 24 h. The medium was removed by aspiration, and 200 μL of serial twofold dilution of each compound ($\mathbf{CyC}_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$, $\mathbf{CyC}_{31\text{-Dansyl}}$, $\mathbf{CyC}_{32\text{-Dansyl}}$, as well as $\mathbf{CyC}_{31}$ and $\mathbf{CyC}_{32}$) in DMEM^{FBS} were then added to each well. After 24 h incubation, 20 μL of a 0.025% (w/v) resazurin solution was added to each well. Fluorescence was measured following a 4 h incubation at 37 °C and 5% CO_2 in the dark, by excitation at 530 nm and emission at 590 nm as described above, leading to relative metabolic activities. Addition of DMSO was used as 100% viability reference and addition of 0.2% Triton X-100 solution served as the negative standard (0% viability). All experiments were performed as two independent triplicates.

Intramacrophage Killing Assay. Raw264.7 macrophages were grown in DMEM^{FBS} medium at 37 °C and 5% CO_2 to subconfluent concentrations. Then 5×10^{4} cells/well were seeded in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid in a final volume of 200 μL per well and cultured for additional 24 h. The cells were infected with *M. abscessus* S-LuxAB at a MOI of 1:10 and incubated at 37 °C in the presence of 5% CO_2 for 3 h. Cells were then washed three times with DMEM, then refed with DMEM^{FBS} supplemented with 200 μg/mL amikacin for 1 h at 37 °C and 5% CO_2 to kill any extracellular bacteria, and washed again three times with DMEM prior to the addition of 2-fold dilutions of the **CyC** compounds or IMP in DMEM^{FBS} supplemented with 50 μg/mL (i.e., 85.4 μM) amikacin (200 μL final volume). In each plate, negative controls

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

consisting of amikacin (50 μg/mL) and 1% DMSO (i.e., infected macrophages only) as well as positive controls containing amikacin (50 μg/mL) plus 80 μg/mL (i.e., 267 μM) IMP were also included.[27,61] Plates were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO_2.

Luminescence measurement was then used to check intracellular bacterial viability of *M. abscessus* S-LuxAB[45] following treatment with each **CyC** compound concentration. Infected macrophage cells were first washed three times with PBS and lysed by addition of 200 μL cold PBS-0.1% Triton X-100. A solution of 1% *n*-decanal (Sigma-Aldrich) in ethanol (20 μL) was added into each well after lysis of macrophages, and luminescence was read immediately using a Tecan Spark 10 M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., France). DMSO-treated infected macrophages corresponded as the control representing 100% of bacterial viability. The luminescence value obtained was next correlated to CFU using a calibration curve $Log_{10}(Lux) = f(Log_{10}(CFU))$ initially built by plating 10-fold serial dilutions of *M. abscessus* S-LuxAB on 7H9 agar medium, followed by colony enumeration after 4−5 days of incubation at 37 °C. Intracellular MIC_{Raw} values were further determined by fitting the CFU% sigmoidal dose−response curves in Kaleidagraph 4.2 software (Synergy Software). The lowest compound concentration inhibiting 50% of intracellular bacterial growth was defined as the MIC_{50Raw}. Each experiment was performed three times independently.

Mycobacteria and Infected/Noninfected Macrophages Labeling with the $CyC_{\text{-Dansyl}}$. Mid-log phase mycobacterial suspension in appropriate 7H9-S medium was harvested for 15 min at 3500 rpm and resuspended in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.05% (v/v) Tween 20 (Euromedex, France) (PBS-T) at an OD_{600} corresponding to 1.5×10^{10} cells/mL. Then, the cells were incubated with 200 μM of each $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ (i.e., $\mathbf{CyC_{31\text{-Dansyl}}}$, $\mathbf{CyC_{32\text{-Dansyl}}}$, $\mathbf{CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}}$, and $\mathbf{CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}}$) or DMSO (negative control) for 3 h at 37 °C (32 °C for *M. marinum*) under shaking at 200 rpm. After incubation, bacteria were washed three times with PBS-T and resuspended in 100 μL PBS-T. For quantification of total fluorescence, 100 μL of each sample (i.e., 7.5×10^9 cells/mL) in PBS-T was dispensed in a 96-well Chimney black microplate (Greiner Bio-one, Germany). The fluorescence related to the Dansyl group was recorded at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 400/535 \pm 10$ nm using a Tecan Spark 10 M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., France). For microscopy observation, the bacteria were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h at room temperature, washed three times with PBS-T, and resuspended in 100 μL PBS-T. Microscopy observations also performed in PBS buffer but in the absence of Tween 20 resulted in similar labeling results, thus excluding any interference of detergent in the labeling of mycobacteria (*data not shown*).

Raw264.7 macrophages were grown in $DMEM^{FBS}$ medium at 37 °C and 5% CO_2 to subconfluent concentration. Then 2.5×10^5 cells/well were seeded in eight-well Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System, RS glass (ThermoFisher Scientific) in a final volume of 250 μL per well and cultured for additional 24 h. Cells were washed three times with DMEM, then refed with $DMEM^{FBS}$ supplemented with 100 μM fluorescent $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ probes, and incubated for additional 24 h at 37 °C and 5% CO_2. Cells were then washed three times with DMEM and infected with the fluorescent *M. abscessus* S-tdTomato strain at a MOI of 10 and processed as described above (see Intramacrophage Killing Assay section). Alternatively, the cells were first infected with *M. abscessus* S-tdTomato strain prior to a 24 h incubation period with 100 μM $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ probes. After incubation, the infected and noninfected macrophages were washed three times with sterile PBS, fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min, then washed twice with PBS, and re-filled with 250 μL PBS.

Fluorescence Microscopy. Fixed samples (4 μL bacterial suspension, i.e., 3.0×10^7 cells, spotted between a microscope slide and coverslip; or macrophage cells in Lab-Tek II Chamber Slide System) were analyzed by snapshot fluorescence imaging at room temperature using an Olympus IX81 confocal microscope equipped with a UPlanSApo 100× 1.40 NA objective and operated with the FV1000 software. Acquisitions were taken using a two-line Kalman integration. Exposure time was 10 μs/pixel for both laser transmission and fluorescence images with conserved settings (X, Y, Z, HV, Gain and offset). The Dansyl was detected by excitation with a 405 nm laser with 39−50% intensity, and emission was collected using a semitransparent mirror collecting all wavelength under 560 nm. The tdTomato was detected by excitation with a 515 nm laser with 20−40% intensity, and emission was collected using a semitransparent mirror collecting all wavelength over 560 nm.

3D-fluorescence images were acquired on a DeltaVision OMX SR imaging system from GE Healthcare, with an Olympus PlanApo N 60× 1.42 NA and 2 cameras sCMOS. The Dansyl was detected by a 405 nm diode laser (61 mW) at 2%T during 50 ms and with a 435/31 nm emission filter and the Nile Red was detected by a 568 nm diode-pumped solid-state laser (61 mW) at 2%T during 100 ms and with a 609/37 nm emission filter. Eleven sections of images of 512 × 512 pixels (pixel size of 80 nm) were acquired with a section spacing of 0.125 μm and a sample thickness of 1.25 μm. Images were then deconvoluted with the microscope software "Softworks 7.0.0" and then analyzed with Fiji 1.53f51. With each $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ probe, two biological replicates were made with infected and noninfected macrophages; and for each sample, eight different images were taken per frame in order to get more than 200 macrophage cells in total. Images were next converted to an 8-bit intensity color range. In all cases, the corresponding control images were taken/checked prior to any fluorescence imaging and quantification.

Analysis of Dansyl Mean Fluorescence Intensity (Adapted from ref 53). A background noise was first calculated by taking the mean fluorescence intensity of 20 different areas free of any cells for each channel (i.e., Dansyl and tdTomato frames, respectively) and was subtracted to each frame. Segmentation and analysis of the images recorded (126.98 × 126.98 μm; 512 × 512 pixels) were performed using the open-source program ImageJ/Fiji 1.53f51. Cell segmentation was performed by manually detouring the Raw264.7 cells on the laser transmission frame and transforming it into a mask. This Raw-mask was then used to determine the Dansyl mean fluorescence intensity of pixels associated to the macrophage region and corresponding to the inhibitor cellular uptake. For intracellular bacterial segmentation, a manual threshold was first applied to the tdTomato frame to create a binary mask, defining all bacterial regions of interest. This bacterial-mask was used to measure the Dansyl mean fluorescence intensity of pixels associated to the *M. abscessus* S-tdTomato region and corresponding to the inhibitor bacterial uptake.

Live Fluorescence Imaging and BioTracker Staining. For live-cell imaging, infected and noninfected Raw264.7 macrophages ±100 nM ConA and ±100 μM $\mathbf{CyC_{\text{-Dansyl}}}$ were washed with PBS buffer (pH 7.4) and stained for 30 min with $DMEM^{FBS}$ medium containing 1X BioTracker NIR633 Lysosome Dye (Sigma-Aldrich) at 37 °C and 5% CO_2 following

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

the manufacturer recommendations. Live-cell imaging was further performed by excitation with a 633 nm laser with 10% intensity, and emission was collected using a semitransparent mirror collecting all wavelength over 560 nm as described above. Segmentation and analysis were performed as described above. First, the background was removed from each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** and BioTracker frames as described previously. To segment the BioTracker positive area, a manual threshold was applied to the BioTracker frames in order to create a binary mask, thereby defining all regions of interest. This BioTracker-mask was further used to quantify the Dansyl mean intensity inside BioTracker positive areas which allowed to compare the uptake of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** inhibitor in acidic compartments inside the macrophages.

Statistical Analyses. Statistical analyses were performed using Prism 4.0 (Graphpad, Inc) and are detailed in each figure legend. Density plot of the resulting fluorescence data was calculated using the distplot tool from the seaborn statistical data visualization python library,[62] and the sinaplot-boxplots were generated with the PlotOfData web tool.[63]

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.2c00448.

Detailed protocols, full chemical characterization, NMR spectra of the new fluorescent **CyC** compounds; Figures S1 and S2, synthesis of racemic **CyC$_{7\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{11\text{-Dansyl}}$**; Figure S3, fluorescence intensity profile of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$**-treated mycobacteria; Figure S4, in-gel fluorescence of DMSO-treated total lysate of *M. abscessus*; Figure S5, fluorescence intensity profile of **CyC$_{\text{-Dansyl}}$**-treated *E. coli*, *P. aeruginosa* or *S. aureus* bacteria; Figure S6, in-gel fluorescence of **CyC$_{\text{-Dansyl}}$**-treated total lysate of *E. coli*, *P. aeruginosa*, or *S. aureus*; Figures S7−S9, fluorescence imaging and quantification of the **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** inside infected and noninfected macrophages (PDF)

Movie S1, 3-D reconstruction of a stack of deconvoluted images of **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$**-treated *M. abscessus* S cells from an epi-fluorescence microscope (AVI)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Christopher D. Spilling − *Department of Chemistry & Biochemistry, University of Missouri St. Louis, St. Louis, Missouri 63121, United States*; Email: SpillingC@msx.umsl.edu

Jean-François Cavalier − *CNRS, LISM, IMM FR3479, Aix-Marseille Univ, Marseille 13009, France*; orcid.org/0000-0003-0864-8314; Email: jfcavalier@imm.cnrs.fr

Stéphane Canaan − *CNRS, LISM, IMM FR3479, Aix-Marseille Univ, Marseille 13009, France*; orcid.org/0000-0001-7478-300X; Email: canaan@imm.cnrs.fr

Authors

Morgane Sarrazin − *CNRS, LISM, IMM FR3479, Aix-Marseille Univ, Marseille 13009, France*

Benjamin P. Martin − *Department of Chemistry & Biochemistry, University of Missouri St. Louis, St. Louis, Missouri 63121, United States*

Romain Avellan − *CNRS, LISM, IMM FR3479, Aix-Marseille Univ, Marseille 13009, France*

Giri Raj Gnawali − *Department of Chemistry & Biochemistry, University of Missouri St. Louis, St. Louis, Missouri 63121, United States*

Isabelle Poncin − *CNRS, LISM, IMM FR3479, Aix-Marseille Univ, Marseille 13009, France*

Hugo Le Guenno − *Microscopy Core Facility, IMM FR3479, CNRS, Aix-Marseille Univ, Marseille 13009, France*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448

Author Contributions

Conceptualization: C.D.S., S.C., and J.-F.C. Resources: B.P.M., G.R.G., and C.D.S. Investigations: M.S., R.A., I.P., and H.L.G. Formal analysis: M.S., R.A., H.L.G., S.C., and J.-F.C. Funding acquisition: S.C. and J.-F.C. Supervision: C.D.S., S.C., and J.-F.C. Writing-original draft: M.S., R.A., and J.-F.C. Writing-review & editing: M.S., R.A., H.L.G., C.D.S., S.C., and J.-F.C. M.S., B.P.M., R.A., and G.R.G. contributed equally and should be considered as first coauthors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille University (AMU), the Association Grégory Lemarchal and Vaincre la Mucoviscidose (project N° RF20190502466), and the Agence Nationale de la Recherche (LipInTB project N°ANR-19-CE44-0011). M.S. was supported by a PhD fellowship from the Association Grégory Lemarchal and Vaincre la Mucoviscidose (project n°RF20190502466). R.A. was supported by a PhD fellowship from the Agence Nationale de la Recherche (LipInTB project N°ANR-19-CE44-0011). We thank Prof. Jean-Louis Herrmann (Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, France) for sharing the *M. abscessus* S-LuxAB bacterial strain.

■ ABBREVIATIONS

ABP, activity-based probe; au, arbitrary unit; AMK, amikacin; CC_{50}, compound concentration leading to 50% of cell cytotoxicity; CF, cystic fibrosis; CFU, colony-forming units; ConA, Concanamycin A; CyC, cyclipostins and cyclophostin analogues; IMP, imipenem; INH, isoniazid; MIC_{50Raw}, minimal compound concentration leading to a 50% decrease in CFU count as compared to untreated cells; MIC_{90}, minimal inhibitory concentration leading to 90% of growth inhibition; NTM, nontuberculous mycobacterial; REMA, resazurin microtiter assay; RFU%, relative fluorescence units

■ REFERENCES

(1) WHO, Global tuberculosis report. 2022, https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data.

(2) Aubry, A.; Mougari, F.; Reibel, F.; Cambau, E. Mycobacterium marinum. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5* (2), DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0038-2016.

(3) Stout, J. E.; Koh, W. J.; Yew, W. W. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int. J. Infect. Dis.* **2016**, *45*, 123−134.

(4) Swenson, C.; Zerbe, C. S.; Fennelly, K. Host Variability in NTM Disease: Implications for Research Needs. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2901.

(5) Tortoli, E.; Fedrizzi, T.; Meehan, C. J.; Trovato, A.; Grottola, A.; Giacobazzi, E.; Serpini, G. F.; Tagliazucchi, S.; Fabio, A.; Bettua, C.;

Bertorelli, R.; Frascaro, F.; De Sanctis, V.; Pecorari, M.; Jousson, O.; Segata, N.; Cirillo, D. M. The new phylogeny of the genus Mycobacterium: The old and the news. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *56*, 19−25.
(6) van Ingen, J.; Wagner, D.; Gallagher, J.; Morimoto, K.; Lange, C.; Haworth, C. S.; Floto, R. A.; Adjemian, J.; Prevots, D. R.; Griffith, D. E.; Ntm, N. E. T. Poor adherence to management guidelines in nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases. *Eur. Respir. J.* **2017**, *49*, 1601855.
(7) Schiff, H. F.; Jones, S.; Achaiah, A.; Pereira, A.; Stait, G.; Green, B. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens: seven year experience in a UK hospital. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1730.
(8) Wetzstein, N.; Geil, A.; Kann, G.; Lehn, A.; Schuttfort, G.; Kessel, J.; Bingold, T. M.; Kupper-Tetzel, C. P.; Haberl, A.; Graf, C.; Vehreschild, M.; Stephan, C.; Hogardt, M.; Wichelhaus, T. A.; Wolf, T. Disseminated disease due to non-tuberculous mycobacteria in HIV positive patients: A retrospective case control study. *PLoS One* **2021**, *16*, No. e0254607.
(9) Roux, A. L.; Catherinot, E.; Ripoll, F.; Soismier, N.; Macheras, E.; Ravilly, S.; Bellis, G.; Vibet, M. A.; Le Roux, E.; Lemonnier, L.; Gutierrez, C.; Vincent, V.; Fauroux, B.; Rottman, M.; Guillemot, D.; Gaillard, J. L.; Jean-Louis Herrmann for the OMA Group. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 4124−4128.
(10) Leung, J. M.; Olivier, K. N. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *34*, 124−134.
(11) Park, I.; Olivier, K. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *36*, 217−224.
(12) Roux, A. L.; Viljoen, A.; Bah, A.; Simeone, R.; Bernut, A.; Laencina, L.; Deramaudt, T.; Rottman, M.; Gaillard, J. L.; Majlessi, L.; Brosch, R.; Girard-Misguich, F.; Vergne, I.; de Chastellier, C.; Kremer, L.; Herrmann, J. L. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages. *Open Biol.* **2016**, *6*, No. 160185.
(13) Boudehen, Y. M.; Kremer, L. Mycobacterium abscessus. *Trends Microbiol.* **2021**, *29*, 951−952.
(14) Johansen, M. D.; Herrmann, J. L.; Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 392−407.
(15) Catherinot, E.; Clarissou, J.; Etienne, G.; Ripoll, F.; Emile, J. F.; Daffe, M.; Perronne, C.; Soudais, C.; Gaillard, J. L.; Rottman, M. Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 1055−1058.
(16) Catherinot, E.; Roux, A. L.; Macheras, E.; Hubert, D.; Matmar, M.; Dannhoffer, L.; Chinet, T.; Morand, P.; Poyart, C.; Heym, B.; Rottman, M.; Gaillard, J. L.; Herrmann, J. L. Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 271−274.
(17) Jönsson, B. E.; Gilljam, M.; Lindblad, A.; Ridell, M.; Wold, A. E.; Welinder-Olsson, C. Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 1497−1504.
(18) Surette, M. G. The cystic fibrosis lung microbiome. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2014**, *11*, S61−S65.
(19) Kiedrowski, M. R.; Bomberger, J. M. Viral-Bacterial Co-infections in the Cystic Fibrosis Respiratory Tract. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3067.
(20) Lim, A. Y. H.; Chotirmall, S. H.; Fok, E. T. K.; Verma, A.; De, P. P.; Goh, S. K.; Puah, S. H.; Goh, D. E. L.; Abisheganaden, J. A. Profiling non-tuberculous mycobacteria in an Asian setting: characteristics and clinical outcomes of hospitalized patients in Singapore. *BMC Pulm. Med.* **2018**, *18*, 85−85.
(21) Pierre-Audigier, C.; Ferroni, A.; Sermet-Gaudelus, I.; Le Bourgeois, M.; Offredo, C.; Vu-Thien, H.; Fauroux, B.; Mariani, P.; Munck, A.; Bingen, E.; Guillemot, D.; Quesne, G.; Vincent, V.; Berche, P.; Gaillard, J. L. Age-related prevalence and distribution of non-tuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 3467−3470.
(22) Nessar, R.; Cambau, E.; Reyrat, J. M.; Murray, A.; Gicquel, B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 810−818.
(23) Osmani, M.; Sotello, D.; Alvarez, S.; Odell, J. A.; Thomas, M. *Mycobacterium abscessus* infections in lung transplant recipients: 15-year experience from a single institution. *Transpl. Infect. Dis.* **2018**, *20*, No. e12835.
(24) Cavalier, J. F.; Spilling, C. D.; Durand, T.; Camoin, L.; Canaan, S. Lipolytic enzymes inhibitors: A new way for antibacterial drugs discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, No. 112908.
(25) Nguyen, P. C.; Delorme, V.; Bénarouche, A.; Martin, B. P.; Paudel, R.; Gnawali, G. R.; Madani, A.; Puppo, R.; Landry, V.; Kremer, L.; Brodin, P.; Spilling, C. D.; Cavalier, J.-F.; Canaan, S. Cyclipostins and Cyclophostin analogs as promising compounds in the fight against tuberculosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11751.
(26) Nguyen, P. C.; Madani, A.; Santucci, P.; Martin, B. P.; Paudel, R. R.; Delattre, S.; Herrmann, J. L.; Spilling, C. D.; Kremer, L.; Canaan, S.; Cavalier, J. F. Cyclophostin and Cyclipostins analogues, new promising molecules to treat mycobacterial-related diseases. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 651−654.
(27) Madani, A.; Ridenour, J. N.; Martin, B. P.; Paudel, R. R.; Abdul Basir, A.; Le Moigne, V.; Herrmann, J. L.; Audebert, S.; Camoin, L.; Kremer, L.; Spilling, C. D.; Canaan, S.; Cavalier, J. F. Cyclipostins and Cyclophostin Analogues as Multitarget Inhibitors That Impair Growth of *Mycobacterium abscessus*. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1597−1608.
(28) Point, V.; Malla, R. K.; Diomande, S.; Martin, B. P.; Delorme, V.; Carriere, F.; Canaan, S.; Rath, N. P.; Spilling, C. D.; Cavalier, J. F. Synthesis and kinetic evaluation of cyclophostin and cyclipostins phosphonate analogs as selective and potent inhibitors of microbial lipases. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10204−10219.
(29) Point, V.; Malla, R. K.; Carriere, F.; Canaan, S.; Spilling, C. D.; Cavalier, J. F. Enantioselective inhibition of microbial lipolytic enzymes by nonracemic monocyclic enolphosphonate analogues of cyclophostin. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4393−4401.
(30) Viljoen, A.; Richard, M.; Nguyen, P. C.; Fourquet, P.; Camoin, L.; Paudal, R. R.; Gnawali, G. R.; Spilling, C. D.; Cavalier, J. F.; Canaan, S.; Blaise, M.; Kremer, L. Cyclipostins and cyclophostin analogs inhibit the antigen 85C from *Mycobacterium tuberculosis* both in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 2755−2769.
(31) Spilling, C. D.; Martin, B. P.; Canaan, S.; Cavalier, J.-F. Fluorescent Labeled Inhibitors. US10047112B2, August 14, 2018, 2018.
(32) Susani-Etzerodt, H.; Schmidinger, H.; Riesenhuber, G.; Birner-Gruenberger, R.; Hermetter, A. A versatile library of activity-based probes for fluorescence detection and/or affinity isolation of lipolytic enzymes. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *144*, 60−68.
(33) Dutta, S.; Malla, R. K.; Bandyopadhyay, S.; Spilling, C. D.; Dupureur, C. M. Synthesis and kinetic analysis of some phosphonate analogs of cyclophostin as inhibitors of human acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2265−2274.
(34) Malla, R. K.; Bandyopadhyay, S.; Spilling, C. D.; Dutta, S.; Dupureur, C. M. The first total synthesis of (+/−)-cyclophostin and (+/−)-cyclipostin P: inhibitors of the serine hydrolases acetyl cholinesterase and hormone sensitive lipase. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3094−3097.
(35) Vasilieva, E.; Dutta, S.; Malla, R. K.; Martin, B. P.; Spilling, C. D.; Dupureur, C. M. Rat hormone sensitive lipase inhibition by cyclipostins and their analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 944−952.
(36) Blanot, D.; Lee, J.; Girardin, S. E. Synthesis and biological evaluation of biotinyl hydrazone derivatives of muramyl peptides. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 2−8.
(37) Huang, J.; Liu, M.; Ma, X.; Dong, Q.; Ye, B.; Wang, W.; Zeng, W. A highly selective turn-off fluorescent probe for Cu(ii) based on a dansyl derivative and its application in living cell imaging. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 22964−22970.

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

(38) Hanson, P. R.; Chegondi, R.; Nguyen, J.; Thomas, C. D.; Waetzig, J. D.; Whitehead, A. Total synthesis of dolabelide C: a phosphate-mediated approach. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4358−4370.
(39) Sauer, R.; Turshatov, A.; Baluschev, S.; Landfester, K. One-Pot Production of Fluorescent Surface-Labeled Polymeric Nanoparticles via Miniemulsion Polymerization with Bodipy Surfmers. *Macromolecules* **2012**, *45*, 3787−3796.
(40) Fletcher, D. I.; Ganellin, C. R.; Piergentili, A.; Dunn, P. M.; Jenkinson, D. H. Synthesis and pharmacological testing of polyaminoquinolines as blockers of the apamin-sensitive Ca^{2+}-activated K^+ channel (SK(Ca)). *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5457−5479.
(41) Ing, H. R.; Manske, R. H. F. CCCXII.—A modification of the Gabriel synthesis of amines. *J. Chem. Soc.* **1926**, *129*, 2348−2351.
(42) Niwa, M.; Morikawa, M.-A.; Nabeta, T.; Higashi, N. Preparation of Anthryl Group-Tagged Helical Poly(γ-benzyl l-glutamate) Self-Assembled Film on Gold Surface and Its Interaction with DNA. *Macromolecules* **2002**, *35*, 2769−2775.
(43) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421−5426.
(44) Christophe, T.; Jackson, M.; Jeon, H. K.; Fenistein, D.; Contreras-Dominguez, M.; Kim, J.; Genovesio, A.; Carralot, J. P.; Ewann, F.; Kim, E. H.; Lee, S. Y.; Kang, S.; Seo, M. J.; Park, E. J.; Skovierova, H.; Pham, H.; Riccardi, G.; Nam, J. Y.; Marsollier, L.; Kempf, M.; Joly-Guillou, M. L.; Oh, T.; Shin, W. K.; No, Z.; Nehrbass, U.; Brosch, R.; Cole, S. T.; Brodin, P. High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2′ epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, No. e1000645.
(45) Le Moigne, V.; Blouquit-Laye, S.; Desquesnes, A.; Girard-Misguich, F.; Herrmann, J. L. Liposomal amikacin and *Mycobacterium abscessus*: intimate interactions inside eukaryotic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, dkac348.
(46) Takano, K.; Shimada, D.; Kashiwagura, S.; Kamioka, Y.; Hariu, M.; Watanabe, Y.; Seki, M. Severe Pulmonary *Mycobacterium abscessus* Cases Due to Co-Infection with Other Microorganisms Well Treated by Clarithromycin and Sitafloxacin in Japan. *Int. Med. Case Rep. J.* **2021**, *14*, 465−470.
(47) Wynn, T. A.; Chawla, A.; Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **2013**, *496*, 445−455.
(48) Huss, M.; Ingenhorst, G.; Konig, S.; Gassel, M.; Drose, S.; Zeeck, A.; Altendorf, K.; Wieczorek, H. Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40544−40548.
(49) Griffith, D. E. *Mycobacterium abscessus* and Antibiotic Resistance: Same As It Ever Was. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, 1687−1689.
(50) Shaw, L. P.; Doyle, R. M.; Kavaliunaite, E.; Spencer, H.; Balloux, F.; Dixon, G.; Harris, K. A. Children With Cystic Fibrosis Are Infected With Multiple Subpopulations of *Mycobacterium abscessus* With Different Antimicrobial Resistance Profiles. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, 1678−1686.
(51) Barelier, S.; Avellan, R.; Gnawali, G. R.; Fourquet, P.; Roig-Zamboni, V.; Poncin, I.; Point, V.; Bourne, Y.; Audebert, S.; Camoin, L.; Spilling, C. D.; Canaan, S.; Cavalier, J. F.; Sulzenbacher, G. Direct capture, inhibition and crystal structure of HsaD (Rv3569c) from *M. tuberculosis*. *FEBS J.* **2022**, DOI: 10.1111/febs.16645.
(52) Greenwood, D. J.; Dos Santos, M. S.; Huang, S.; Russell, M. R. G.; Collinson, L. M.; MacRae, J. I.; West, A.; Jiang, H.; Gutierrez, M. G. Subcellular antibiotic visualization reveals a dynamic drug reservoir in infected macrophages. *Science* **2019**, *364*, 1279−1282.
(53) Santucci, P.; Greenwood, D. J.; Fearns, A.; Chen, K.; Jiang, H.; Gutierrez, M. G. Intracellular localisation of *Mycobacterium tuberculosis* affects efficacy of the antibiotic pyrazinamide. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3816.
(54) Schump, M. D.; Fox, D. M.; Bertozzi, C. R.; Riley, L. W. Subcellular Partitioning and Intramacrophage Selectivity of Antimicrobial Compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01639−e01616.
(55) Sambandamurthy, V. K.; Derrick, S. C.; Hsu, T.; Chen, B.; Larsen, M. H.; Jalapathy, K. V.; Chen, M.; Kim, J.; Porcelli, S. A.; Chan, J.; Morris, S. L.; Jacobs, W. R. *Mycobacterium tuberculosis* DeltaRD1 DeltapanCD: a safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* **2006**, *24*, 6309−6320.
(56) Bernut, A.; Herrmann, J. L.; Kissa, K.; Dubremetz, J. F.; Gaillard, J. L.; Lutfalla, G.; Kremer, L. *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, E943−E952.
(57) Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2720−2722.
(58) Rybniker, J.; Vocat, A.; Sala, C.; Busso, P.; Pojer, F.; Benjak, A.; Cole, S. T. Lansoprazole is an antituberculous prodrug targeting cytochrome bc1. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7659.
(59) Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163−175.
(60) Santucci, P.; Dedaki, C.; Athanasoulis, A.; Gallorini, L.; Munoz, A.; Canaan, S.; Cavalier, J.-F.; Magrioti, V. Synthesis of long chain β-lactones and their antibacterial activities against pathogenic mycobacteria. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 349−358.
(61) Dupont, C.; Viljoen, A.; Dubar, F.; Blaise, M.; Bernut, A.; Pawlik, A.; Bouchier, C.; Brosch, R.; Guerardel, Y.; Lelievre, J.; Ballell, L.; Herrmann, J. L.; Biot, C.; Kremer, L. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*. *Mol. Microbiol.* **2016**, *101*, 515−529.
(62) Waskom, M. seaborn: statistical data visualization. *J. Open Source Softw.* **2021**, *6*, 3021.
(63) Postma, M.; Goedhart, J. PlotsOfData—A web app for visualizing data together with their summaries. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, No. e3000202.

Recommended by ACS

Synthesis and Testing of Analogs of the Tuberculosis Drug Candidate SQ109 against Bacteria and Protozoa: Identification of Lead Compounds against *Mycobacteriu...*

Marianna Stampolaki, Antonios D. Kolocouris, *et al.*
JANUARY 27, 2023
ACS INFECTIOUS DISEASES
READ

CCCP Facilitates Aminoglycoside to Kill Late Stationary-Phase *Escherichia coli* by Elevating Hydroxyl Radical

Zhongyan Li, Xinmiao Fu, *et al.*
MARCH 24, 2023
ACS INFECTIOUS DISEASES
READ

Small Molecule IITR00693 (2-Aminoperimidine) Synergizes Polymyxin B Activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Mahak Saini, Ranjana Pathania, *et al.*
JANUARY 30, 2023
ACS INFECTIOUS DISEASES
READ

Synthesis and Characterization of DOTAM-Based Sideromycins for Bacterial Imaging and Antimicrobial Therapy

Carsten Peukert, Mark Brönstrup, *et al.*
JANUARY 31, 2023
ACS INFECTIOUS DISEASES
READ

Get More Suggestions >

https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00448
ACS Infect. Dis. 2022, 8, 2564−2578

Supporting Information

Synthesis and Biological characterization of Fluorescent Cyclipostins & Cyclophostin Analogs: new Probes for Diagnosis and Treatment of Mycobacterial-related Diseases

Morgane Sarrazin,[a,#] Benjamin P. Martin,[b,#] Romain Avellan,[a,#] Giri Raj Gnawali,[b,#] Isabelle Poncin,[a] Hugo Le Guenno,[c] Christopher D. Spilling,[b,*] Jean Francois Cavalier,[a,*] Stéphane Canaan[a,*]

[a] Aix-Marseille Univ, CNRS, LISM, IMM FR3479, Marseille, France

[b] Department of Chemistry & Biochemistry, University of Missouri St. Louis, One University Boulevard, St. Louis, MO 63121.

[c] Microscopy Core Facility, IMM FR3479, CNRS, Aix-Marseille Univ, Marseille, France

[#] These authors should be considered as equal first authors.

* To whom correspondence should be addressed:

E-mail address: canaan@imm.cnrs.fr (S. Canaan); jfcavalier@imm.cnrs.fr (JF Cavalier); SpillingC@msx.umsl.edu (C.D. Spilling)

Table of contents

Chemistry - synthesis of compounds S2

Biological evaluation S18

Figures S1-S8 S27

^{1}H, ^{13}C and ^{31}P NMR spectra S35

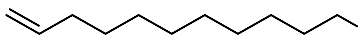
SAFETY STATEMENT

No unexpected or unusually high safety hazards were encountered.

CHEMISTRY - SYNTHESIS OF COMPOUNDS

General Experimental. All reactions were carried out in oven dried glassware under an atmosphere of argon unless otherwise noted. THF was distilled from sodium and benzophenone, CH_2Cl_2 and CH_3CN were distilled from CaH_2, and MeOH and *i*-PrOH were distilled from magnesium. All chemicals and reagents were purchased from commercial suppliers and used directly unless otherwise noted. ^1H ^{13}C and ^{31}P NMR spectra were recorded at 300, 75 and 121 MHz, respectively. ^1H NMR spectra are referenced to $CDCl_3$ (7.27 ppm), ^{13}C NMR spectra are referenced to $CDCl_3$ (77.23 ppm), and ^{31}P NMR spectra are referenced to external H_3PO_4.

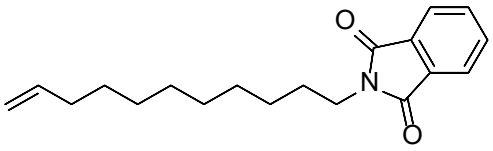
Preparative HPLC Specifications and Conditions. Manual Preparative injector: Rheodyne 1700 (3725i-119) with 20 mL loop; Solvent A – MeOH; Solvent B – H_2O; Varian ProStar Model 210 pumps equipped with 25 mL/min Rainin/Gilson type pump heads. Kromasil 100-10C18-2025 column; 10 μm particle diameter; 250 mm × 20 mm i.d. Spectra-Physics Spectra 100 UV detector with prep cell. LKB 2211 Superac fraction collector. 50% MeOH/50% H_2O to 100% MeOH from 12 min to 60 min at a flow rate of 10 mL/min.



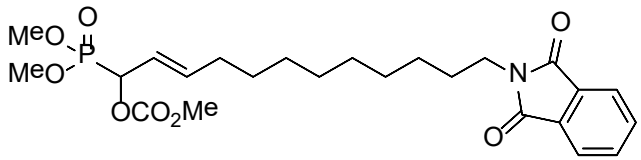
Undec-10-en-1-amine (2). Undec-10-enoic acid (20.25 g, 109.9 mmol) was dissolved in thionyl chloride (136 mL). The solution was heated at reflux for 1 h, and then concentrated by distillation of the remaining thionyl chloride. The resulting oil was dissolved in CH_2Cl_2 and added dropwise to concentrated aqueous NH_4OH at 0 °C. The mixture was diluted with water and CH_2Cl_2 until two clear layers formed. The organic phase was washed with 1N HCl and brine was added to aid the separation. The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* giving the amide (19.91 g, 99%) as a pale pink solid. ^1H NMR (300 MHz,

$CDCl_3$) δ 5.82 (ddt, J_{HH} = 17.1, 10.2, 6.8 Hz, 1H), 5.38 (br s, 2H), 4.98 (m, 2H), 2.23 (t, J_{HH} = 7.5 Hz, 2H), 2.04 (q, J_{HH} = 6.9 Hz, 2H), 1.64 (p, J_{HH} = 7.5 Hz, 2H), 1.31 (m, 12H).

$LiAlH_4$ (2.3 g, 60.6 mmol) was slowly added to the flask containing THF (50 mL). The suspension was heated at reflux for 30 min. The mixture was cooled to room temperature and a solution of the amide (5.0 g, 27.3 mmol) in THF (100 mL) was added dropwise. The mixture was again heated at reflux for 24 h. EtOAc (20 mL) was added dropwise and then the mixture was cooled to 0°C in an ice water bath. Saturated aqueous Na_2SO_4 (40 mL) was added slowly and the resulting white suspension was filtered, rinsing 5 times with EtOAc (20 mL each). The organic phase was separated, dried, and concentrated *in vacuo*. The resulting oil was distilled (kugelrohr oven) to give amine **5** (3.12 g, 68%) as a green oil. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.82 (ddt, J_{HH} = 17.0, 10.1, 6.7 Hz, 1H), 4.97 (m, 2H), 2.68 (t, J_{HH} = 6.9 Hz, 2H), 2.05 (q, J_{HH} = 7.0 Hz, 2H), 1.29 (m, 14H).

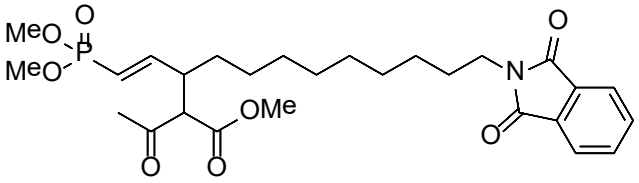


2-(Undec-10-en-1-yl)isoindoline-1,3-dione (3). To a solution of amine **2** (333 mg, 1.97 mmol) in toluene (5 mL) was added phthalic anhydride (291 mg, 1.96 mmol) and the resulting solution was heated at reflux for 16 h. The mixture was concentrated *in vacuo* and the crude material was purified by column chromatography (SiO_2, 5% EtOAc in hexanes) to give the phthalimide **6** (464 mg, 79%) as a white solid. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.87 – 7.75 (m, 2H), 7.75 – 7.60 (m, 2H), 5.79 (ddt, J_{HH} = 17.0, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.03 – 4.82 (m, 1H), 3.67 (t, J_{HH} = 7.3 Hz, 2H), 2.02 (q, J_{HH} = 6.8 Hz, 2H), 1.72 – 1.55 (m, 2H), 1.39 – 1.16 (m, 12H).



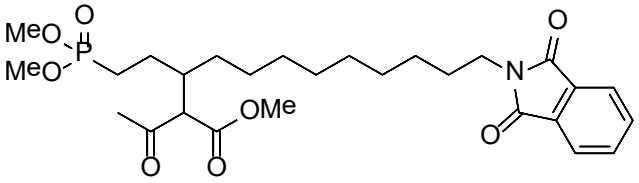
(±)-(*E*)-1-(Dimethoxyphosphoryl)-12-(1,3-dioxoiso indolin-2-yl)dodec-2-en-1-yl methyl carbonate (5). To a solution of phthalimide **3** (2.06 g, 6.88 mmol) and phosphonate **4** (2.00 g, 8.92 mmol) in CH_2Cl_2 (17.2 mL), was added CuI (66 mg, 0.35 mmol) and Grubbs 2nd generation catalyst (292 mg, 0.344 mmol). The mixture was heated at reflux for 4 h, and then cooled and concentrated

in vacuo. The crude material was purified by column chromatography (SiO_2, 30–50% EtOAc in hexanes) to remove nonpolar impurities and then by preparative reverse phase HPLC to give **5** (2.75 g, 81%) as a yellow oil. IR (neat, NaCl) 3006, 2928, 2855, 1755, 1713, 1615 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 – 7.73 (m, 2H), 7.69 – 7.61 (m, 2H), 5.97 – 5.81 (m, 1H), 5.55 – 5.43 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 3.75 (m, 9H), 3.60 (t, J_{HH} = 7.3 Hz 2H), 2.07 – 1.95 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.25 (m, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.4, 155.9 (d, J_{CP} = 9.6 Hz), 138.9 (d, J_{CP} = 12.6 Hz), 133.9, 132.3, 123.15, 120.4 (d, J_{CP} = 3.5 Hz), 73.2 (d, J_{CP} = 171.2 Hz), 55.3, 53.8 (d, J_{CP} = 10.6 Hz), 53.7 (d, J_{CP} = 9.5 Hz), 38.0, 32.4, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.6, 26.9; ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 20.1, 19.8 (*Z*:*E* = 1:11); HRMS (FAB, NBA, MH^+) calcd for $C_{24}H_{35}NO_8P$: 496.2100, found 496.2117.

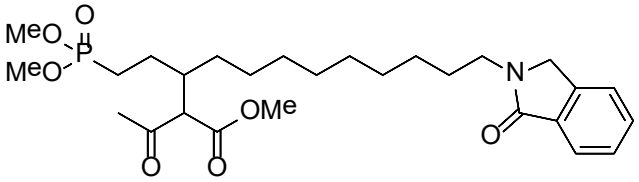


(±)-(*E*)-Methyl 2-acetyl-3-(2-(dimethoxyphosphoryl) vinyl)-12-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl) dodecanoate (6). To a solution of carbonate **5** (300 mg, 0.605 mmol) and methyl acetoacetate (200 µL, 1.8 mmol) in dry THF (750 µL) was added a solution of $Pd_2(dba)_3$ (11 mg, 0.012 mmol) and dppe (12 mg, 0.030 mmol) in dry THF (500 µL) by cannula rinsing with additional dry THF (250 µL). The resulting green solution was heated in oil bath at 40°C for 2 h and then concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2, 70–85% EtOAc in hexanes) to give **6** (229 mg, 71%) as a pale-yellow oil (1:1 mixture of diastereoisomers). IR (neat, NaCl) 2930, 2855, 1772, 1713, 1633 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.89 – 7.70 (m, 2H), 7.75 – 7.64 (m, 2H), 6.49 (m, 1H), 5.82 – 5.50 (m, 1H), 3.79 – 3.61 (m, 11 H), 3.51 (m, 1H), 3.07 – 2.83 (m, 1H), 2.18 (d, *J* = 17.7 Hz, 3H), 1.71 – 1.55 (m, 2H), 1.42 – 1.10 (m, 14H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 201.3, 168.6, 153.3, 134.0, 132.3, 123.2, 118.8 (118.6) (d, J_{CP} = 185.7 Hz), 63.8 (63.7), 52.7 (52.5), 52.4 (d, J_{CP} = 5.6 Hz), 44.2 (43.9), 38.1, 31.8 (31.7), 30.2, 30.0, 29.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7, 27.2, 27.0, 26.9; ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 20.0, 19.9; HRMS (FAB, NBA, MH^+) calcd for $C_{27}H_{39}NO_8P$: 536.2413, found 536.2428.

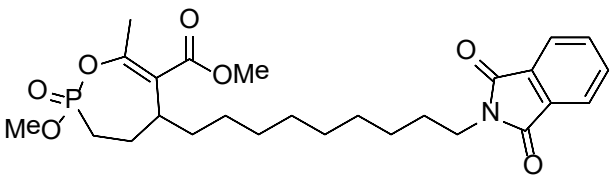
To a solution of **6** (1.65 g, 3.08 mmol) in MeOH (7.7 mL) was added palladium on carbon (10%, 328 mg) and the resulting mixture was stirred under hydrogen atmosphere until the reaction was complete (^{31}P NMR). The catalyst was removed by filtration through Celite and the solution was concentrated *in vacuo* to give a 7.8:1 mixture **7** and **8** (1.65 g, 100%) as a colorless oil. The compounds were separated by preparative HPLC for characterization.



(±)-Methyl 2-acetyl-3-(2-(dimethoxyphosphoryl) ethyl)-12-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)dodecanoate (7). (1:1 mixture of diastereoisomers). IR (neat, NaCl) 2929, 2855, 1772, 1713 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.79 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 3.68 (m, 9H), 3.62 (t, J_{HH} = 7.3 Hz, 2H), 3.42 (d, J_{HH} = 8.3 Hz, 1H), 2.18 (m, 4H), 1.62 (m, 6H), 1.23 (m, 14H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 202.90 (202.87), 169.62 (169.60), 168.5, 134.0, 132.2, 123.2, 63.0, 52.5 (d, J_{CP} = 5.7 Hz), 38.1, 37.9, 30.5 (30.4), 29.8 (29.7), 29.6, 29.5, 29.2, 28.7, 26.9 (26.3), 23.5 (23.4) (d, J_{CP} = 5.9 Hz), 21.7 (21.5) (d, J_{CP} = 141.2 Hz); ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 34.4, 34.2; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{27}H_{40}NO_8PNa^+$: 560.2389, found 560.2394.



Methyl 2-acetyl-3-(2-(dimethoxyphosphoryl)ethyl)-12-(1-oxoisoindolin-2-yl)dodecanoate (8). (1:1 mixture of diastereoisomers). IR (neat, NaCl) 2928, 2854, 1712, 1678 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85 (m, 1H), 7.49 (m, 3H), 4.38 (s, 2H), 3.77 – 3.67 (m, 9H), 3.61 (t, J_{HH} = 7.3 Hz, 2H), 3.46 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 2.23 (s, 4H), 1.81 – 1.57 (m, 6H), 1.28 (m, 14H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 203.03 (203.01), 169.74 (169.71), 168.6, 141.3, 133.3, 131.3, 128.2, 123.8, 122.8, 63.14 (63.11), 52.62, 52.58, 52.5, 50.1, 42.6, 38.2 (38.0), 30.6 (30.5), 29.9 (29.8), 29.7, 29.6, 29.5, 28.7, 27.0, 26.5, 23.62 (23.55), 21.8 (21.7) (d, J_{CP} = 141.4 Hz), 9.8; ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 34.4, 34.2; HRMS (FAB, NBA, MH^+) calcd for $C_{27}H_{43}NO_7P$: 524.2777, found 524.2786.

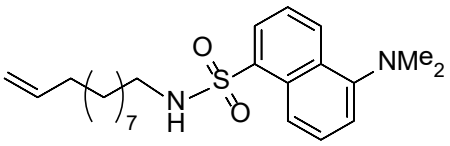


(±)-Methyl-5-(9-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)nonyl)-2-methoxy-7-methyl-2,3,4,5-tetrahydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide (9α and 9β). To a solution of **7** and **8** (7.8:1, 528 mg, 0.98 mmol) in dry CH_3CN (500 µL) was added NaI (162 mg, 1.08 mmol). The solution was heated at reflux until the reaction was complete (^{31}P NMR). The mixture was concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in dry DMF (4 mL) and Hunig's base (260 µL, 1.5 mmol) was added followed by HBTU (559 mg, 1.47 mmol). After 2 h, the red solution was partitioned between 1N HCl and CH_2Cl_2 and then extracted twice more with CH_2Cl_2. The combined organic layers were washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine and concentrated *in vacuo*. The crude material was purified by preparative HPLC to give **9** (310 mg, 62%, 1:1.8 mixture of diastereomers) as a yellow oil. Further chromatographic separation of the diastereomers gave **9α** and **9β** as a yellow oil.

9α: IR (neat, NaCl) 2928, 2855, 1773, 1718 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 3.77 (d, J_{HP} = 11.2 Hz, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.61 (t, J_{HH} = 7.3 Hz, 2H), 2.92 (m, 1H), 2.17 (d, J_{HP} = 1.6 Hz, 3H), 2.15–1.78 (m, 4H), 1.58 (m, 3H), 1.40 (m, 1H), 1.57 (m, 12H); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0 (d, J_{CP} = 1.7 Hz), 168.5, 155.7 (d, J_{CP} = 7.3 Hz), 133.9, 132.2 123.2, 123.1, 52.1 (d, J_{CP} = 7.1 Hz), 38.1, 37.2 (d, J_{CP} = 1.5 Hz), 30.7, 29.6, 29.4, 29.2, 28.6, 27.7, 26.9, 24.9 (d, J_{CP} = 6.9 Hz), 21.9 (d, J_{CP} = 135.1 Hz), 21.4 (d, J_{CP} = 1.2 Hz); ^{31}P NMR (121.4 MHz, $CDCl_3$) δ 26.1; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{26}H_{36}NO_7PNa^+$: 528.2128, found 528.2139.

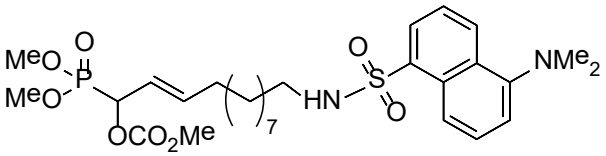
9β: IR (neat, NaCl) 2928, 2855, 1771, 1712 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (m, 1H), 7.62 (m, 3H), 3.73 (d, J_{HP} = 11.0 Hz, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.56 (t, J_{HH} = 7.3 Hz, 2H), 2.78 (m, 1H), 2.13–1.76 (m, 4H), 2.08 (d, J_{HP} = 0.8 Hz, 3H), 1.56 (m, 3H), 1.40 (m, 1H), 1.17 (m, 12H); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0 (d, J_{CP} = 1.6 Hz), 168.3, 154.8 (d, J_{CP} = 9.4 Hz), 133.8, 132.1, 123.1, 123.0, 52.5 (d, J_{CP} = 6.8 Hz), 51.9, 37.9, 37.0, 30.8, 29.4, 29.3, 29.1, 28.5, 27.5, 26.8, 25.1 (d, J_{CP} = 7.9 Hz), 25.1 (d, J_{CP} = 134.0 Hz), 21.0 (d, J_{CP} = 2.0 Hz); ^{31}P NMR (121.4 MHz, $CDCl_3$) δ 23.4; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{26}H_{36}NO_7PNa^+$: 528.2127, found 528.2126.

Deprotection and dansylation. To a solution of the α-phthalimide **9β** (134 mg, 0.265 mmol) in isopropyl alcohol/water (6:1, 2.7 mL) was added sodium borohydride (50 mg, 1.32 mmol). The solution was stirred for 2 h and then the reaction was quenched by the addition of 1N HCl. The reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2 and the extract was dried over sodium sulfate and concentrated in *vacuo*. The residue was re-dissolved in isopropyl alcohol (2.7 mL) and acetic acid (30 μL, 1.05 mmol) was added. The resulting solution was heated at reflux for 24 h. The solution was cooled to room temperature and DMF (1.3 mL) was added. The solution was concentrated under reduced pressure to remove the isopropyl alcohol and then and Hunig's base (140 μL, 0.804 mmol) was added with stirring followed by Dansyl-chloride (107 mg, 0.397 mmol) in DMF (1.4 mL). The solution was stirred for 24 h and then it was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (SiO_2, 55% EtOAc in hexanes) to give the Dansylamide (21.6 mg, 13%). Reverse phase HPLC gave the pure **CyC$_{7β\text{-Dansyl}}$** diastereoisomer (^{31}P NMR 26.2 ppm) (7.1 mg 4%). (see below for full characterization data).

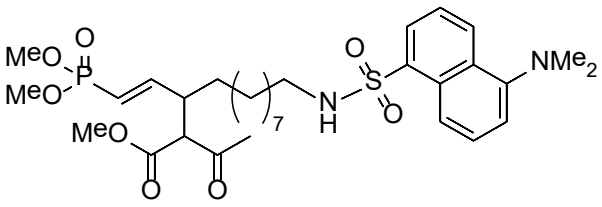


5-(dimethylamino)-N-(undec-10-en-1-yl)naphthalene-1-sulfonamide (11). To the solution of **2** (2.0 g, 11.82 mmol) in 2 mL dry DCM was added DIPEA (4.3 mL, 24.882 mmol) followed by the addition of Dansyl-chloride (3.49 g, 13 mmol) dissolved in 5 mL DCM slowly, over five minutes. The reaction mixture was stirred for 72 hours at room temperature. Then 137 mL of brine was added followed by addition of 500 mL of EtOAc and washed several times with water to bring to neutral PH. Finally washed with brine and the organic phase was evaporated *in vacuo*. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2, 5-15 % EtOAc in Hexane) to get green viscous liquid (3.845 g, 81%). IR (neat) 3291, 3071, 2921, 2850 cm^{-1} ; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.55 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.26 (dd, J_{HH} = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.21 (s, 1H), 5.80 (ddt, J_{HH} = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.06 – 4.80 (m, 2H), 4.64 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 2.95 – 2.84 (m, 8H), 2.06 –

1.90 (m, 2H), 1.35 – 1.09 (m, 14H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 152.2, 139.4, 139.0, 134.9, 130.6, 130.0, 129.9, 129.8, 128.6, 123.4, 118.9, 115.3, 114.3, 45.6, 43.5, 33.9, 29.7, 29.5, 29.2, 29.1, 29.0, 26.6. HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{23}H_{34}N_2O_2SNa^+$: 425.2238, found 425.2238.

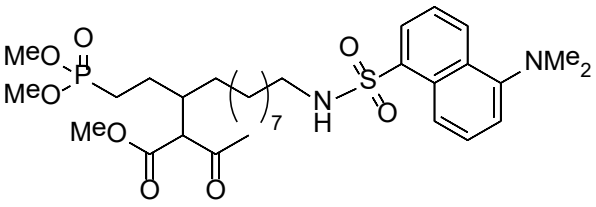


(±)-(*E*)-1-(dimethoxyphosphoryl)-12-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido) dodec-2-en-1-yl methyl carbonate (12). To the solution of **11** (2.58 g, 6.409 mmol) in dry DCM, vinyl carbonate **4** (2.88 g, 12.818 mmol). Then Grubbs 2nd generation catalyst (326 mg, 0.385 mmol) and CuI (98 mg, 0.512 mmol) were added. The mixture was heated at reflux for 5 hours. The completion of reaction was checked by TLC and ^{31}P NMR. The reaction mixture was cooled and concentrated *in vacuo* and then purified by Column Chromatography (SiO_2, 70% EtOAc in Hexane) to give viscous green product **12** (3.45 g, 90%). IR(neat) 3175, 2924, 2851, 1750 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.51 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.31 (d, J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.23 (dd, J_{HH} = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.44 (m, 2H), 7.16 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 5.93 (m, 1H), 5.61 – 5.35 (m, 2H), 5.02 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 3.85 – 3.74 (m, 9H), 2.86 (m, 8H), 2.05 (m, 2H), 1.40 – 1.26 (m, 4H), 1.25 – 0.99 (m, 10H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 154.8 (d, J_{CP} = 9.8 Hz), 152.0, 139.1 (d, J_{CP} = 12.5 Hz), 135.0, 130.4, 129.9, 129.7, 129.6, 128.37 (s), 123.3, 120.2 (d, J_{CP} = 3.8 Hz), 118.9, 115.2, 73.1 (d, J_{CP} = 171.1 Hz), 55.4, 53.9 (d, J_{CP} = 7.1 Hz), 53.8 (d, J_{CP} = 6.5 Hz), 45.5, 43.4, 32.4, 29.6, 29.3, 29.2, 29.0, 28.9, 26.4. ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 19.9; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{28}H_{43}N_2O_8PSNa^+$: 621.2375, found 621.2367.



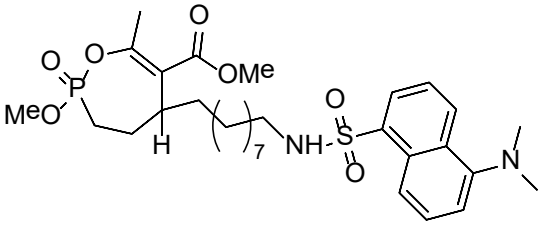
(±)-Methyl (*E*)-2-acetyl-3-(2-(dimethoxyphosphoryl) vinyl)-12-((5-(dimethylamino) naphthalene)-1-sulfonamido) dodecanoate (13). To an oven dried RB flask, $Pd_2(dba)_3$ (111.0 mg, 0.121mmol) and dppe (121.0 mg, 0.303 mmol) were added. To this flask 2 mL of dry THF was added and the mixture was stirred for 10 minutes at room temperature under

Argon atmosphere. Then methyl acetoacetate (3 equivalent, 9.11 mmol, 1mL) was added and left stirring for about 5 minutes. To this mixture the solution of **12** (1.82 g, 3.4 mmol) in THF (5 mL/mmol) was added through canula and rinsed with additional 0.5 mL THF, and the reaction mixture was heated at reflux for 4 hours till completion, which was checked by TLC and ^{31}P NMR. The reaction mixture was extracted with EtOAc and washed with brine and dried over Na_2SO_4. Solvents were removed under reduced pressure and the pure product was isolated by column chromatography (SiO_2, 20-40% Acetone in Hexane) to get viscous green product **13** (1.645 g, 85%). IR (neat) 3161, 2924, 2851, 1738, 1713 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.49 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.30 (d, J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.20 (dd, J_{HH} = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.49 (dt, J_{HH} = 8.6, 7.6 Hz, 2H), 7.14 (d, J_{HH} = 7.4 Hz, 1H), 6.51 (m, 1H), 5.74 – 5.54 (m, 1H), 5.27 (t, J_{HH} = 5.7 Hz, 1H), 3.72 – 3.61 (m, 9H), 3.52 (m, 1H), 3.00 – 2.77 (m, 9H), 2.17 (m, 3H), 1.46 – 1.24 (m, 4H), 1.05 (m, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 201.4 (d, J_{CP} = 2.5 Hz), 168.4 (d, J_{CP} = 12.2 Hz), 153.4 (d, J_{CP} = 4.5 Hz),151.9, 135.0, 130.2, 129.9, 129.7, 129.5, 128.2, 123.2, 118.9, 118.6 (d, J_{CP} = 184.5 Hz), 115.1, 63.6 (d, J_{CP} = 8.5 Hz), 52.7, 52.4 (d, J_{CP} = 3.75 Hz) 45.4, 44.0 (43.7) (d, J_{CP} = 3.9 Hz), 43.3, 31.6, 31.5 (d, J_{CP} = 10.8 Hz), 31.5, 30.2 , 29.9, 29.5, 29.1, 29.0, 28.8, 26.8 (d, J_{CP} = 10.4 Hz), 26.4; ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 19.9, 20.0; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{31}H_{47}N_2O_8PSNa^+$: 661.2684, found 661.2682.



(±)-Methyl 2-acetyl-3-(2-(dimethoxyphosphoryl)ethyl)-12-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido) dodecanoate (14). To a solution of **13** (1.139 g, 1.78 mmol) in Methanol (3 mL/mmol) were added 10% palladium on charcoal (0.05 g/mmol). The solution was first flushed with Argon followed by H_2 (balloon pressure). H_2 pressure was maintained, while the reaction mixture was vigorously stirred. The completion of reaction was observed by ^{31}P NMR analysis. After complete reduction (4 h), the reaction mixture was filtered through Celite and washed with CH_2Cl_2, solvent removed under reduced pressure to get mixture of saturated

phosphonate **14** in quantitative yield. IR (neat): 3159, 3144, 2924, 2850, 1734, 1709 $cm^{-}1$; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.45 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.25 (d, J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.16 (dd, J_{HH} = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.54 – 7.37 (m, 2H), 7.10 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 5.19 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 9H), 3.39 (m, 1H), 2.87 – 2.74 (m, 8H), 2.20 (m 4H), 1.71 – 1.48 (m, 4H), 1.34 – 0.95 (m, 16H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 202.8 (d, J_{CP} = 3.0 Hz), 169.5 (d, J_{CP} = 2.9 Hz), 151.9, 135.0, 130.2, 129.9, 129.7, 129.4, 128.2, 123.2, 118.9, 115.1, 62.8 (d, J_{CP} = 6.7 Hz), 52.4 (d, J_{CP} = 6.6 Hz), 52.3, 45.4, 43.2, 37.9, 37.7, 30.3 (d, J_{CP} = 8.9 Hz), 29.7 (29.13), 27.6 (d, J_{CP} = 188.0 Hz 26.1 (d, J_{CP} = 3.4 Hz), 23.4 (d, J_{CP} = 4.7 Hz), 23.2 (d, J_{CP} = 4.6 Hz), 23.4 (23.23), 22.4 (d, J_{CP} = 4.5 Hz), 20.5 (d, J_{CP} = 4.5 Hz). ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 34.4, 34.2; HRMS (FAB, NBA, MNa^{+}) calcd for $C_{31}H_{49}N_2O_8PSNa^{+}$: 663.2844, found 663.2842.

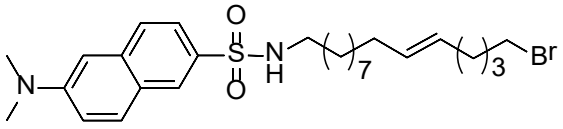


(±)-Methyl 5-(9-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)nonyl)-2-methoxy-7-methyl-3,4,5-trihydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide (racemic CyC$_{7\text{-Dansyl}}$). To a solution of **14** (3.1 g, 4.9 mmol) in CH_3CN (2.4 mL/mmol) in an oven dried RB flask, NaI (0.809 g, 5.402 mmol) was added. This solution was refluxed at 80ºC for 24 hours. The completion of reaction was observed through ^{31}P NMR. The resulting sodium salt was dried under reduced pressure. The solid sodium salt of phosphonate was dissolved in 20 ml of DMF (4ml/mmol) with 1.5 mL of diisopropyl ethyl amine (0.3 mL/mol). Then HBTU (2.80 g, 7.36 mmol) was added. After three hours the red solution was then partitioned between saturated NH_4Cl and CH_2Cl_2. The organic layer was then washed with $NaHCO_3$ and brine and concentrated *in vacuo*. The crude product was chromatographed (SiO_2, 20-30% Acetone in Hexane) to get viscous, sticky green liquid of diastereomer **CyC$_{7\text{-Dansyl}}$** (1.819 g, 2.98 mmol, 61%), further separated to give **CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$** and **CyC$_{7\beta\text{-Dansyl}}$.**

CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$: IR (neat) 3175, 2923, 2851, 1711 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.59 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.34 (d, J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.29 (dd, J_{HH} = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.65 – 7.53 (m, 2H), 7.23

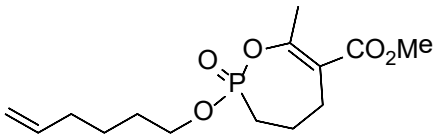
(d, J_{HH} = 7.4 Hz, 1H), 4.75 (t, J_{HH} = 6.1 Hz, 1H), 3.86 (d, J_{HP} = 11.2 Hz, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.02 – 2.88 (m, 9H), 2.27 (m, 3H), 2.13 – 1.75 (m, 4H), 1.51 (m, 4H), 1.28 – 1.12 (m, 12H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.9 (d, J_{CP} = 1.7 Hz), 155.6 (d, J_{CP} = 7.3 Hz), 151.9, 135.0, 130.2, 129.8, 129.6, 129.4, 128.2, 123.2, 123.0 (d, J_{CP} = 5.3 Hz), 118.9, 115.1, 52.0 (d, J_{CP} = 7.1 Hz), 51.9, 45.4, 43.2, 37.1, 30.6, 29.5, 29.2, 28.9, 27.6, 26.3, 24.9 (d, J_{CP} = 6.9 Hz), 21.8 (d, J_{CP} = 134.21 Hz), 21.2 (d, J_{CP} = 1.4 Hz); ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 26.2; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{30}H_{45}N_2O_7PSNa^+$: 631.2582, found 631.2581.

CyC$_{7\beta\text{-Dansyl}}$: IR(neat) 3163, 2921, 2849, 1712, cm^{-1}; H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.51 (d, J_{HH} = 8.4 Hz, 1H), 8.30 (d, J_{HH} = 8.6 Hz, 1H), 8.22 (d, J_{HH} = 7.2 Hz, 1H), 7.60 – 7.42 (m, 2H), 7.16 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 5.05 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 3.81 (d, J_{HP} = 2.4 Hz, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.87 (s, 8H), 2.26 – 2.11 (m, 4H), 1.98 (m, 4H), 1.53 (m, 2H), 1.33 (m, 2H), 1.28 – 1.04 (m, 12H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.5, 156.2 (d, J_{CP} = 7.3 Hz), 135.4, 130.9, 130.4, 130.2, 128.9, 123.8, 123.6 (d, J = 5.2 Hz), 119.34, 115.7, 52.6 (d, J = 7.1 Hz), 52.5, 46.0, 43.9, 37.7, 31.2, 30.0 (d, J_{CP} = 3.2 Hz), 29.8, 29.5, 28.1, 26.9, 25.4 (d, J_{CP} = 6.8 Hz), 23.4 (d, J_{CP} = 134.25 Hz), 21.8 (d, J_{CP} = 1.5 Hz); ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 23.5; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{30}H_{45}N_2O_7PSNa$: 631.2582, found 631.2593.

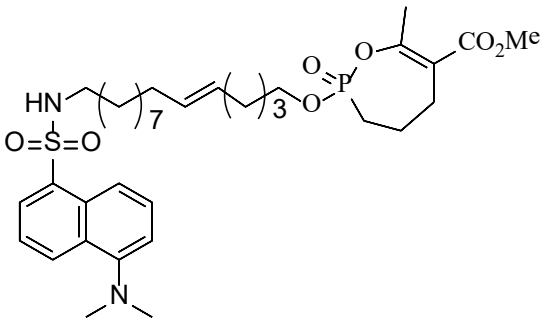


N-(15-bromopentadecyl)-6-(dimethylamino) naphthalene-2-sulfonamide (15): To the solution of **11** (0.300 g, 0.745 mmol) in dry DCM (2 mL), 5-bromo-Hex-1-ene (6 equivalent, 0.729 g, 4.48 mmol) was added in the RB flask under Argon pressure. Then Grubbs 2nd generation catalyst (0.038 g, 0.0447 mmol) was added, followed by the addition of CuI (0.011 g, 0.0596 mmol). The flask was then placed in the preheated Sand bath and refluxed for 6 hours. Completion of reaction was checked by TLC. The reaction mixture was dried and then purified by Column Chromatography (SiO_2, 5-10% EtOAc in Hexane) to get green viscous liquid **15** (0.295 g, 74%. IR(neat) 3297, 22920, 2849, 2784, 1308 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.56 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.28 (dd, J_{HH} = 14.4, 7.9 Hz, 2H), 7.56

(dt, J_{HH} = 10.3, 8.0 Hz, 2H), 7.20 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 5.50 – 5.23 (m, 2H), 4.65 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 3.41 (m, 2H), 2.93 – 2.82 (m, 8H), 2.14 – 1.74 (m, 6H), 1.49 (m, 2H), 1.41 – 1.03 (m, 14H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 153.4, 134.7, 131.3, 130.5, 129.9, 129.8, 129.7, 129.4, 128.5, 123.3, 118.7, 115.2, 45.5, 43.4, 34.0, 32.6, 32.3, 31.7, 29.6, 29.4, 29.7, 28.7, 26.5; HRMS (ESI, M^+) calcd for $C_{27}H_{42}BrN_2O_2S$: 537.2150, found 537.2145.

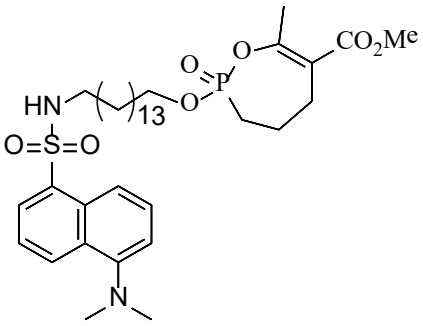


Methyl 2-(hex-5-en-1-yloxy)-7-methyl-3,4,5-trihydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide (17). To the solution of **CyC4** (0.468 g, 1.99 mmol) in 2 ml of Toluene (distilled over CaH_2 and placed in 4 Å molecular sieves for 1 h) was added TBAI (0.074 g, 0.199 mmol) followed by the addition of 6-bromo-hexene (3.24 g, 19.9 mmol) through syringe. The reaction mixture was refluxed till completion, which was monitored by TLC and ^{31}PNMR. The reaction mixture was dried over reduced pressure and purified by column chromatography (SiO_2 30-50% EtOAc in Hexane) to get **17** (0.450 g, 75%). IR (neat) 3073, 2931, 2862, 1711, 1639 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.74 (ddt, J_{HP} = 16.9, J_{HH} = 10.2, 6.7 Hz, 1H), 5.08 – 4.82 (m, 2H), 4.25 – 4.01 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.69 – 2.37 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.13 – 1.95 (m, 4H), 1.94 – 1.79 (m, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.50 – 1.38 (m, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.2 (d, J_{CP} = 1.8 Hz), 159.4 (d, J_{CP} = 7.8 Hz), 138.4 (s), 119.3 (d, J_{CP} = 4.6 Hz), 115.2, 66.0 (d, J_{CP} = 7.0 Hz), 52.1, 33.3, 29.9 (d, J_{CP} = 6.2 Hz), 26.8 (d, J_{CP} = 133.5 Hz) 26.4 (d, J_{CP} = 2.7 Hz), 24.9, 21.3 (d, J_{CP} = 7.5 Hz), 21.2 (d, J_{CP} = 1.7 Hz); ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 23.2; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{14}H_{23}O_5PNa$: 325.1180, found 325.1186.



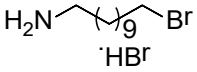
Methyl (*E*)-2-((15-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentadec-5-en-1-yl)oxy)-7-methyl-3,4,5-trihydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide (16). To the solution of **17** (0.081 g, 0.267 mmol) in dry DCM (2 mL), labeled alkene **11** (0.324 g, 0.803 mmol) was added in the RB flask under Argon pressure. Then

Hoveyda Grubbs catalyst II (0.009 g, 0.00405 mmol) was added. The flask was placed in the preheated Sand bath and refluxed for 6 hours. The completion of reaction was checked by TLC and ^{31}P NMR. The reaction mixture was dried and then purified by Column Chromatography (SiO_2, 30-50% EtOAc in Hexane) to get green viscous liquid **16** (0.089 g, 49.2%). IR (neat): 3172, 2921, 2850, 2785, 1713, 1643 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.48 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.27 (d, J_{HH} = 8.6 Hz, 1H), 8.23 – 8.15 (m, 1H), 7.55 – 7.41 (m, 2H), 7.13 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 5.43 – 5.22 (m, 2H), 4.97 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.88 – 2.76 (m, 8H), 2.55 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.01 (m, 8H), 1.67 (m, 2H), 1.46 – 1.00 (m, 16H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.2 (d, J_{CP} = 1.8 Hz), 159.3 (d, J_{CP} = 7.8 Hz), 152.0, 134.9, 131.3, 130.4, 129.9, 129.7, 129.6, 128.4, 123.3, 119.1 (d, J_{CP} = 4.6 Hz), 118.9, 115.2, 66.0 (d, J_{CP} = 7.0 Hz), 52.0 (s), 45.5, 43.4, 32.6, 32.0, 29.9 (d, J_{CP} = 6.2 Hz), 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 29.1, 29.0, 26.6 (d, J_{CP} = 133.5 Hz), 26.5, 26.3 (d, J_{CP} = 2.7 Hz), 25.5, 21.2 (d, J_{CP} = 7.5 Hz), 21.0 (d, J_{CP} = 1.7 Hz); ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 23.3. HRMS (FAB, NBA, MH^+) calcd for $C_{35}H_{54}N_2O_7PS$: 677.3389, found 677.3400.

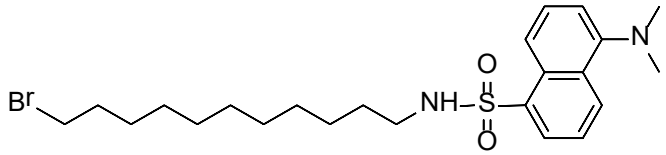


Methyl 2-((15-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)pentadecyl)oxy)-7-methyl-3,4,5-trihydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide ($CyC_{11\text{-}Dansyl}$). To a solution of **16** (0.089 g, 0.131mmol) in methanol (2 mL/mmol) were added 10% palladium on charcoal (0.05 g/mmol, 0.007 g). The solution was first flushed with Argon and with hydrogen gas filled in the balloon. The reaction was stirred for 3 hours till completion. After the completion of reaction, the reaction mixture was filtered through Celite and washed with CH_2Cl_2. Solvents were removed *in vaccuo* to get saturated phosphonate **$CyC_{11\text{-}Dansyl}$** in quantitative yield. IR (neat): 3281,3172, 2920, 2850, 2784, 1713 ,1643 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.53 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.29 (d, J_{HH} = 8.6 Hz, 1H), 8.24 (d, J_{HH} = 7.2 Hz, 1H), 7.53 (m, 2H), 7.17 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 4.86 (t, J_{HH} = 5.7 Hz, 1H), 4.23 – 4.04 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 2.93 – 2.82 (m, 8H), 2.58 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.20 – 2.01 (m, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.38 – 1.03 (m, 24H); ^{13}C NMR

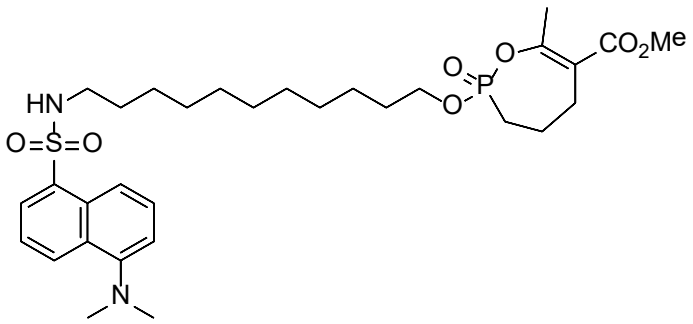
(75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.3, 159.4 (d, J_{CP} = 7.8 Hz), 152.1, 134.9, 130.5, 130.0, 129.8, 128.5, 123.4, 119.2 (d, J_{CP} = 4.6 Hz), 118.9, 115.3, 66.3 (d, J_{CP} = 7.1 Hz), 52.1, 45.6, 43.5, 30.6 (d, J_{CP} = 6.1 Hz), 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.2, 29.1, 26.76 (d, J_{CP} = 132.75 Hz), 26.57 (s), 26.40 (d, J_{CP} = 2.6 Hz), 25.62 (s), 21.28 (d, J_{CP} = 7.5 Hz), 21.15 (d, J_{CP} = 1.6 Hz). ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 23.2. HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{35}H_{55}N_2O_7PSNa^+$: 701.3365, found 701.3344.



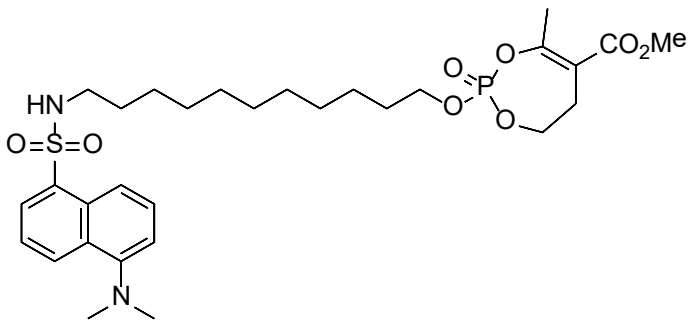
11-bromoundecan-1-amine (20) was prepared following the literature method. The spectral data were in accordance to the cited literature.[1-4] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (br, 3H), 3.43 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.11 – 3.01 (m, 2H), 1.86 (m, 4H), 1.36 (d, J = 37.9 Hz, 14H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 40.1, 34.0, 32.8, 29.4, 29.3, 28.9, 28.7, 28.1, 27.6, 26.5.



N-(11-bromoundecyl)-5-(dimethylamino) naphthalene-1-sulfonamide (21). To a solution of 11-bromoundecan-1-amine **20** (0.200 g, 0.802 mmol) in dry DCM (3 mL), Dansyl-chloride was added (0.238 g, 0.883 mmol) slowly followed by the addition of DIPEA (0.294 mL, 1.686 mmol) and stirred for 6 hours at room temperature. To the reaction mixture brine was added followed by the addition of EtOAc and washed with water several times. Finally washed with brine and dried over $MgSO_4$. The solvents were removed under reduced pressure. The crude mixture was purified by column chromatography (SiO_2; 10-20% EtOAc in Hexane) to give **21** as a viscous green liquid. (0.216 g, 55%). IR (neat) 3293, 3078, 2921, 2849, 1610, 1572 cm^-1; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.53 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.33 (d, J_{HH} = 8.6 Hz, 1H), 8.25 (d, J_{HH} = 7.2 Hz, 1H), 7.61 – 7.44 (m, 2H), 7.17 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.01 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.39 (t, J_{HH} = 6.8 Hz, 2H), 2.97 – 2.80 (m, 8H), 1.79 (m, 2H), 1.35 (m, 4H), 1.30 – 1.00 (m, 12H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 152.0, 134.9, 130.4, 129.9, 129.7, 129.7, 128.5, 123.3, 118.9, 115.2, 45.5, 43.4, 34.3, 32.9, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 28.8, 28.2, 26.4; HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{23}H_{35}BrN_2O_2SNa^+$: 505.1482, found 505.1509.

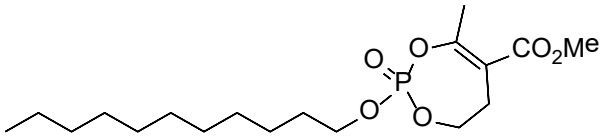


Methyl 2-((9-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)nonyl)oxy)-7-methyl-3,4,5-trihydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide (CyC$_{32\text{-Dansyl}}$). To a solution of monocyclic phosphonate ester **CyC$_4$** (0.100 g, 0.4272 mmol) in dry toluene 1 ml (distilled) was added solution of solution **21** (226 mg, 0.4699 mmol) in dry toluene 1 mL followed by the addition of TBAI (0.021 g, 0.043 mmol) and heated in reflux for 7 h till the completion of reaction as observed by TLC and ^{31}P NMR. Solvents were removed, and the crude mixture was purified through column chromatography (SiO_2, 50% EtOAc in Hexane) to give **CyC$_{32\text{-Dansyl}}$** as a viscous green liquid (0.114 mg, 43%). IR (neat) 3283, 3165, 2923, 2851, 1712, 1643 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.51 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.29 (d, J_{HH} = 8.7 Hz, 1H), 8.22 (dd, J_{HH} = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.56 – 7.46 (m, 2H), 7.17 (d, J_{HH} = 7.1 Hz, 1H), 4.91 (t, J_{HH} = 6.1 Hz, 1H), 4.16 – 4.00 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.90 – 2.79 (m, 8H), 2.70 – 2.43 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.17 – 1.81 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 1.38 – 1.05 (m, 16H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.2, 159.3 (d, J_{CP} = 7.8 Hz), 152.0, 134.9, 130.4, 129.9, 129.76, 129.7, 128.4, 123.34, 119.2 (d, J_{CP} = 4.6 Hz), 118.9, 115.2, 66.2 (d, J_{CP} = 7.1 Hz), 52.0, 45.5, 43.4, 30.5 (d, J = 6.2 Hz), 29.6, 29.5, 29.4, 29.1, 29.0, 26.7 (d, J_{CP} = 132.75 Hz), 26.5, 26.3 (d, J_{CP} = 2.7 Hz), 25.52, 21.2 (d, J_{CP} = 7.4 Hz), 21.0 (d, J_{CP} = 1.7 Hz). ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 23.2. HRMS (FAB, NBA, MNa^+) calcd for $C_{31}H_{47}N_2O_7PSNa^+$ 645.2739 found 645.2751.

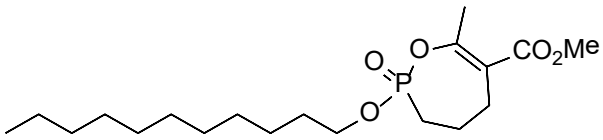


Methyl 2-((11-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)undecyl)oxy)-4-methyl-6,7-dihydro-1,3,2-dioxaphosphepine-5-carboxylate 2-oxide (CyC$_{31\text{-Dansyl}}$). To a solution of monocyclic phosphate ester **CyC$_{16}$** (0.099 g, 0.4176 mmol) in dry dioxane (1 mL) was added **21** (0.226 g, 0.4699 mmol) dissolved in dioxane through canula followed by the addition of TBAI (0.016 g, 0.042 mmol),

and refluxed for 7 h till the completion of reaction. The reaction mixture was evaporated to remove the solvents and the crude mixture was purified through column chromatography (SiO_2, 30-50% EtOAc in Hexane) to give **CyC$_{31\text{-Dansyl}}$** as a viscous green liquid (0.114 g, 43%). IR(neat) 3276, 3208, 2922, 2851, 1715, 1645 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.52 (d, J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 8.29 (d, J_{HH} = 8.6 Hz, 1H), 8.23 (dd, J_{HH} = 7.2, 0.7 Hz, 1H), 7.58 – 7.46 (m, 2H), 7.17 (d, J_{HH} = 7.5 Hz, 1H), 4.84 (t, J_{HH} = 6.0 Hz, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.21 – 4.09 (m, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.05 – 2.77 (m, 10H), 2.34 (s, 3H), 1.75 – 1.62 (m, 2H), 1.33 (m, 4H), 1.28 – 1.05 (m, 12H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 167.3, 161.1 (d, J_{CP} = 9.6 Hz), 152.2, 135.0, 130.5, 130.0, 129.8, 129.8, 128.5, 123.4, 118.9, 115.5 (d, J_{CP} = 3.8 Hz), 115.3, 69.2 (d, J_{CP} = 6.1 Hz), 68.4 (d, J_{CP} = 6.8 Hz), 52.3, 45.6, 43.5, 30.4 (d, J_{CP} = 6.6 Hz), 29.7, 29.5, 29.4, 29.1 (d, J_{CP} = 5.1 Hz), 28.3, 26.5, 25.4, 20.5 (d, J_{CP} = 3.9 Hz); ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ -10.8; HRMS (ESI, MNa^+) calcd for $C_{30}H_{45}N_2O_8PSNa^+$ 647.2514, found 647.2526.



Methyl 4-methyl-2-(undecyloxy)-6,7-dihydro-1,3,2-dioxaphosphepine-5-carboxylate 2-oxide (CyC$_{31}$). To a solution of monocyclic phosphate ester **CyC$_{16}$** (0.100 g, 0.421 mmol) in 1,4-dioxane (1 mL) was added a solution of bromoundecane (0.366 mL, 1.63 mmol) followed by the addition of *n*Bu_4NI (0.020 g, 0.054 mmol) in 1,4-dioxane (1 mL). The resulting solution was heated to reflux for 4 hours when the completion of reaction was observed by TLC and ^{31}P NMR spectroscopy. The solution was concentrated *in vacuo* and the residue was purified using column chromatography (SiO_2, 50% EtOAc in hexane) to give CyC_{31} viscous liquid (0.059 mg, 38%). IR (neat) 2921, 2851, 1717, 1644, 1287 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.434-4.28 (m, 1H), 4.23-4.08 (m, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.06-2.76 (m, 2H), 1.76-1.64 (m, 2H), 1.40-1.17 (m, 16H), 0.86 (d, J_{HH} = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 167.2 (d, J_{HP} = 1.9 Hz), 161.1 (d, J_{HP} = 9.6 Hz), 115.4 (d, J_{HP} = 3.8 Hz), 84.8, 69.2 (d, J_{HP} = 6.0 Hz), 68.2, 68.2, 52.2, 31.9, 30.3 (d, J_{CP} = 6.6 Hz), 29.6, 29.5, 29.4, 29.1, 28.2, 22.7, 20.4 (d, J_{CP} = 3.8 Hz), 14.2; ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$); δ -10.8; HRMS (ESI, MH^+) calcd for $C_{18}H_{34}O_6P$ 377.2093, found 377.2088.



Methyl 7-methyl-2-(undecyloxy)-3,4,5-trihydro-1,2-oxaphosphepine-6-carboxylate 2-oxide (CyC$_{32}$). To a solution of monocyclic phosphonate ester **CyC$_4$** (0.145 g, 0.619 mmol) in toluene (1 mL) was added a solution of bromoundecane (0.0.415 mL, 1.85 mmol) followed by the addition of *n*Bu$_4$NI (0.023 g, 0.062 mmol) in toluene (1 mL). The resulting solution was heated to reflux for 4 hours when the completion of reaction was observed by TLC and ^{31}P NMR spectroscopy. The solution was concentrated *in vacuo* and the residue was purified using column chromatography (SiO_2, 50% EtOAc in hexane) to give CyC$_{32}$ viscous liquid (0.097 g, 42%). IR (neat) 2921, 2852, 1714, 1644 cm^{-1}; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.20-4.03 (m, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.69-2.48 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.30-1.82 (m, 5H), 1.71 – 1.59 (m, 3H), 1.21 (m, 16H), 0.86 (d, J_{HH} = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 186.1, 159.4 (d, J_{HP} = 7.8 Hz), 119.1 (d, J_{HP} = 4.7 Hz), 66.2 (d, J_{HP} = 6.9 Hz), 51.9, 30.5 (d, J_{CP} = 6.0 Hz), 29.7, 29.63, 29.57, 29.4, 29.3, 29.2, 27.0 (d, J_{CP} = 93 Hz) , 25.5, 22.8, 21.2, 21.1, 22.0, 14.2; ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$); δ 23.2; HRMS (ESI, MH^+) calcd for $C_{19}H_{36}O_5P$ 375.2300, found 375.2296.

BIOLOGICAL EVALUATION.

Bacterial culture. *Escherichia coli* DH10B, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and S*taphylococcus aureus* (clinical isolate) cells were grown in Luria-Bertani (LB) broth (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) at 37 °C under shaking at 200 rpm. *M. smegmatis* was cultured in Middlebrook 7H9 liquid media (BD Difco) supplemented with 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 0.2% glycerol (Euromedex, France) (7H9-S). *M. abscessus* CIP104536^T with either a smooth (S) or a rough (R) morphotype, *M. marinum* ATCC BAA-535/M, *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 and *M. tuberculosis* mc^{2}6230 (H37Rv Δ*RD1* Δ*panCD*[5]) were cultured in 7H9-S supplemented with 10% Oleic Albumin Dextrose Catalase (OADC enrichment, BD Difco) (7H9-S^{OADC}). In the case of *M. tuberculosis* mc^{2}6230, 24 µg/mL D-pantothenate (Sigma-Aldrich) was also added in the 7H9-S^{OADC} medium. Recombinant *M. abscessus* S carrying pTEC27 (Addgene, plasmid 30182) expressing red fluorescent tdTomato protein was grown in 7H9-S^{OADC} with 500 µg/mL hygromycin B (Euromedex, France).[6] Recombinant *M. abscessus* S carrying the pSMT3-GFP-LuxAB plasmid allowing luminescence and fluorescence was grown in 7H9-S^{OADC} with 1,000 µg/mL hygromycin B (Euromedex, France).[7] This latter *M. abscessus* S-LuxAB strain was a generous gift from Prof. Jean-Louis Herrmann (Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and was used for measurement of bacterial load inside infected macrophages. All cultures were incubated at 37 °C, except *M. marinum* which was cultured at 32 °C. *M. smegmatis* and *M. abscessus* were stirred at 200 rpm; *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* mc^{2}6230 and *M. marinum* at 50 rpm.

Determination of minimum inhibitory concentrations. Susceptibility testing for mycobacteria was performed using the Middlebrook 7H9 broth microdilution method. MICs of the **CyCs** were determined in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid (Thermo-Fisher Scientific, ref. 167008) using the resazurin microtiter assay (REMA) as described previously.[8-10] Briefly, log-phase bacteria were diluted to a cell density of 5×10^6 cells/mL in appropriate 7H9-S medium. Then, 100 µL of this bacterial suspension (5×10^5 cells per well) was added to each well

containing 100 µL of the appropriate 7H9-S medium, serial two-fold dilutions of the selected **CyCs** or controls to a final volume of 200 µL. Plates were incubated at 37 °C (32 °C for *M. marinum*) for either 3-5 days (*M. smegmatis* and *M. abscessus*) or 7-14 days (*M. marinum*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* $mc^2$6230). Then, 20 µL of 0.025% (*w*/*v*) resazurin solution was added and incubation was proceeded for color change (from blue to pink) in the control well (bacteria without antibiotic). Fluorescence of the resazurin metabolite resorufin ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 530/590 ± 10 nm) was quantified using a Tecan Spark 10M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd, France). The lowest compound concentration leading to 90% bacterial growth inhibition was defined as the MIC_{90}.

In parallel, MICs of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* were assessed using the broth microdilution method.[11] Log phase bacteria were diluted in LB medium to around 5×10^5 cells/mL. Then 100 µL of this latter inoculum were added into each well containing serial dilution of the **CyCs**, and the plates were incubated at 37 °C for 18-24 h. After incubation, OD_{600nm} was recorded using a Tecan Spark 10M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd, France). The MIC was defined as the lowest concentration of **CyC** that inhibited visible growth of the bacteria. Each assay for each strain was carried out at least in triplicate.

Determination of Cytotoxic Activity for new CyCs. The cytotoxicity of each new synthesized **CyC** against eukaryotic cells was measured based on the reduction of resazurin as a value of cellular viability by metabolic activity.[8, 12] Murine (Raw264.7) macrophages (American Type Culture Collection TIB-71) were cultured from a freezer stock in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FBS, Invitrogen) ($DMEM^{FBS}$). Cells were grown at 37 °C and 5% CO_2 to subconfluent concentrations. Then 5×10^4 cells/well were seeded in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid (ThermoFisher Scientific) in a final volume of 200 µL per well and incubated for additional 24 h. The medium was removed by aspiration, and 200 µL of serial two-fold dilution of each compound (**$CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$**, **$CyC_{31\text{-Dansyl}}$**,**$CyC_{32\text{-Dansyl}}$**, as well as **$CyC_{31}$** and **$CyC_{32}$**) in $DMEM^{FBS}$ were then

added to each well. After 24 h incubation, 20 µL of a 0.025% (*w/v*) resazurin solution was added to each well. Fluorescence was measured following a 4 h incubation at 37 °C and 5% CO_2 in the dark, by excitation at 530 nm and emission at 590 nm as described above, leading to relative metabolic activities. Addition of DMSO was used as 100% viability reference and addition of 0.2% Triton X-100 solution served as negative standard (0% viability). All experiments were performed as two independent triplicates.

Intramacrophage killing assay. Raw264.7 macrophages were grown in $DMEM^{FBS}$ medium at 37 °C and 5% CO_2 to subconfluent concentrations. Then 5×10^4 cells/well were seeded in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid in a final volume of 200 µL per well and cultured for additional 24 h. The cells were infected with *M. abscessus* S-LuxAB at a multiplicity of infection (MOI) of 1:10 and incubated at 37 °C in the presence of 5% CO_2 for 3 h. Cells were then washed three times with DMEM then refed with $DMEM^{FBS}$ supplemented with 200 µg/mL amikacin for 1 h. at 37°C and 5% CO_2 to kill any extracellular bacteria; washed again three times with DMEM prior to the addition of 2-fold dilutions of the **CyC** compounds or imipenem (IMP) in $DMEM^{FBS}$ supplemented with 50 µg/mL (*i.e.*, 85.4 µM) amikacin (200 µL final volume). In each plate, negative controls consisting of amikacin (50 µg/mL) and 1% DMSO (*i.e.*, infected macrophages only); as well as positive controls containing amikacin (50 µg/mL) plus 80 µg/mL (*i.e.*, 267 µM) IMP were also included.[8, 13] Plates were incubated for 24 h at 37°C, 5% CO_2.

Luminescence measurement was then used to check intracellular bacterial viability of *M. abscessus* S-LuxAB[7] following treatment with each **CyC** compound concentration. Infected macrophage cells were first washed three times with PBS and lysed by addition of 200 µL cold 0.1% Triton X-100. A solution of 1% *n*-decanal (Sigma-Aldrich) in ethanol (20 µL) was added in each well after lysis of macrophages, and luminescence was read immediately using a Tecan Spark 10M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd, France). DMSO-treated infected macrophages corresponded as control representing 100% of bacterial viability. The luminescence value obtained was next correlated

to CFU using a calibration curve $Log_{10}(Lux) = f(Log_{10}(CFU))$ initially built by plating 10-fold serial dilutions of *M. abscessus* S-LuxAB on 7H9 agar medium, followed by colonies enumeration after 4-5 days of incubation at 37 °C.

Intracellular MIC_{Raw} values were further determined by fitting the CFU% sigmoidal dose-response curves in Kaleidagraph 4.2 software (Synergy Software). The lowest compound concentration inhibiting 50% of intracellular bacterial growth was defined as the MIC_{50Raw}. Each experiment was done three times independently.

Mycobacteria and infected/non-infected macrophages labeling with the CyC$_{\text{-Dansyl}}$. Mid-log phase mycobacterial suspension in appropriate 7H9-S medium was harvested for 15 min at 3,500 rpm and resuspended in PBS buffer (pH 7.4) containing 0.05% (*v*/*v*) Tween 20 (Euromedex, France) (PBS-T) at an OD_{600} corresponding to 1.5×10^{10} cells/mL. Then, the cells were incubated with 200 µM of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** (*i.e.*, **CyC$_{\text{31-Dansyl}}$**, **CyC$_{\text{32-Dansyl}}$**, **CyC$_{\text{7α-Dansyl}}$** and **CyC$_{\text{7β-Dansyl}}$**) or DMSO (negative control) for 3 h at 37 °C (32 °C for *M. marinum*) under shaking at 200 rpm. After incubation, bacteria were washed three times with PBS-T and resuspended in 100 µL PBS-T. For quantification of total fluorescence, 100 µL of each sample (*i.e.*, 7.5×10^9 cells/mL) in PBS-T was dispensed in a 96-well Chimney black microplate (Greiner Bio-one, Germany). The fluorescence related to the Dansyl group was recorded at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 400/535 ±10 nm using a Tecan Spark 10M multimode microplate reader (Tecan Group Ltd, France). For microscopy observation, the bacteria were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h at room temperature, washed three times with PBS-T and resuspended in 100 µL PBS-T.

Raw264.7 macrophages were grown in DMEM^{FBS} medium at 37 °C and 5% CO_2 to subconfluent concentration. Then 2.5×10^5 cells/well were seeded in 8-well Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System, RS glass (ThermoFisher Scientific) in a final volume of 250 µL per well, and cultured for additional 24 h. Cells were washed three times with DMEM, then refed with DMEM^{FBS} supplemented with 100 µM fluorescent **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** probes and incubated for additional 24 h at 37 °C and 5% CO_2.

Cells were then washed three times with DMEM, and infected with the fluorescent *M. abscessus* S-tdTomato strain at a MOI of 10 and processed as described above (see ***Intramacrophage killing assay*** section). Alternatively, the cells were first infected with *M. abscessus* S-tdTomato strain prior to a 24 h-incubation period with 100 µM **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** probes. After incubation, the infected and non-infected macrophages were washed three times with sterile PBS, fixed using 4% paraformaldehyde for 15 min, then washed twice with PBS and re-filed with 250 µL PBS.

Fluorescent Microscopy. Fixed samples (4 µL bacterial suspension, *i.e.* 3.0×10^7 cells, spotted between a microscope slide and coverslip; or macrophage cells in Lab-Tek II Chamber Slide System) were analyzed by snapshot fluorescence imaging at room temperature using an Olympus IX81 confocal microscope equipped with a UPlanSApo 100× 1.40 NA objective and operated with the FV1000 software. Acquisitions were taken using a 2-line Kalman integration. Exposure time was 10 µs/pixel for both laser transmission and fluorescence images with conserved settings (X, Y, Z, HV, Gain and offset). The Dansyl was detected by excitation with a 405 nm laser with 39-50% intensity, and emission was collected using a semitransparent mirror collecting all wavelength under 560 nm. The tdTomato was detected by excitation with a 515 nm laser with 20-40% intensity, and emission was collected using a semitransparent mirror collecting all wavelength over 560 nm.
3D-fluorescence images were acquired on a DeltaVision OMX SR imaging system from GE Healthcare, with an Olympus PlanApo N 60× 1.42 NA and 2 cameras sCMOS. The Dansyl was detected by a 405 nm diode laser (61 mW) at 2%T during 50 ms and with a 435/31 nm emission filter and the Nile Red was detected by a 568 nm diode-pumped solid-state laser (61mW) at 2%T during 100 ms and with a 609/37 nm emission filter. 11 sections of images of 512 × 512 pixels (pixel size of 80 nm) were acquired with a section spacing of 0.125 µm and a sample thickness of 1.25 µm. Images were then deconvoluted with the microscope software "Softworks 7.0.0" and then analyzed with Fiji 1.53f51. With each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** probe, two biological replicates were made with infected and non-

infected macrophages; and for each sample, 8 different images where taken per frame in order to get more than 200 macrophage cells in total. Images were next converted to an 8-bit intensity color range. In all cases, the corresponding control images were taken/checked prior to any fluorescence imaging and quantification.

Analysis of Dansyl mean fluorescence intensity (adapted from [14]). A background noise was first calculated by taking the mean fluorescence intensity of 20 different areas free of any cells for each channel (*i.e.*, Dansyl and tdTomato frames, respectively), and was subtracted to each frame. Segmentation and analysis of the images recorded (126.98 × 126.98 µm; 512 × 512 pixels) were performed using the open source program ImageJ/Fiji 1.53f51. Cells segmentation was done by manually detouring the Raw264.7 cells on the laser transmission frame and transforming it into a mask. This Raw-mask was then used to determine the Dansyl mean fluorescence intensity of pixels associated to the macrophage region and corresponding to the inhibitor cellular uptake. For intracellular bacterial segmentation, a manual threshold was first applied to the tdTomato frame to create a binary mask, defining all bacterial regions of interest. This bacterial-mask was used to measure the Dansyl mean fluorescence intensity of pixels associated to the *M. abscessus* S-tdTomato region and corresponding to the inhibitor bacterial uptake.

Live fluorescence imaging and BioTracker staining. For live-cell imaging, infected and non-infected Raw264.7 macrophages ± 100 nM ConA and ± 100 µM **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** were washed with PBS buffer (pH 7.4) and stained for 30 min with DMEM^{FBS} medium containing 1X BioTracker™ NIR633 Lysosome Dye (Sigma Aldrich) at 37 °C and 5% CO_2 following the manufacturer recommendations. Live-cell imaging was further performed by excitation with a 633 nm laser with 10% intensity, and emission was collected using a semitransparent mirror collecting all wavelength over 560 nm as described above. Segmentation and analysis were performed as described above. First, the background was removed from each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** and BioTracker frames as described previously. To

segment BioTracker positive area, a manual threshold was applied to the BioTracker frames in order to create a binary mask, thereby defining all regions of interest. This BioTracker-mask was further used to quantify the Dansyl mean intensity inside BioTracker positive areas which allowed to compare the uptake of each **CyC-Dansyl** inhibitor in acidic compartments inside the macrophages.

Movie S1. Movie was generated using Dragonfly **2022.1** (ORS) using the same data from **Figure 3D**. A 3D reconstruction was first made and then different views (zoom, rotation, orthoslice) have been selected at different key frame to make the movie.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using Prism 4.0 (Graphpad, Inc) and are detailed in each figure legend. Density plot of the resulting fluorescence data was calculated using the distplot tool from the seaborn statistical data visualization python library,[15] and the sinaplot-boxplots were generated with the PlotOfData web tool.[16]

REFERENCES

(1) Cheng, K.; Landry, C. C. Diffusion-based deprotection in mesoporous materials: a strategy for differential functionalization of porous silica particles. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (31), 9674-9685.

(2) Mes, T.; van der Weegen, R.; Palmans, A. R.; Meijer, E. W. Single-chain polymeric nanoparticles by stepwise folding. *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50* (22), 5085-5089.

(3) Sauer, R.; Turshatov, A.; Baluschev, S.; Landfester, K. One-Pot Production of Fluorescent Surface-Labeled Polymeric Nanoparticles via Miniemulsion Polymerization with Bodipy Surfmers. *Macromolecules* **2012**, *45* (9), 3787-3796.

(4) Tanahashi, M.; Matsuda, T. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res* **1997**, *34* (3), 305-315.

(5) Sambandamurthy, V. K.; Derrick, S. C.; Hsu, T.; Chen, B.; Larsen, M. H.; Jalapathy, K. V.; Chen, M.; Kim, J.; Porcelli, S. A.; Chan, J.; et al. Mycobacterium tuberculosis DeltaRD1 DeltapanCD: a safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* **2006**, *24* (37-39), 6309-6320.

(6) Bernut, A.; Herrmann, J. L.; Kissa, K.; Dubremetz, J. F.; Gaillard, J. L.; Lutfalla, G.; Kremer, L. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (10), E943-952.

(7) Le Moigne, V.; Blouquit-Laye, S.; Desquesnes, A.; Girard-Misguich, F.; Herrmann, J.-L. Liposomal Amikacin and *Mycobacterium abscessus*: Intimate interactions inside eukaryotic cells. *Submitted manuscript* **2022**.

(8) Madani, A.; Ridenour, J. N.; Martin, B. P.; Paudel, R. R.; Abdul Basir, A.; Le Moigne, V.; Herrmann, J. L.; Audebert, S.; Camoin, L.; Kremer, L.; et al. Cyclipostins and Cyclophostin Analogues as Multitarget Inhibitors That Impair Growth of *Mycobacterium abscessus*. *ACS Infect Dis* **2019**, *5* (9), 1597-1608.

(9) Nguyen, P. C.; Madani, A.; Santucci, P.; Martin, B. P.; Paudel, R. R.; Delattre, S.; Herrmann, J.-L.; Spilling, C. D.; Kremer, L.; Canaan, S.; et al. Cyclophostin and cyclipostins analogs, new

promising molecules to treat mycobacterial-related diseases. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2018**, *51*, 651-654.

(10) Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, *46* (8), 2720-2722.

(11) Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* **2008**, *3* (2), 163-175.

(12) Santucci, P.; Dedaki, C.; Athanasoulis, A.; Gallorini, L.; Munoz, A.; Canaan, S.; Cavalier, J.-F.; Magrioti, V. Synthesis of long chain β-lactones and their antibacterial activities against pathogenic mycobacteria. *ChemMedChem* **2019**, *14* (3), 349-358.

(13) Dupont, C.; Viljoen, A.; Dubar, F.; Blaise, M.; Bernut, A.; Pawlik, A.; Bouchier, C.; Brosch, R.; Guerardel, Y.; Lelievre, J.; et al. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in Mycobacterium abscessus. *Mol Microbiol* **2016**, *101* (3), 515-529.

(14) Santucci, P.; Greenwood, D. J.; Fearns, A.; Chen, K.; Jiang, H.; Gutierrez, M. G. Intracellular localisation of Mycobacterium tuberculosis affects efficacy of the antibiotic pyrazinamide. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 3816.

(15) Waskom, M. seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software* **2021**, *6* (60), 3021.

(16) Postma, M.; Goedhart, J. PlotsOfData—A web app for visualizing data together with their summaries. *PLOS Biology* **2019**, *17* (3), e3000202.

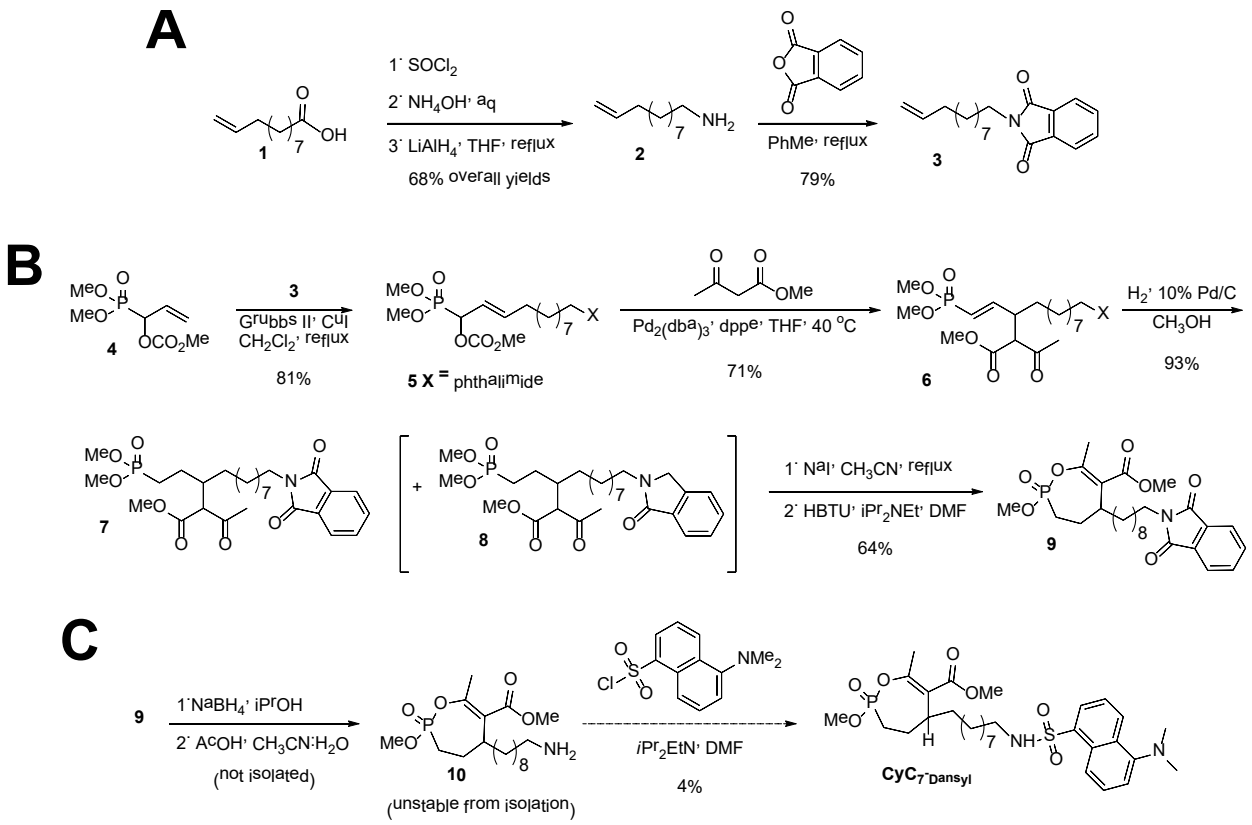


Figure S1. First synthetic route for the obtention of racemic **CyC$_{7\text{-Dansyl}}$**.

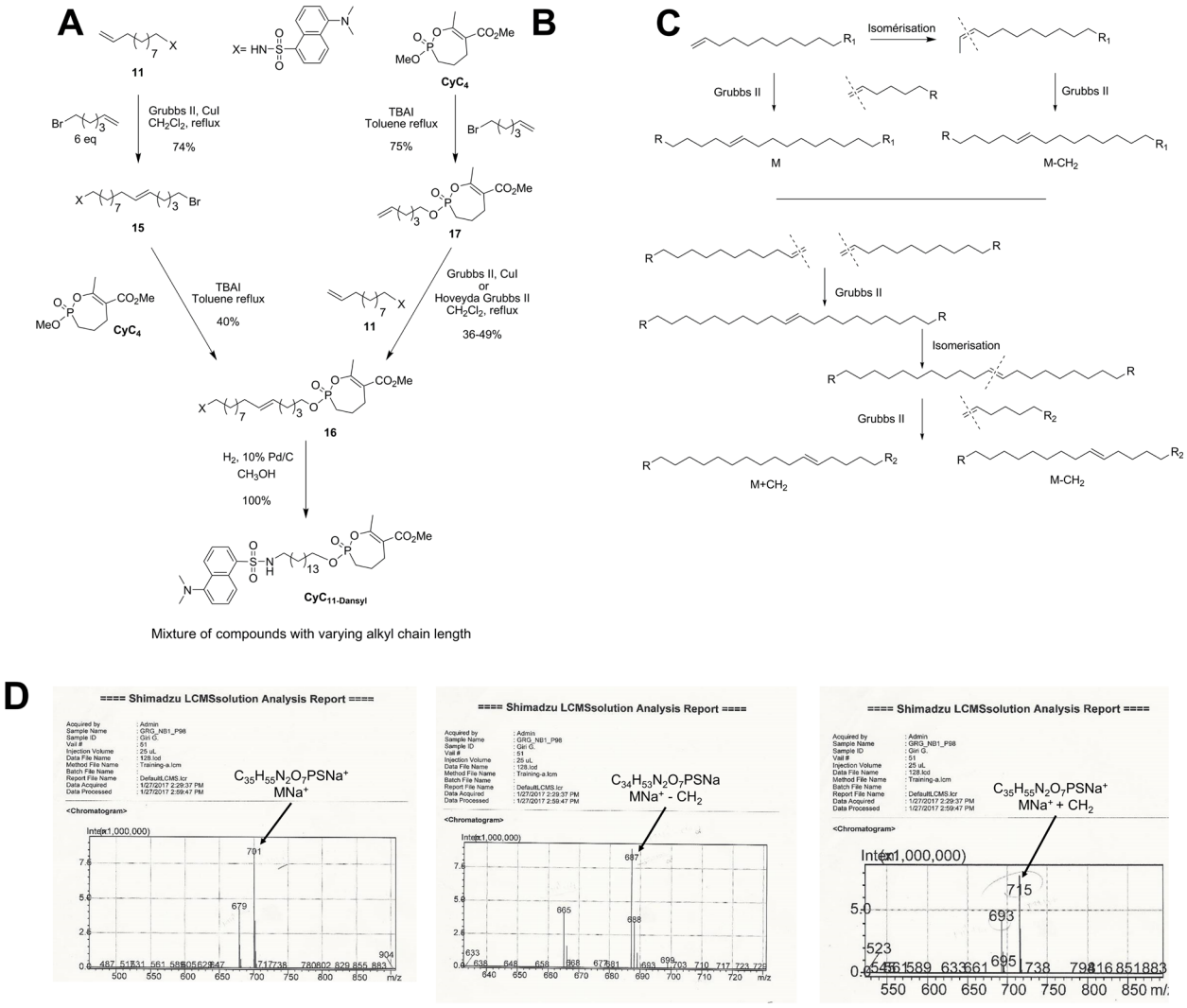


Figure S2. (A-B) Cross metathesis pathway for the obtention of **$CyC_{11\text{-}Dansyl}$**, and **(C)** probable isomerization of double bonds during the metathesis reaction, and **(D)** LC-MS spectra of final product.

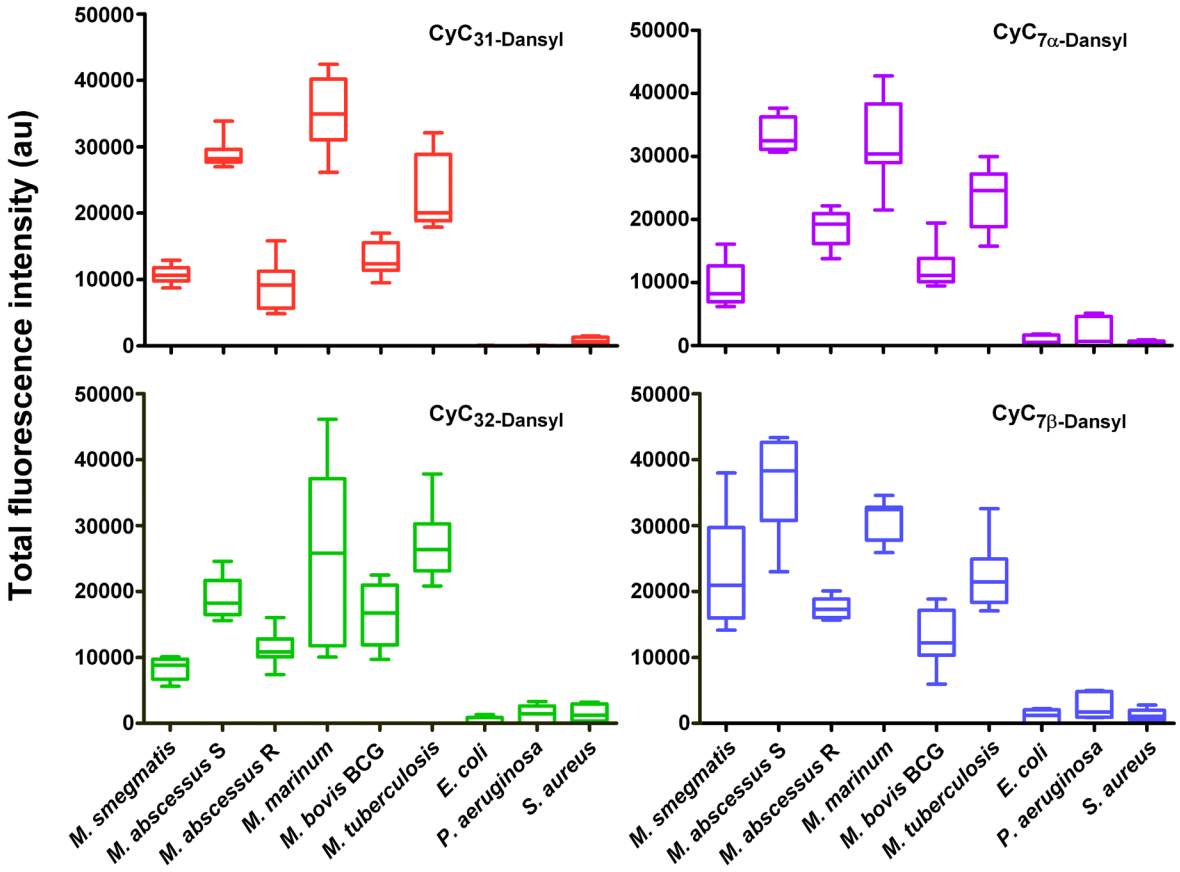


Figure S3. Total fluorescence intensity profile of each CyC$_{\text{-Dansyl}}$-treated bacteria expressed as arbitrary units (au). For each **CyC** probe, boxplot representation of the Dansyl total fluorescence intensity measured for *M. smegmatis*, *M. abscessus* S & R, *M. marinum*, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* strains. Values are from **Figure 2B** and **Figure S4B**.

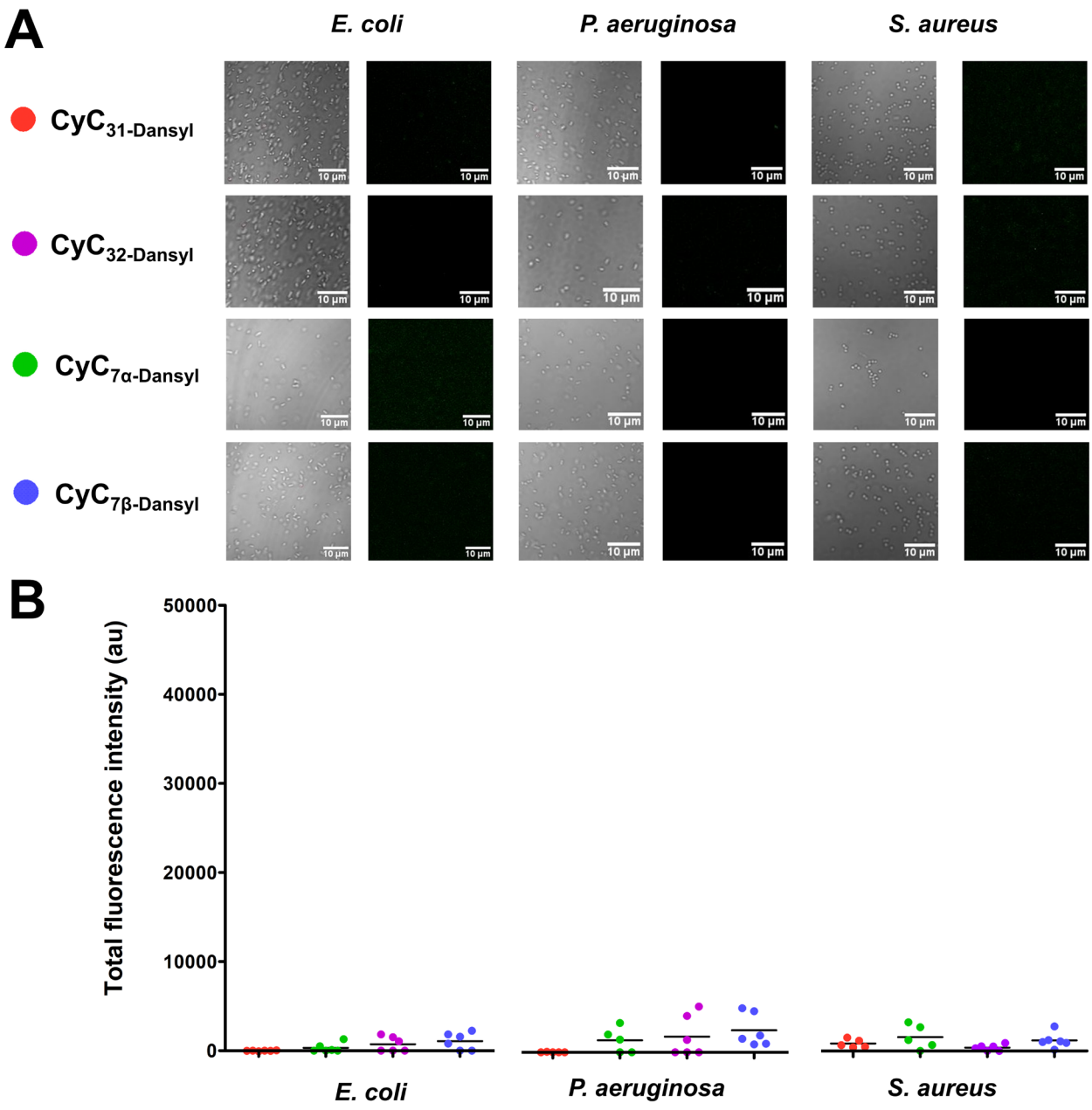


Figure S4. **The CyCs are unable to cross the cell wall of Gram-positive and Gram-negative bacteria. (A)** Representative fluorescence images of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains in presence of fluorescent **CyCs**. The bacteria were exposed to 200 µM **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** for 3 h, then washed and fixed with 4% paraformaldehyde. Fixed bacteria were imaged using an Olympus IX81 confocal microscope. Scale bars correspond to 5 µm. **(B)** Total fluorescence intensity of each **CyC$_{\text{-Dansyl}}$**-treated bacteria expressed as arbitrary units (au). For the sake of comparison, the *y*-axis has been scaled to the one reported in **Figure 2**. Compounds color code is indicated in panel (**A**). Results are corresponding to $n = 3$ biologically independent experiments performed in triplicate.

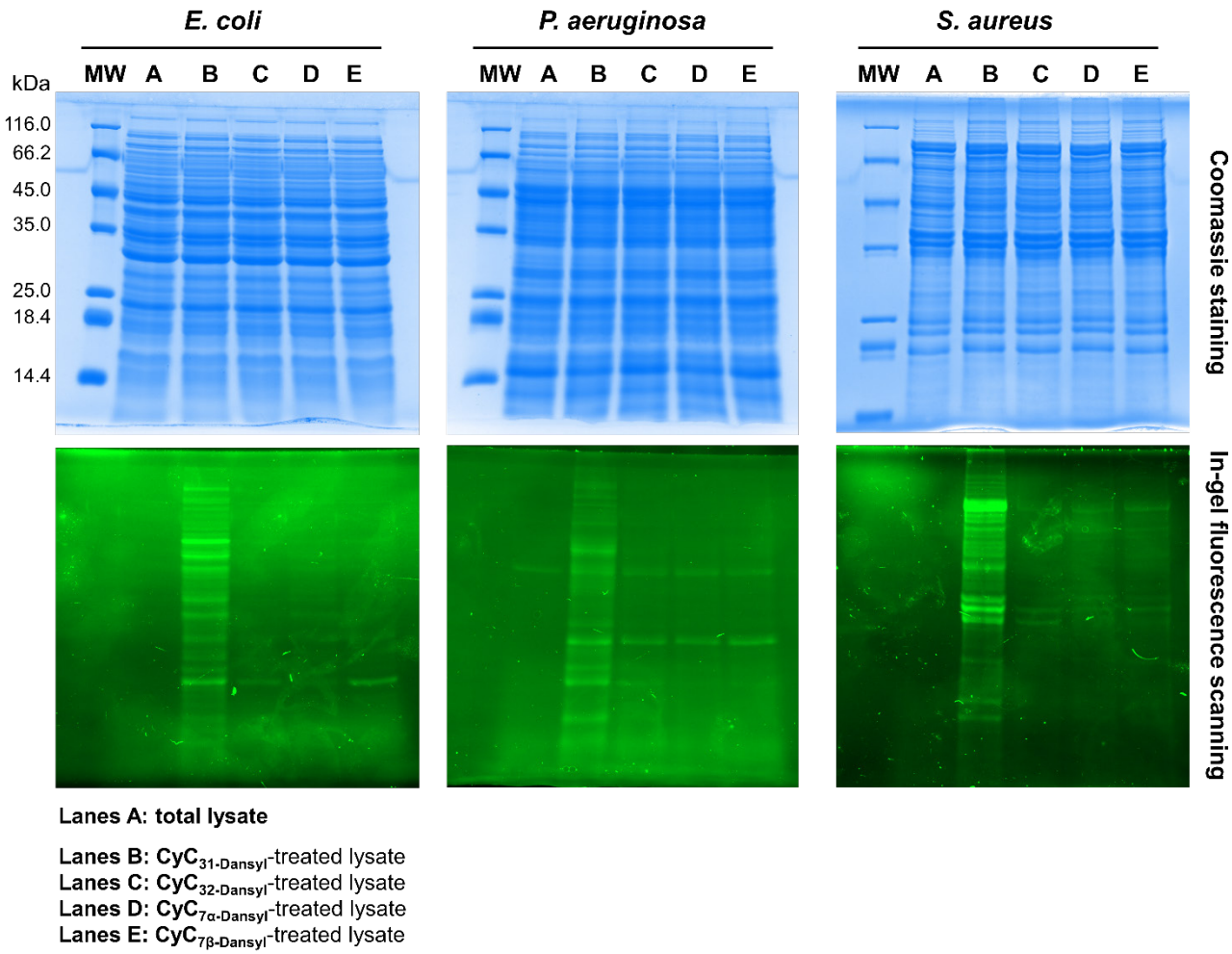
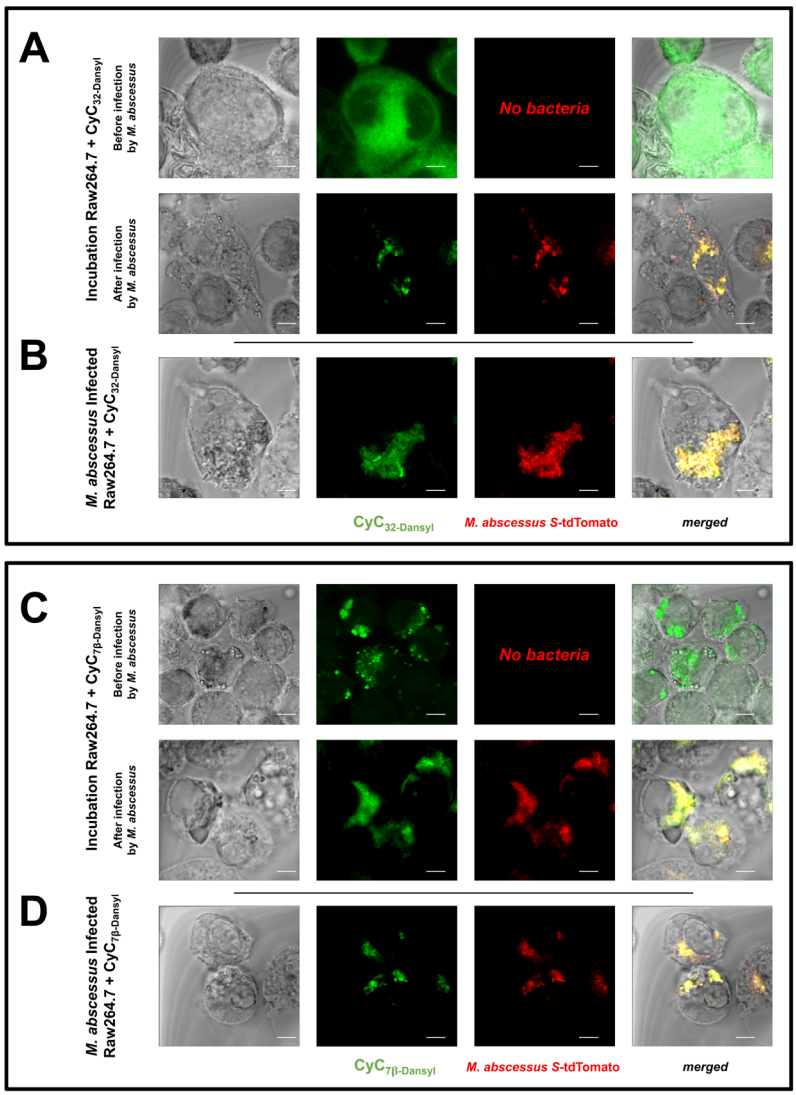
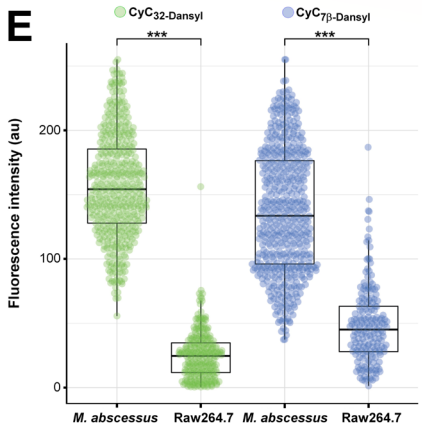


Figure S5. **The CyCs are able to react with Gram-positive and Gram-negative bacterial (Ser/Cys)-base enzymes when incubated with total lysate.** A sample of *E. coli*, *P. aeruginosa* or *S. aureus* total lysate (1 mg/mL - 50 µL final volume) was pre-incubated for 3 h with 200 µM **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** or DMSO. The reaction was stopped by adding 5X Laemmli reducing buffer followed by boiling, and equal amounts of proteins (50 µg) were separated by 12% SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining (*top*) or in-gel fluorescence visualization (*bottom*). The various **CyC$_{\text{-Dansyl}}$** compounds are able to covalently label bacterial (Ser/Cys)-base enzymes, as evidenced by the occurrence of various fluorescent bands in ***lanes B-E***.
The **CyC$_{\text{-Dansyl}}$**-labeled proteins were detected by fluorescent gel scanning using trans-UV illumination (λ_{ex} 302 nm) as excitation source and as emission the 530/28 filter of a ChemiDoc MP Imager (Bio-Rad) before staining of the gels with Coomassie Brilliant Blue dye.





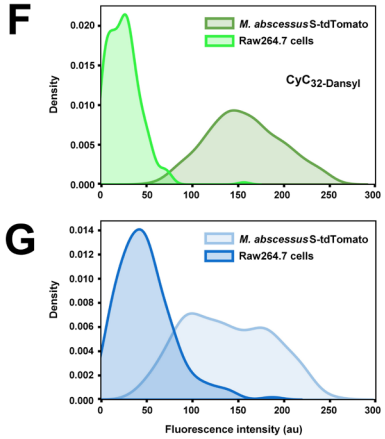


Figure S6. The $CyC_{32\text{-}Dansyl}$ and $CyC_{7\beta\text{-}Dansyl}$ specifically localized on *M. abscessus* S inside infected Raw264.7 macrophages. (**A, C**) Raw264.7 macrophages were preincubated with 100 µM **$CyC_{32\text{-}Dansyl}$** (**A**) or **$CyC_{7\beta\text{-}Dansyl}$** (**C**) for 24 h prior to be infected with *M. abscessus* S-tdTomato (MOI 10) for another 24 h. (**B, D**) Alternatively, *M. abscessus* S-dtTomato infected Raw264.7 were treated with each probe for 24 h before chemical fixation and confocal fluorescence imaging. Scale bars correspond to 5 µm. Micrographs are representative of 2 independent experiments. (**E**) Quantitative analysis of the Dansyl fluorescence signal per bacterium and Raw264.7 cell positive area shown as a sinaplot-boxplot and expressed as arbitrary units (au). Results are from two biologically independent experiments. 185 to 251 cells were observed resulting in 451 to 511 segmented intracellular *M. abscessus* S-dtTomato positive regions. The *p*-values were calculated by using a two-tailed *t*-statistic test with Prism 4.0 (Graphpad, Inc): *** *p*-value < 0.001. **(F-G)** Analysis of the Dansyl-fluorescent signal profile of *M. abscessus* S-tdTomato and Raw264.7 positive cells reported as density plot.

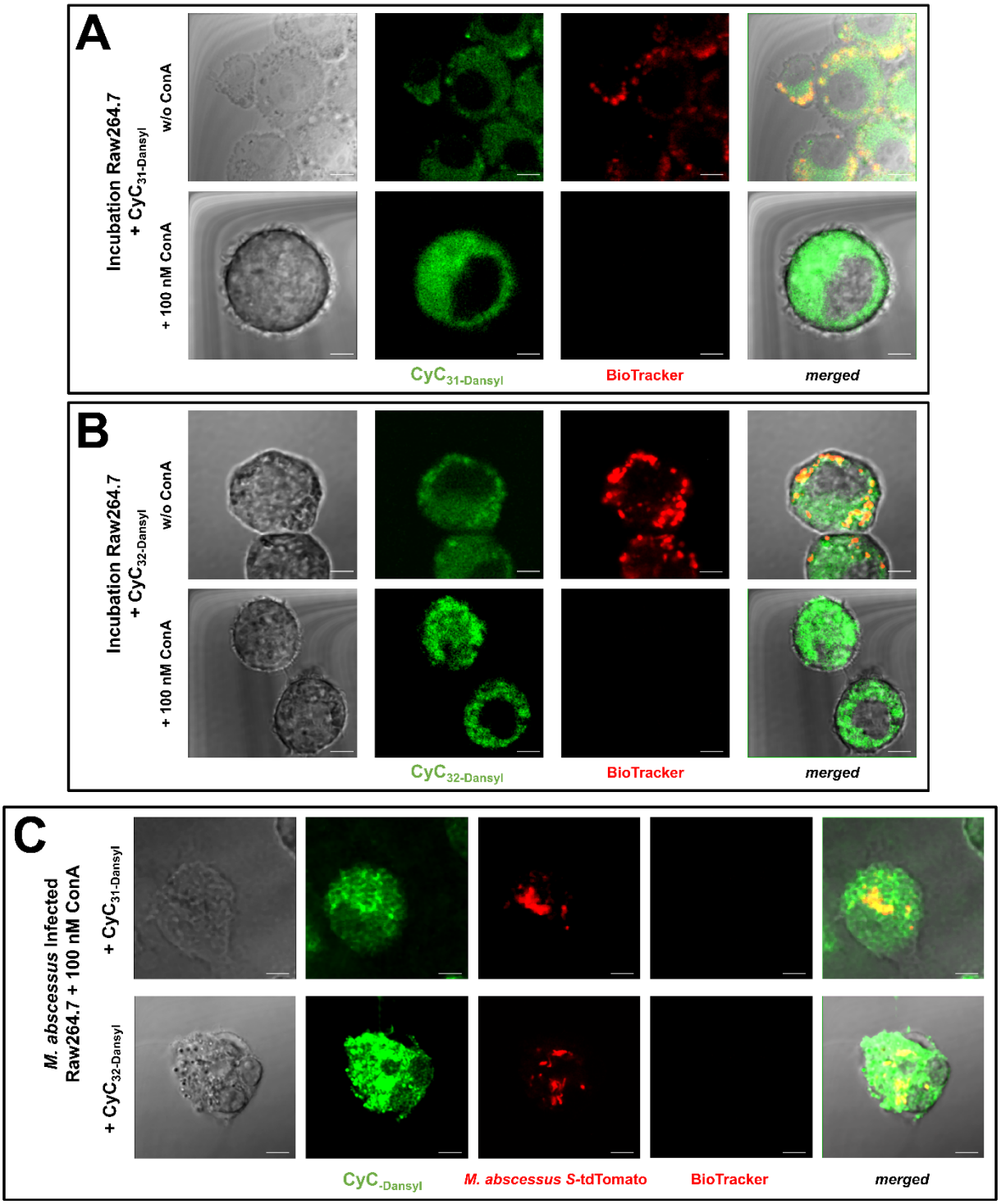


Figure S7. The $CyC_{31/32\text{-}Dansyl}$ do not accumulate mainly in acidic compartments inside Raw264.7 macrophages. Raw264.7 macrophages were preincubated with 100 µM **$CyC_{31\text{-}Dansyl}$ (A)** or **$CyC_{32\text{-}Dansyl}$ (B)** for 24 h in presence or absence of 100 nM Concanamycin A (ConA) prior to be stained with 1X BioTracker™ NIR633 Lysosome Dye (Sigma Aldrich) and processed for confocal fluorescence imaging. Micrographs are representative of 106 to 136 observed cells from two biologically independent experiments. (**C**) **Disruption of endolysosomal acidification impairs $CyC_{\text{-}Dansyl}$ colocalization with *M. abscessus* cells inside infected Raw264.7 macrophages**. *M. abscessus* S-dtTomato infected Raw264.7 macrophages treated with 100 nM Concanamycin A (ConA) were further preincubated with 100 µM **$CyC_{31\text{-}Dansyl}$** or **$CyC_{32\text{-}Dansyl}$** for 24 h prior to be stained with 1X BioTracker™ NIR633 dye and processed for confocal fluorescence imaging. Micrographs are representative of around 120 observed cells from two biologically independent experiments. Scale bars: 5 µm.

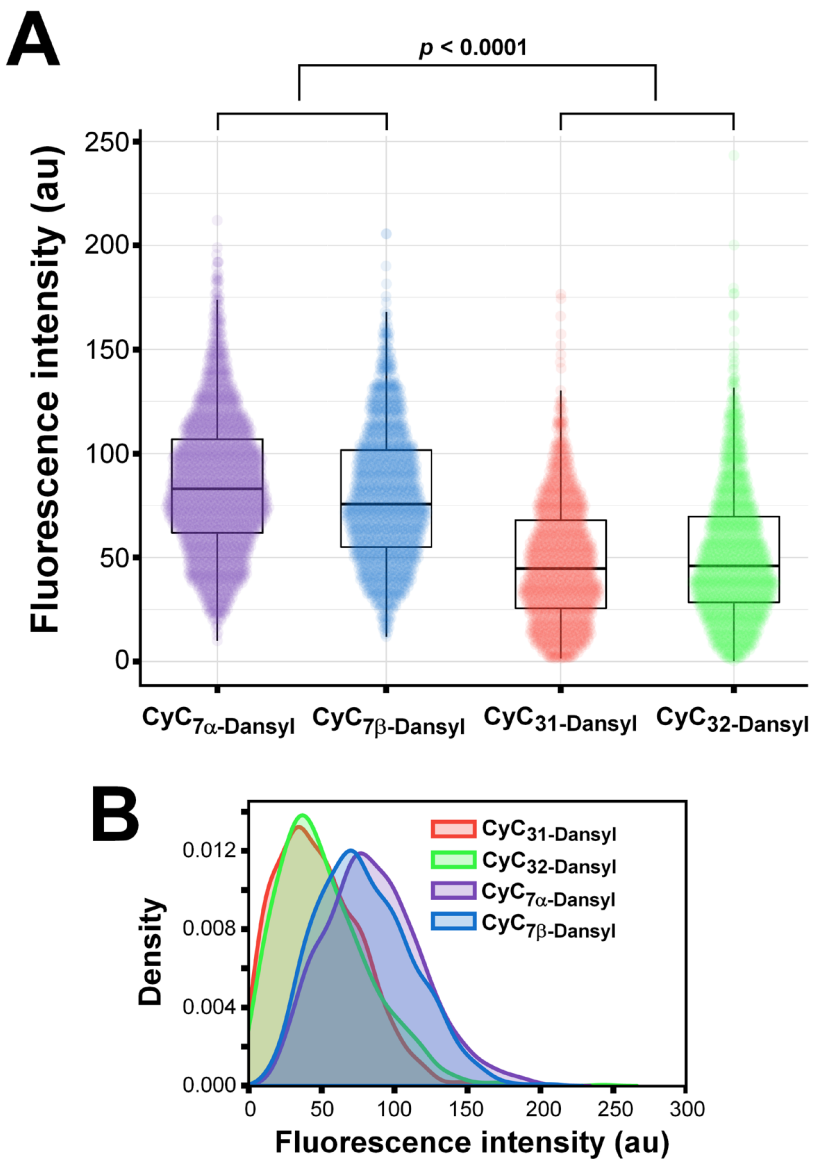
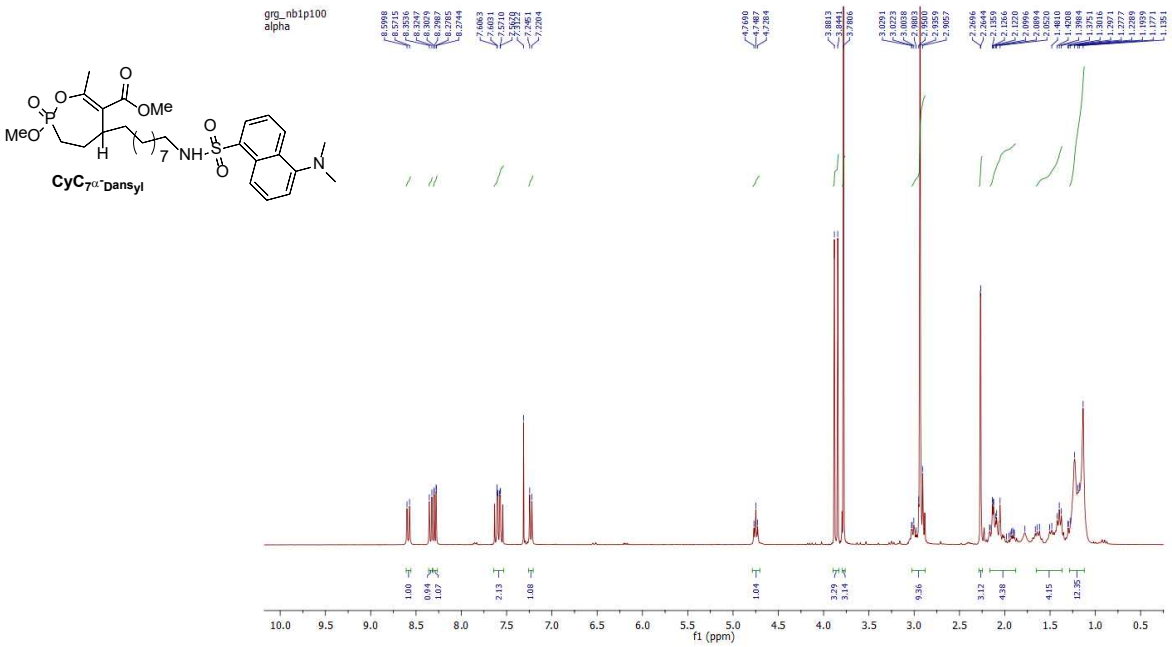
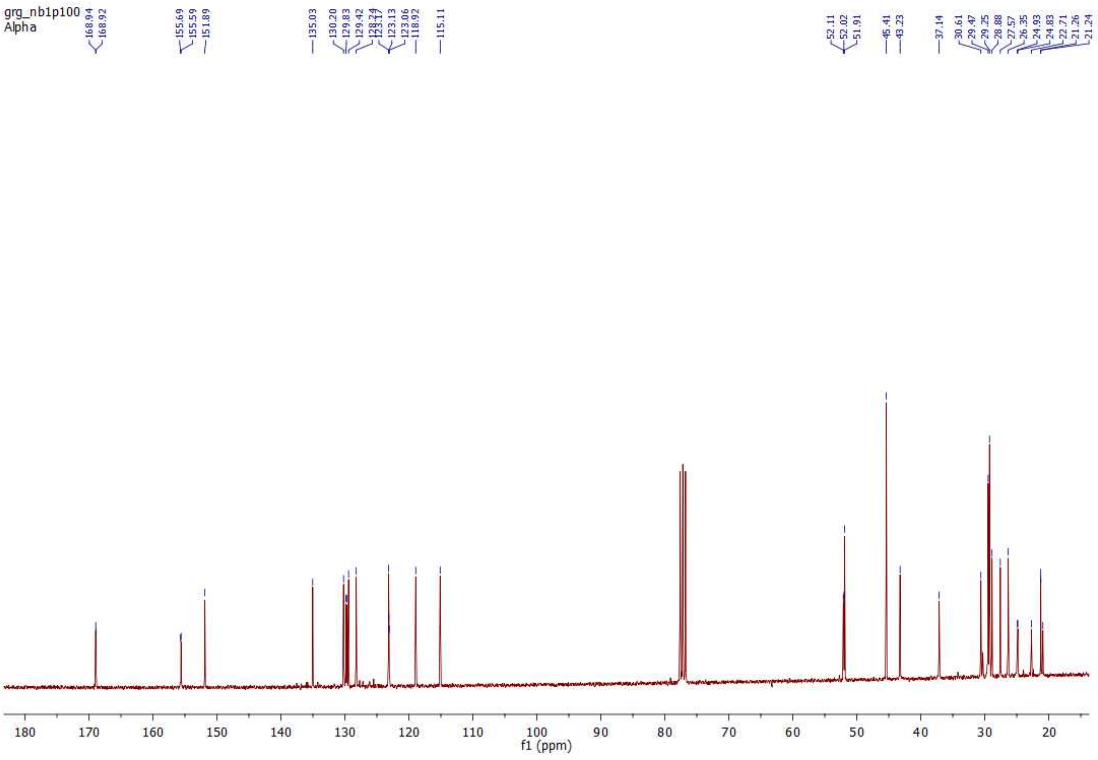


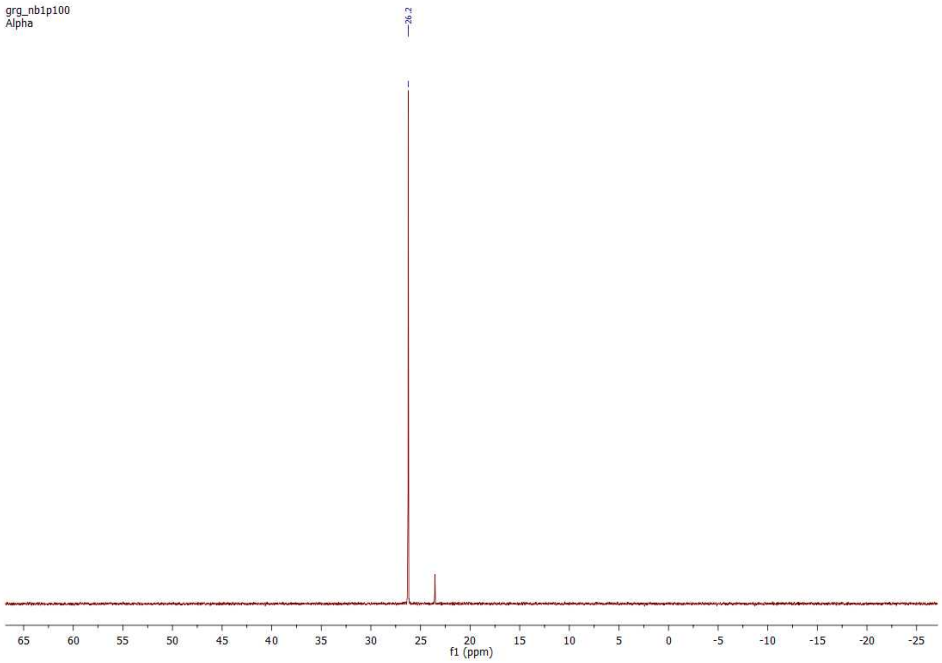
Figure S8. The $CyC_{7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$ accumulates in acidic compartments inside Raw264.7 macrophages. Raw264.7 macrophages were incubated with 100 µM **$CyC_{31\text{-Dansyl}}$**, **$CyC_{32\text{-Dansyl}}$**, **$CyC_{7\alpha\text{-Dansy}}$** or **$CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$** for 24 h before being stained with 1X BioTracker™ NIR633 Lysosome Dye (Sigma Aldrich) and processed for confocal fluorescence imaging. Quantitative analysis of the Dansyl fluorescent signal was performed on the BioTracker positive regions for each compound and plotted **(A)** as sinaplot-boxplot and expressed as arbitrary units (au), and **(B)** as density plot. Result are from 106 to 136 observed cells resulting in 1183 to 1955 segmented BioTracker positive regions. The *p*-value was calculated by using a two-tailed *t*-statistic test with Prism 4.0 (Graphpad, Inc).



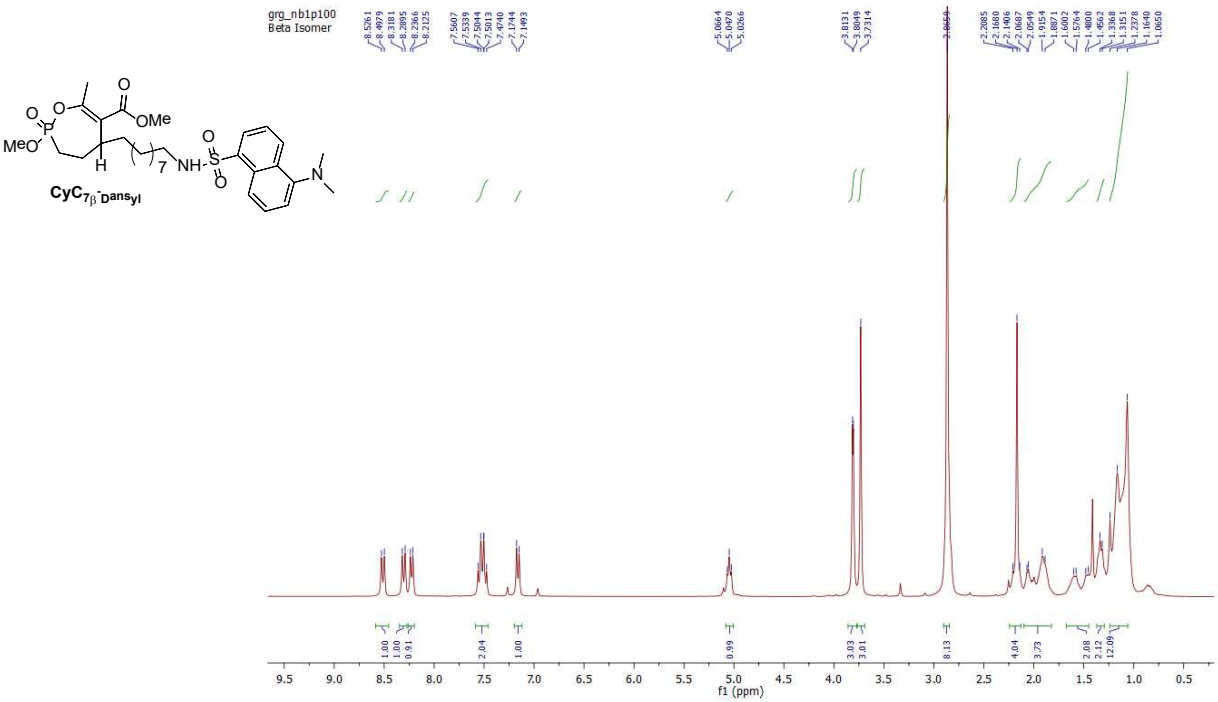
^{1}HNMR spectrum (300 MHz, CDCl3)



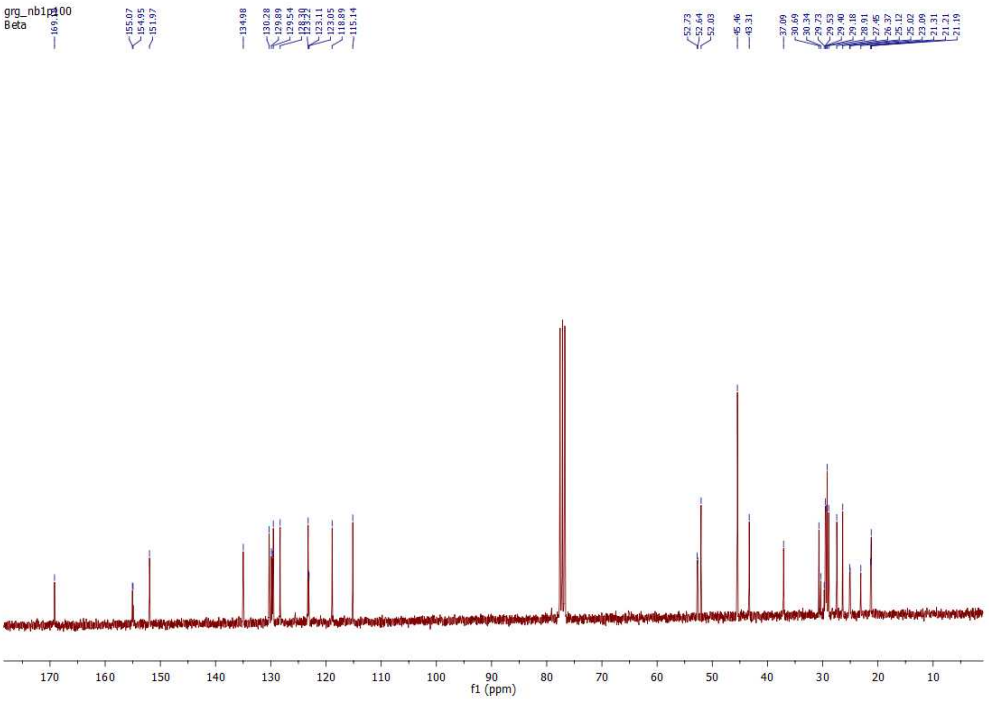
^{13}C NMR spectrum



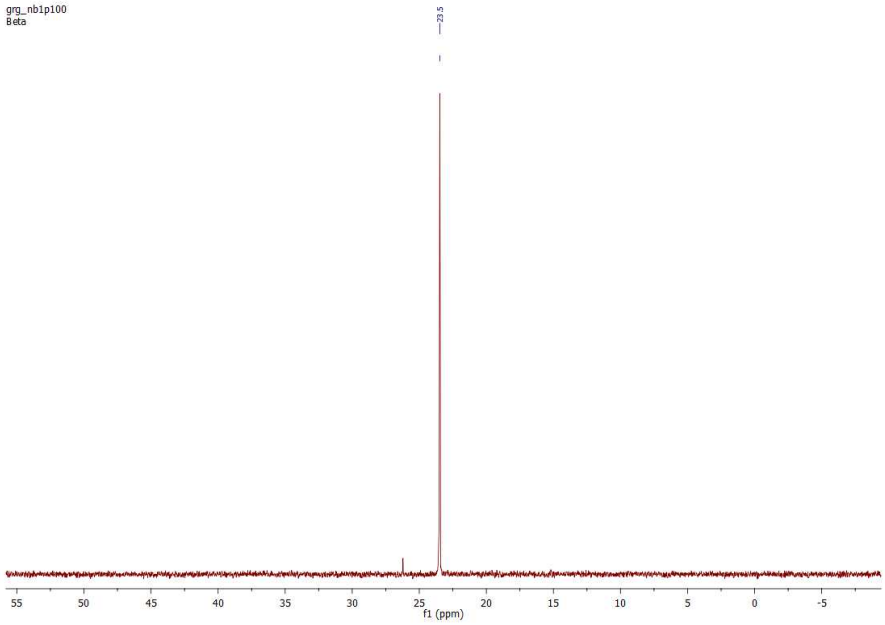
^{31}P NMR spectrum



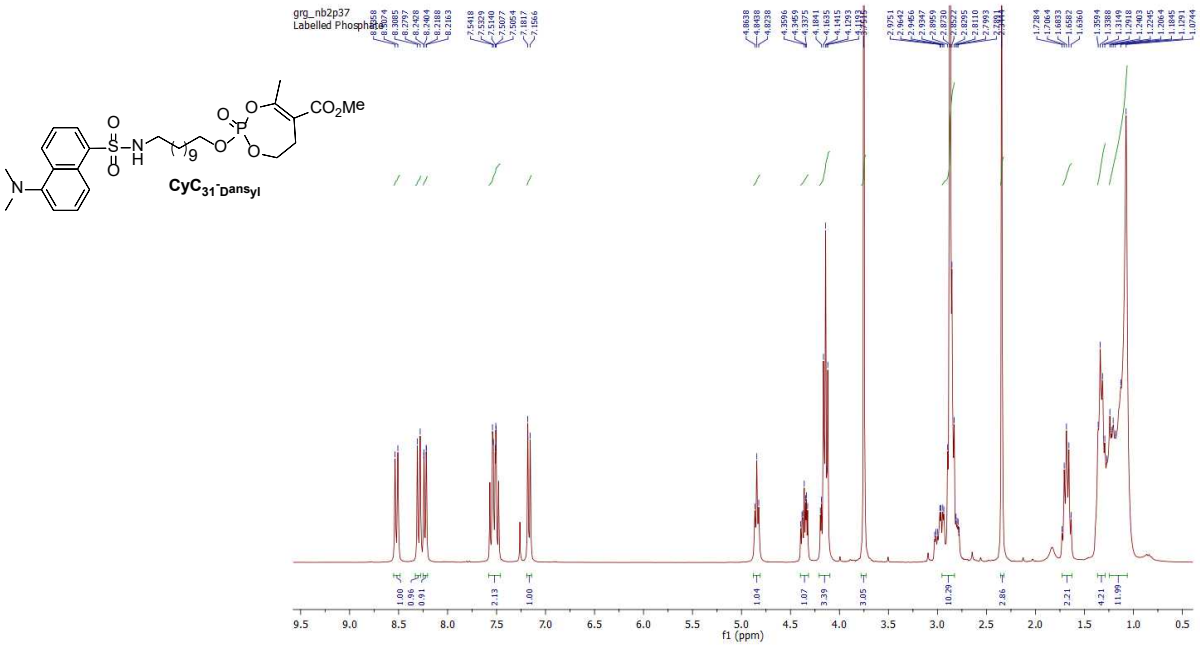
^{1}HNMR spectrum (300 MHz, CDCl3)



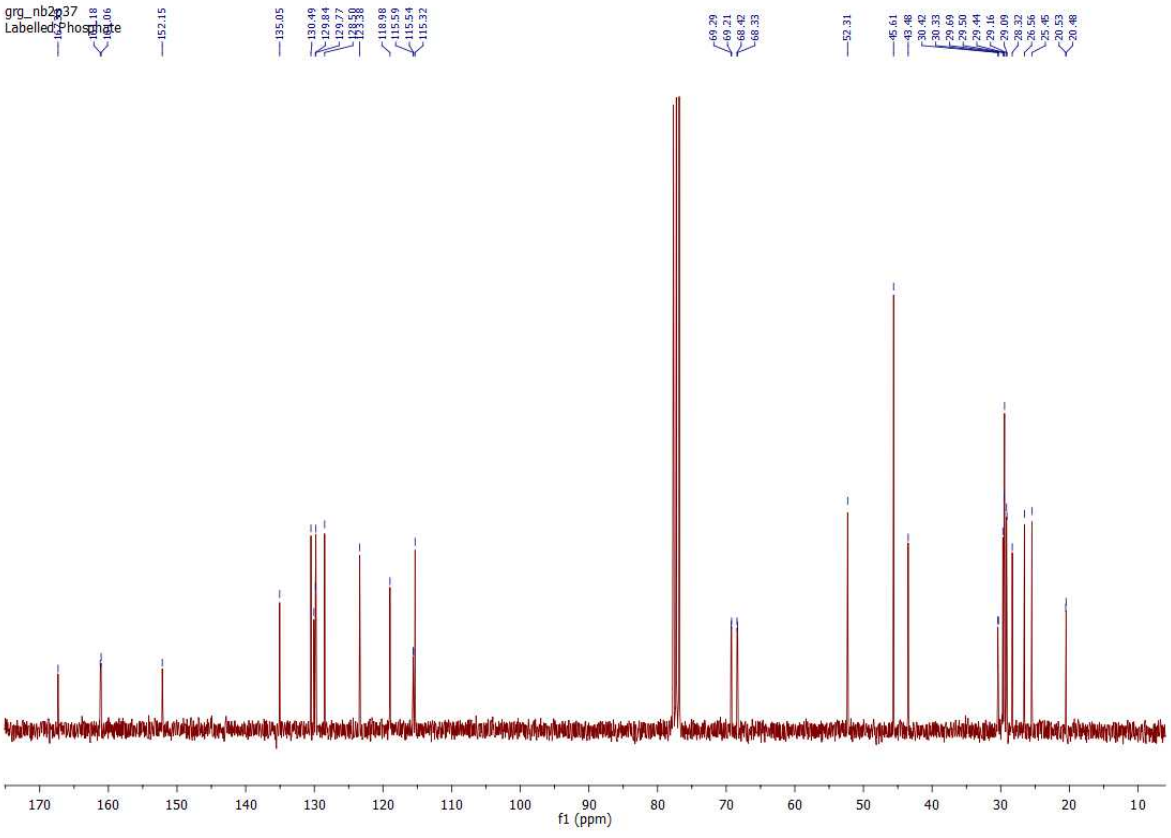
^{13}C NMR spectrum



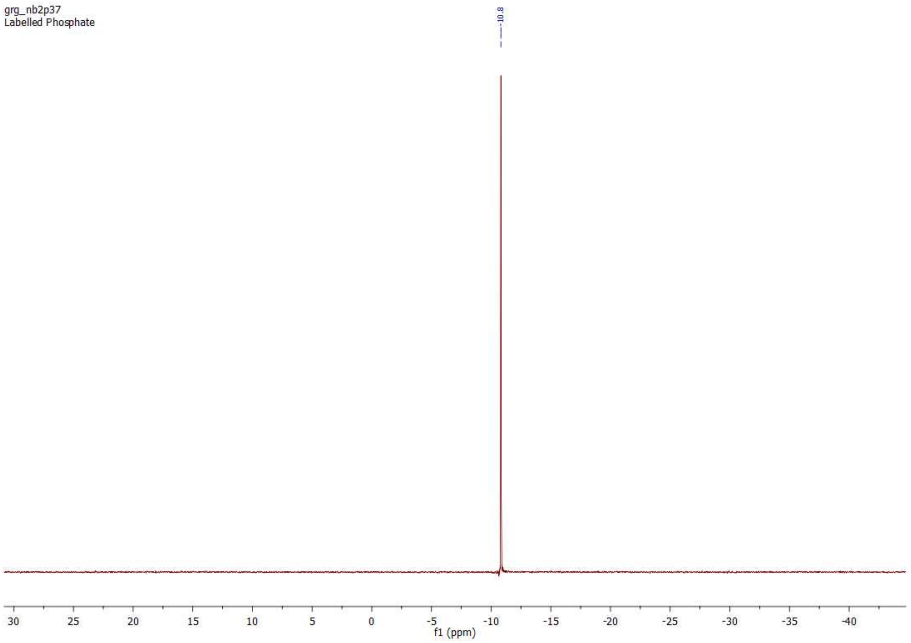
^{31}P NMR spectrum



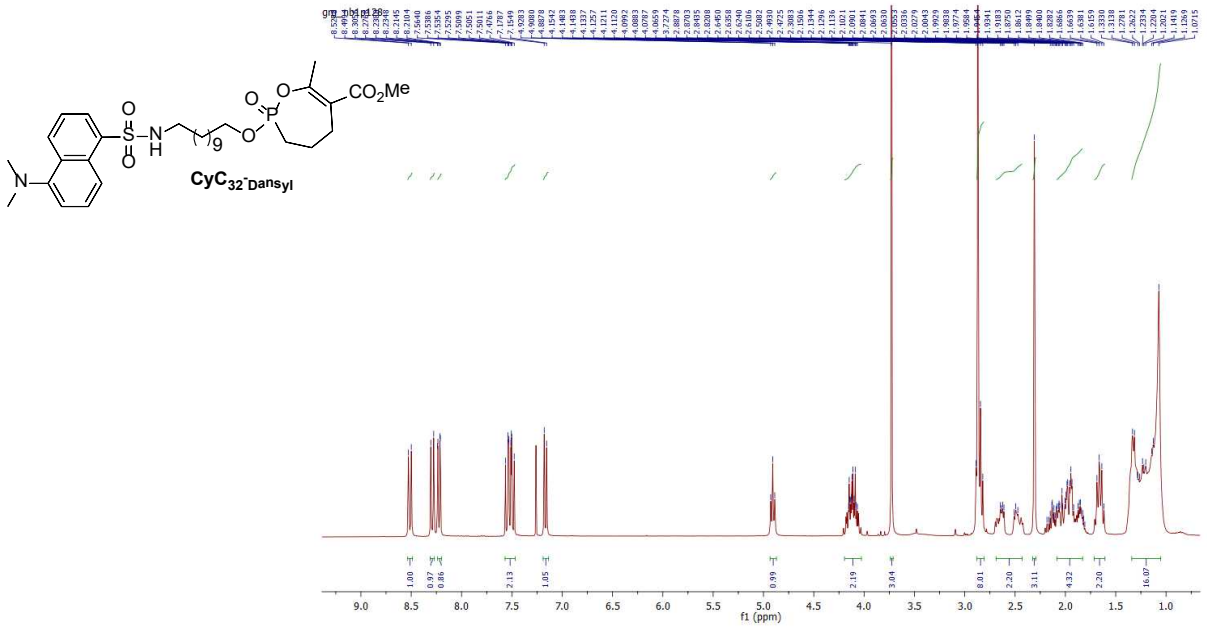
^{1}H NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)



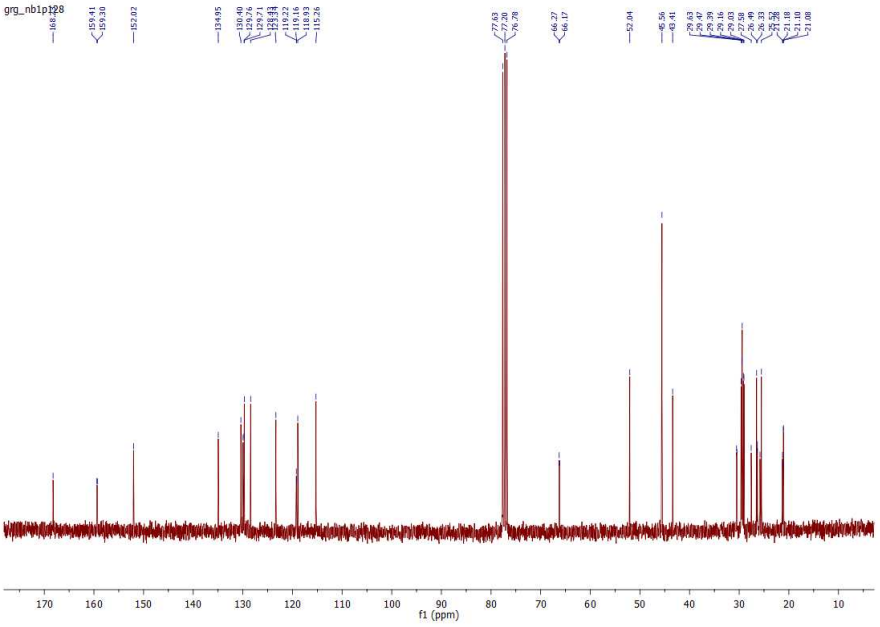
^{13}C NMR spectrum



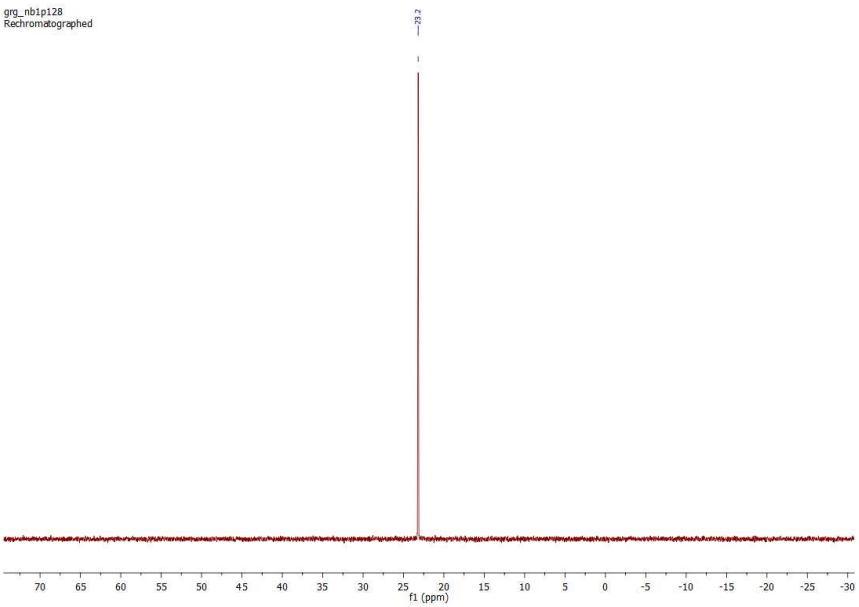
^{31}P NMR spectrum



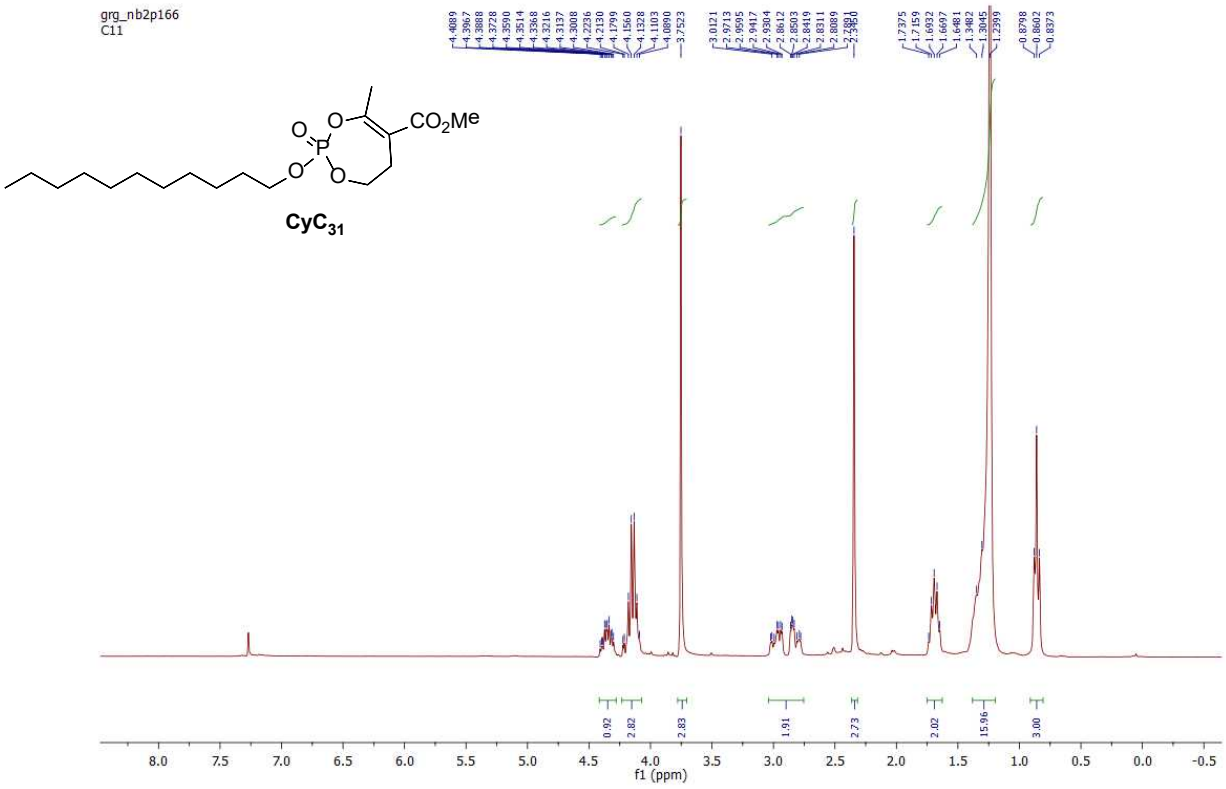
^{1}H NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)



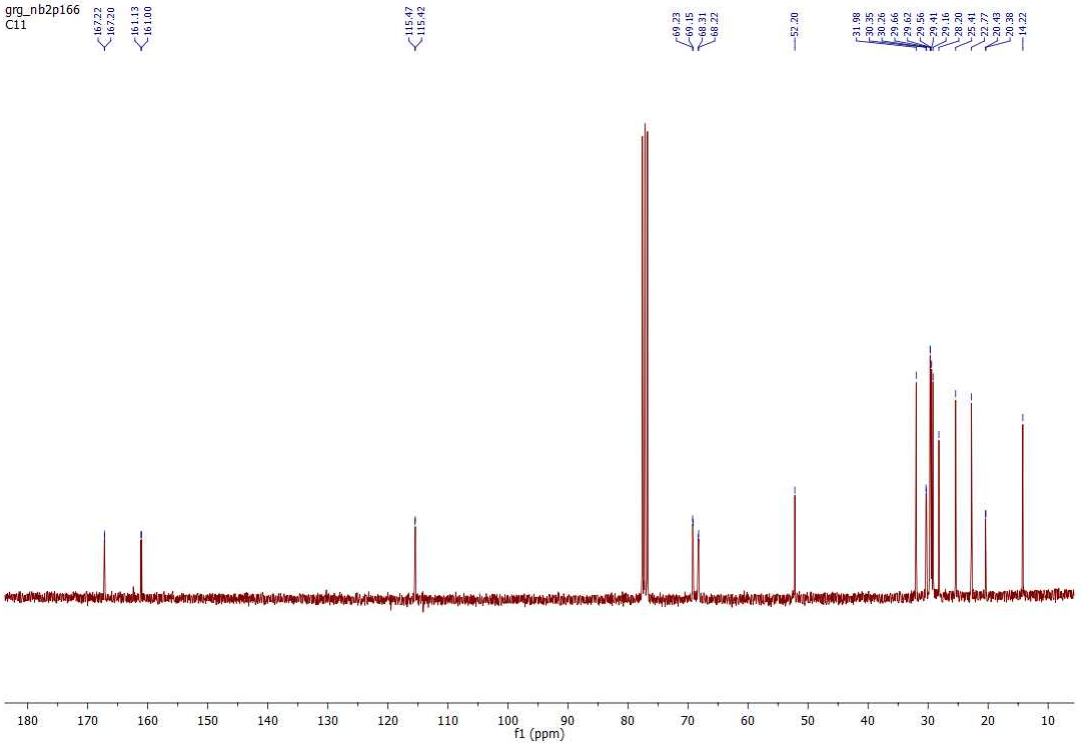
^{13}C NMR spectrum



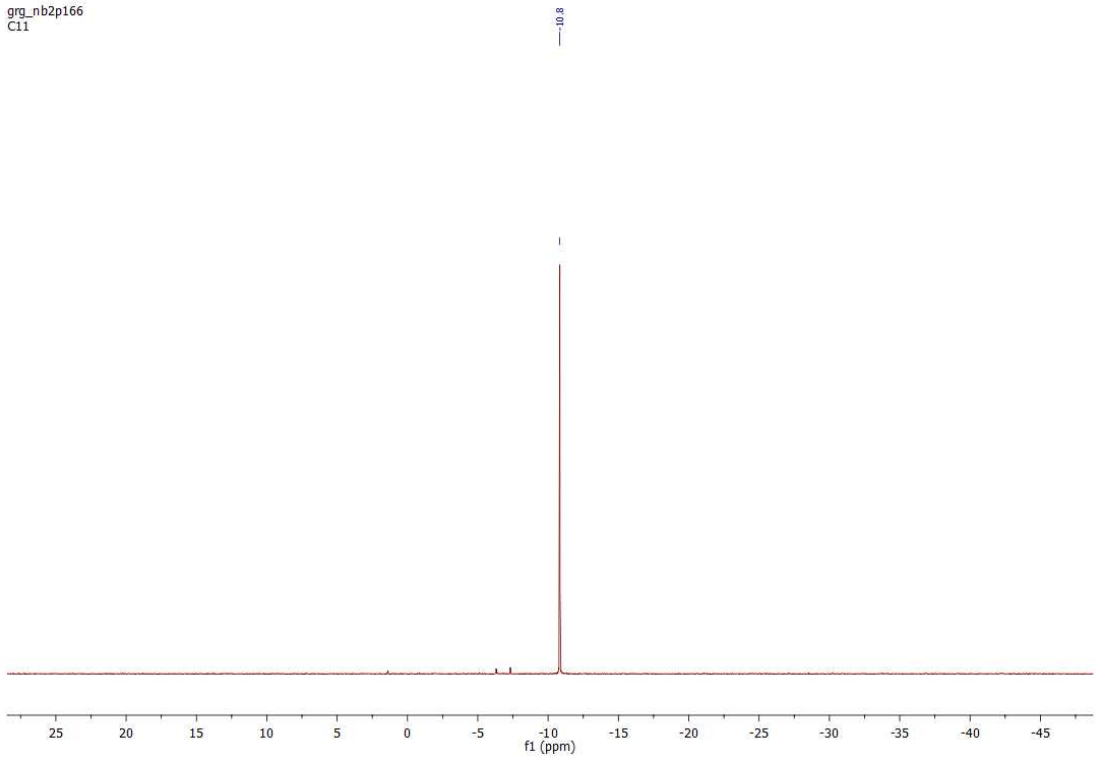
^{31}P NMR spectrum



^{1}H NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)

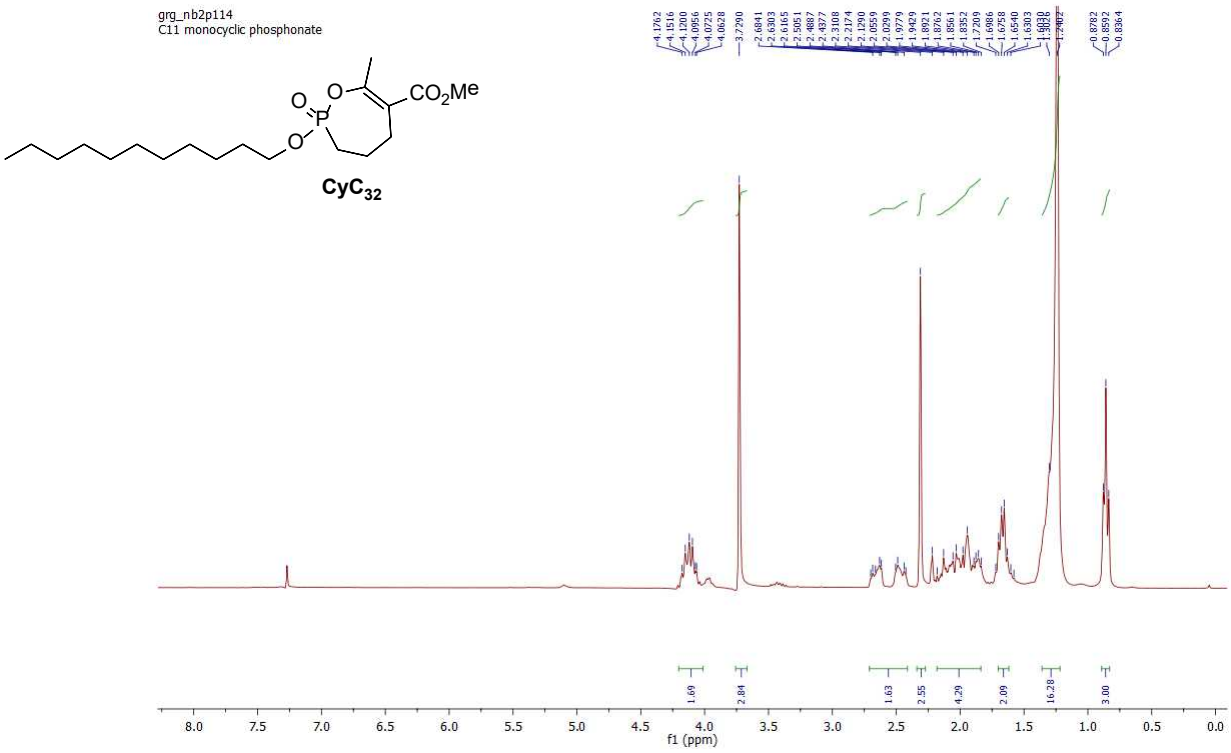


^{13}C NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)

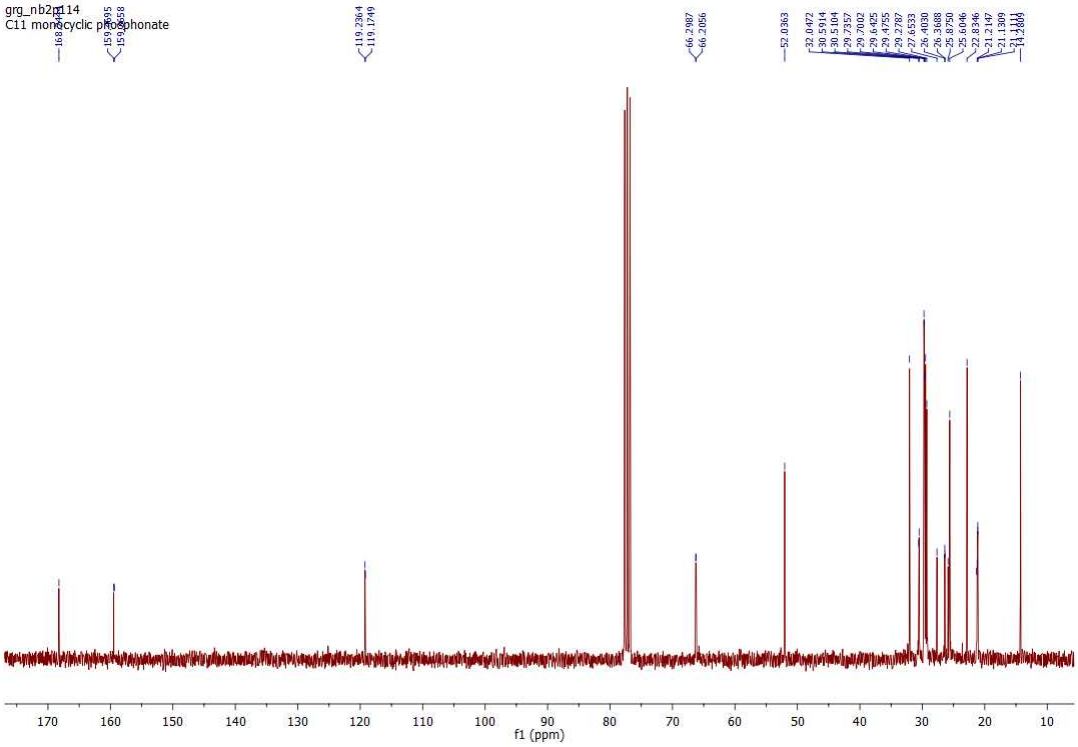


^{31}P NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)

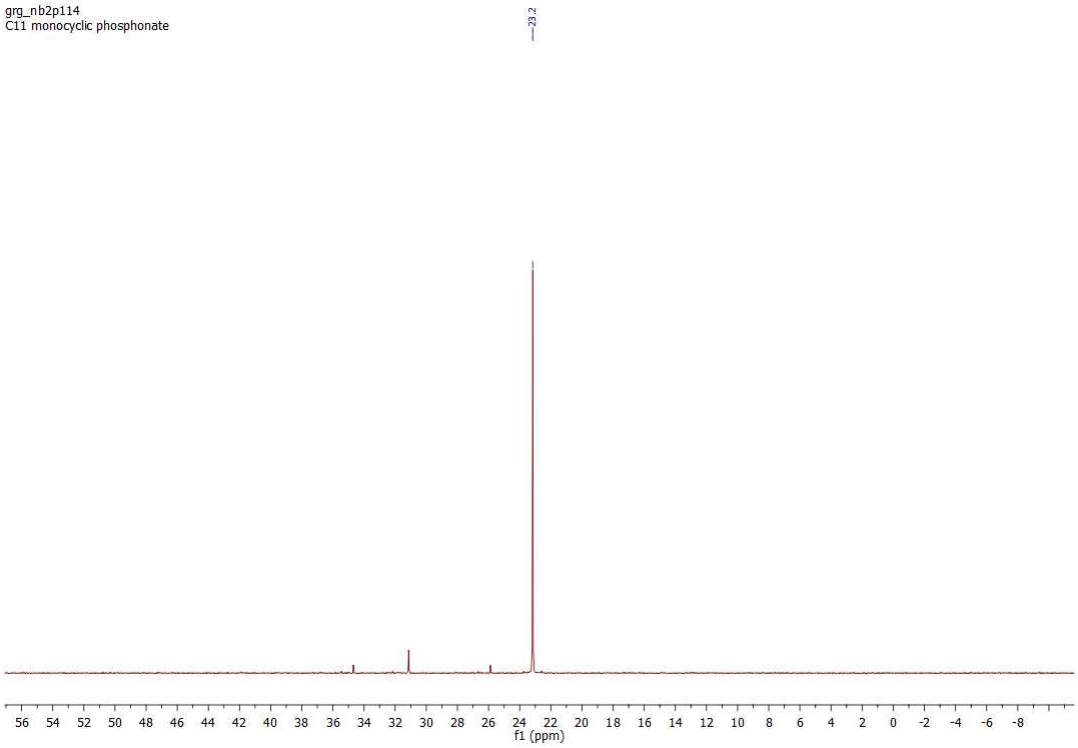
(CyC_{32})



^{1}H NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)



^{13}C NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)



^{31}P NMR Spectrum (300 MHz, $CDCl_3$)

Article 3

« Cyclophostin and Cyclipostins analogs counteract macrolide-induced resistance mediated by Erm(41) in *Mycobacterium abscessus* »

Morgane Sarrazin, Isabelle Poncin, Patrick Fourquet, Stéphane Audebert, Luc Camoin, Yann Denis, Pierre Santucci, Christopher D. Spilling, Laurent Kremer, Vincent Le Moigne, Jean-Louis Herrmann, Jean-François Cavalier et Stéphane Canaan

Manuscrit soumis

Comme cela a été décrit dans l'introduction, la présence d'une protéine Erm(41) fonctionnelle chez les isolats de *M. abscessus* suffit à conférer une résistance aux macrolides, incluant l'AZM et la CLR, au cours d'un traitement prolongé (Nash et al., 2009). La mise en place de cette résistance induite par les macrolides peut être problématique et à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques, laissant que peu d'alternatives de guérison pour les patients (Roux et al., 2015). Aujourd'hui, la caractérisation de molécules qui réversent la résistance aux antibiotiques est devenue une stratégie alternative attrayante, dans le but de réduire le nombre d'antibiotiques utilisés dans la thérapie et de préserver la sensibilité aux antibiotiques actuels (Laws et al., 2019). Par conséquent, l'inhibition d'Erm(41) permettrait de contrecarrer cette résistance et ainsi de restaurer la sensibilité aux macrolides chez *M. abscessus*. D'ailleurs, il a déjà été rapporté que l'association de la vancomycine ou de la rifabutine avec de la CLR permet de maintenir la sensibilité à la CLR, même lors d'une exposition prolongée sur des souches de *M. abscessus erm(41)*-positives (Mukherjee et al., 2017 ; Aziz et al., 2020).

L'identification d'Erm(41) comme cible du CyC_{17} suggérait que ce composé était capable d'inhiber son activité enzymatique qui était elle-même responsable de la résistance. Afin de confirmer qu'Erm(41) était bien une cible des CyC, nous avons réalisé des tests d'interaction, basés sur la compétition entre la sonde TAMRA-FP, possédant le même mécanisme d'action que nos composés, entre la protéine purifiée et les différents inhibiteurs CyC actifs sur *M. abscessus* (Viljoen et al., 2018 ; Nguyen et al., 2018a). En plus du CyC_{17} et du CyC_{31}, actifs sur la croissance *in vitro*, nous avons utilisé le $CyC_{8\alpha}$, et le $CyC_{8\beta}$, actifs sur la croissance intramacrophagique (Madani et al., 2019 ; Sarrazin et al., 2022). Nous avons montré que la protéine Erm(41) est capable d'interagir avec l'ensemble des quatre CyC testés avec aucune spécificité particulière. La modélisation 3D du complexe Erm(41)-CyC ainsi que l'analyse par spectrométrie de masse de l'interaction d'Erm(41) avec le CyC_{17} a permis de confirmer que cette interaction était covalente et que la position du CyC dans la protéine empêchait la fixation du co-facteur SAM, nécessaire à l'activité de l'enzyme. Ces résultats sont encourageants puisqu'ils suggèrent que l'activité inhibitrice des CyC peut être utilisée pour contrecarrer l'activité d'Erm(41) responsable de la résistance inductible aux macrolides à la fois *in vitro*, en utilisant les CyC_{17} et CyC_{31}, et au sein de macrophages infectés en utilisant les $CyC_{8\alpha}$ et $CyC_{8\beta}$. Dès lors, nous avons supposé que l'association d'un CyC avec un macrolide permettrait sur des souches sauvages d'éviter la génération de souches résistantes aux macrolides, et sur des souches résistantes de restaurer la sensibilité aux macrolides.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet antibactérien des CyC en association avec les principaux antibiotiques déjà utilisés en clinique contre *M. abscessus* comme l'AZM, la CLR, l'AMK, l'imipénem et la céfoxitine. Pour cela, nous avons tout d'abord évalué *in vitro* l'effet de l'association du CyC_{17} ou du CyC_{31} avec l'AZM, la CLR, l'AMK, l'imipénem ou la céfoxitine en microplaque grâce à la méthode de l'échiquier. L'interaction, synergistique, indifférent ou antagoniste, entre les deux composés a été déterminée grâce aux mesures des FIC index (FICI) qui ont été obtenus selon la méthode de référence (voir § **Chapitre II : II/ C) Association d'antibiotiques**). Finalement, nous avons pu obtenir quatre associations dont le FICI est inférieur à 0,5 et qui sont donc considérées comme synergiques.

L'association de l'AZM avec le CyC_{17} a montré un effet synergique évident avec un FICI de 0,19. Dans ce contexte, la meilleure combinaison présentait des valeurs de CMI_{AZM} et CMI_{CyC17} 8 fois et 16 fois inférieures à celles de l'AZM et du CyC_{17} seuls, respectivement. De même, l'association de la CLR avec le CyC_{17} (FICI = 0,16) permet de diviser par 8 la CMI de la CLR et de diviser par 32 la CMI du CyC_{17}. En ce qui concerne l'association CLR avec le CyC_{31}, les valeurs de CMI de la CLR et du CyC_{31} étaient respectivement 4 fois et 128 fois plus faibles que celles de la CLR et du CyC_{31} seuls. Enfin, l'association de la céfoxitine avec le CyC_{31} (FICI = 0,28) a montré aussi une synergie et a permis de diviser la CMI de la céfoxitine par 32 et la CMI du CyC_{31} par 4. Pour les autres associations testées, tous les FICI obtenus sont compris entre 0,5 et 2,5 montraient clairement un effet indifférent. En revanche, nous avons pu constater que l'ajout du CyC_{31} avec l'AMK permet de diviser la CMI de l'AMK par 4, bien que l'association soit considérée comme indifférente. En conclusion, ces résultats confirment que les CyC peuvent être associés avec d'autres antibiotiques déjà utilisés dans la polythérapie contre cette mycobactérie.

Dans une dernière partie, nous avons étudié la capacité des CyC à restaurer la sensibilité aux macrolides sur des souches dont la résistance avait été préalablement induite. Pour cela, nous avons exposé la souche *M. abscessus* CIP104536T, qui possède un gène *erm(41)* fonctionnel, à une concentration subinhibitrice 10 fois inférieure à la CMI en CLR (0,1 µg/mL) ou en AZM (0,5 µg/mL) pendant 14 jours. Au cours de cette induction, nous avons suivi deux paramètres : la CMI de la CLR et de l'AZM, ainsi que l'expression d'*erm(41)* par RT-qPCR pour chaque condition. L'incubation durant ces 14 jours avec de l'AZM ou de la CLR a permis d'augmenter significativement la CMI de l'AZM (> 100 µg/mL) et de la CLR (> 40µg/mL) jusqu'à arriver à un phénotype totalement résistant à ces deux macrolides. Ce phénomène est associé à une augmentation de l'expression d'*erm(41)* lorsque la bactérie est exposée (AZM ou CLR).

À la fin de l'induction, le séquençage du gène *rrl*, codant pour l'ARNr 23S, sur les souches traitées à l'AZM ou au CLR a montré qu'aucune mutation n'avait été générée au cours de l'exposition et confirme que la résistance induite observée est bien due à Erm(41). En parallèle, nous avons généré des mutants spontanés qui sont totalement résistants à la CLR et à l'AZM de manière irréversible, chez lesquels une mutation de l'A2059 dans le gène *rrl* a été substituée en guanine, empêchant ainsi l'interaction du macrolide avec sa cible.

Ensuite, nous avons testé l'activité du CyC_{17} ou du CyC_{31} en association avec l'AZM ou la CLR sur ces souches résistantes. Pour la souche exposée à l'AZM, trois associations (AZM-CyC_{17}, CLR-CyC_{17}/CyC_{31}) ont permis de restaurer efficacement la sensibilité aux macrolides et ceux même avec de faibles concentrations en CyC. La combinaison CLR-CyC_{17} s'est montrée la plus efficace pour abaisser la CMI de la CLR. En effet, une concentration de 0,05 µg/mL en CyC permet de diviser la CMI de la CLR par 8. Quant à la souche exposée à la CLR, deux combinaisons (CLR-CyC_{17}/CyC_{31}) ont permis de restaurer la sensibilité aux macrolides. La combinaison CLR-CyC_{17} s'est montré également la plus efficace pour abaisser la CMI de la CLR sur cette souche. En effet, une concentration de 0,4 µg/mL en CyC permet de diviser la CMI de la CLR par 8. En revanche, nous avons pu observer qu'il est nécessaire d'avoir une concentration en CyC plus élevée pour restaurer la sensibilité aux macrolides dans cette condition qu'avec une exposition à l'AZM. D'autre part, nous avons pu montrer que l'activité des CyC n'est pas modifiée sur les souches résistantes qui présentaient une mutation dans le gène *rrl*.

Au final, cette étude a permis de montrer que les CyC peuvent être associés avec d'autres molécules et sont capables de potentialiser l'activité des antibiotiques utilisés en clinique tels que la CLR ou la céfoxitine. D'autre part, nous avons pu montrer que les CyC sont de bons outils pour contrecarrer la résistance aux macrolides médiée par la protéine Erm(41) qui peut être à l'origine d'échec thérapeutique. À terme, les résultats obtenus sur le potentiel thérapeutique des CyC incluant les études synergiques et d'inhibition d'un mécanisme de résistance particulier permettront de proposer une alternative dans le schéma thérapeutique actuel.

Cyclophostin and Cyclipostins analogs counteract macrolide-induced resistance mediated by Erm(41) in *Mycobacterium abscessus*

Morgane Sarrazin[1], Isabelle Poncin[1], Patrick Fourquet[2], Stéphane Audebert[2], Luc Camoin[2], Yann Denis[3], Pierre Santucci[1], Christopher D. Spilling[4], Laurent Kremer[5,6], Vincent Le Moigne[7], Jean-Louis Herrmann[7,8], Jean-François Cavalier[1] and Stéphane Canaan[1,§]

[1] Aix-Marseille Univ., CNRS, LISM UMR7255, IMM-FR3479, Marseille, France

[2] INSERM, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille Protéomique, Aix-Marseille Univ., France

[3] Plateforme Transcriptome, Aix-Marseille Univ., CNRS, IMM-FR3479, Marseille, France

[4] Department of Chemistry and Biochemistry, University of Missouri St. Louis, MO, USA

[5] Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 34293 Montpellier, France

[6] INSERM, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France

[7] Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM, Infection et Inflammation, Montigny-Le-Bretonneux, France

[8] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Ile-de-France Ouest, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France.

§ Corresponding author: canaan@imm.cnrs.fr

ABSTRACT

Background:

Mycobacterium abscessus is an emerging pathogen causing severe pulmonary infections, particularly in individuals with underlying conditions, such as cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease. Macrolides, including clarithromycin and azithromycin, represent the current cornerstone of antibiotherapy against *M. abscessus* complex. However, prolonged exposure to macrolides can induce the emergence of Erm(41)-mediated resistance, limiting their spectrum of activity and often leading to therapeutic failure. Therefore, inhibiting Erm(41) could thwart this resistance mechanism to maintain macrolide susceptibility and avoid the therapeutic failure. In a previous study, the Erm(41) methyltransferase was identified as a target enzyme of Cyclipostins and Cyclophostin compounds (**CyC**).

Method

Herein, we took advantage of this feature to evaluate the *in vitro* activity of clarithromycin and azithromycin in combination with different **CyC** *via* the checkerboard assay on macrolide susceptible and induced macrolide-resistant *M. abscessus* generated by either clarithromycin or azithromycin exposure.

Results

Our results emphasize the use of the **CyC** to overcome Erm(41)-induced resistance, restore macrolide susceptibility and thus preventing the emergence of spontaneous resistant mutants.

Conclusion

This work should help to expand our therapeutic arsenal in the fight against a particularly antibiotic-resistant mycobacterial species and could provide the opportunity to revisit the therapeutic regimen for combating *M. abscessus* pulmonary infections in CF patients, and particularly in *erm(41)*-positive strains.

KEYWORDS

Mycobacterium abscessus, drug susceptibility, macrolide, resistance, synergy testing, Erm(41).

RUNNING TITLE

The **CyC** restore *M. abscessus* susceptibility to macrolide-induced resistance

Background

Mycobacterium abscessus is a rapid-growing mycobacteria (RGM) causing pulmonary diseases in vulnerable individuals such as cystic fibrosis (CF) or bronchiectasis patients [1-3]. These infections are particularly challenging to cure because *M. abscessus* is intrinsically resistant to most antibiotic classes and anti-tuberculosis drugs [4-8]. The current treatment consists in a multidrug regimen which involves an initial phase comprising a macrolide, usually clarithromycin (CLR) or azithromycin (AZM), associated with other antibiotics such amikacin (AMK), tigecycline, imipenem (IPM) or cefoxitin (CFX) for 3 to 12 weeks. This initial phase is followed by a continuation phase that comprises a macrolide, amikacin and one or several additional antibiotics (minocycline, clofazimine and moxifloxacin) depending on the severity of the infection, the tolerability of the regimen and the drug susceptibility profile of the strain [2,9]. Although macrolides are the cornerstone of anti-*M. abscessus* therapy, the treatment success (30-50%) remains poor [10,11], particularly due to the emergence of macrolide-resistant strains [12]. Macrolides target the large subunit of the bacterial ribosome and bind/occlude the nascent peptide exit tunnel, therefore inhibiting protein synthesis. However, prolonged exposure to macrolides, even at sub-inhibitory concentrations, can lead to the emergence of an inducible resistant phenotype mediated by the Erm(41) methyltransferase [13-17]. This enzyme is able to catalyze the specific methylation of the adenine 2270 of the 23S rRNA, which protects the ribosome from the macrolide activity. This mechanism can be observed *in vitro*, using a drug susceptible assay by prolonging the incubation of the bacteria up to 14 days instead of the classical 3-5 days [13,15]. This intrinsic resistance mechanism occurs in *M. abscessus* subspecies *M. abscessus* as well as in *M. abscessus* subspecies *M. bolletii*, both expressing a functional Erm(41) enzyme, unlike *M. abscessus* subspecies *M. massiliense* which harbors a truncated version of the *erm(41)* gene [13,18]. Sequencing of *erm(41)* is essential to determine the macrolide susceptibility pattern of clinical isolates [9] as inducible macrolide resistance is often associated with poor clinical outcomes and therapeutic failure [19,20]. Thus, a yet unmet medical need would consist to develop new therapeutic approaches to counteract the induction of resistance to macrolides in *erm(41)*-expressing strains and restore the susceptibility activity of macrolides in these strains [21,22]. Similar strategies have been set up with the use of β-lactamase inhibitors to render *M. abscessus* strains susceptible to β-lactams [7,23,24] and highlight the importance and potential of molecules able to block drug resistance as attractive therapeutic adjuncts to reduce and/or circumvent resistance to antibiotics. Recently, the combination of rifabutin with CLR has been reported to suppress

CLR resistance in *erm(41)*-expressing strains [24], whereby rifabutin acts as an inhibitor of *erm(41)* transcriptional induction, maintaining *M. abscessus* in a phenotypically susceptible state to CLR.

Cyclipostins and Cyclophostin analogs (**CyC**) represent attractive molecules with potent antibacterial activity against *M. abscessus in vitro* and inside infected macrophages with very low toxicity toward host cells [25-29]. Among this family of molecules, two enolphosphate analogs, **CyC$_{17}$** and **CyC$_{31}$**, were the most active growth inhibitors of the two variants S and R of *M. abscessus,* with minimal inhibitory concentrations (MIC) similar to those of the best drugs used in clinical settings [28,29]. These compounds react with enzymes containing a catalytic serine and/or cysteine in their active site by forming an irreversible covalent bond [30-33]. This characteristic was exploited to identify their target enzymes through competitive activity-based protein profiling (ABPP) approach [26-28,30,32-35]. In *M. abscessus*, 39 potential target enzymes of **CyC$_{17}$** were identified, most of which playing a role in lipid metabolism or cell wall synthesis [26]. In addition, 9 out of 39 have orthologs annotated as essential in the *Mycobacterium tuberculosis* genome [26]. Interestingly, 7 methyltransferases were also identified, including Erm(41). This finding highlights the potential of the **CyC** to thwart inducible macrolide resistance by blocking Erm(41), opening the possibility of exploiting these inhibitors as adjuncts molecules to suppress macrolide inducible resistance in the context of anti-*M. abscessus* chemotherapy.

Herein, we validated Erm(41) as an effective target of the **CyC** analogs and investigated their synergistic activity when given in combination with macrolides (CLR or AZM) and other commonly used antibiotics (AMK, CFX and IPM) in susceptible and induced macrolide-resistant *M. abscessus* strains. Our results emphasize the high efficacy of the **CyC** against induced macrolide-resistant strains by restoring the activity of macrolides. Opening the way to expand our therapeutic arsenal against the fight on *M. abscessus* strains.

Methods

Antibiotics and compounds

Clarithromycin (Euromedex, France) and Azithromycin (Sigma Aldrich) were solubilized in 96% ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO), respectively. Amikacin, Imipenem and Cefoxitin was from Toku-E, France and dissolved in water. The **CyC** analogs: **CyC$_{17}$**, **CyC$_{31}$**, **CyC$_{8\alpha}$** and **CyC$_{8\beta}$** were synthesized as described previously [32,36]. Stock solutions (10 mM) in which the CyC compounds (purity of ≥95%) [27,29] were found to be completely soluble in DMSO were prepared and stored at 4°C.

Strain and Bacterial culture

Escherichia coli DH10B cells used in cloning experiments were grown in Luria-Bertani broth (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) or on agar plates at 37°C. Transformants were selected on LB agar supplemented with 200 µg/mL hygromycin B (Toku-E). *Mycobacterium smegmatis* mc^{2}155 *groEL1ΔC* strain [37] was grown in Middlebrook 7H9 (BD Difco) supplemented with 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 0.2% glycerol (Euromedex, France) (7H9-S) at 37°C. For the *M. abscessus* CIP104536^T S morphotype, 7H9 was supplemented with 0.05% Tween 80, 0.2% glycerol and with 10% Oleic acid Albumin Dextrose Catalase (OADC) enrichment (BD Difco) (7H9-S^{OADC}).

Expression and purification of recombinant Erm(41)

The *MAB_2297* gene encoding Erm(41), was amplified by PCR using *M. abscessus* genomic DNA and the forward primer 5'-GTATAA**CCATGG**TTTCCGGCCAACGGTCGCGAC-3' (NcoI site in bold) and reverse primer 5'-CATATT**AAGCTT**TGCGCCGCCTGATCACCAG-3' (HindIII site in bold). The PCR product was cloned into the acetamide-inducible pMyC vector digested with NcoI and HindIII, as previously described [38], enabling the incorporation of a polyhistidine tag in the C terminus of the Erm(41) protein. The integrity of the insert was confirmed by DNA sequencing (Eurofins Genomics). Approximately 200 ng of pMyC-*erm(41)* were electroporated into *M. smegmatis* mc^{2}155 *groEL1ΔC* competent cells by using a Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) at 2500 V, 25 µF and 600 Ω. Recombinant clones were selected on 7H10 agar plates and used to inoculate 10 mL of 7H9-S supplemented with 50 µg/mL hygromycin at 37°C under shaking at 180 rpm. After 3 days, the preparation was used to inoculate 2 L of culture medium for a large-scale production and the bacteria were grown at 37°C under shaking until OD_{600nm} value reached 1.5-2.

Production of recombinant proteins was induced by adding acetamide (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 0.5% (*w/v*) for 16 h at 37°C. Cultures were harvested by centrifugation at 4,500×*g* for 30 min at 4°C. The bacterial pellets were resuspended in 30 mL CHES buffer (100 mM N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES), pH 10, 150 mM NaCl and 1% N-lauroylsarcosine) (buffer A) and lysed using three passages through a French Press (Aminco, Silver Spring, MD, USA) at 1,100 PSI. The supernatant was centrifuged for 30 min at 17,000×*g* and loaded onto a Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose gel column (Amersham Biosciences, UK). The column was extensively washed with buffer A to remove unspecific proteins and Erm(41) protein was eluted with buffer A containing 50 mM imidazole. Eluted fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE followed by dialysis overnight against a solution of 100 mM CHES, pH 10, 150 mM NaCl and 0.05% N-lauroylsarcosine (buffer B) to remove imidazole. The final concentration of the recombinant protein was measured by determination of OD_{280nm} using the molar extinction coefficient ($\varepsilon = 32290\ cm^{-1}.M^{-1}$), concentrated by ultrafiltration to a final concentration of 1.5 mg/mL and stored at -80°C.

CyC and Erm(41) interaction

To validate the inhibitory interaction between **CyC** analogs and Erm(41), 2.5 µg of Erm(41) was incubated for 30 min with different **CyC** inhibitors at a molar excess x_1 of 100 in buffer B at 37°C with shaking. Next, Erm(41) pretreated or not with the **CyC** analogs were further incubated with 5 µM ActivX TAMRA-FP probe (Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature in the darkness. The reaction was stopped by adding 5X Laemmli reducing buffer followed by boiling and proteins were separated by 12% SDS-PAGE. Subsequently, TAMRA FP-labeled proteins were detected by fluorescent gel scanning (TAMRA: λ_{ex} 557 nm, λ_{em} 583 nm) using the Cy®3 filter of a ChemiDoc MP Imager (Bio-Rad) before staining the gels with Coomassie Brilliant Blue dye. Densitometric analyses were performed using the ImageLab™ software version 5.0 (Bio-Rad) to determine the fluorescence intensity content per sample. All raw data were exported as CSV files, imported in the R studio software (The R Project for Statistical Computing, version 4.2.1) and graphs were plotted with the ggplot2 package (version 3.4.0). Histogram represented the mean ± standard deviation of two independent replicates.

Molecular docking *in silico*

The 3D models structures of Erm(41) protein (UniProt accession no. B1MAV7) were built with the Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis using Erm(E) structure

from *Saccharopolyspora erythraea* (PDB 6NVM) and Erm(38) structure from *M. smegmatis* (PDB 7F8B) as structural templates [39].

The PyMOL Molecular Graphics System (version 1.4, Schrödinger, LLC) was used as working environment with an in-house version of the AutoDock/Vina PyMOL plugin to perform *in silico* molecular docking with the **CyC$_{17}$** [40,41]. A model structure file was generated for the **CyC$_{17}$** molecule, and its geometry was refined using the Avogadro open-source program (version 1.1.1. "http://avogadro.openmolecules.net/"). The box size used for the receptor was chosen to fit the whole protein and to allow nonconstructive binding positions, and was further refined to the identified binding site of the inhibitor in Erm(41) protein.

Mass spectrometry

Global mass analyses were determined on purified Erm(41) (15 mg/ml in 100 mM CHES, pH 10, 150 mM NaCl and 0.05% N-lauroylsarcosine buffer) preincubated or not with **CyC$_{17}$** at a molar excess, x_I, of 100. Ten microliters of the proteins sample solution ± **CyC$_{17}$** were desalted on ZipTip C4 (Millipore, Molsheim, France) and eluted by 3 µL of sinapinic acid matrix solution in 0.3% TFA/CH3CN (50:50 v/v). One microliter of the latter sample was analyzed on a MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflex III spectrometer (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) controlled by the Flexcontrol 3.0 package (Build 51). This instrument was used at a maximum accelerating potential of 25 kV and was operated in linear mode using the *m/z* range from 20,000 to 100,000 (LP_66kDa_method) as already described [30]).

Erm(41) quantification

Proteomic studies on macrolide-resistant strains were performed from 20 mL of *M. abscessus* cultures. Cells were washed twice in PBS (Phosphate Buffer Saline) solution pH 7 and lysed by mechanical disruption on a BioSpec Beadbeater in PBS containing 8 M urea. Quantification of Erm(41) was performed using Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis using an Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) online with an Ultimate 3000RSLCnano chromatography system (ThermoFisher Scientific, Sunnyvale, CA). MS was performed using a data-independent acquisition (DIA) mode. Quantification was based on relative label-free intensity (LFQ) calculated using the DIA-NN 1.8 algorithm [42]. Main DIA-NN output file was further filtered and the LFQ intensity was calculated using our DIAgui package at 1% q-value (https://github.com/marseille-proteomique/DIAgui) [43]. Relative quantification was calculated using fold changes of LFQ intensity under CLR or AZM exposure relative to LFQ intensity in non-exposure condition.

206 **Preparation of Anti-Erm(41) Immune Serum**

207 Mouse anti-Erm(41) antibodies were produced as follows. A His-tagged version of Erm(41)
208 was prepared as previously described. Purified Erm(41) was subcutaneously injected into five
209 BALB/c mice (Janvier, France) (20 µg per mouse) with incomplete Freund's adjuvant (1/1,
210 vol/vol) on days 1, 28, and 57. One week after days 28 and 57, blood samples were obtained
211 from the retroorbital plexus, centrifuged, and stored at -20°C until use. Mouse experiments were
212 performed according to institutional and national ethical guidelines (Agreement n°783223;
213 approved by the Ministry of Higher Education and Research with APAFIS#11465-
214 2016111417574906v4).

215 **Synergistic assay**

216 Synergistic activities were tested in 96-well microplates by the checkerboard assay in
217 Middlebrook 7H9-S^{OADC} broth and using microdilution method [44]. MIC of the antibiotics
218 were determined in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid (Thermo-
219 Fisher Scientific, ref. 167008) using optical density to assess growth. Log-phase bacteria were
220 diluted to a cell density of 5×10^6 cells/mL in 7H9-S^{OADC} medium. Then, 100 µL of this bacterial
221 suspension (5×10^5 cells final per well) was added to each well containing 100 µL of the 7H9-
222 S^{OADC} medium, serial two-fold dilutions of the selected antibiotics or controls to a final volume
223 of 200 µL. In addition, wells containing 200 µL of 7H9-S^{OADC} medium only were used as
224 sterility/background controls, whereas wells containing 100 µg/mL kanamycin (Euromedex)
225 was used as positive control for growth inhibition. Plates were incubated at 37°C for 4 to 5
226 days. The optical density (OD) at 600 nm was quantified using a Tecan Spark 10M™ multimode
227 microplate reader (Tecan Group Ltd., France). Relative growth units were defined as: RGU% =
228 (test well OD_{600nm}/mean OD_{600nm} of growth control wells) ×100. For each condition, three
229 biological replicates were performed. The MIC of each drug was defined as the lowest drug
230 concentration that inhibited more than 90% of the bacterial growth.

231 The fractional inhibitory concentration index (FICI) is the reference parameter for quantifying
232 the interaction between two antibiotics in a combination [45]. The fractional inhibitory
233 concentration (FIC) of antibiotic A is defined as the MIC of antibiotic A in the combination
234 divided by the MIC of antibiotic A alone, and *vice versa* for the FIC of antibiotic B. The FICI
235 value was obtained by the sum of the FIC_A and FIC_B. A combination with an FICI of less than
236 0.5 is considered synergistic; between 0.5 and 4, the effect is considered indifferent; and when
237 the FICI is greater than 4, antagonistic [45]. All FICI presented correspond to the minimal FICI

obtained. All the results were exported as CSV files, imported in the R studio software and graphs were plotted with the ggplot2 package.

Induction of macrolide resistance in *M. abscessus* strains

Macrolide resistance was induced in the *M. abscessus* S reference strain following exposure to CLR or AZM for 14 days. Briefly, *M. abscessus* S strain was used to inoculate 10 mL of 7H9-S^{OADC} in absence/presence of 0.1 µg/mL CLR or 0.5 µg/mL AZM corresponding to around 10 times lower than the CMI values, at an $OD_{600\ nm}$ of 0.05. After 5 days of incubation at 37°C with shaking (50 rpm), 0.2 mL of the preparation was used to inoculate 10 mL of fresh culture medium with or without CLR/AZM, and after 5 additional days of incubation, 0.2 mL of the latter preparation was used to re-inoculate 10 mL of fresh culture medium with or without CLR/AZM. The MIC of CLR or AZM was determined before macrolide exposition and during the induction phase at 5, 10, and 14 days. Susceptibility testing was performed in Middlebrook 7H9-S^{OADC} broth using the microdilution method. MIC of CLR and AZM were determined in 96-well flat-bottom Nunclon Delta Surface microplates with lid using the same method, as described in the previous section. The MIC of each drug was defined as the lowest drug concentration that inhibited more than 90% of the bacterial growth. For each condition, three biological replicates were performed.

RNA extraction and reverse transcription

RNA was prepared from 10^9 *M. abscessus* cells at different time points 1, 2, 5, 6, 7, 10, 11, 12 and 14 days. The bacteria were harvested and frozen at -80°C beforehand. Pellet was resuspended in homogenization solution supplemented of 2.5% 1-Thioglycerol (*v*/*v*) and then lysed by mechanical disruption on a BioSpec Beadbeater. Total RNA was purified using Maxwell® 16 miRNA Tissue Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions with an extra TURBO DNase (Invitrogen) digestion step to eliminate the contaminating DNA. Finally, the RNA quality was assessed by Tapestation system (Agilent). To obtain cDNAs, GoScript™ Reverse Transcription System protocol (Promega) was used. The final mix contained 1 µg total RNA, 0.5 µg random primers (Promega), 4 µL GoScript™ 5X Reaction Buffer (Promega), 2 µL of 25 mM $MgCl_2$, 1 µL 40 mM dNTP and 1 µL GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega).

Quantitative PCR analysis

Quantitative real-time PCR (qPCR) analyses were performed on a CFX96 real-time system (Bio-Rad). The reaction volume was 15 µL, and the final concentration of each primer was 0.5 µM. Specific primers used for qPCR are the following: e*rm(41)* forward 5'-CTCAGGGGAGTTCGTTGTGG-3' and reverse 5'-CCGCTATCCGGACATCTTCC-3' and *rrs* (*MAB_r5051*) forward 5'-CATGGTGAGTGGTGCAAAGC-3' and reverse 5'-AGTCTGGGCCGTATCTCAGT-3'. The cycling parameters of the qPCR were 98°C for 2 min, followed by 45 cycles of 98°C for 5 sec, 64°C for 10 sec, and 72°C for 1 sec. A final melting curve from 65°C to 95°C was added to determine the specificity of the amplification. To determine the amplification kinetics of each product, the fluorescence derived from the incorporation of SYBERGreen into the double-stranded PCR products was measured at the end of each cycle using the Sso Advanced Universal SYBRGreen Supermix kit (Bio-Rad, France). The results were analyzed using Bio-Rad CFX Maestro software, version 2.3 (Bio-Rad, France). The 16S RNA gene (*rrs*) was used as a reference for normalization. For each point, a technical duplicate was performed. All the results were exported as CSV files, imported in the R studio software and graphs were plotted with the ggplot2 package.

Results

Characterization of the CyC-Erm(41) interaction

In a previous study, competitive ABPP conducted with the **CyC17** inhibitor allowed identifying the Erm(41) methyltransferase responsible for inducible macrolide resistance as biological target in *M. abscessus* at a permutation false discovery rate of 5% [26]. To investigate whether other **CyC** analogs displaying activity against *M. abscessus* interact and inhibit Erm(41), the *erm(41)* gene (*MAB_2297*) was cloned within a homemade pMyC vector in frame with a 6xHis-tag, allowing strong expression of Erm(41)-His_6 in the presence of acetamide [46]. The recombinant protein (theoretical mass ~ 22 400 Da) was produced in *M. smegmatis* mc^2155 *groEL1ΔC*, and purified to homogeneity by nickel affinity, leading to around 20 mg of pure recombinant protein per liter of culture. Purity and the molecular weight were checked by 12% SDS-PAGE and global mass spectrometry (**Figure 1**).

Considering the structure and mechanism of action of the **CyC** analogs on catalytic serine or cysteine active residues, a chemically relevant fluorophosphonate (FP) bearing a fluorophore (*i.e.*, rhodamine for TAMRA-FP) and exhibiting a similar mode of action [33,47] was selected and tested in competitive inhibition tests to assess the covalent interaction between Erm(41) and various **CyC**. Purified Erm(41) was first incubated with either **CyC17** and **CyC31** displaying potent activity against extracellularly-growing *M. abscessus* or **CyC8α** and **CyC8β** active only against intracellularly-growing *M. abscessus* (**Figure 1B**) [26,28,29]. The Erm(41)-CyC complexes were further co-incubated for 1 h with TAMRA-FP and equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining (**Figure 1C, upper panel**) and in-gel fluorescence for TAMRA detection (**Figure 1C, middle panel**). In each case, pre-treatment with the **CyC** molecules resulted in a significant decrease in the fluorescence intensity *vs.* the control, indicating that the reaction with the TAMRA probe was impeded in the Erm(41)-**CyC** adducts. Comparison of the fluorescence intensity between the four **CyC**-Erm(41) complexes and the control condition without **CyC**, showed a decrease in fluorescence of ~50-60% (**Figure 1C**). Surprisingly, incubation with higher concentrations of CyC, up to a molar excess x_I of 200 related to 1 mol of Erm(41), did not further reduce the fluorescence intensity (data not shown). Taken together, these results suggest that the four **CyC8α**, **CyC8β**, **CyC17** and **CyC31** interact with Erm(41) in a similar manner, confirming that this methyltransferase is an effective target of these inhibitors. The fact that the CyC-mediated inhibition of fluorescence was not complete, remains however unexplained.

To further confirm this interaction, the **CyC$_{17}$**-Erm(41) complex obtained above was subjected to MALDI-TOF mass spectrometry (**Figure 1D**), which allows to track mass changes if the **CyC** inhibitor is covalently bound to the protein. Total mass results showed the presence of two peaks: a first peak (20,409.9 ± 3 Da) corresponds to the unmodified protein, and a second one (20,710 Da) to the **CyC$_{17}$**-bound Erm(41) adduct. It is noteworthy, however, that the observed 300.4-Da mass shift increment in global mass was 146.08 Da lower than the expected **CyC$_{17}$** theoretical molecular mass of 446.28 Da (**Figure 1D**). Such a mass difference is consistent with previous studies with the thioesterase TesA [31], the antigen 85 complex [33] and the hydrolase HsaD [30] where further rearrangement of the covalently bound **CyC$_{17}$** inhibitors has occurred, resulting in the loss of the methyl 2-acetyl-4-hydroxybutanoate moiety to reach a stable thermodynamic state. Overall, these results therefore support the formation of a covalent and irreversible Erm(41)-**CyC** complex.

To identify the binding site of the CyC into the protein, we generated two Erm(41) three-dimensional structural models based on the *Saccharopolyspora erythraea* Erm(E) structure that shares 28% sequence identity with Erm(41) (PDB id: 6NVM) and on the *M. smegmatis* Erm(38) structure that shares 30% sequence identity with Erm(41) (PDB id: 7F8B) [48,49]. Both models share 100% of confidence score and sequence coverage of 92% with Erm(41) (**Figure 2**). Although the two models generated slightly different 3D structures, they unraveled an Y-shaped catalytic pocket able to accommodate the *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) co-factor. SAM is the methyl donor for Erm(41) to methylate the 23S rRNA at the adenine 2270 [50,51]. The Erm(41) pocket comprises mostly hydrophobic and positive-charge residues at its entrance, facilitating the interaction with the negatively-charged rRNA, for the methyltransferase reaction.

The docking of **CyC$_{17}$** in the Erm(41) pocket generated from the two structural models revealed that this **CyC** would adopt a favorable that should prevent the positioning of SAM in active site (**Figure 2B and D**). Taken together, these 3D models along with the biochemical data not only confirmed the ability of **CyC$_{17}$** to interact with Erm(41), but importantly, strongly suggest that its location inside the catalytic pocket would prevent fixation of SAM, rendering the enzyme inactive.

Combined efficacity of the CyC with other drugs on macrolide-susceptible strains

We investigated the *in vitro* interaction of the **CyC** in association with a panel of drugs used in clinical settings: CLR, AZM, AMK, IPM and CFX. The **CyC$_{17}$** and **CyC$_{31}$** which are the best

inhibitors of extracellularly-growing *M. abscessus* [26] have been selected and tested with CLR and AZM using the checkerboard assay. In our assay, the MIC of each compound tested alone was 5 µg/mL for AZM, 0.75 µg/mL for CLR, 3.2 µg/mL for **CyC17** and 20 µg/mL for **CyC31**. The association of AZM with **CyC17** showed a clear synergistic effect with a fractional inhibitory concentration index (FICI) of 0.19 (**Figure 3A**). In this context, the best combination displayed MIC_{AZM} and MIC_{CyC17} values that were 8-fold (0.63 µg/mL) and 16-fold lower (0.2 µg/mL) than that of AZM and **CyC17** alone, respectively. Also, the association of CLR with **CyC17** and **CyC31** showed a synergistic effect with a FICI of 0.16 and 0,38 respectively (**Figure 3B and C**). In this context, the best combination displayed MIC_{CLR} and MIC_{CyC17} values that were 8-fold (0.094 µg/mL) and 32-fold lower (0.025 µg/mL) than that of CLR and **CyC17** alone, respectively. About **CyC31**-CLR association, the MIC_{CLR} and MIC_{CyC31} values were 4-fold (0.19 µg/mL) and 128-fold lower (0.15 µg/mL) than that of CLR and **CyC31** alone, respectively. Regarding the **CyC31**-AZM association, no effect could be measured on either compound for every combination, with calculated FICI between 0.63 and 2.5, the interaction was qualified as indifferent (**Figure S1)**.

We next evaluated the *in vitro* activity of AMK, IPM or CFX in association with **CyC17** or **CyC31**. In our conditions the MIC values of AMK, IPM and CFX alone were 10 µg/mL, >20 µg/mL and 10 µg/mL, respectively similar to those found in the literature [52]. As observed above with AZM and CLR, the combination of CFX with **CyC31** showed a synergistic effect, with a FICI of 0.28 (**Figure 3D**), thus resulting in 32-fold (0.31 µg/mL) and 4-fold (5 µg/mL) decrease in MIC values of CFX and **CyC31** respectively. For the other combinations, including **CyC17**-AMK, **CyC31**-AMK, **CyC17**-IPM, **CyC31**-IPM and **CyC17**-CFX, the FICI values were between 0.51 and 2.0, considered as indifferent interactions (**Figure S1**). However, it should be noted that in the **CyC31**-AMK association, the presence of **CyC31** allow a 2-fold decrease in MIC_{AMK} in 0.15-1.25 µg/mL interval and a 4-fold decrease in MIC_{AMK} in 2.5-10 µg/mL interval.

Globally, these results suggest that the **CyC** exert a positive effect when associated with other antibiotics, notable with AZM, CLR and CFX with FICI including between 0.16 and 0.38. These associations allow to obtain MIC for antibiotic and **CyC** significantly reduced with at least a 4-fold reduction.

Induction of macrolide resistance and *erm(41)* expression

The validation of Erm(41) as a target of the **CyC** prompted us to evaluate the capacity of these inhibitors to block the Erm(41)-mediated inducible macrolide resistance in *M. abscessus*. To do so, *M. abscessus* was first pre-exposed to CLR or AZM for 14 days, as previously reported in [13-17]. To avoid the generation of spontaneous resistant mutant in *rrl* gene (*MAB_r5052*), coding for rRNA 23S which is the target of macrolides, we incubated *M. abscessus* with sub-inhibitory macrolide concentrations corresponding to 0.1×MIC, *i.e.*, 0.1 µg/mL and 0.5 µg/mL for CLR and AZM, respectively (**Figure 4A**). The inducible macrolide resistance was followed by MIC measurements, western blotting, global proteomic analysis and determination of the *erm(41)* transcriptional levels, as described in [13-15].

Determination of MIC was assessed after 5, 10 and 14 days of induction (**Table 1**). As awaited, the prolonged treatment with CLR or AZM increased both the MIC_{CLR} and MIC_{AZM} values up to 50-times (≥40 µg/mL) and 17-times (>100 µg/mL), respectively, after 14 days for both CLR-treated and AZM-treated strains. As previously reported [17], the MIC of AZM increased more rapidly than that of CLR,. These results indicate that pre-exposure of *M. abscessus* to sub-inhibitory concentrations of CLR or AZM results in high levels of resistance to macrolides.

In parallel, the expression of *erm(41)* gene was followed during the 14 days of exposure to CLR or AZM. The mRNA levels for *erm(41)* were quantified by reverse transcription and qPCR at day 1, 2, 5, 6, 7, 10, 11, 12 and 14. As shown in **Figure 4B**, the use of suboptimal macrolide concentrations induced *erm(41)* expression with an optimum reached at 24 h which decreased after 48 h until day 5. Renewal of the antibiotics every 5 days, allowed to significantly increase the mRNA level of *erm(41)* for both macrolides. The same *erm(41)* gene expression profile can be observed along the 5-10 days period. These results demonstrated the importance to renew macrolides during the induction of resistance when using suboptimal concentration to maintain *erm(41)* expression. Given these transcriptomic results, immunoblotting detection using Erm(41)-specific murine antibodies in *M. abscessus* lysates exposed to CLR or AZM at 24 h and 48 h was performed. Unfortunately, we were unable to detect the protein in these samples despite several attempts (data not show). For more sensitive Erm(41) detection, the complete proteome of CLR- and AZM-treated *M. abscessus* cultures was analyzed after 24 h, 48 h and 5 days of exposure. Statistical differential analysis with the non-exposed *M. abscessus* proteome at the same time points, revealed the presence of Erm(41) protein in the AZM- and CLR-treated *M. abscessus* proteome at 24 h and 48 h (**Figure 4C**). In contrast, no protein was detected after 5 days of exposure to macrolides. These results confirm the RT-qPCR results, but also show a weak overexpression of the protein with a fold-change of 1.7-2.1 at 24 h and

1.3-1.6 at 48 h compared to the proteome of non-treated *M. abscessus* to macrolides. The presence of the Erm(41) at 24 and 48 h, together with the low level of *erm(41)* transcripts and its disappearance at day 5, suggests that this protein may be produced in low scale and is probably very unstable.

To evaluate whether this observed inducible macrolide resistance mechanism is a reversible phenomenon, macrolide-resistant strains were washed with fresh 7H9-S^{OADC} medium and grown in culture medium without antibiotic for 7 days [17]. Then, susceptibility testing was performed to check the capacity of the strains to revert to a susceptible phenotype (**Table 1, Reversion condition**). Whatever the macrolide used for the induction of resistance, MIC of AZM and CLR measured after 7 days of culture medium without any antibiotic were identical to those before macrolide induction, confirming that this resistance phenomenon is reversible. Moreover, no mutation was found after sequencing of *rrl* gene for AZM- or CLR-treated *M. abscessus* strains (data not show), thus excluding the occurrence of a genetically-acquired resistance mechanism.

In contrast, we generated spontaneous macrolide-resistant mutant strain by using a high concentration of macrolide (10× MIC). This mutant showed a high level of resistance to CLR (MIC >40 µg/mL) and AZM (MIC >100 µg/mL). Such a resistance was found to be irreversible with the presence of adenine 2271 mutated in guanine in *rrl* gene allowing the macrolide to interact with the 23S rRNA (**Figure S2**), as already reported in *M. abscessus* clinical isolates [53,54].

CyC-macrolide association on macrolide resistant strains

The ability of the **CyC** to interact *in vitro* with purified Erm(41) protein suggest that these inhibitors could thwart the Erm(41) activity and, consequently, restore susceptibility to macrolides. To test this hypothesis, we evaluated *in vitro* the association of AZM and CLR with **CyC_{17}** or **CyC_{31}** using the checkerboard assay with reversible resistant strains generated as described below (**Table 2**). For susceptibility breakpoint, we followed the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. If the MIC of macrolide is ≤ 2 µg/mL, the strain is considered susceptible (colored in green); between 2 and 8 µg/mL, intermediate (colored in yellow); and ≥ 8 µg/mL, resistant (colored in red) [55].

The control strain, corresponding to the untreated condition, showed already an intermediate AZM sensitivity profile (MIC_{AZM} = 6 µg/mL). The association of **CyC_{17}** with AZM resulted in a 3- and 7-fold decrease in MIC_{AZM} in the 0.05-0.2 µg/mL (MIC_{AZM} = 2 µg/mL) and in the 0.4-

1.6 µg/mL (MIC_{AZM} = 0.8 µg/mL) **CyC_{17}** concentration range, respectively. Similarly, a 2-fold reduction in MIC_{AZM} (MIC_{AZM} = 3 µg/mL) was reached in presence of **CyC_{31}** in the 0.31-5 µg/mL concentration range, the strain becoming fully susceptible from 10 µg/mL of **CyC_{31}**. Although the addition of **CyC_{17}** and **CyC_{31}** with CLR did not modify the CLR susceptibility profile of the control strain, their presence led to a 2-fold reduction in CMI_{CLR}.

As reported above resistant strains displayed a MIC_{AZM} >100, MIC_{CLR} >40 µg/mL, MIC_{CyC17} = 3.2 µg/mL and MIC_{CyC31} = 20 µg/mL, respectively.

For the CLR-treated strain, two combinations were able to restore susceptibility to macrolides. The association of CLR with **CyC_{17}** leads to a gradual decrease of MIC_{CLR} until an intermediate susceptibility profile at 0.4 µg/mL, corresponding to **CyC_{17}**'s $MIC_{/8}$. The strain become totally susceptible at CyC_{17}'s $MIC_{/4}$ concentration with a fold change reduction of 40 (MIC_{CLR} = 1 µg/mL), and even reached a fold change in its MIC_{CLR} up to 133 (MIC_{CLR} = 0.3) at **CyC_{17}**'s $MIC_{/2}$. Similarly, 5 µg/mL (*i.e.*, $MIC_{/4}$) **CyC_{31}** allowed to dramatically decrease the MIC_{CLR} (3 µg/mL) by 13-fold. When using 10 µg/mL (*i.e.*, **CyC_{31}**'s $MIC_{/2}$) the strain became totally susceptible to CLR with a fold change of 66 in its MIC_{CLR}.

In the case of AZM-treated strains, three combinations were able to restore susceptibility to macrolides. The AZM association with 0.8 µg/mL ($MIC_{/4}$) of **CyC_{17}** allowed to reach a MIC_{AZM} value of 3 µg/mL (33-fold decrease), which is considered as 'intermediate'. In the presence of 1.6 µg/mL ($MIC_{/2}$) of **CyC_{17}** a 50-fold decrease in MIC_{AZM} was reached (MIC_{AZM}=2 µg/mL) and the strain was considered susceptible. With the **CyC_{31}**, regardless the concentration used, the AZM-treated strain remained resistant, even if a 7-fold decrease in MIC_{AZM} was obtained at a **CyC_{31}**'s $MIC_{/2}$. Regarding CLR susceptibility to this AZM-treated strain, the most efficient associations was the combination of CLR with **CyC_{17}** or **CyC_{31}**. The addition of low concentration of **CyC_{17}** corresponding to $MIC_{/64}$ decreased drastically MIC_{CLR} until an intermediate level. The use of **CyC_{17}**'s $MIC_{/4}$ concentration (0.8 µg/mL) fully restored CLR susceptibility. Similarly, the addition of **CyC_{31}** together with CLR resulted in an 8-fold decrease in MIC_{CLR} for CyC_{31} concentrations ranging from 0.31-1.25 µg/mL. Finally, 10 µg/mL of **CyC_{31}** ($MIC_{/2}$) rendered the strain susceptible to CLR.

As previously described, induction experiments were carried out on *M. massiliense* strain, which lacks induced resistance due to the presence of a truncated, non-functional Erm(41) protein [13]. We did not generate resistant bacteria, validating the induction protocol. On the other hand, we also tested the association of AZM and CLR with **CyC**, and no effect on MIC

476 of AZM/CLR or **CyC** was measured. Finally, we tested the activity of **CyC$_{17}$** and **CyC$_{31}$** against
477 CLR- and AZM-resistant spontaneous mutant carrying an irreversible point mutation in *rrl*
478 gene. The MIC determination showed that the association of the **CyC** with macrolides did not
479 affect the susceptibility profiles of this resistant mutant strain to macrolides (**Table S2**). These
480 latest results on *M. massiliense* and *rrl* mutant suggest that the potentiating effect of the **CyC**
481 for macrolides is only effective in the case of Erm(41)-dependent inducible resistance.

482

DISCUSSION

M. abscessus is considered as the main pathogenic RGM to humans [56], responsible for a broad spectrum of infections from mucocutaneous infections in immunocompetent individuals to severe pulmonary infections in patients with CF or chronic obstructive pulmonary disease [2,3]. The natural resistance of *M. abscessus* to most conventional antibiotics, the poor clinical outcome and the lengthy regimens make treatments particularly difficult. In clinical practice, drug combinations are given in efforts to prevent the development of drug resistance during therapy and to optimize the efficacy of the treatments. In this context, the discovery of a new family of the multitargeted **CyC** inhibitors, acting specifically on mycobacteria with no toxicity toward mammalian cells, adds new hope for subsequent therapeutic developments [26-28]. Among the targets impacted by the **CyC**, we identified the Erm(41) a methyltransferase involved in the resistance induced by macrolides, which are the pillar of anti-*M. abscessus* therapy and whose inactivation often leads to a therapeutic end [1,20]. Here, we investigated the interaction between the **CyC** and Erm(41) to by-pass inducible macrolide resistance, thus opening the door to new therapeutic interventions.

Foremost, we showed that Erm(41) interacts with several **CyC**, including **CyC$_{17}$** and **CyC$_{31}$** which exhibit *M. abscessus* growth *in vitro* growth; and **CyC$_{8\alpha}$** and **CyC$_{8\beta}$**, primarily acting against *M. abscessus* residing in the macrophage [26,29]. Biochemical studies involving the TAMRA-FP probe that binds to serine hydrolases along with mass spectrometry and *in silico* molecular docking, suggest that the **CyC** analogs may covalently bind in active site of Erm(41), thereby preventing the accommodation of SAM into Erm(41) the catalytic site, which may result in enzymatic blockage. The future high-resolution structure of Erm(41) and detailed description of the catalytic mechanism of the enzyme may lead to the development of other chemical entities capable to inhibit its catalytic activity. The development of Erm(41)-specific inhibitors or SAM derivatives may provide alternative means to preserve low susceptibility levels in *M. abscessus* isolates [57,58].

We investigated the synergistic potential of the **CyC** in combination with antibiotics already used in chemotherapy against *M. abscessus*. Several combinations were tested in vitro with **CyC$_{17}$** and **CyC$_{31}$** emphasizing an optimal synergistic activity between **CyC$_{17}$**-AZM, **CyC$_{17}$**-CLR and **CyC$_{31}$**-CLR-. Our analysis also highlighted the potent association between **CyC$_{31}$** and CFX, the latter being largely used for the treatment against *M. abscessus*. Overall, this study confirms that the **CyC** can be used in association with other clinically relevant drugs against this mycobacterium, displaying a clear improvement regarding the existing treatments, at least

in vitro. Pre-clinical studies are now warranted to study the impact and efficacy of these treatment combinations in animal models.

Importantly, the **CyC** are able to counteract macrolide resistance mediated by Erm(41) or remain active on spontaneous resistant mutants carrying a mutation in the *rrl* gene. This restoration of macrolide susceptibility is of major interest and offers new prospects for the study of novel therapeutic regimens.

In this study, we demonstrated that the Erm(41) protein is also able to interact with the **CyC$_{8(\alpha,\beta)}$** which are only active *ex vivo* inside infected macrophages. These results may suggest that these **CyC$_{8(\alpha,\beta)}$** might also be able to restore macrolide susceptibility in resistant strains generated by a treatment to macrolides. To confirm this hypothesis, it will be necessary to test the association of **CyC$_{8(\alpha,\beta)}$** with AZM or CLR against macrophages infected with *M. abscessus* strain whose resistance has previously been induced.

Finally, our data confirmed the efficacy of the **CyC** to restore the CLR or AZM susceptibility on macrolide-resistant *M. abscessus* strain following Erm(41) induction. A major asset of the **CyC** relies on the fact that these molecules can target multiple enzymes, thus preventing the emergence of spontaneous resistant mutants. The work presented here describes a novel and unique aspect of this family of inhibitors by lowering/suppressing a mechanism that leads to drug in inactivation. To the best of our knowledge, **CyC** are the first inhibitors of the Erm(41) methyltransferase.

In addition, this work revealed that the synergy activity of the **CyC** in association with CFX should also be taken into consideration. Further experiments are however needed to better understand the relationship between the CFX and **CyC** compounds.

The recently studied CLR-Rifabutin combination showed also a synergistic effect able to block Erm(41) induction and so increased the efficiency of macrolide [24]. Thereby, blocking the main actor responsible for the resistance to macrolide by molecules unable to generate spontaneous mutants deserves more attention.

Conclusion

Taken together, these results could provide the opportunity to revisit the therapeutic regimen for combating *M. abscessus* pulmonary infections in CF patients, and particularly in *erm(41)*-positive strains. To conclude long-term prospects for this work should help to expand our therapeutic arsenal in the fight against a particularly antibiotic-resistant mycobacterial species.

Abbreviations

ABPP: activity-based protein profiling, AMK: amikacin, AZM: azythromycin; CF: cystic fibrosis, CLR: clarithromycin, CFX: cefoxitin, **CyC**: Cyclipostins and Cyclophostin analogs, IPM: imipenem, FIC: fractional inhibitory concentration, FICI: fractional inhibitory concentration index, MIC: minimal inhibitory concentration, RGM: rapid-growing mycobacteria,

Acknowledgments:

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille University (AMU), the Association Grégory Lemarchal and Vaincre la Mucoviscidose (projects N°RF20190502466 and RF20220503053), and the Agence Nationale de la Recherche (LipInTB project N°ANR-19-CE44- 0011). M.S. was supported by a PhD fellowship from the Association Grégory Lemarchal and Vaincre la Mucoviscidose (project N°RF20190502466 and RF20220503053). Marseille Proteomics (marseille-proteomique.univ-amu.fr/) was supported by IBISA (Infrastructures Biologie Santé et Agronomie), the Canceropôle PACA, the Provence-Alpes-Côte d'Azur Région, the Institut Paoli-Calmettes, and the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

Author contributions:

Conceptualization: J-FC, LK, J-LH and SC. Methodology and validation: MS, IP, PF, SA, LC, YD, C.D.S. J-FC. Formal analysis: MS, IP, PF, SA, LC, YD, PS, C.D.S. J-FC and SC. Investigation: MS, IP, PF, SA, LC, YD, J-FC. Writing—review and editing: MS, J-FC, LK, PS, VLM, J-LH and SC. Supervision: SC. Project administration: SC.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Table 1: Resistance levels to macrolides following exposure of *M. abscessus* to CLR or AZM. The MIC are given in µg/mL. The MIC presented in the table correspond to the mean ± SD of the MIC obtained from three biological replicates. ND, not determined

Growth conditions	**MIC (µg/mL)**									
	Before exposition		Day 5		Day 10		Day 14		Reversion	
	CLR	AZM	CLR	AZM	CLR	AZM	CLR	AZM	CLR	AZM
Control (Untreated)	0.9±0.5	5.8±1.6	0.8±0	6.9±1.4	0.3±0.1	4.5±1.5	0.6±0.2	6.0±2.0	ND	ND
CLR treated	0.9±0.5	5.8±1.6	3.1±1.7	47±17	9.4±3.4	>100	>40	>100	0.8±0.4	4.1±1.2
AZM treated	0.9±0.5	5.8±1.6	3.6±2.1	63±0	8.3±3.2	>100	40±11	>100	0.7±0.2	3.6±1.1

Table 2: Activity of CyC-macrolides association on macrolides resistant *M. abscessus* strains. Values correspond to the MIC of macrolide according to the different **CyC** concentrations tested in each condition (Control, AZM-treated, CLR-treated). The fold-change was calculated relative to the MIC of macrolide without **CyC**. Each **CyC** concentration was reported relative to the **CyC**'s MIC. The MIC are given in µg/mL and were obtained from three biological replicates.

Control	[**CyC$_{17}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.05	MIC$_{/32}$ 0.1	MIC$_{/16}$ 0.2	MIC$_{/8}$ 0.4	MIC$_{/4}$ 0.8	MIC$_{/2}$ 1.6	MIC 3.2
	MIC$_{AZM}$	6	2	2	2	0.8	0.8	0.8	< 0.8
	Fold-change	-	3	3	3	7.5	7.5	7.5	> 7.5
	MIC$_{CLR}$	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	< 0.3
	Fold-change	-	2	2	2	2	2	2	> 2
	[**CyC$_{31}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.31	MIC$_{/32}$ 0.63	MIC$_{/16}$ 1.25	MIC$_{/8}$ 2.5	MIC$_{/4}$ 5	MIC$_{/2}$ 10	MIC 20
	MIC$_{AZM}$	6	3	3	3	3	3	2	< 0.8
	Fold-change	-	2	2	2	2	2	3	> 7.5
	MIC$_{CLR}$	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	< 0.3
	Fold-change	-	2	2	2	2	2	2	> 2
AZM-treated	[**CyC$_{17}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.05	MIC$_{/32}$ 0.1	MIC$_{/16}$ 0.2	MIC$_{/8}$ 0.4	MIC$_{/4}$ 0.8	MIC$_{/2}$ 1.6	MIC 3.2
	MIC$_{CLR}$	40	5	3	5	3	1	0.3	< 0.3
	Fold-change	-	8	13	8	13	40	133	> 133
	MIC$_{AZM}$	> 100	25	50	25	13	3	2	< 0.8
	Fold-change	-	4	2	4	7	33	50	> 125
	[**CyC$_{31}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.31	MIC$_{/32}$ 0.63	MIC$_{/16}$ 1.25	MIC$_{/8}$ 2.5	MIC$_{/4}$ 5	MIC$_{/2}$ 10	MIC 20
	MIC$_{CLR}$	40	5	5	5	3	3	1	< 0.6
	Fold-change	-	8	8	8	13	13	40	> 66
	MIC$_{AZM}$	> 100	50	50	50	50	50	13	< 0.8
	Fold-change	-	2	2	2	2	2	7	> 125
CLR-treated	[**CyC$_{17}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.05	MIC$_{/32}$ 0.1	MIC$_{/16}$ 0.2	MIC$_{/8}$ 0.4	MIC$_{/4}$ 0.8	MIC$_{/2}$ 1.6	MIC 3.2
	MIC$_{CLR}$	> 40	40	20	20	5	1	0.3	< 0.3
	Fold-change	-	-	2	2	8	40	133	> 133
	MIC$_{AZM}$	> 100	100	100	100	100	50	3	< 0.8
	Fold-change	-	-	-	-	-	2	33	> 125
	[**CyC$_{31}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.31	MIC$_{/32}$ 0.63	MIC$_{/16}$ 1.25	MIC$_{/8}$ 2.5	MIC$_{/4}$ 5	MIC$_{/2}$ 10	MIC 20
	MIC$_{CLR}$	> 40	> 40	> 40	> 40	20	3	0.6	< 0.3
	Fold-change	-	-	-	-	2	13	66	> 133
	MIC$_{AZM}$	> 100	100	100	100	100	100	50	< 0.8
	Fold-change	-	-	-	-	-	-	2	> 125

Susceptible	MIC ≤ 2
Intermediate	2 < MIC < 8
Resistant	MIC ≥ 8

Figure 1

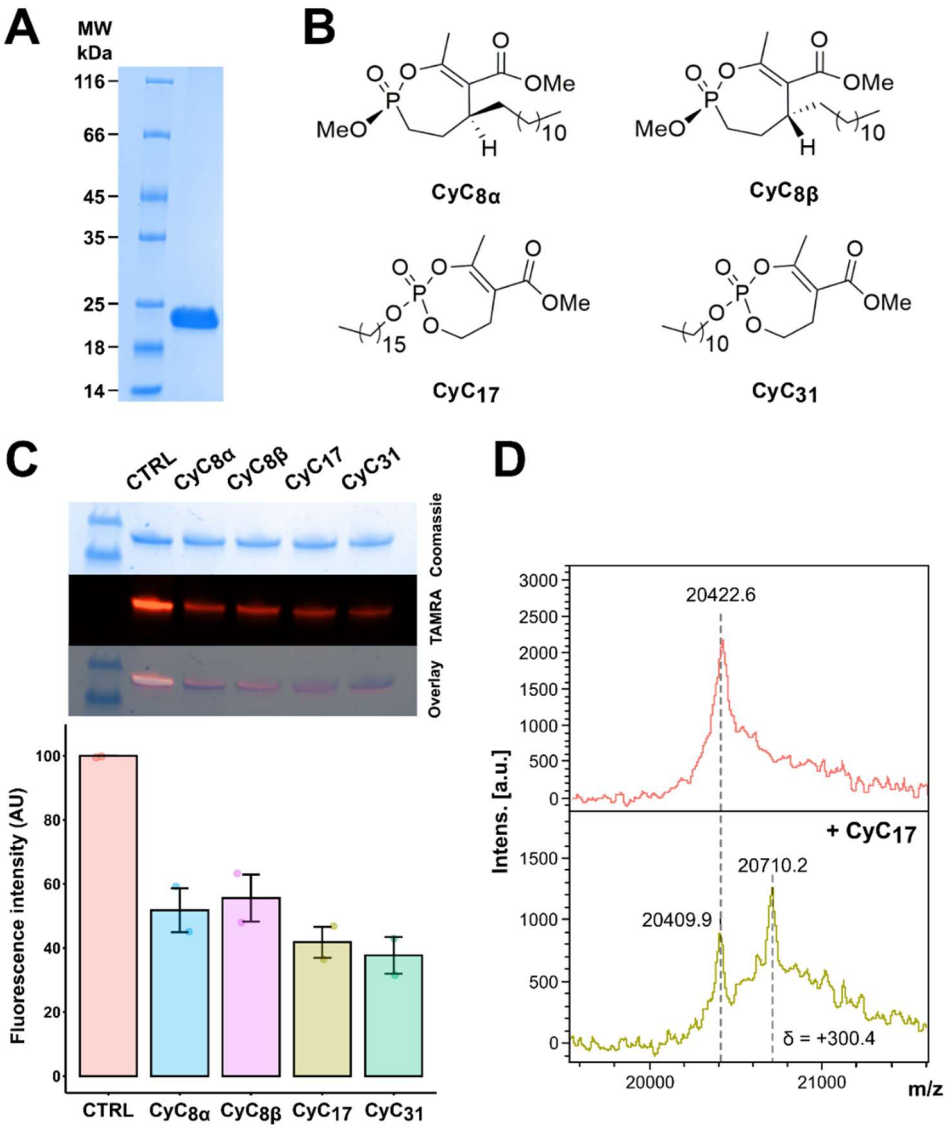


Figure 1: Biochemical characterization of the CyC-Erm(41) interaction (A) Protein purity assessed by SDS-PAGE. Ten micrograms of protein were loaded onto a 12% polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue G-250 solution. MW, molecular weight standards (5 µg; Euromedex). **(B)** Chemical structures of the **CyC** analogs used in this study. **(C)** Equal amounts of Erm(41) were pretreated with **CyC8α**. **CyC8β**. **CyC17** and **CyC31**; then incubated with TAMRA-FP, separated by SDS-PAGE, and visualized by Coomassie Blue staining (top) or in-gel fluorescence (middle). Fluorescence intensity was quantified using the ImageLab™ software and the TAMRA-FP without **CyC** (CTRL) was taken as 100 AU of fluorescence intensity. **(D)** Global mass modification of Erm(41) alone (top) or pre-incubated with **CyC17** (down) as determined using an Ultraflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics) in linear mode with the LP_66kDa method.

Figure 2

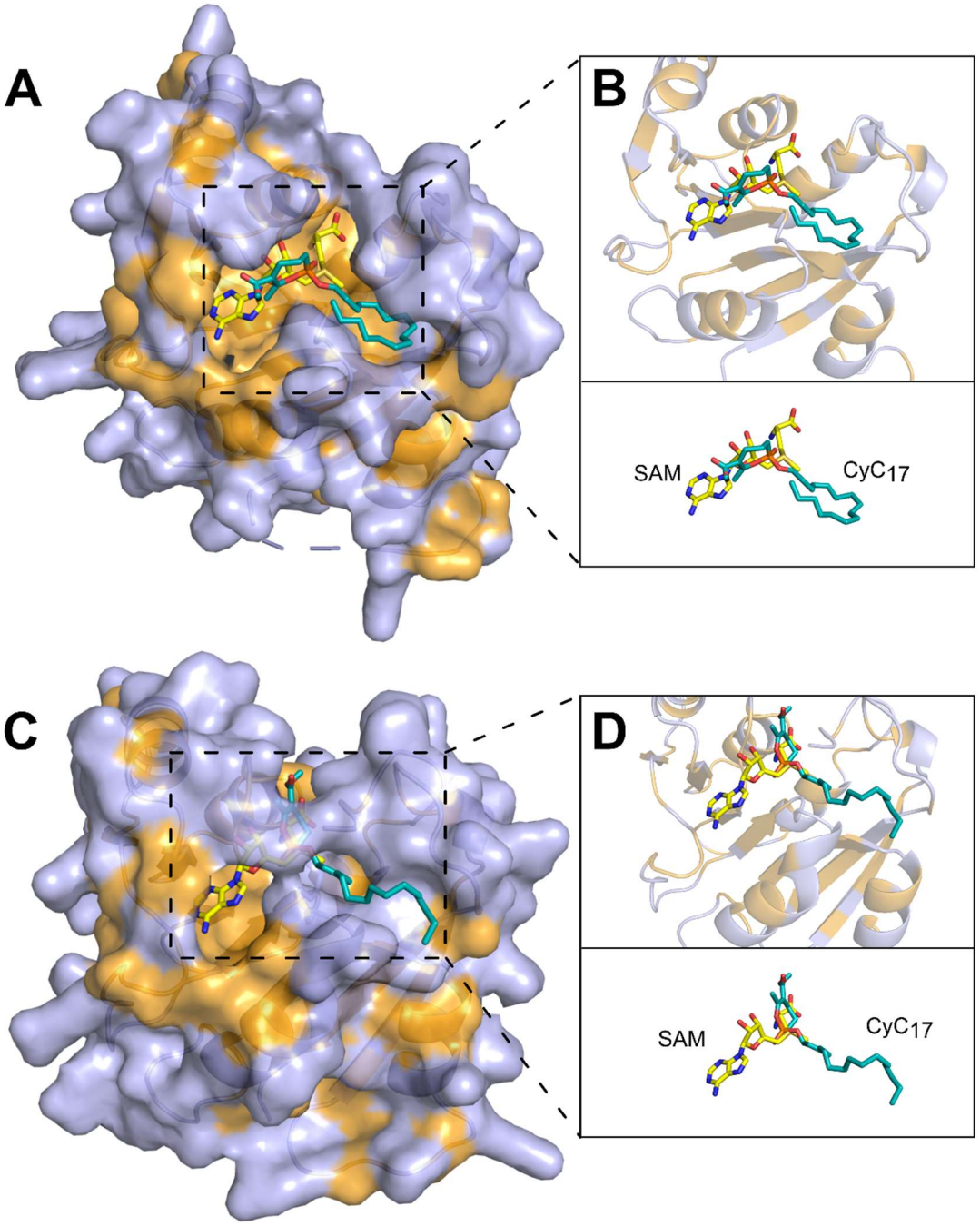
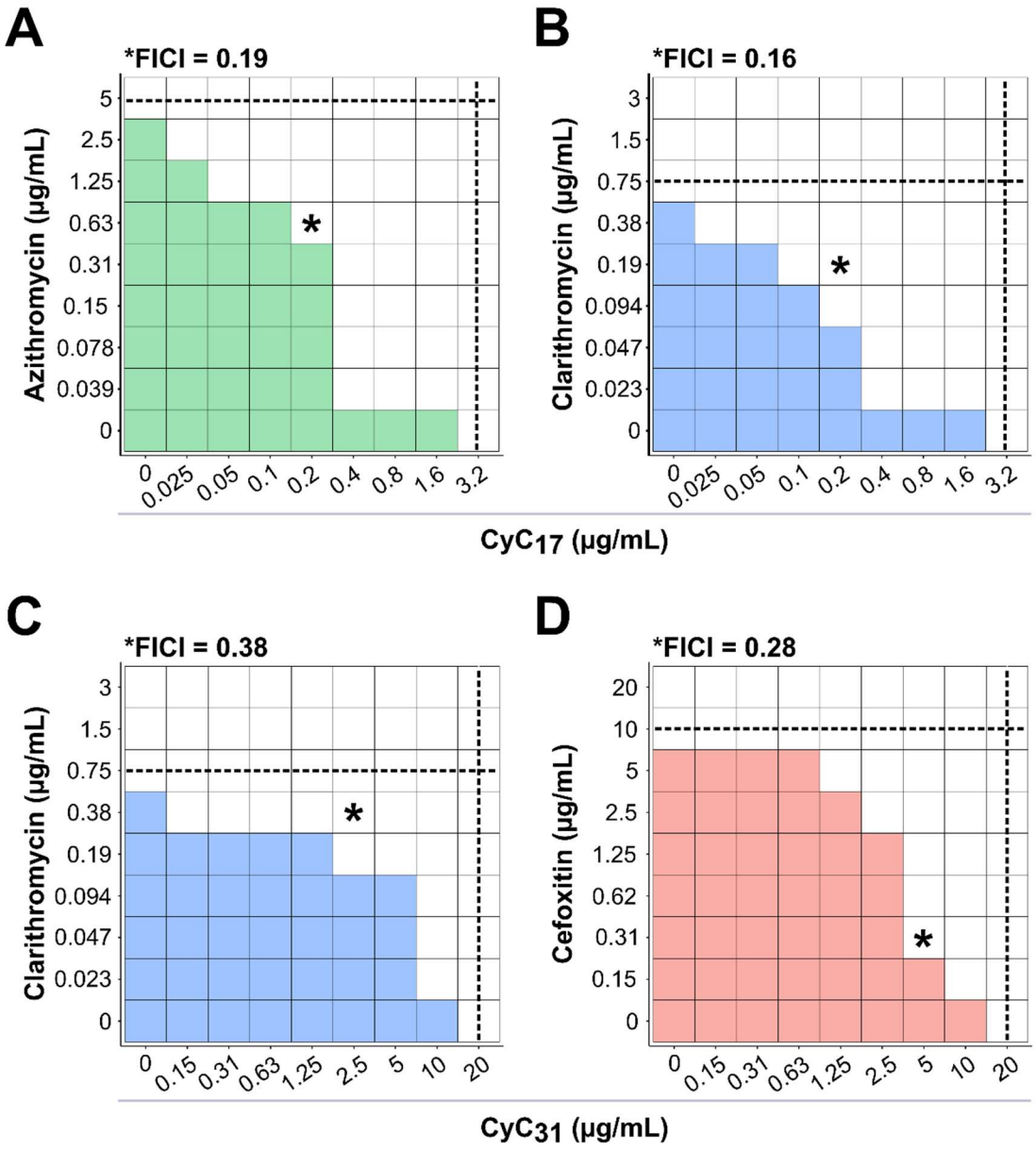


Figure 2: Molecular docking of CyC17 in the active site of Erm(41). Model structures of Erm(41) generated using the Phyre2 web portal for protein modeling and based on **(A-B)** Erm(E) structure (PDB id: 6NVM) or **(C-D)** Erm(38) structure (PDB id: 7F8B). **(B-D)** Catalytic pocket view in presence of **CyC17** and SAM co-factor. Hydrophobic residues (alanine, leucine, isoleucine, valine, tryptophan, tyrosine, phenylalanine, proline and methionine) are highlighted in orange. The inhibitor and SAM co-factor are in stick representation with the following atom color-code: oxygen red; phosphorus orange; carbon cyan for **CyC17** and yellow for SAM. Structures were drawn with PyMOL Molecular Graphics System (version 1.4, Schrödinger, LLC).

610 **Figure 3**



611

612 **Figure 3: Synergistic activity of CyC-antibiotic combinations against *M. abscessus*.**
613 Heatmap of association between **(A)** azithromycin or **(B)** clarithromycin and **CyC17** and
614 between **(C)** clarithromycin or **(D)** cefoxitin and **CyC31**. The growth is represented by the color.
615 Black dotted bars represent the MIC for the drug (horizontal) or the **CyC** (vertical). The
616 fractional inhibitory concentration index (FICI) of the best combination is indicated on top of
617 the heatmap and by the black star. The smallest FICI obtained for a combination is taken as the
618 FICI of the association. Data represent three biological replicates.

619

Figure 4

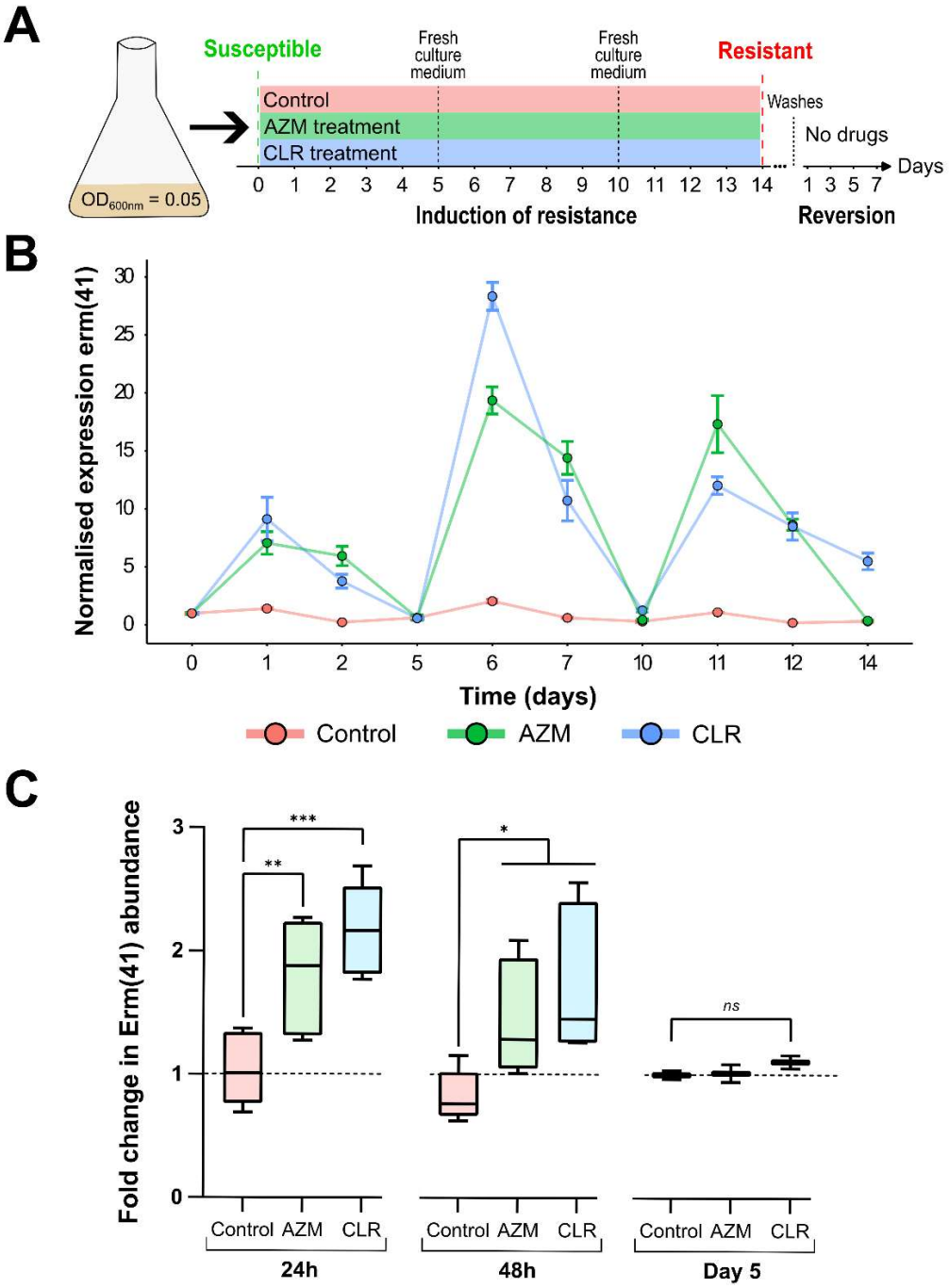


Figure 4: Induction of macrolide resistance. (A) Schematic protocol of induction of macrolide resistance and reversion in *M. abscessus* strains **(B)** Expression of *erm(41)* gene was quantified by RT-qPCR during the induction of macrolide resistance in *M. abscessus*. The amount of transcript in the untreated condition (control) at day 0 is taken as reference. Data represent the mean of normalized expression of two biological replicates. **(C)** Quantification of Erm(41) abundance by mass spectrometry. The graph shows the variations in fold change values for Erm(41) abundance after 24 h, 48 h and 5 days of induction of macrolide resistance in *M. abscessus*. In each case, the untreated control strain was taken as reference with a fold change of 1. Statistical analysis was done using a non-parametric Mann–Whitney test with Prism 8.0 (Graphpad Inc): * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001.

REFERENCES

1. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S.M., Horsburgh R., Huitt G., Iademarco M.F., Iseman M., Olivier K., Ruoss S., von Reyn C.F., Wallace R.J., Jr. and Winthrop K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 175(4):367-416, 2007.
2. Cowman S., van Ingen J., Griffith D.E. and Loebinger M.R. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease. Eur Respir J 54(1), 2019.
3. Martiniano S.L., Nick J.A. and Daley C.L. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Cystic Fibrosis. Clin Chest Med 43(4):697-716, 2022.
4. Wallace R.J., Jr., Brown-Elliott B.A., Crist C.J., Mann L. and Wilson R.W. Comparison of the in vitro activity of the glycylcycline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 46(10):3164-3167, 2002.
5. Nessar R., Cambau E., Reyrat J.M., Murray A. and Gicquel B. Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother 67(4):810-818, 2012.
6. Maurer F.P., Bruderer V.L., Castelberg C., Ritter C., Scherbakov D., Bloemberg G.V. and Bottger E.C. Aminoglycoside-modifying enzymes determine the innate susceptibility to aminoglycoside antibiotics in rapidly growing mycobacteria. J Antimicrob Chemother 70(5):1412-1419, 2015.
7. Lefebvre A.L., Le Moigne V., Bernut A., Veckerle C., Compain F., Herrmann J.L., Kremer L., Arthur M. and Mainardi J.L. Inhibition of the beta-Lactamase Bla(Mab) by Avibactam Improves the In Vitro and In Vivo Efficacy of Imipenem against Mycobacterium abscessus. Antimicrob Agents Chemother 61(4), 2017.
8. Rominski A., Roditscheff A., Selchow P., Bottger E.C. and Sander P. Intrinsic rifamycin resistance of Mycobacterium abscessus is mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591. J Antimicrob Chemother 72(2):376-384, 2017.
9. Brown-Elliott B.A., Vasireddy S., Vasireddy R., Iakhiaeva E., Howard S.T., Nash K., Parodi N., Strong A., Gee M., Smith T. and Wallace R.J., Jr. Utility of sequencing the erm(41) gene in isolates of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus with low and intermediate clarithromycin MICs. J Clin Microbiol 53(4):1211-1215, 2015.
10. Daley C.L., Iaccarino J.M., Lange C., Cambau E., Wallace R.J., Andrejak C., Bottger E.C., Brozek J., Griffith D.E., Guglielmetti L., Huitt G.A., Knight S.L., Leitman P., Marras T.K., Olivier K.N., Santin M., Stout J.E., Tortoli E., van Ingen J., Wagner D. and Winthrop K.L. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. Clin Infect Dis 71(4):905-913, 2020.
11. 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., Hempstead S.E., Koetz K., Sabadosa K.A., Sermet-Gaudelus I., Smyth A.R., van Ingen J., Wallace R.J., Winthrop K.L., Marshall B.C. and Haworth C.S. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. Thorax 71 Suppl 1(Suppl 1):i1-22, 2016.
12. 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. and Koh W.J. Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of Patients with Acquired Macrolide-Resistant Mycobacterium abscessus Lung Disease. Antimicrob Agents Chemother 61(10), 2017.
13. Nash K.A., Brown-Elliott B.A. and Wallace R.J., Jr. A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is

absent from Mycobacterium chelonae. Antimicrob Agents Chemother 53(4):1367-1376, 2009.
14. 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., Jeong B.H., Jeon K. and Koh W.J. Macrolide treatment for Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense infection and inducible resistance. Am J Respir Crit Care Med 186(9):917-925, 2012.
15. Maurer F.P., Castelberg C., Quiblier C., Bottger E.C. and Somoskovi A. Erm(41)-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of Mycobacterium abscessus. J Antimicrob Chemother 69(6):1559-1563, 2014.
16. Schildkraut J.A., Pennings L.J., Ruth M.M., de Brouwer A.P., Wertheim H.F., Hoefsloot W., de Jong A. and van Ingen J. The differential effect of clarithromycin and azithromycin on induction of macrolide resistance in Mycobacterium abscessus. Future Microbiol 14:749-755, 2019.
17. Richard M., Gutierrez A.V. and Kremer L. Dissecting erm(41)-Mediated Macrolide-Inducible Resistance in Mycobacterium abscessus. Antimicrob Agents Chemother 64(2), 2020.
18. Kim H.Y., Kim B.J., Kook Y., Yun Y.J., Shin J.H. and Kook Y.H. Mycobacterium massiliense is differentiated from Mycobacterium abscessus and Mycobacterium bolletii by erythromycin ribosome methyltransferase gene (erm) and clarithromycin susceptibility patterns. Microbiol Immunol 54(6):347-353, 2010.
19. 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. and Saito H. Clinical and microbiological differences between Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense lung diseases. J Clin Microbiol 50(11):3556-3561, 2012.
20. Roux A.L., Catherinot E., Soismier N., Heym B., Bellis G., Lemonnier L., Chiron R., Fauroux B., Le Bourgeois M., Munck A., Pin I., Sermet I., Gutierrez C., Veziris N., Jarlier V., Cambau E., Herrmann J.L., Guillemot D. and Gaillard J.L. Comparing Mycobacterium massiliense and Mycobacterium abscessus lung infections in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 14(1):63-69, 2015.
21. Blondiaux N., Moune M., Desroses M., Frita R., Flipo M., Mathys V., Soetaert K., Kiass M., Delorme V., Djaout K., Trebosc V., Kemmer C., Wintjens R., Wohlkonig A., Antoine R., Huot L., Hot D., Coscolla M., Feldmann J., Gagneux S., Locht C., Brodin P., Gitzinger M., Deprez B., Willand N. and Baulard A.R. Reversion of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis by spiroisoxazoline SMARt-420. Science 355(6330):1206-1211, 2017.
22. Laws M., Shaaban A. and Rahman K.M. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. FEMS Microbiol Rev 43(5):490-516, 2019.
23. Dubee V., Bernut A., Cortes M., Lesne T., Dorchene D., Lefebvre A.L., Hugonnet J.E., Gutmann L., Mainardi J.L., Herrmann J.L., Gaillard J.L., Kremer L. and Arthur M. beta-Lactamase inhibition by avibactam in Mycobacterium abscessus. J Antimicrob Chemother 70(4):1051-1058, 2015.
24. Aziz D.B., Go M.L. and Dick T. Rifabutin Suppresses Inducible Clarithromycin Resistance in Mycobacterium abscessus by Blocking Induction of whiB7 and erm41. Antibiotics (Basel) 9(2), 2020.
25. Cavalier J.F., Spilling C.D., Durand T., Camoin L. and Canaan S. Lipolytic enzymes inhibitors: A new way for antibacterial drugs discovery. Eur J Med Chem 209:112908, 2021.
26. Madani A., Ridenour J.N., Martin B.P., Paudel R.R., Abdul Basir A., Le Moigne V., Herrmann J.L., Audebert S., Camoin L., Kremer L., Spilling C.D., Canaan S. and

Cavalier J.F. Cyclipostins and Cyclophostin Analogues as Multitarget Inhibitors That Impair Growth of Mycobacterium abscessus. ACS Infect Dis 5(9):1597-1608, 2019.
27. Nguyen P.C., Delorme V., Benarouche A., Martin B.P., Paudel R., Gnawali G.R., Madani A., Puppo R., Landry V., Kremer L., Brodin P., Spilling C.D., Cavalier J.F. and Canaan S. Cyclipostins and Cyclophostin analogs as promising compounds in the fight against tuberculosis. Sci Rep 7(1):11751, 2017.
28. Nguyen P.C., Madani A., Santucci P., Martin B.P., Paudel R.R., Delattre S., Herrmann J.L., Spilling C.D., Kremer L., Canaan S. and Cavalier J.F. Cyclophostin and Cyclipostins analogues, new promising molecules to treat mycobacterial-related diseases. Int J Antimicrob Agents 51(4):651-654, 2018.
29. Sarrazin M., Martin B.P., Avellan R., Gnawali G.R., Poncin I., Le Guenno H., Spilling C.D., Cavalier J.F. and Canaan S. Synthesis and Biological Characterization of Fluorescent Cyclipostins and Cyclophostin Analogues: New Insights for the Diagnosis of Mycobacterial-Related Diseases. ACS Infect Dis 8(12):2564-2578, 2022.
30. Barelier S., Avellan R., Gnawali G.R., Fourquet P., Roig-Zamboni V., Poncin I., Point V., Bourne Y., Audebert S., Camoin L., Spilling C.D., Canaan S., Cavalier J.F. and Sulzenbacher G. Direct capture, inhibition and crystal structure of HsaD (Rv3569c) from M. tuberculosis. Febs J 290(6):1563-1582, 2023.
31. Nguyen P.C., Nguyen V.S., Martin B.P., Fourquet P., Camoin L., Spilling C.D., Cavalier J.F., Cambillau C. and Canaan S. Biochemical and Structural Characterization of TesA, a Major Thioesterase Required for Outer-Envelope Lipid Biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. J Mol Biol 430(24):5120-5136, 2018.
32. Point V., Malla R.K., Diomande S., Martin B.P., Delorme V., Carriere F., Canaan S., Rath N.P., Spilling C.D. and Cavalier J.F. Synthesis and kinetic evaluation of cyclophostin and cyclipostins phosphonate analogs as selective and potent inhibitors of microbial lipases. J Med Chem 55(22):10204-10219, 2012.
33. Viljoen A., Richard M., Nguyen P.C., Fourquet P., Camoin L., Paudal R.R., Gnawali G.R., Spilling C.D., Cavalier J.F., Canaan S., Blaise M. and Kremer L. Cyclipostins and cyclophostin analogs inhibit the antigen 85C from Mycobacterium tuberculosis both in vitro and in vivo. J Biol Chem 293(8):2755-2769, 2018.
34. Dutta S., Malla R.K., Bandyopadhyay S., Spilling C.D. and Dupureur C.M. Synthesis and kinetic analysis of some phosphonate analogs of cyclophostin as inhibitors of human acetylcholinesterase. Bioorg Med Chem 18(6):2265-2274, 2010.
35. Spilling C.D. The Chemistry and Biology of Cyclophostin, the Cyclipostins and Related Compounds. Molecules 24(14), 2019.
36. Martin B.P., Vasilieva E., Dupureur C.M. and Spilling C.D. Synthesis and comparison of the biological activity of monocyclic phosphonate, difluorophosphonate and phosphate analogs of the natural AChE inhibitor cyclophostin. Bioorg Med Chem 23(24):7529-7534, 2015.
37. Noens E.E., Williams C., Anandhakrishnan M., Poulsen C., Ehebauer M.T. and Wilmanns M. Improved mycobacterial protein production using a Mycobacterium smegmatis groEL1DeltaC expression strain. BMC Biotechnol 11:27, 2011.
38. Bakala N'goma J C., Schue M., Carriere F., Geerlof A. and Canaan S. Evidence for the cytotoxic effects of Mycobacterium tuberculosis phospholipase C towards macrophages. Biochim Biophys Acta 1801(12):1305-1313, 2010.
39. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N. and Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protoc 10(6):845-858, 2015.
40. Trott O. and Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem 31(2):455-461, 2010.

41. Seeliger D. and de Groot B.L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. J Comput Aided Mol Des 24(5):417-422, 2010.
42. Demichev V., Messner C.B., Vernardis S.I., Lilley K.S. and Ralser M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. Nat Methods 17(1):41-44, 2020.
43. Gerault M.A., Camoin L. and Granjeaud S. DIAgui: a Shiny application to process the output from DIA-NN. Bioinform Adv 4(1):vbae001, 2024.
44. Le Run E., Arthur M. and Mainardi J.L. In Vitro and Intracellular Activity of Imipenem Combined with Rifabutin and Avibactam against Mycobacterium abscessus. Antimicrob Agents Chemother 62(8), 2018.
45. Odds F.C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother 52(1):1, 2003.
46. Santucci P., Point V., Poncin I., Guy A., Crauste C., Serveau-Avesque C., Galano J.M., Spilling C.D., Cavalier J.F. and Canaan S. LipG a bifunctional phospholipase/thioesterase involved in mycobacterial envelope remodeling. Biosci Rep 38(6), 2018.
47. Liu Y., Patricelli M.P. and Cravatt B.F. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. Proc Natl Acad Sci U S A 96(26):14694-14699, 1999.
48. Stsiapanava A. and Selmer M. Crystal structure of ErmE - 23S rRNA methyltransferase in macrolide resistance. Sci Rep 9(1):14607, 2019.
49. Goh B.C., Xiang X., Lescar J. and Dedon P.C. Crystal structure and functional analysis of mycobacterial erythromycin resistance methyltransferase Erm38 reveals its RNA-binding site. J Biol Chem 298(2):101571, 2022.
50. Skinner R., Cundliffe E. and Schmidt F.J. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. J Biol Chem 258(20):12702-12706, 1983.
51. Malone T., Blumenthal R.M. and Cheng X. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. J Mol Biol 253(4):618-632, 1995.
52. Singh S., Bouzinbi N., Chaturvedi V., Godreuil S. and Kremer L. In vitro evaluation of a new drug combination against clinical isolates belonging to the Mycobacterium abscessus complex. Clin Microbiol Infect 20(12):O1124-1127, 2014.
53. Wallace R.J., Jr., Meier A., Brown B.A., Zhang Y., Sander P., Onyi G.O. and Bottger E.C. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus. Antimicrob Agents Chemother 40(7):1676-1681, 1996.
54. Lipworth S., Hough N., Leach L., Morgan M., Jeffery K., Andersson M., Robinson E., Smith E.G., Crook D., Peto T. and Walker T. Whole-Genome Sequencing for Predicting Clarithromycin Resistance in Mycobacterium abscessus. Antimicrob Agents Chemother 63(1), 2019.
55. Woods G.L., Brown-Elliott B.A., Conville P.S., Desmond E.P., Hall G.S., Lin G., Pfyffer G.E., Ridderhof J.C., Siddiqi S.H., Wallace R.J., Jr., Warren N.G. and Witebsky F.G., Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. 2nd ed, Wayne (PA), 2011.
56. Johansen M.D., Herrmann J.L. and Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. Nat Rev Microbiol 18(7):392-407, 2020.
57. Foik I.P., Tuszynska I., Feder M., Purta E., Stefaniak F. and Bujnicki J.M. Novel inhibitors of the rRNA ErmC' methyltransferase to block resistance to macrolides, lincosamides, streptogramine B antibiotics. Eur J Med Chem 146:60-67, 2018.

58. Fischer T.R., Meidner L., Schwickert M., Weber M., Zimmermann R.A., Kersten C., Schirmeister T. and Helm M. Chemical biology and medicinal chemistry of RNA methyltransferases. Nucleic Acids Res 50(8):4216-4245, 2022.

SUPPLEMENTAL DATA

Cyclophostin and Cyclipostins analogs counteract macrolide-induced resistance mediated by Erm(41) in *Mycobacterium abscessus*

Morgane Sarrazin[1], Isabelle Poncin[1], Patrick Fourquet[2], Stéphane Audebert[2], Luc Camoin[2], Yann Denis[3], Pierre Santucci[1], Christopher D. Spilling[4], Laurent Kremer[5,6], Vincent Le Moigne[7], Jean-Louis Herrmann[7,8], Jean-François Cavalier[1] and Stéphane Canaan[1,§]

[1] Aix-Marseille Univ., CNRS, LISM UMR7255, IMM-FR3479, Marseille, France

[2] INSERM, CNRS, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille Protéomique, Aix-Marseille Univ., France

[3] Plateforme Transcriptome, Aix-Marseille Univ., CNRS, IMM-FR3479, Marseille, France

[4] Department of Chemistry and Biochemistry, University of Missouri St. Louis, MO, USA

[5] Centre National de la Recherche Scientifique UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, 34293 Montpellier, France

[6] INSERM, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, 34293 Montpellier, France

[7] Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM, Infection et Inflammation, Montigny-Le-Bretonneux, France

[8] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Ile-de-France Ouest, GHU Paris-Saclay, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France.

§ Corresponding author: canaan@imm.cnrs.fr

Figure S1

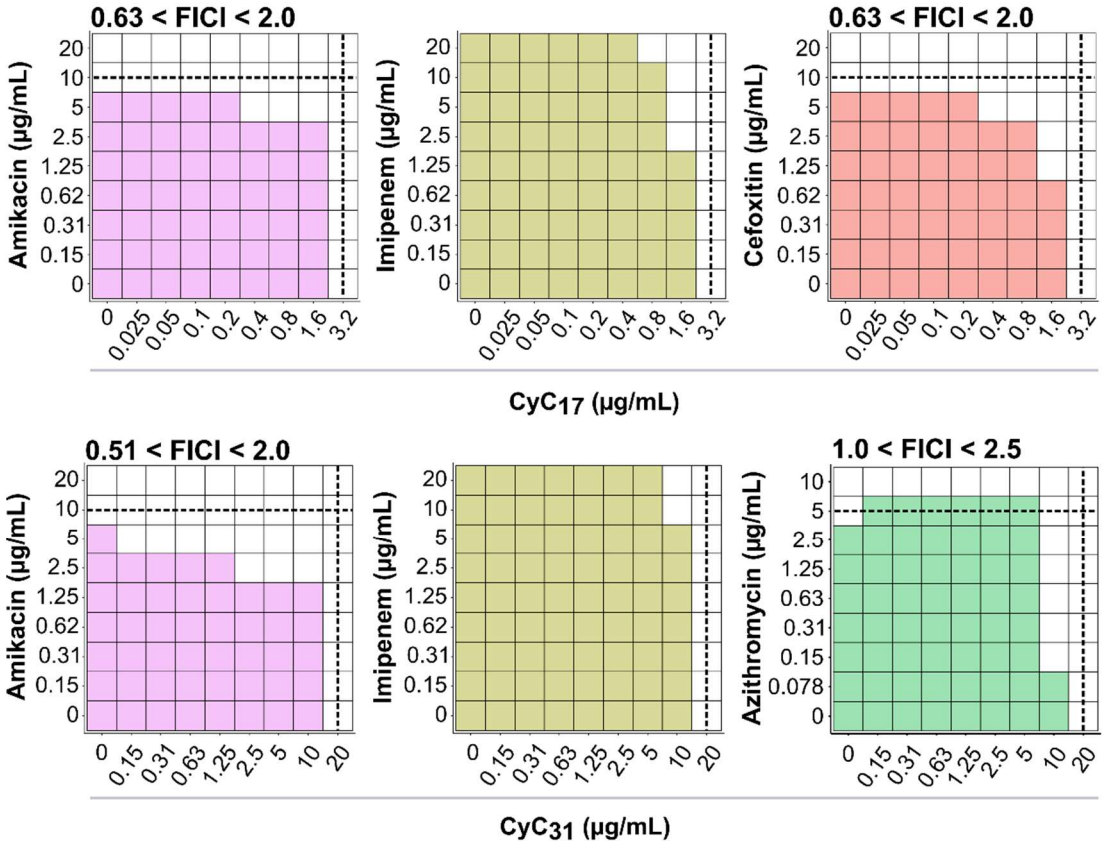


Figure S1: Activity of CyC-antibiotics combination against *M. abscessus*. Heatmap of the association between amikacin, imipenem, and cefoxitin with **CyC_{17}**, and between amikacin, imipenem, and azithromycin with **CyC_{31}**. The growth is represented by the color. Data represent three biological replicates. Black dotted bars represent the MIC of the drug (horizontal) or the **CyC** (vertical). The absence of black dotted bars means that the MIC is over the concentration range. The FICI range of association is indicated upper the heatmap. The smallest FICI obtained for a combination is taken as the FICI of the association.

Figure S2

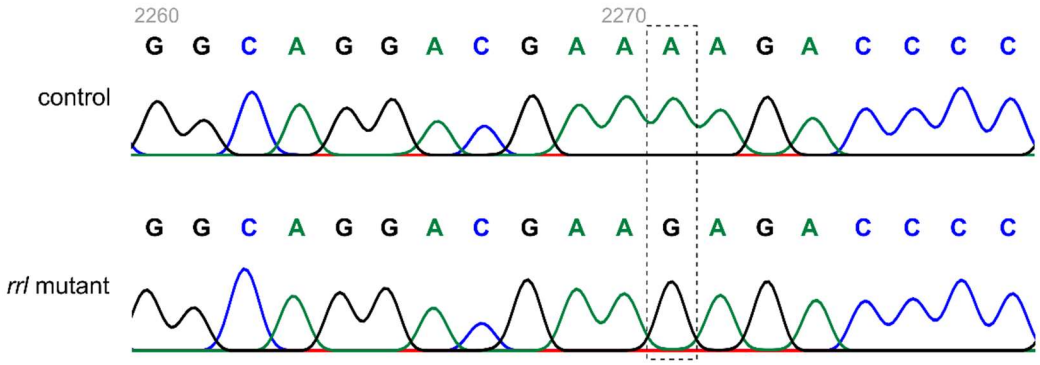


Figure S2: Sequencing of the *rrl* gene coding for 23S rRNA. DNA chromatogram of *rrl* gene between 2260 and 2278 positions for macrolide sensitive strain (up) and spontaneous mutant generated by high macrolide concentration exposure (down).

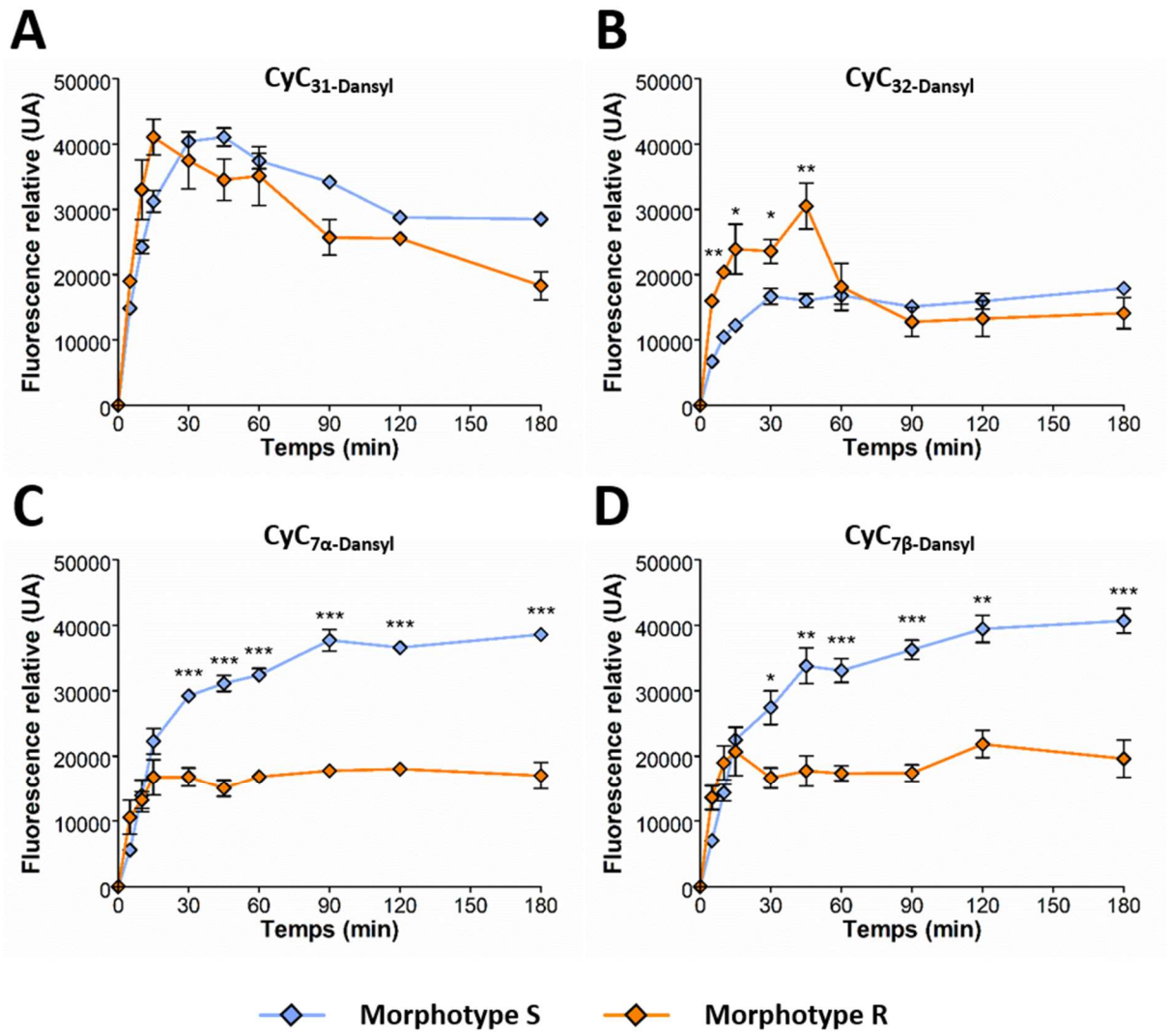
Table S1: Mean relative growth obtained as a function of the different CyC concentrations tested for control, AZM-treated and CLR-treated conditions.

[**CyC$_{17}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.05	MIC$_{/32}$ 0.1	MIC$_{/16}$ 0.2	MIC$_{/8}$ 0.4	MIC$_{/4}$ 0.8	MIC$_{/2}$ 1.6	MIC 3.2
Relative growth of all strains (%)	100±0	100±12	75±14	38±11	31±4	23±4	18±3	5±5
[**CyC$_{31}$**] µg/mL	0	MIC$_{/64}$ 0.31	MIC$_{/32}$ 0.63	MIC$_{/16}$ 1.25	MIC$_{/8}$ 2.5	MIC$_{/4}$ 5	MIC$_{/2}$ 10	MIC 20
Relative growth of all strains (%)	100±0	72±26	44±17	36±9	33±6	31±8	25±3	10±6

Table S2: Activity of the CyC-macrolide combination on *rrl* mutant strain macrolides resistant of *M. abscessus*. Values correspond to the MIC of macrolide according to the different **CyC** concentrations tested. The MIC are given in µg/mL and were obtained from three biological replicates.

***rrl* mutant**	**[CyC]**	0	$MIC_{/64}$ - $MIC_{/2}$	MIC
	MIC_{CLR}	> 40	> 40	< 0.3
	MIC_{AZM}	> 100	> 100	< 0.8

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES



<u>Figure 47 :</u> Cinétique de pénétration des CyC chez *M. abscessus* S *versus* R. Suivi en fonction du temps de la pénétration du **(A)** $CyC_{31\text{-}Dansyl}$, **(B)** $CyC_{32\text{-}Dansyl}$, **(C)** $CyC_{7\alpha\text{-}Dasnyl}$ et **(D)** $CyC_{7\beta\text{-}Dansyl}$. Les bactéries ont été incubées avec le CyC fluorescent (120 µg/mL) à différents temps puis lavées, puis la fluorescence du Dansyl a été mesurée à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 400/535 nm. Les cinétiques correspondent à la moyenne de trois réplicats indépendants et les barres d'erreur à l'erreur type de la moyenne. La différence de pénétration entre le morphotype S et R a été évaluée à l'aide d'un test de Student en utilisant Prism 4.0 (Graphpad, Inc) : * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01 ; *** p-value < 0,001.

Cette partie regroupe les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse qui n'ont pas été inclus dans les publications et dont certains sont encore préliminaires.

L'ensemble des travaux précédant a permis l'identification des cibles impactées par les CyC au niveau des différents compartiments cellulaires incluant la paroi et le cytoplasme (Nguyen et al., 2017 ; Madani et al., 2019). De plus, l'étude de la pénétration des CyC *in vitro* (voir § **Article 2**) a permis de confirmer que les composés sont capables de franchir la paroi mycobactérienne et d'atteindre le cytoplasme. Ces résultats, nous ont amenés à nous demander quel était le mécanisme d'import de nos composés et s'il nécessitait un mécanisme actif ou passif. En complément, nous nous sommes également questionnés sur l'éventuelle capacité des mycobactéries à relarguer les CyC dans le milieu extracellulaire. Dans ce contexte et pour répondre à ces questions, nous avons voulu approfondir la caractérisation de la pénétration des CyC et comprendre leur dynamique chez les mycobactéries, et en particulier chez notre modèle *M. abscessus*.

I/ Dynamique de pénétration des CyC chez *Mycobacterium abscessus*

Précédemment, nous avons pu mettre en évidence qu'indépendamment de leur activité les $CyC_{31/32/7\alpha,\beta\text{-Dansyl}}$ sont capables de pénétrer chez les deux morphotypes S et R de *M. abscessus*, mais avec différents profils de fluorescence selon le composé. Nous avons également constaté une différence d'accumulation des quatre CyC entre le variant S et R. Cette différence entre les deux morphotypes peut être due soit à une entrée moins rapide du CyC ou soit à une plus faible accumulation du CyC chez le variant R que chez le variant S. Afin de tester ces hypothèses, nous avons étudié la cinétique de pénétration de nos quatre CyC fluorescents ($CyC_{31/32/7\alpha,\beta\text{-Dansyl}}$) dans la souche de référence *M. abscessus* CIP104536T morphotype S et R (**Figure 47**).

Ces expériences ont pu montrer que le marquage des CyC sur les deux morphotypes de *M. abscessus* est un phénomène rapide puisqu'en 30 minutes pour le variant S et 15 minutes pour le variant R, la quantité de fluorescence est à son maximum pour tous les CyC fluorescents testés. Par conséquent, bien que les structures chimiques soient très proches, la dynamique de pénétration est différente pour chaque CyC et varie en fonction du morphotype. Le $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ et le $CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$ présentent des profils de cinétiques de pénétration similaires pour les deux souches avec l'obtention d'un plateau de fluorescence maximale vers 90 minutes pour la souche S et vers 30 minutes pour la souche R suggérant que les deux CyC partageraient le même mécanisme de pénétration.

Table 6 : Vitesse d'accumulation des CyC chez les deux morphotypes. Les vitesses d'accumulation des CyC ont été déterminées par régression linéaire sur l'intervalle 0-15 minutes de la cinétique. La différence entre le morphotype S et R a été évaluée à l'aide d'un test de Student en utilisant Prism 4.0 (Graphpad, Inc) à partir de trois réplicats biologiques.

Composés	Morphotype S	Morphotype R	Morphotype S *vs* Morphotype R (p-value)
$CyC_{31\text{-Dansyl}}$	2242 $UA.min^{-1}$	2973 $UA.min^{-1}$	0,002
$CyC_{32\text{-Dansyl}}$	916 $UA.min^{-1}$	1833 $UA.min^{-1}$	0,001
$CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$	1430 $UA.min^{-1}$	1244 $UA.min^{-1}$	0,48
$CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$	1473 $UA.min^{-1}$	1622 $UA.min^{-1}$	0,73

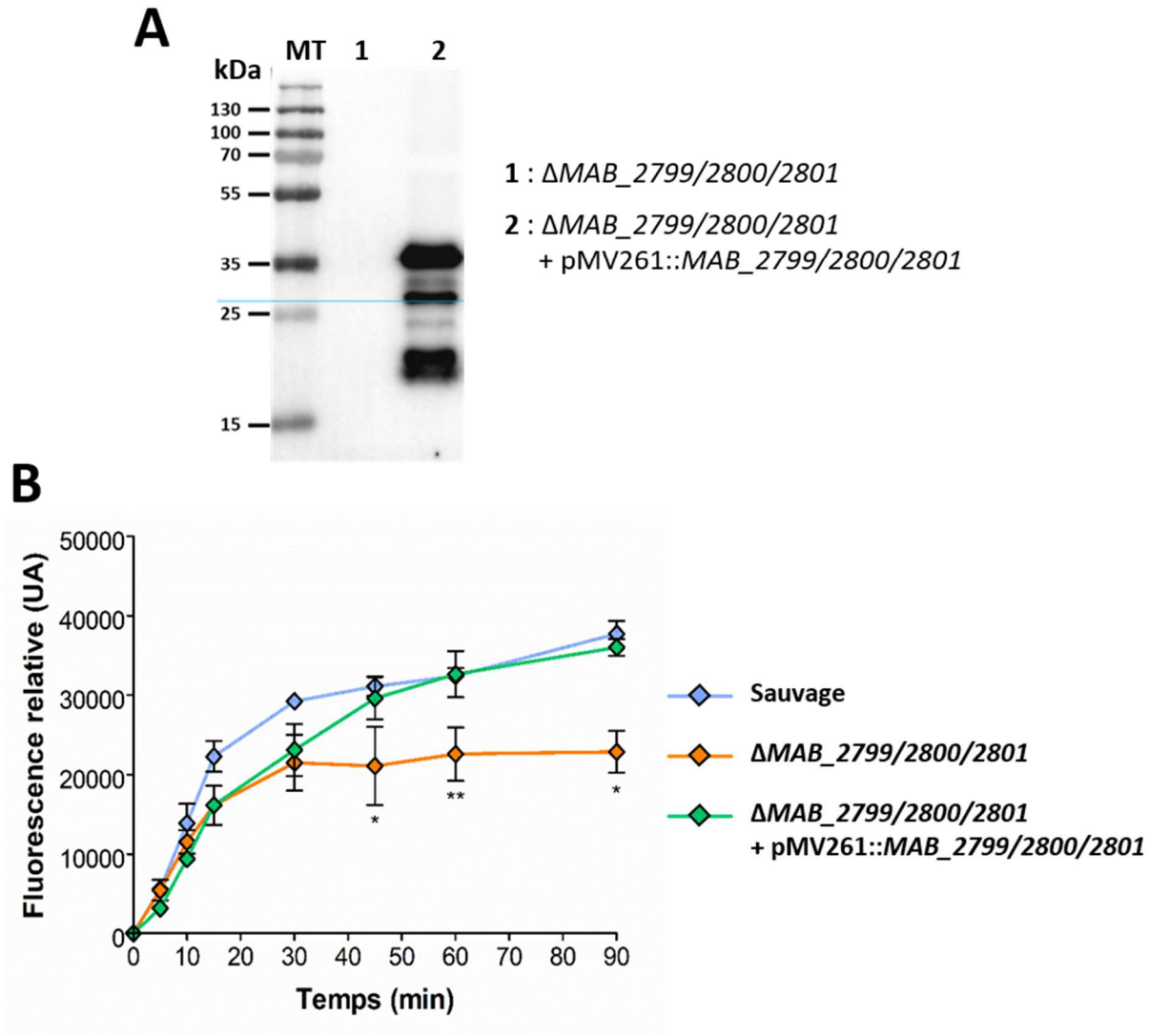
De plus, la vitesse de pénétration pour ces deux composés est similaire pour les deux morphotypes (**Table 6**). En revanche, nous avons pu observer une différence d'accumulation de ces deux CyC entre le morphotype S et R. En effet, les composés $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ et $CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$ pénètrent près de deux fois plus chez le variant S (fluorescence totale ~40000 UA) que chez le variant R (fluorescence totale ~20000 UA). Par conséquent, la différence entre les deux variants repose uniquement sur la différence d'accumulation en CyC.

Pour le $CyC_{32\text{-Dansyl}}$, on peut observer que le niveau de fluorescence, qui est directement lié à la quantité en composé présent dans la bactérie, est 1,5-2 fois plus faible à partir de 90 minutes que pour les autres CyC. Cependant, chez le variant R, la fluorescence augmente rapidement jusqu'à 45 minutes puis diminue jusqu'à se stabiliser vers 90 minutes qui pourrait être due à un équilibre entrée et sortie. De plus, la vitesse d'accumulation est plus élevée chez le morphotype R que le morphotype S (**Table 6**).

De la même manière, avec le $CyC_{31\text{-Dansyl}}$, la fluorescence augmente rapidement puis diminue jusqu'à se stabiliser vers 120-150 minutes pour les deux morphotypes ; caractéristique d'un équilibre entrée et sortie. On pourrait supposer que ce composé ainsi que le $CyC_{32\text{-Dansyl}}$ sont capables de pénétrer dans la bactérie puis de ressortir, soit par simple diffusion, soit par les systèmes de détoxification mis en place par la bactérie. En effet, il est probable que les pompes à efflux responsables de la détoxification d'antibiotique, telle que la bédaquiline, puissent participer à l'efflux du $CyC_{31/32\text{-Dansyl}}$ (Viljoen et al., 2019). Comme pour le $CyC_{32\text{-Dansyl}}$, la vitesse d'accumulation du $CyC_{31\text{-Dansyl}}$ est plus importante chez le morphotype R que le S (**Table 6**). Au vu de ces résultats, la différence observée entre les deux morphotypes pourrait être due à la présence ou non de GPL qui peut avoir un impact sur la vitesse de pénétration des CyC.

II/ Implication des porines

Parmi les voies possibles de pénétration des métabolites et/ou des antibiotiques dans les bactéries, les porines localisées dans la paroi représentent des acteurs majeurs dans ce processus (Zeth et al., 2010). Contextuellement, nous avions identifié trois gènes de porines putatifs, nommés *MAB_2799*, *MAB_2800*, et *MAB_2801* qui sont organisés en opéron et présentant une forte homologie avec MspA la porine majeure de *M. smegmatis*.



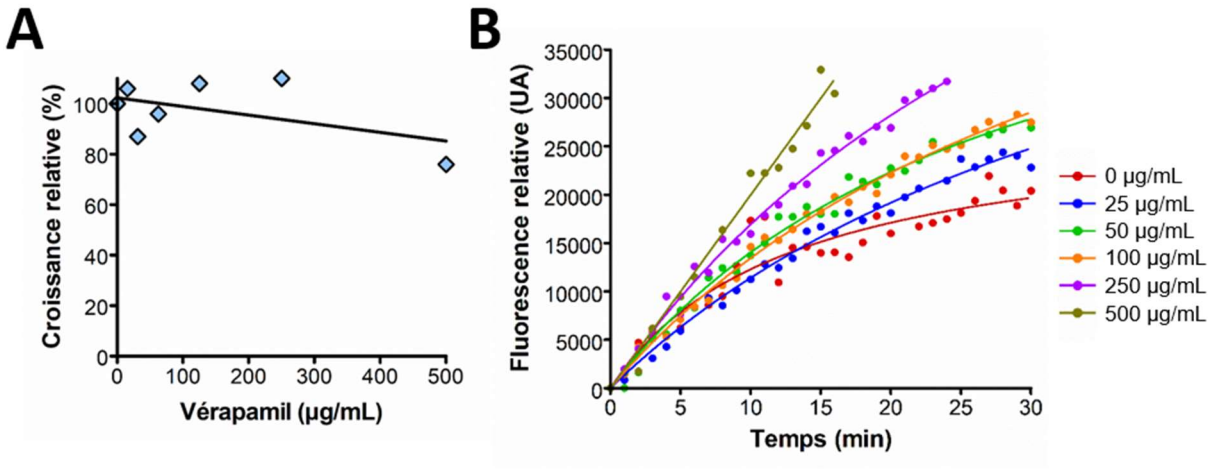
<u>Figure 48 :</u> Implication des protéines MAB_2799/2800/2801 dans la pénétration du CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ chez *M. abscessus* morphotype S. (A) Suivi de la production des porines MAB_2799/2800/2801 par western blot grâce à la présence d'une étiquette HA sur MAB_2801. Le trait bleu correspond à la taille attendue pour MAB_2801. **(B)** Cinétique de pénétration du CyC$_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ chez la souche parentale (bleu), le triple mutant (orange) et le triple mutant complémenté (vert). Comme précédemment, les bactéries ont été incubées avec le CyC à différents temps puis lavées, et la fluorescence a été mesurée à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 400/535 nm. Les cinétiques correspondent à la moyenne de trois réplicats indépendants et les barres d'erreur à l'erreur type de la moyenne. La différence de pénétration entre la souche sauvage et le mutant *ΔMAB_2799/2800/2801* a été évaluée à l'aide d'un test de Student en utilisant Prism 4.0 (Graphpad, Inc) : * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01.

Afin de déterminer si les CyC empruntaient cette voie, nos collaborateurs (équipe du Dr Laurent Kremer, Montpellier) ont généré un triple mutant pour ces gènes en utilisant la méthode de recombinaison développée par van Kessel *et al.* (van Kessel et al., 2007) chez le morphotype S, ainsi que le mutant complémenté avec la construction pMV261::*MAB_2799/2800/2801*, dont l'expression est sous contrôle du promoteur *hsp60* (**Figure 48A**). Puis, nous avons traité ces souches avec les quatre CyC fluorescents. De façon surprenante et malgré des structures chimiques très proches, nous avons observé que seule la pénétration du $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ était impactée par la délétion de *MAB_2799/2800/2801* (**Figure 48B**). En effet, le mutant accumule 1,5 fois moins de CyC que la souche parentale. En revanche, l'entrée du composé n'est pas totalement abolie suggérant une autre voie possible d'import. De plus, nous avons pu confirmer que ce défaut de pénétration du $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ observé chez le mutant est bien restauré lorsqu'on complémente avec les trois gènes.

Ces expériences ont permis de montrer que les porines peuvent être une des portes d'entrée empruntées par les CyC pour franchir la paroi mycobactérienne. En effet, la modification de l'accumulation du $CyC_{7\alpha\text{-Dansyl}}$ chez le triple mutant Δ*MAB_2799/2800/2801* suggère que ce composé est capable de passer par ce système. Par contre, l'absence de modification de la pénétration chez ce mutant pour les $CyC_{31/32/7\beta\text{-Dansyl}}$ ne veut pas dire forcément que ces composés ne passent pas par la voie des porines, car il est tout à fait possible que d'autres porines soient impliquées dans l'import. Au sein du génome de *M. abscessus*, une multitude de gènes de porines putatifs a pu être identifiée dont deux, *mmpA* et *mmpB,* qui ont pu être validées par l'étude de de Moura *et al.* en 2021 (Ripoll et al., 2009 ; de Moura et al., 2021). Il n'est pas exclu que ces deux porines soient impliquées aussi dans l'import. L'utilisation d'un inhibiteur de porines telles que la spermine ou la cadavérine permettrait d'avoir une vue d'ensemble sur leur implication dans l'import des CyC (delaVega et al., 1995 ; Chevalier et al., 2000). Enfin, il n'est pas exclu que les CyC puissent passer par d'autres voies pour entrer, comme la diffusion passive.

III/ Implication des pompes à efflux

En complément de l'import, nous avons également voulu savoir si la bactérie était capable d'exporter nos composés et s'il est possible de potentialiser leur action en bloquant l'efflux. Afin d'évaluer l'implication des pompes à efflux dans l'export de nos composés, nous avons choisi d'utiliser le vérapamil une molécule décrite comme étant capable d'inhiber l'efflux des transporteurs de type ABC, MFS, SMR, RND (Song et al., 2016).



<u>Figure 49 :</u> Effet du vérapamil sur la croissance et les pompes à efflux de *M. abscessus* (A) Suivi de la sensibilité de *M. abscessus* au vérapamil exprimé en pourcentage de croissance relative, normalisé sur le contrôle négatif sans vérapamil. **(B)** Cinétique d'accumulation du BET chez *M. abscessus* S sauvage en présence de différentes concentrations en vérapamil par mesure de la fluorescence à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 530/620 nm.

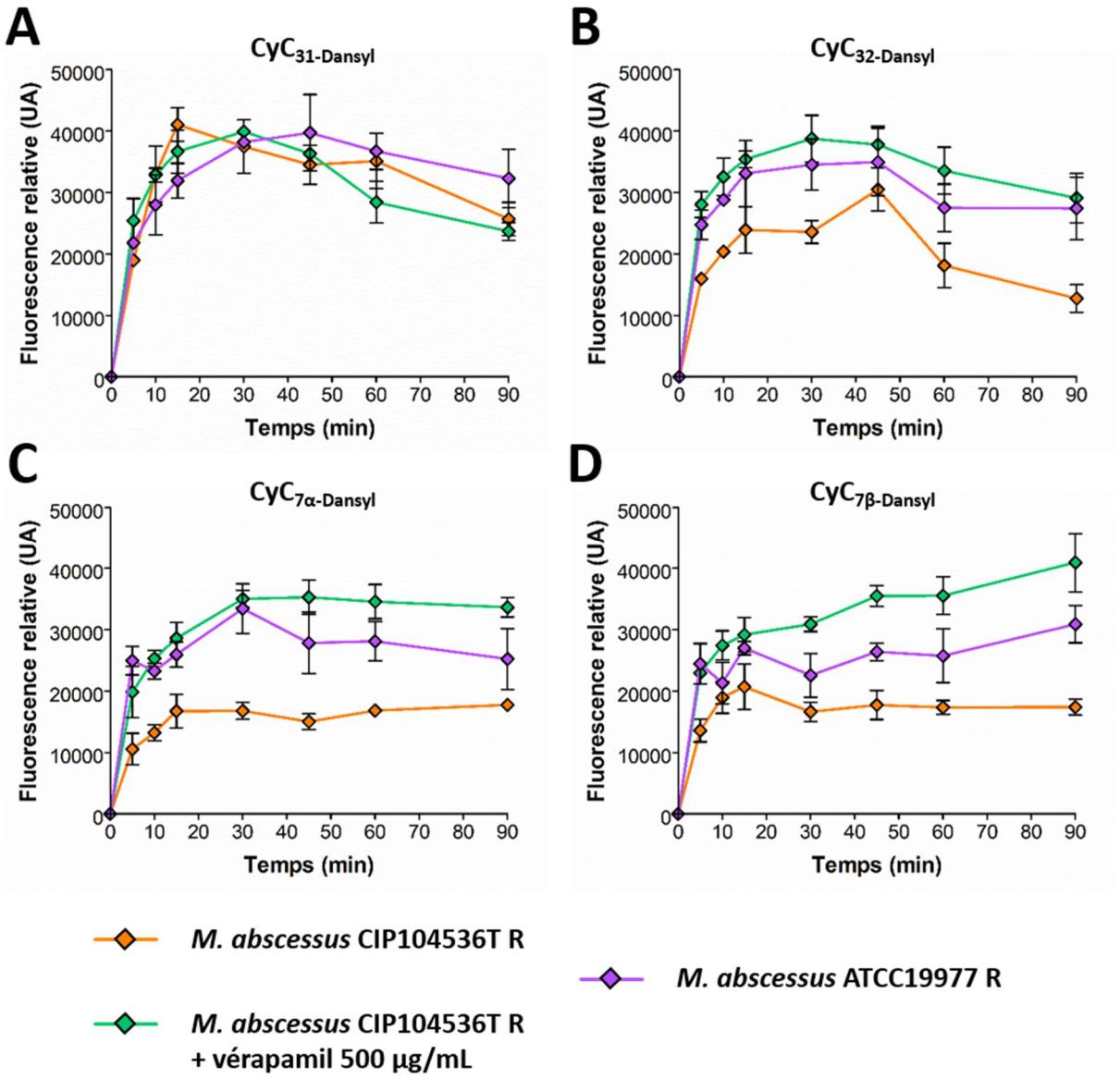
Cette molécule, qui a été approuvée par la FDA comme inhibiteur des canaux calciques, potentialise l'efficacité de plusieurs antibiotiques chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus* en agissant sur les pompes à efflux (Viljoen et al., 2019).

Dans un premier temps, afin de déterminer la concentration optimale pour l'inhibition des pompes, mais sans affecter la croissance bactérienne, nous avons testé la sensibilité au vérapamil par la méthode de microdilution en microplaque avec une gamme de concentrations allant de 10 à 500 µg/mL (**Figure 49A**). Quelles que soient les concentrations testées, la croissance de *M. abscessus* n'est pas impactée par le vérapamil.

Ensuite, afin de contrôler l'action inhibitrice du vérapamil sur les pompes à efflux, nous avons suivi la cinétique d'entrée et de sortie d'un intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET) avec différentes doses en vérapamil chez *M. abscessus* S (**Figure 49B**). En effet, le BET est capable de pénétrer dans la bactérie et de se fixer à l'ADN en émettant de la fluorescence, mais il est aussi relargué par les pompes à efflux (Costa et al., 2016). L'activité inhibitrice du vérapamil dans nos conditions était dose dépendante et la concentration la plus élevée n'altérait pas la croissance cellulaire, nous avons donc choisi pour nos tests d'utiliser une concentration finale en vérapamil de 500 µg/mL.

Dans le but d'évaluer l'implication des pompes à efflux dans la sortie des CyC, les cinétiques de pénétration du $CyC_{31/32/7(\alpha,\beta)\text{-Dansyl}}$ en présence de vérapamil ont été réalisé sur les souches *M. abscessus* S et R. Nous avons pu constater qu'en présence de vérapamil, aucun changement du profil de fluorescence n'a été observé chez le variant S pour les quatre composés. En revanche, chez le morphotype R, les cinétiques des CyC_{31} et CyC_{32} ne sont pas impactées par la présence de vérapamil, contrairement aux $CyC_{7\alpha}$ et $CyC_{7\beta}$ qui montrent un profil de fluorescence différent (**Figure 50**). En effet, en présence de vérapamil, l'intensité de fluorescence augmente d'environ 50 %, suggérant une augmentation de l'accumulation de ces composés dans la bactérie lorsque les pompes sont inhibées. Ces résultats montrent une implication des pompes dans l'export des $CyC_{7\alpha}$ et $CyC_{7\beta}$ chez le morphotype R.

La différence entre le variant S et R réside dans un défaut de synthèse ou de transport des GPL. La souche *M. abscessus* CIP104536T morphotype R présente une mutation dans les gènes de synthèse des GPL et possède donc un système de transport MmpL4a/b fonctionnel. Au vu de l'implication des pompes à efflux dans le relargage du $CyC_{7(\alpha,\beta)}$, nous nous sommes demandés si ce transporteur des GPL était impliqué dans l'export.



<u>Figure 50 :</u> Implication des pompes à efflux dans l'export des CyC. Suivi de la pénétration du **(A)** $CyC_{31\text{-Dansyl}}$, **(B)** $CyC_{32\text{-Dansyl}}$, **(C)** $CyC_{7\alpha\text{-Dasnyl}}$ et **(D)** $CyC_{7\beta\text{-Dansyl}}$. Les bactéries ont été incubées avec le CyC fluorescent (120 µg/mL) à différents temps en présence ou non de vérapamil puis lavées, et la fluorescence du Dansyl a été mesurée à $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 400/535 nm. Les cinétiques correspondent à la moyenne de trois réplicats indépendants et les barres d'erreur à l'erreur type de la moyenne.

Pour tester notre hypothèse, nous avons utilisé une autre souche de *M. abscessus* R (ATCC19977) qui produit des GPL, mais présente un système MmpL4 non fonctionnel. La comparaison des cinétiques de pénétration des CyC entre la souche *M. abscessus* CIP104536T R et la souche *M. abscessus* ATCC19977 R montre que la souche ATCC19977 accumule plus de CyC que la souche CIP104536T (**Figure 50**), ce qui semble indiquer que le transporteur MmpL4a/b serait un des acteurs impliqués dans l'efflux des $CyC_{7\alpha}$ et $CyC_{7\beta}$ chez le variant R. Néanmoins, nous avons pu observer que l'accumulation en $CyC_{7\alpha/\beta\text{-Dansyl}}$ chez la souche ATCC19977 reste plus faible que la souche CIP104536T traitée au vérapamil. Ces résultats suggèrent que la présence d'autres systèmes d'export serait responsable du relargage des CyC dans le milieu extracellulaire.

Cette première étude de l'import et de l'export a permis de commencer à caractériser quelle voie les CyC pourraient emprunter pour entrer dans la bactérie, mais également d'apporter des informations sur leur relargage *via* les pompes à efflux. Il reste encore de nombreuses expériences à réaliser pour pouvoir répondre aux nombreuses questions concernant le mode de pénétration de ces molécules qui seront discutées dans la conclusion & perspectives de ce manuscrit.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'accroissement des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques est devenu un véritable problème de santé publique et atteint des niveaux dangereusement élevés. L'OMS et la « Public Health England » estiment que d'ici 2050, le nombre de décès lié à des infections par des bactéries résistantes sera de 10 millions chaque année (PHE, 2015). La perte d'efficacité des antibiotiques rend les traitements plus difficiles et dans certains cas conduire à une impasse thérapeutique. Plusieurs mesures de prévention ont été mises en place par l'OMS pour éviter l'émergence et la propagation des mécanismes de résistance (OMS, 2020). La stratégie mise en place pour la recherche d'alternative thérapeutique se concentre sur la découverte et le développement de nouvelles molécules antibactériennes ou la réaffectation et le repositionnement d'antibiotiques déjà disponibles. Mon travail de thèse s'est inscrit dans l'étude de nouvelles alternatives thérapeutiques pour lutter contre les infections à *M. abscessus*.

M. abscessus, une mycobactérie non tuberculeuse à croissance rapide, est devenue depuis quelques années un pathogène préoccupant. En effet, elle est capable de provoquer des infections pulmonaires sévères chez des individus ayant une pathologie sous-jacente, en particulier chez les individus atteints de mucoviscidose (Cullen et al., 2000 ; Qvist et al., 2016). À l'heure actuelle, le traitement se compose d'une poly-antibiothérapie longue dont les macrolides sont le pilier central, car cette famille d'antibiotiques reste très active sur cette mycobactérie. Le « résistome » intrinsèque de *M. abscessus* comprend une multitude de mécanismes qui lui permettent de résister à beaucoup d'antibiotiques, dont ceux utilisés aujourd'hui en clinique. En particulier, le mécanisme de résistance induite aux macrolides, médié par la méthylation des ribosomes grâce à la protéine Erm(41), est à l'origine de nombreuses impasses thérapeutiques (Roux et al., 2015). Le développement d'alternatives ou de nouveaux schémas thérapeutiques devient donc indispensable pour élaborer une thérapie efficace contre *M. abscessus*.

Les CyC représentent donc une entité aux propriétés fortes intéressantes qui pourraient à l'avenir très bien s'intégrer dans l'arsenal thérapeutique. Leur puissante activité antibactérienne, leur mécanisme d'action irréversible, leur absence de cytotoxicité et leur effet multi-cible sont des atouts majeurs pour un futur développement comme traitement. Cependant, pour ce type d'application, des études sur le modèle animal sont encore nécessaires pour continuer à avancer sur le développement de ces molécules. Dans ce contexte, des études de pharmacocinétiques et de pharmacodynamiques ont même déjà été initiées chez la souris C3HeB/FeJ avec les deux meilleurs CyC, le CyC_{17} actif *in vitro* et le $CyC_{8(\alpha,\beta)}$ actif en *ex vivo* (données non publiées, réalisées par l'équipe du Pr Jean-Louis Herrmann).

Que les CyC soient administrés par des injections intraveineuse, intrapéritonéale ou encore par voie orale, ces derniers n'ont présenté aucune toxicité chez la souris, avec une répartition relativement homogène des composés dans l'ensemble des organes tels que le cerveau, le cœur, le foie, la rate, le rein, les poumons ainsi que dans le sérum. L'obtention des cinétiques de distribution et d'élimination du $CyC_{8\beta}$ a permis de déterminer que son temps de demi-vie est de 5 à 8 h, similaire à un grand nombre d'antibiotique. Ceci est un paramètre important qui permettra de définir la fréquence d'injection à réaliser pour traiter une infection à *M. abscessus*. Afin d'évaluer l'impact de l'activité des CyC sur la clearance bactérienne dans le modèle murin, des challenges infectieux doivent être réalisés.

La découverte de la méthyltransférase Erm(41) comme cible potentielle des CyC, m'a permis de cibler plus spécifiquement mon travail de thèse sur cette protéine qui est une cible thérapeutique particulièrement attractive, car elle est responsable de la résistance aux macrolides à l'origine d'échec du traitement. Son inactivation pourrait représenter un avantage pour contrecarrer la résistance et maintenir le phénotype sensible de *M. abscessus* au cours du traitement. Les objectifs de ce travail se sont centrés sur l'étude du potentiel thérapeutique, dans le contexte de résistance aux macrolides, et de diagnostic des CyC pour lutter contre les infections à *M. abscessus*. L'ensemble des résultats que j'ai pu générer ou initier lors de mes travaux vont permettre d'ouvrir de nombreuses perspectives de recherches intéressantes.

I/ Axe 1 : Étude de la pénétration des CyC *in vitro* et *ex vivo*

L'étude de la pénétration des CyC sur la bactérie *in vitro* et au sein de macrophages infectés, nous a permis de comprendre pourquoi les CyC sont actifs uniquement sur les mycobactéries et inactifs sur les bactéries à Gram positif et négatif comme *P. aeruginosa* ou encore *S. aureus*. De même, nous avons apporté des informations sur, pourquoi les CyC actifs sur la croissance *in vitro* ne présentaient pas d'activité *ex vivo* et inversement. Cette partie de mes travaux a permis d'envisager de nombreuses perspectives très fondamentales, mais aussi bien en termes de traitement potentiel ou de diagnostic.

A) Modèle *in vitro*

Nous avons pu constater que chez les mycobactéries peu importe l'activité du CyC, la molécule est capable de franchir la paroi. Ce résultat était fort surprenant puisque nous pensions que l'activité était étroitement liée à l'entrée du CyC dans la bactérie. On peut supposer alors que l'activité du CyC est plutôt dépendante des cibles impactées.

Il serait intéressant alors d'identifier les cibles impactées par un CyC non actif sur la croissance *in vitro* de *M. abscessus* comme le $CyC_{7(\alpha,\beta)}$ et de les comparer avec les cibles impactées par un CyC actif comme le CyC_{17} par exemple. Cette étude pourrait permettre d'identifier les cibles importantes pour l'inhibition de la croissance *in vitro* versus *in vivo* et d'identifier également de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'absence de pénétration des CyC sur les bactéries à Gram négatif et positif, mais la présence de cibles potentielles dans le lysat, permettent de spéculer que si les CyC franchissent la paroi bactérienne, ces derniers seraient en mesure d'interagir avec un certain nombre de protéines et, peut-être, de bloquer efficacement la croissance bactérienne. Si cette hypothèse s'avère exacte, cela permettra d'élargir le spectre d'activité des CyC sur d'autres pathogènes pulmonaires comme *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *A. xylosoxidans*.

Il existe plusieurs méthodes afin de faciliter ou favoriser l'entrée d'une molécule dans un organisme. La première pourrait être d'associer les CyC avec des molécules perméabilisant la membrane de ces bactéries. Un autre moyen serait l'utilisation des CyC avec des vecteurs spécifiques à chaque type bactérien. En effet, pour survivre dans leur environnement, les bactéries utilisent des systèmes d'assimilation permettant aux nutriments de franchir la paroi. Ces systèmes peuvent représenter une « porte d'entrée » exploitable pour le passage de molécules antibactériennes.

La voie d'acquisition du fer est un élément essentiel pour la survie bactérienne, car le fer est un microélément impliqué dans plusieurs processus biologiques. Cette assimilation est assurée par des sidérophores qui sont des métabolites sécrétés par la bactérie et des chélateurs d'ions Fe^{3+} dans le milieu extracellulaire. Ils peuvent ensuite être reconnus par un système de transport spécifique, puis internalisés et une fois dissocié du fer, le sidérophore est recyclé vers le milieu extérieur *via* un transporteur (Kramer et al., 2020).

L'utilisation des sidérophores comme molécules vectrices pour faire entrer des antibiotiques a déjà fait ses preuves comme stratégie alternative pour traiter des infections graves aux bactéries à Gram négatif extra-résistantes. En effet, le céfidérocol est une céphalosporine couplée à un sidérophore approuvé par la FDA, montrant des valeurs de CMI inférieures à 2 µg/mL contre *Acinetobacter* spp, *Klebsiella* spp et *P. aeruginosa* résistantes aux β-lactamines et a démontré une efficacité chez des patients colonisés par des bactéries extra-résistantes (Jean et al., 2019 ; Zhanel et al., 2019).

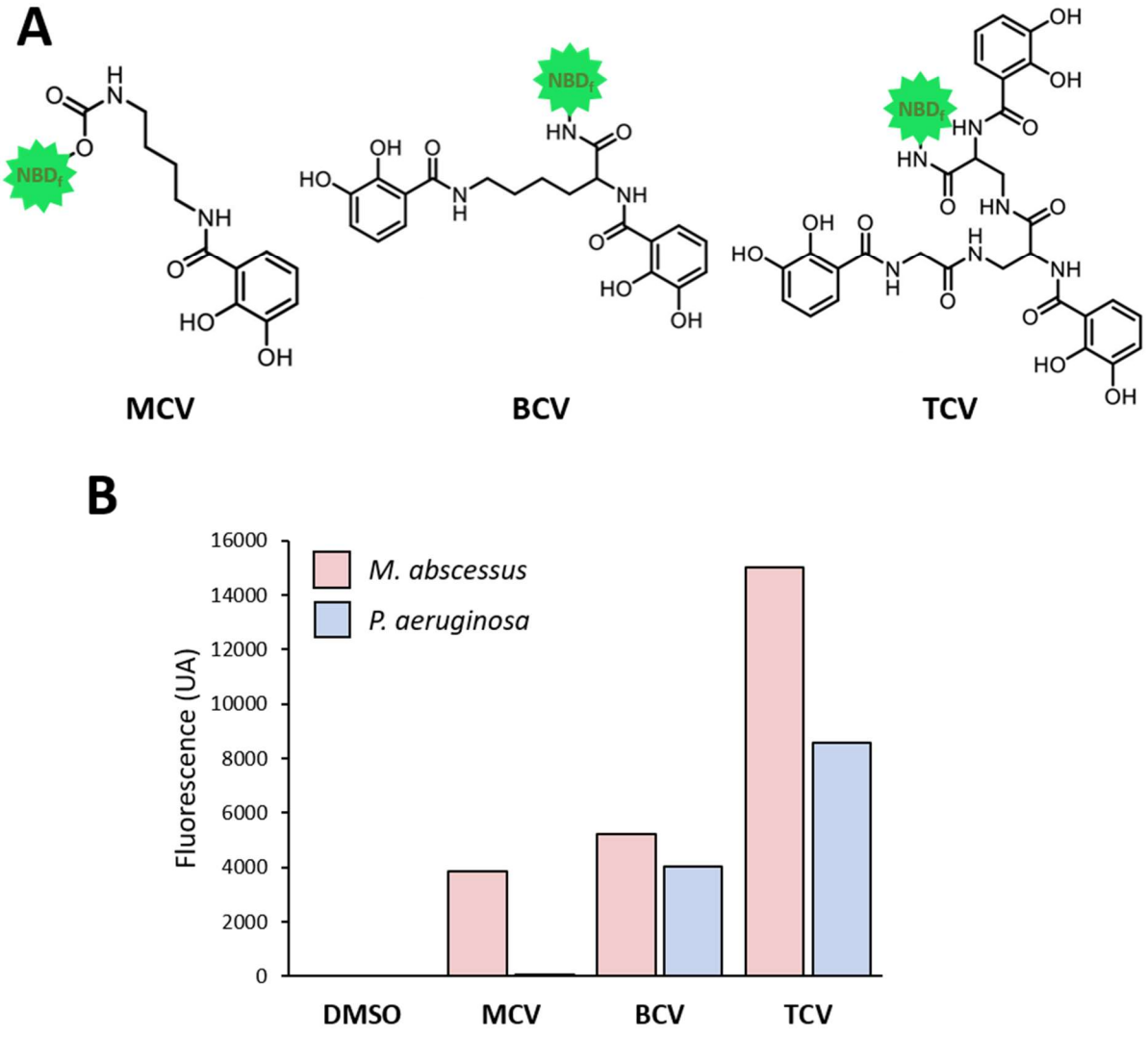


Figure 51 : Molécules vectrices (A) Structure des analogues du sidérophore entérobactine couplés au fluorophore NBD_f (Nitrobenzoxadiazole) coloré en vert, synthétisés par l'équipe du Dr Gaëtan Mislin. **(B)** Analyse préliminaire de la capacité de pénétration des vecteurs MCV, BCV et TCV chez *M. abscessus* S et *P. aeruginosa* PAO1. Au total, $7{,}5 \times 10^8$ bactéries ont été incubées pendant 3 heures avec une concentration finale de 200 µM dans un volume total de 50 µL. L'excès de molécules fluorescentes est éliminé par centrifugation des cellules, suivi de trois lavages avec du tampon PBS (pH 7,4) contenant du Tween 20 0,05 % (*v*/*v*). La fluorescence du NBD_f (longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) : 467 nm ; longueur d'onde d'émission (λ_{em}) : 539 nm) émise par les cellules a ensuite été quantifiée avec le lecteur de microplaque « TECAN Spark 10M multimode microplate reader ».

Par conséquent, la vectorisation des CyC avec des sidérophores pourrait offrir la possibilité aux CyC de passer la paroi bactérienne des Gram négatif et d'atteindre leurs cibles. J'ai pu réaliser des expériences préliminaires où j'ai étudié la pénétration de trois nouveaux vecteurs fluorescents synthétisés par l'équipe du Dr Gaëtan Mislin (CNRS, Strasbourg) chez *P. aeruginosa* et *M. abscessus* (**Figure 51**). Ces vecteurs sont dérivés de l'entérobactine un sidérophore utilisé par de nombreuses bactéries, dont *P. aeruginosa* (Perraud et al., 2020). Nous avons pu observer que les vecteurs BCV et TCV sont capables de pénétrer chez *P. aeruginosa* contrairement au MCV. De façon inattendue, les composés MCV, BCV et TCV ont aussi la capacité d'entrer chez *M. abscessus*.

Ces résultats suggèrent que la stratégie d'utiliser les sidérophores comme vecteurs ou chevaux de Troie peut être une alternative prometteuse pour élargir le spectre d'activité des CyC aux bactéries pathogènes à Gram négatif. Enfin, elle pourrait très bien s'appliquer pour le traitement des infections à *M. abscessus* notamment avec des antibiotiques qui n'ont pas la capacité de traverser la mycomembrane.

B) Développement d'un outil de diagnostic

Mon travail a également permis de mettre en évidence la détection sélective de *M. abscessus* dans un mélange bactérien complexe, ouvrant ainsi la porte à de nouveaux outils de diagnostic. En effet, les patients atteints de mucoviscidose ont un risque significativement plus élevé de contracter des infections aux mycobactéries non tuberculeuses, principalement dues à *M. abscessus*, que la population en bonne santé.

Parce que les infections à *M. abscessus* sont une cause majeure de déclin clinique et de morbidité chez ces patients, l'amélioration du traitement et de la détection de cette mycobactérie dans le contexte d'une culture polymicrobienne représente un élément essentiel pour mieux gérer les soins et traitements administrés aux patients.

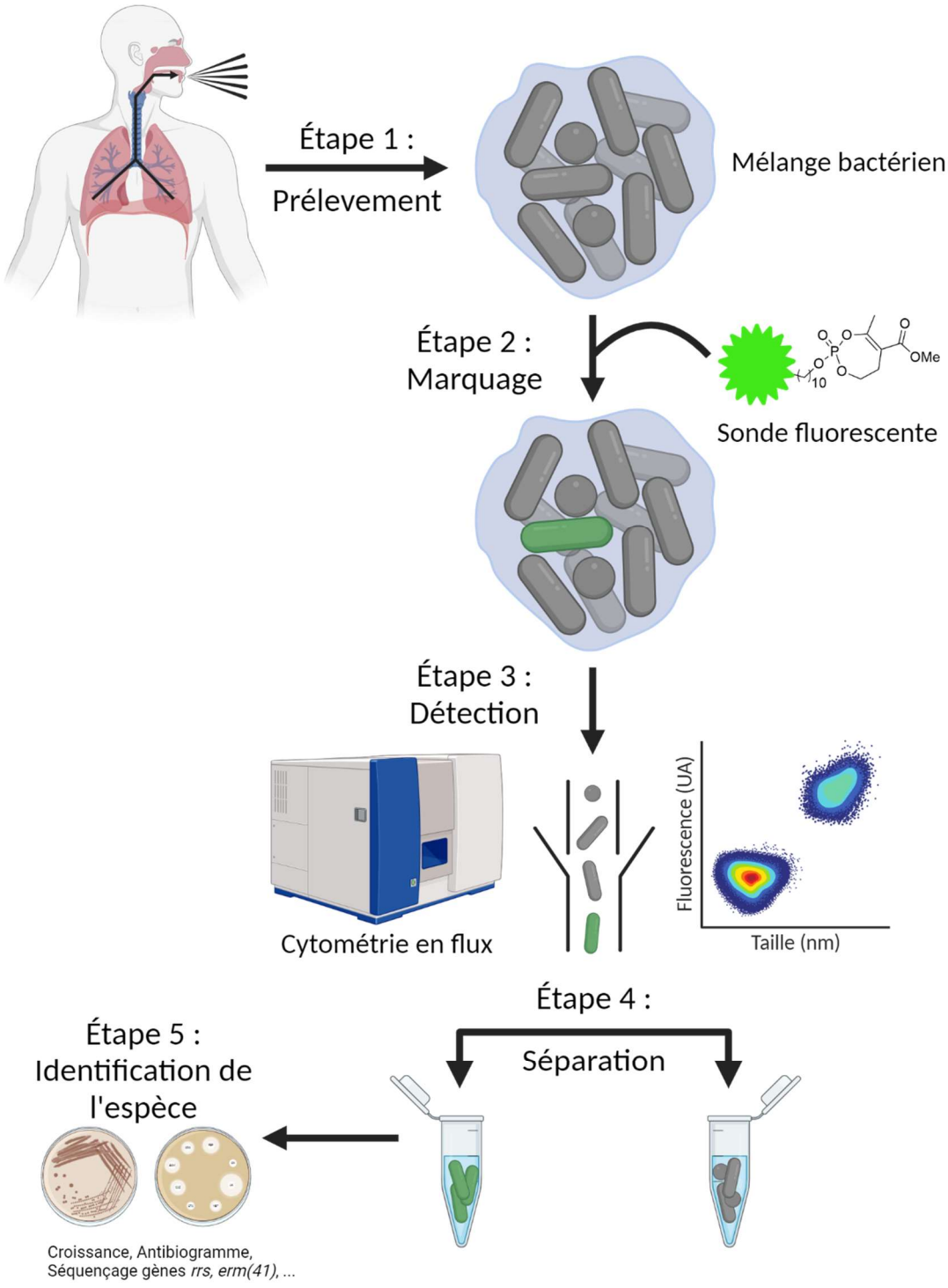


Figure 52 : Utilisation des CyC comme outil de diagnostic. Protocole hypothétique pour la détection des mycobactéries par les CyC à partir d'échantillon d'expectorât issu de patients infectés.

Dans ce contexte, l'idée est donc d'utiliser la spécificité des CyC et leur capacité à pénétrer rapidement dans les bactéries comme sonde afin de détecter *M. abscessus* directement dans les expectorâts de patient (**Figure 52**).

Un des aspects techniques à prendre en compte est que la présence de mycobactéries dans un échantillon d'expectorât peut-être généralement furtif, et donc la sensibilité de détection est un point important à prendre en compte. L'évolution technologique de la cytométrie en flux et en particulier du FACS (« Fluorescence activated cell sorting ») pourrait permettre à la fois de détecter les mycobactéries dans un échantillon complexe, mais également de les séparer. De plus, cette méthode d'analyse est très sensible et permet d'analyser des milliers d'événements par seconde. Enfin, la récupération des mycobactéries avec l'étape de FACS permettra alors de les mettre en culture sur milieu spécifique et de faire des analyses supplémentaires pour identifier l'espèce et le profil de sensibilité aux antibiotiques. Ces perspectives pourraient être validées sur des échantillons issus de patients atteints de mucoviscidose provenant de la collection d'échantillons cliniques déjà collectés durant l'étude clinique CiMENT.

C) Modèle *ex vivo*

Lors de l'étude de la pénétration des CyC dans le modèle *ex vivo*, nos résultats ont révélé que les CyC actifs au niveau intracellulaire s'accumulent dans les compartiments acides des macrophages ; que cette accumulation semble être essentielle pour leur délivrance aux phagosomes contenant des mycobactéries, et par conséquent, pour leur effet antimicrobien contre la réplication intracellulaire de *M. abscessus* ; et que la modification d'une telle localisation intracellulaire *via* la perturbation du pH endo-lysosomal affecte fortement l'accumulation et l'efficacité du CyC. On pourrait très bien imaginer que l'accumulation des CyC dans les lysosomes pourrait être une condition *sine qua non* pour leur délivrance en quantité suffisante dans le phagosome et inhiber la croissance de *M. abscessus*.

Une des caractéristiques de *M. abscessus* est que la bactérie est capable de se répliquer à l'intérieur des macrophages en induisant la rupture de la membrane phagosomale du macrophage *via* son système ESX-4 pour lui permettre d'aller dans le cytosol (Roux et al., 2016 ; Laencina et al., 2018). Ces changements spatiaux modifient la zone environnante de la mycobactérie et pourraient alors avoir un impact sur l'activité du CyC. Il serait alors intéressant de tester l'activité des CyC sur des macrophages infectés avec différentes localisations cellulaires de *M. abscessus* (phagosome *versus* cytoplasme).

À l'image du pyrazinamide, dont l'activité est augmentée chez un mutant de *M. tuberculosis* ΔRD1 dépourvu de son système de sécrétion ESX-1, qui est incapable d'altérer la membrane phagosomale et de se retrouver dans le cytoplasme (Santucci et al., 2022). La sensibilité aux CyC pourrait aussi être testée chez un mutant Δ*eccB4* dépourvu d'une machinerie ESX-4 fonctionnelle et qui est restreint aux phagosomes (Laencina et al., 2018), et de le comparer avec une souche sauvage qui a la capacité de se retrouver dans le cytosol. Si la localisation cellulaire de *M. abscessus* a un impact sur l'activité du CyC, alors on devrait retrouver une différence d'activité de notre CyC lorsque la bactérie est retrouvée dans le phagosome et dans le cytoplasme.

D'autre part, bien que *M. abscessus* soit capable d'infecter des individus en bonne santé, ce pathogène est largement impliqué dans des infections chez des individus atteints de mucoviscidose (Varghese et al., 2012 ; Martiniano et al., 2022). Il serait également pertinent de tester l'activité des CyC en intracellulaire contre *M. abscessus* dans un modèle déficient en *cftr,* car dans ce modèle, l'acidification du phagosome est altérée et pourrait avoir un impact sur l'activité du CyC (Di et al., 2006).

II/ Axe 2 : Étude de l'import et de l'export des CyC chez *Mycobacterium abscessus*

Le deuxième objectif de ma thèse était d'étudier l'import et l'export des CyC dans notre modèle *M. abscessus*. Cette partie visait à apporter des informations sur les voies que peuvent emprunter les CyC pour entrer ou sortir de la bactérie. Bien que cette partie ne soit pas totalement finalisée, les premières expériences ont permis d'apporter quelques éléments de réponse aux questions soulevées sur les voies possibles d'import et le relargage des CyC. En définitive, l'étude du transport, de l'accumulation et de l'export des CyC chez *M. abscessus* servira à comprendre les propriétés pharmacologiques de nos composés et à l'avenir synthétiser des composés plus efficaces.

Tout d'abord, nous avons montré que la pénétration des CyC est un phénomène rapide indépendamment de l'activité du composé et que ces profils de pénétration sont totalement divergents pour les deux variants. Nous avons pu également constater que la vitesse de pénétration des CyC entre le morphotype S et R est similaire contrairement à la quantité accumulée qui est significativement plus faible chez le variant R. Nous avons pu montrer également que les porines MAB_2779/2800/2801, homologues de la porine MspA chez *M. smegmatis*, peuvent être une des portes d'entrée des CyC.

Néanmoins, il est tout à fait possible que d'autres porines soient impliquées dans cet import des CyC et le suivi de la pénétration des CyC en présence d'inhibiteur de porines permettrait alors d'avoir une vue d'ensemble sur leur implication dans ce phénomène. Sans compter qu'on ne peut pas exclure que les CyC utilisent d'autres voies pour franchir la paroi mycobactérienne. Afin de déterminer si l'import des CyC nécessite aussi un transport actif, la pénétration des CyC pourrait être testée en présence ou non d'ATP et en présence de CCCP, car si le CyC passe *via* un transport utilisant l'ATP, la pénétration sera alors diminuée. Enfin, le passage de ces molécules hydrophobes directement par diffusion passive au travers de l'enveloppe n'est pas à exclure non plus et l'importance de ce phénomène pourra être évaluée une fois que la contribution des autres modes de transport aura été établie.

Des perspectives similaires pourront aussi être envisagées sur les systèmes d'export des CyC au travers des différentes pompes à efflux. Afin d'apporter des preuves supplémentaires sur l'implication de MmpL4 dans l'efflux, le suivi de l'accumulation des $CyC_{7(\alpha,\beta)}$ en condition de surexpression du système MmpL4a/b pourrait être réalisé. La surexpression de ce système devrait induire une diminution d'accumulation du CyC. Cependant, l'accumulation chez la souche ATCC19977 reste plus faible que la souche CIP104536T traitée au vérapamil. Ces résultats suggèrent donc que d'autres transporteurs seraient impliqués dans le relargage des CyC. Afin d'identifier le ou les transporteurs, il pourrait être envisagé de réaliser un criblage de la pénétration des CyC sur une banque de mutant de transporteur comme cela a été fait pour l'export de plusieurs antibiotiques chez *M. abscessus* (Gorzynski et al., 2021).

III/ Axe 3 : Activité synergique des CyC

Si les challenges infectieux s'avèrent encourageants, les caractéristiques bioactives des CyC en association avec les antibiotiques employés lors de la phase intensive du traitement, pourraient à l'avenir s'intégrer dans un schéma thérapeutique pour lutter contre les infections à *M. abscessus*. En effet, l'activité synergique du CyC_{17} avec la CLR et l'AZM, et du CyC_{31} avec la céfoxitine et la CLR montre que les CyC peuvent être non seulement associés avec d'autres molécules, mais sont aussi capables de potentialiser leur activité. D'autant plus, que les autres associations testées n'ont pas démontré d'effet antagoniste, nous confortant dans l'idée que ces composés peuvent être incorporés dans la thérapie actuelle. Afin d'approfondir cette partie, et avant de passer sur des modèles de souris, l'étude de l'interaction des CyC associés avec ces mêmes antibiotiques pourrait être réalisée cette fois-ci sur des macrophages infectés par *M. abscessus*.

Les résultats générés par l'étude *in vitro* et *ex vivo* permettront d'évaluer les meilleures associations pour traiter les formes intra- et extracellulaires. En complément, ces mêmes études pourront être réalisées sur les sous-espèces du MABSC et sur plusieurs isolats cliniques qui présentent différents profils de sensibilité aux antibiotiques. Enfin, les associations qui ont un effet synergique pourront être évaluées chez la souris infectée par *M. abscessus*.

Qui plus est, l'effet synergique entre le CyC_{31} et la céfoxitine pourrait ouvrir la voie à une nouvelle application des CyC. Lors des expériences d'ABPP, des β-lactamases ont pu être identifiées comme cibles des CyC. Il serait intéressant de tester l'activité inhibitrice d'un CyC sur Bla_{Mab}, enzyme largement responsable de la résistance aux β-lactamines chez *M. abscessus*. Ensuite, les meilleurs inhibiteurs de l'enzyme pourront être testés sur la croissance de *M. abscessus* en association avec différentes β-lactamines dont celles qui sont inactivées par Bla_{Mab}. À l'image des associations CyC-macrolide, l'inhibition de Bla_{Mab} par les CyC permettrait de restaurer la sensibilité de ces antibiotiques.

IV/ Axe 4 : Caractérisation biochimique d'Erm(41)

À la suite de l'identification d'Erm(41) comme cible du CyC_{17}, un des objectifs de mon travail de thèse était d'étudier l'effet potentialisateur des CyC pour contrecarrer la résistance aux macrolides médiée par Erm(41). L'obtention de la protéine purifiée, nous a permis de valider que cette protéine était bien une cible des différents CyC testés. Cependant, il sera intéressant de compléter la caractérisation biochimique telle que la caractérisation de son activité enzymatique, la spécificité de substrat, la mesure des constantes d'inhibitions, la sélection des meilleurs inhibiteurs, etc.. ; et structurale comme l'obtention de la structure 3D d'Erm(41) en complexe avec les différents CyC.

V/ Axe 5 : Résistance induite aux macrolides

À l'échelle de la bactérie, nos résultats ont clairement montré que les CyC sont capables de potentialiser l'activité de la CLR et de l'AZM sur des souches résistantes à ces antibiotiques, et ceux, à des concentrations inférieures à sa valeur de CMI. En revanche, nous avons observé que lors d'une exposition à la CLR, il est nécessaire d'avoir une concentration en CyC plus élevée pour restaurer la sensibilité aux macrolides qu'avec une exposition à l'AZM. L'ensemble de ces expériences suggère que la nature du macrolide utilisé pour induire la résistance est extrêmement importante pour que les CyC soient efficaces à de très faibles concentrations. Ce dernier point est particulièrement important si les CyC peuvent un jour être inclus dans une stratégie thérapeutique pour lutter contre *M. abscessus*.

D'autre part, nous avons pu montrer que la protéine Erm(41) est capable d'interagir avec les $CyC_{8(\alpha,\beta)}$ qui sont actifs uniquement *ex vivo*. Ce résultat suggère que les CyC seraient également capables d'inhiber la résistance aux macrolides médiée par Erm(41) au sein de macrophages infectés. Pour tester cette hypothèse, il est nécessaire de tester l'association du $CyC_{8(\alpha,\beta)}$ avec l'AZM ou la CLR sur des macrophages infectés par une souche de *M. abscessus* dont la résistante a été préalablement induite.

En fin de compte, il est indéniable que les progrès réalisés au niveau de la lutte contre certaines bactéries pathogènes ont permis d'augmenter l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose. Néanmoins, les moyens de lutte disponibles restent encore insuffisants du fait de l'efficacité limitée et/ou du nombre restreint d'antibiotiques disponibles sur le marché. Cette situation est notamment exacerbée par la résistance intrinsèque de certaines bactéries comme *M. abscessus*, et par l'émergence de souches multi-résistantes. Finalement, les études antérieures et les résultats générés par mes travaux de thèse ont permis d'apporter de nombreuses informations sur le potentiel thérapeutique des CyC. Les résultats obtenus nous laissent imaginer la place que pourraient éventuellement prendre ces molécules dans la thérapie actuelle. Avant tout, l'étape essentielle pour approfondir la caractérisation des CyC comme alternative thérapeutique est de montrer que ces composés sont actifs contre *M. abscessus* dans le modèle murin. Pour cela, il sera alors important de trouver la meilleure formulation pour délivrer les CyC en quantité suffisante au point d'infection.

On pourrait très bien imaginer administrer les CyC sous forme d'un cocktail contenant deux CyC, un actif *in vitro* et un actif *ex vivo*, afin de traiter les formes intra- et extracellulaire de *M. abscessus*. Il serait possible aussi de les inclure dans la phase intensive du traitement actuelle puisqu'il présente une activité synergique avec la CLR/AZM et la céfoxitine. De la même manière, les CyC pourraient très bien être inclus dans la phase intensive et le traitement de fond en association avec les macrolides et ainsi éviter l'apparition de la résistance induite par les macrolides. On peut également les utiliser directement sur des souches qui ont développé cette résistance en association avec de la CLR, association qui a présenté la meilleure activité sur les souches déjà résistantes. En définitive, les nombreuses caractéristiques des CyC offrent une multitude d'application thérapeutique pour le traitement des infections à *M. abscessus*, mais également leur sélectivité sur les mycobactéries permettrait de faire des thérapies ciblées. De plus, cette sélectivité pourrait très bien être utilisée pour le développement d'un futur outil de diagnostic.

En définitive, mon travail de thèse a finalement permis d'ouvrir de nombreuses perspectives dans les différents domaines : fondamental, diagnostic ou encore thérapeutique. J'espère que ma contribution pourra apporter de nombreuses réponses et surtout de l'espoir aux patients infectés par cette bactérie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alcaide, F., J. Amlerova, G. Bou, P. J. Ceyssens, P. Coll, D. Corcoran, M. S. Fangous, I. Gonzalez-Alvarez, R. Gorton, G. Greub, G. Hery-Arnaud, J. Hrabak, A. Ingebretsen, B. Lucey, I. Marekovic, C. Mediavilla-Gradolph, M. R. Monte, J. O'Connor, J. O'Mahony, O. Opota, B. O'Reilly, D. Orth-Holler, M. Oviano, J. J. Palacios, B. Palop, A. B. Pranada, L. Quiroga, D. Rodriguez-Temporal, M. J. Ruiz-Serrano, G. Tudo, A. Van den Bossche, J. van Ingen, B. Rodriguez-Sanchez, G. European Study Group on and D. Molecular (2018). "How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry." Clin Microbiol Infect **24**(6): 599-603.

Alcaide, F., G. E. Pfyffer and A. Telenti (1997). "Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **41**(10): 2270-2273.

Alvarez-Elcoro, S. and M. J. Enzler (1999). "The macrolides: erythromycin, clarithromycin, and azithromycin." Mayo Clinic proceedings **74**(6): 613-634.

Anastasi, E., S. Giguere, L. J. Berghaus, M. K. Hondalus, J. M. Willingham-Lane, I. MacArthur, N. D. Cohen, M. C. Roberts and J. A. Vazquez-Boland (2015). "Novel transferable erm(46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in Rhodococcus equi." The Journal of antimicrobial chemotherapy **70**(12): 3184-3190.

Andries, K., P. Verhasselt, J. Guillemont, H. W. Gohlmann, J. M. Neefs, H. Winkler, J. Van Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis and V. Jarlier (2005). "A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis." Science **307**(5707): 223-227.

Angala, S. K., Z. Palcekova, J. M. Belardinelli and M. Jackson (2018). "Covalent modifications of polysaccharides in mycobacteria." Nature chemical biology **14**(3): 193-198.

Armstrong, D. T. and N. Parrish (2021). "Current Updates on Mycobacterial Taxonomy, 2018 to 2019." Journal of clinical microbiology **59**(7): e0152820.

Ates, L. S., A. D. van der Woude, J. Bestebroer, G. van Stempvoort, R. J. Musters, J. J. Garcia-Vallejo, D. I. Picavet, R. Weerd, M. Maletta, C. P. Kuijl, N. N. van der Wel and W. Bitter (2016). "The ESX-5 System of Pathogenic Mycobacteria Is Involved In Capsule Integrity and Virulence through Its Substrate PPE10." PLoS pathogens **12**(6): e1005696.

Azimi, T., M. Mosadegh, M. J. Nasiri, S. Sabour, S. Karimaei and A. Nasser (2019). "Phage therapy as a renewed therapeutic approach to mycobacterial infections: a comprehensive review." Infection and drug resistance **12**: 2943-2959.

Aziz, D. B., M. L. Go and T. Dick (2020). "Rifabutin Suppresses Inducible Clarithromycin Resistance in Mycobacterium abscessus by Blocking Induction of whiB7 and erm41." Antibiotics **9**(2).

Aziz, D. B., J. L. Low, M. L. Wu, M. Gengenbacher, J. W. P. Teo, V. Dartois and T. Dick (2017). "Rifabutin Is Active against Mycobacterium abscessus Complex." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(6).

Bandyopadhyay, S., S. Dutta, C. D. Spilling, C. M. Dupureur and N. P. Rath (2008). "Synthesis and biological evaluation of a phosphonate analog of the natural acetyl cholinesterase inhibitor cyclophostin." The Journal of organic chemistry **73**(21): 8386-8391.

Barelier, S., R. Avellan, G. R. Gnawali, P. Fourquet, V. Roig-Zamboni, I. Poncin, V. Point, Y. Bourne, S. Audebert, L. Camoin, C. D. Spilling, S. Canaan, J. F. Cavalier and G. Sulzenbacher (2023). "Direct capture, inhibition and crystal structure of HsaD (Rv3569c) from M. tuberculosis." The FEBS journal **290**(6): 1563-1582.

Barkay, T., S. M. Miller and A. O. Summers (2003). "Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems." FEMS microbiology reviews **27**(2-3): 355-384.

Bastian, S., N. Veziris, A. L. Roux, F. Brossier, J. L. Gaillard, V. Jarlier and E. Cambau (2011). "Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing." Antimicrobial agents and chemotherapy **55**(2): 775-781.

Bay, D. C., K. L. Rommens and R. J. Turner (2008). "Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow." Biochimica et biophysica acta **1778**(9): 1814-1838.

Becker, K., K. Haldimann, P. Selchow, L. M. Reinau, M. Dal Molin and P. Sander (2017). "Lipoprotein Glycosylation by Protein-O-Mannosyltransferase (MAB_1122c) Contributes to Low Cell Envelope Permeability and Antibiotic Resistance of Mycobacterium abscessus." Frontiers in microbiology **8**: 2123.

Belisle, J. T. and P. J. Brennan (1989). "Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria." Journal of bacteriology **171**(6): 3465-3470.

Bellio, P., L. Fagnani, L. Nazzicone and G. Celenza (2021). "New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay." MethodsX **8**: 101543.

Benwill, J. L. and R. J. Wallace, Jr. (2014). "Mycobacterium abscessus: challenges in diagnosis and treatment." Current opinion in infectious diseases **27**(6): 506-510.

Bernut, A., C. Dupont, N. V. Ogryzko, A. Neyret, J. L. Herrmann, R. A. Floto, S. A. Renshaw and L. Kremer (2019). "CFTR Protects against Mycobacterium abscessus Infection by Fine-Tuning Host Oxidative Defenses." Cell reports **26**(7): 1828-1840 e1824.

Bernut, A., J. L. Herrmann, K. Kissa, J. F. Dubremetz, J. L. Gaillard, G. Lutfalla and L. Kremer (2014a). "Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(10): E943-952.

Bernut, A., J. L. Herrmann, G. Lutfalla and L. Kremer (2014b). "[Mycobacterial cording: a new mechanism of immune evasion?]." Medecine sciences : M/S **30**(5): 499-502.

Bernut, A., J. L. Herrmann, D. Ordway and L. Kremer (2017). "The Diverse Cellular and Animal Models to Decipher the Physiopathological Traits of Mycobacterium abscessus Infection." Frontiers in cellular and infection microbiology **7**: 100.

Bernut, A., A. Viljoen, C. Dupont, G. Sapriel, M. Blaise, C. Bouchier, R. Brosch, C. de Chastellier, J. L. Herrmann and L. Kremer (2016). "Insights into the smooth-to-rough transitioning in Mycobacterium bolletii unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members." Molecular microbiology **99**(5): 866-883.

Bhalla, G. S., M. S. Sarao, D. Kalra, K. Bandyopadhyay and A. R. John (2018). "Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria." Practical laboratory medicine **12**: e00107.

Bich Hanh, B. T., N. T. Quang, Y. Park, B. E. Heo, S. Jeon, J. W. Park and J. Jang (2021). "Omadacycline Potentiates Clarithromycin Activity Against Mycobacterium abscessus." Frontiers in pharmacology **12**: 790767.

Billman-Jacobe, H., M. J. McConville, R. E. Haites, S. Kovacevic and R. L. Coppel (1999). "Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of Mycobacterium smegmatis." Mol Microbiol **33**(6): 1244-1253.

Birnbaum, J., E. O. Stapley, A. K. Miller, H. Wallick, D. Hendlin and H. B. Woodruff (1978). "Cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin: a microbiological overview." The Journal of antimicrobial chemotherapy **4**(B): 15-32.

Blanchard, A. C. and V. J. Waters (2019). "Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease." Seminars in respiratory and critical care medicine **40**(6): 727-736.

Blanchard, A. C. and V. J. Waters (2022). "Opportunistic Pathogens in Cystic Fibrosis: Epidemiology and Pathogenesis of Lung Infection." J Pediatric Infect Dis Soc **11**(Supplement_2): S3-S12.

Bonfield, T. L., J. R. Panuska, M. W. Konstan, K. A. Hilliard, J. B. Hilliard, H. Ghnaim and M. Berger (1995). "Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs." American journal of respiratory and critical care medicine **152**(6 Pt 1): 2111-2118.

Braun, V., H. Gnirke, U. Henning and K. Rehn (1973). "Model for the structure of the shape-maintaining layer of the Escherichia coli cell envelope." Journal of bacteriology **114**(3): 1264-1270.

Braun, V. and H. Wolff (1970). "The murein-lipoprotein linkage in the cell wall of Escherichia coli." European journal of biochemistry **14**(2): 387-391.

Brennan, P. J. and H. Nikaido (1995). "The envelope of mycobacteria." Annual review of biochemistry **64**: 29-63.

Brown-Elliott, B. A., D. E. Griffith and R. J. Wallace, Jr. (2002a). "Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria." Infectious disease clinics of North America **16**(1): 187-220.

Brown-Elliott, B. A., S. Vasireddy, R. Vasireddy, E. Iakhiaeva, S. T. Howard, K. Nash, N. Parodi, A. Strong, M. Gee, T. Smith and R. J. Wallace, Jr. (2015). "Utility of sequencing the erm(41) gene in isolates of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus with low and intermediate clarithromycin MICs." Journal of clinical microbiology **53**(4): 1211-1215.

Brown-Elliott, B. A. and R. J. Wallace, Jr. (2019). "In Vitro Susceptibility Testing of Bedaquiline against Mycobacterium abscessus Complex." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(2).

Brown-Elliott, B. A., R. J. Wallace, Jr., N. L. Wengenack, S. D. Workman, A. D. S. Cameron, G. Bush, M. D. Hughes, S. Melton, B. Gonzalez-Ramirez, E. Rodriguez, K. Somayaji, C. Klapperich, M. Viers, A. J. Bolaji, E. Rempel and D. C. Alexander (2023). "Emergence of Inducible Macrolide Resistance in Mycobacterium chelonae Due to Broad-Host-Range Plasmid and Chromosomal Variants of the Novel 23S rRNA Methylase Gene, erm(55)." Journal of clinical microbiology: e0042823.

Bruscia, E. M. and T. L. Bonfield (2016). "Cystic Fibrosis Lung Immunity: The Role of the Macrophage." Journal of innate immunity **8**(6): 550-563.

Bryant, J. M., D. M. Grogono, D. Greaves, J. Foweraker, I. Roddick, T. Inns, M. Reacher, C. S. Haworth, M. D. Curran, S. R. Harris, S. J. Peacock, J. Parkhill and R. A. Floto (2013). "Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study." Lancet **381**(9877): 1551-1560.

Bryant, J. M., D. M. Grogono, D. Rodriguez-Rincon, I. Everall, K. P. Brown, P. Moreno, D. Verma, E. Hill, J. Drijkoningen, P. Gilligan, C. R. Esther, P. G. Noone, O. Giddings, S. C. Bell, R. Thomson, C. E. Wainwright, C. Coulter, S. Pandey, M. E. Wood, R. E. Stockwell, K. A. Ramsay, L. J. Sherrard, T. J. Kidd, N. Jabbour, G. R. Johnson, L. D. Knibbs, L. Morawska, P. D. Sly, A. Jones, D. Bilton, I. Laurenson, M. Ruddy, S. Bourke, I. C. Bowler, S. J. Chapman, A. Clayton, M. Cullen, T. Daniels, O. Dempsey, M. Denton, M. Desai, R. J. Drew, F. Edenborough, J. Evans, J. Folb, H. Humphrey, B. Isalska, S. Jensen-Fangel, B. Jonsson, A. M. Jones, T. L. Katzenstein, T. Lillebaek, G. MacGregor, S. Mayell, M. Millar, D. Modha, E. F. Nash, C. O'Brien, D. O'Brien, C. Ohri, C. S. Pao, D. Peckham, F. Perrin, A. Perry, T. Pressler, L. Prtak, T. Qvist, A. Robb, H. Rodgers, K. Schaffer, N. Shafi, J. van Ingen, M. Walshaw, D. Watson, N. West, J. Whitehouse, C. S. Haworth, S. R. Harris, D. Ordway, J. Parkhill and R. A. Floto (2016). "Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium." Science **354**(6313): 751-757.

Burian, J., S. Ramon-Garcia, C. G. Howes and C. J. Thompson (2012). "WhiB7, a transcriptional activator that coordinates physiology with intrinsic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis." Expert review of anti-infective therapy **10**(9): 1037-1047.

Buriankova, K., F. Doucet-Populaire, O. Dorson, A. Gondran, J. C. Ghnassia, J. Weiser and J. L. Pernodet (2004). "Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex." Antimicrobial agents and chemotherapy **48**(1): 143-150.

Bussiere, D. E., S. W. Muchmore, C. G. Dealwis, G. Schluckebier, V. L. Nienaber, R. P. Edalji, K. A. Walter, U. S. Ladror, T. F. Holzman and C. Abad-Zapatero (1998). "Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria." Biochemistry **37**(20): 7103-7112.

Campbell, E. A., N. Korzheva, A. Mustaev, K. Murakami, S. Nair, A. Goldfarb and S. A. Darst (2001). "Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase." Cell **104**(6): 901-912.

Carriere, F., E. Rogalska, C. Cudrey, F. Ferrato, R. Laugier and R. Verger (1997). "In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases." Bioorganic & medicinal chemistry **5**(2): 429-435.

Cassio Barreto de Oliveira, M. and A. Balan (2020). "The ATP-Binding Cassette (ABC) Transport Systems in Mycobacterium tuberculosis: Structure, Function, and Possible Targets for Therapeutics." Biology **9**(12).

Catanzaro, A. (2002). "Diagnosis, differentiating colonization, infection, and disease." Clinics in chest medicine **23**(3): 599-601, vi.

Catherinot, E., A. L. Roux, E. Macheras, D. Hubert, M. Matmar, L. Dannhoffer, T. Chinet, P. Morand, C. Poyart, B. Heym, M. Rottman, J. L. Gaillard and J. L. Herrmann (2009). "Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus." Journal of clinical microbiology **47**(1): 271-274.

Cavalier, J. F., C. D. Spilling, T. Durand, L. Camoin and S. Canaan (2021). "Lipolytic enzymes inhibitors: A new way for antibacterial drugs discovery." European journal of medicinal chemistry **209**: 112908.

Chalut, C. (2016). "MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria." Tuberculosis **100**: 32-45.

Chan, E. D., X. Bai, M. Kartalija, I. M. Orme and D. J. Ordway (2010). "Host immune response to rapidly growing mycobacteria, an emerging cause of chronic lung disease." American journal of respiratory cell and molecular biology **43**(4): 387-393.

Cheng, A., Y. T. Tsai, S. Y. Chang, H. Y. Sun, U. I. Wu, W. H. Sheng, Y. C. Chen and S. C. Chang (2019). "In Vitro Synergism of Rifabutin with Clarithromycin, Imipenem, and Tigecycline against the Mycobacterium abscessus Complex." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(4).

Chevalier, J., M. Malléa and J.-M. Pagès (2000). "Comparative aspects of the diffusion of norfloxacin, cefepime and spermine through the F porin channel of Enterobacter cloacae." Biochemical Journal **348**(1): 223-227.

Chiaradia, L., C. Lefebvre, J. Parra, J. Marcoux, O. Burlet-Schiltz, G. Etienne, M. Tropis and M. Daffe (2017). "Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane." Scientific reports **7**(1): 12807.

Chitsaz, M. and M. H. Brown (2017). "The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance." Essays in biochemistry **61**(1): 127-139.

Choi, G. E., K. N. Min, C. J. Won, K. Jeon, S. J. Shin and W. J. Koh (2012a). "Activities of moxifloxacin in combination with macrolides against clinical isolates of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense." Antimicrobial agents and chemotherapy **56**(7): 3549-3555.

Choi, G. E., S. J. Shin, C. J. Won, K. N. Min, T. Oh, M. Y. Hahn, K. Lee, S. H. Lee, C. L. Daley, S. Kim, B. H. Jeong, K. Jeon and W. J. Koh (2012b). "Macrolide treatment for Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense infection and inducible resistance." American journal of respiratory and critical care medicine **186**(9): 917-925.

Choi, W. S., M. J. Kim, D. W. Park, S. W. Son, Y. K. Yoon, T. Song, S. M. Bae, J. W. Sohn and H. J. Cheong (2011). "Clarithromycin and amikacin vs. clarithromycin and moxifloxacin for the treatment of post-acupuncture cutaneous infections due to Mycobacterium abscessus: a prospective observational study." Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **17**(7): 1084-1090.

Choo, S. W., W. Y. Wee, Y. F. Ngeow, W. Mitchell, J. L. Tan, G. J. Wong, Y. Zhao and J. Xiao (2014). "Genomic reconnaissance of clinical isolates of emerging human pathogen Mycobacterium abscessus reveals high evolutionary potential." Scientific reports **4**: 4061.

Chopra, I. and M. Roberts (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **65**(2): 232-260 ; second page, table of contents.

Chopra, S., K. Matsuyama, C. Hutson and P. Madrid (2011). "Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae." The Journal of antimicrobial chemotherapy **66**(7): 1533-1536.

Ciofu, O., T. Tolker-Nielsen, P. O. Jensen, H. Wang and N. Hoiby (2015). "Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients." Advanced drug delivery reviews **85**: 7-23.

Clary, G., S. J. Sasindran, N. Nesbitt, L. Mason, S. Cole, A. Azad, K. McCoy, L. S. Schlesinger and L. Hall-Stoodley (2018). "Mycobacterium abscessus Smooth and Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes but Are Killed by Acetic Acid." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(3).

Cole, S. T. and P. M. Alzari (2005). "Microbiology. TB--a new target, a new drug." Science **307**(5707): 214-215.

Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-544.

Cole, S. T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honore, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J. R. Woodward and B. G. Barrell (2001). "Massive gene decay in the leprosy bacillus." Nature **409**(6823): 1007-1011.

Collins, C. H., J. M. Grange and M. D. Yates (1984). "Mycobacteria in water." The Journal of applied bacteriology **57**(2): 193-211.

Compain, F., D. Soroka, B. Heym, J. L. Gaillard, J. L. Herrmann, D. Dorchene, M. Arthur and V. Dubee (2018). "In vitro activity of tedizolid against the Mycobacterium abscessus complex." Diagnostic microbiology and infectious disease **90**(3): 186-189.

Coraux, C., R. Hajj, P. Lesimple and E. Puchelle (2005). "[Repair and regeneration of the airway epithelium]." Medecine sciences : M/S **21**(12): 1063-1069.

Costa, S. S., E. Lopes, E. Azzali, D. Machado, T. Coelho, P. E. da Silva, M. Viveiros, M. Pieroni and I. Couto (2016). "An Experimental Model for the Rapid Screening of Compounds with Potential Use Against Mycobacteria." Assay and drug development technologies **14**(9): 524-534.

Cotes, K., R. Dhouib, I. Douchet, H. Chahinian, A. de Caro, F. Carriere and S. Canaan (2007). "Characterization of an exported monoglyceride lipase from Mycobacterium tuberculosis possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids." The Biochemical journal **408**(3): 417-427.

Cravatt, B. F., A. T. Wright and J. W. Kozarich (2008). "Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry." Annual review of biochemistry **77**: 383-414.

Cremades, R., A. Santos, J. C. Rodriguez, E. Garcia-Pachon, M. Ruiz and G. Royo (2009). "Mycobacterium abscessus from respiratory isolates: activities of drug combinations." Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy **15**(1): 46-48.

Cullen, A. R., C. L. Cannon, E. J. Mark and A. A. Colin (2000). "Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis. Colonization or infection?" American journal of respiratory and critical care medicine **161**(2 Pt 1): 641-645.

Dabbs, E. R., K. Yazawa, Y. Mikami, M. Miyaji, N. Morisaki, S. Iwasaki and K. Furihata (1995). "Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation." Antimicrobial agents and chemotherapy **39**(4): 1007-1009.

Daffe, M. and H. Marrakchi (2019). "Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope." Microbiology spectrum **7**(4).

Daffe, M., M. McNeil and P. J. Brennan (1991). "Novel type-specific lipooligosaccharides from Mycobacterium tuberculosis." Biochemistry **30**(2): 378-388.

Dal Molin, M., M. Gut, A. Rominski, K. Haldimann, K. Becker and P. Sander (2018). "Molecular Mechanisms of Intrinsic Streptomycin Resistance in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(1).

Davis, A. R., D. W. Gohara and M. N. Yap (2014). "Sequence selectivity of macrolide-induced translational attenuation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(43): 15379-15384.

de Moura, V. C. N., D. Verma, I. Everall, K. P. Brown, J. M. Belardinelli, C. Shanley, M. Stapleton, J. Parkhill, R. A. Floto, D. J. Ordway and M. Jackson (2021). "Increased Virulence of Outer Membrane Porin Mutants of Mycobacterium abscessus." Frontiers in microbiology **12**: 706207.

De Rossi, E., J. A. Ainsa and G. Riccardi (2006). "Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question." FEMS microbiology reviews **30**(1): 36-52.

De Rossi, E., M. Branzoni, R. Cantoni, A. Milano, G. Riccardi and O. Ciferri (1998). "mmr, a Mycobacterium tuberculosis gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors." Journal of bacteriology **180**(22): 6068-6071.

Deb, C., J. Daniel, T. D. Sirakova, B. Abomoelak, V. S. Dubey and P. E. Kolattukudy (2006). "A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in Mycobacterium tuberculosis." The Journal of biological chemistry **281**(7): 3866-3875.

Dedieu, L., C. Serveau-Avesque, L. Kremer and S. Canaan (2013). "Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research." Biochimie **95**(1): 66-73.

Dedrick, R. M., C. A. Guerrero-Bustamante, R. A. Garlena, D. A. Russell, K. Ford, K. Harris, K. C. Gilmour, J. Soothill, D. Jacobs-Sera, R. T. Schooley, G. F. Hatfull and H. Spencer (2019). "Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus." Nature medicine **25**(5): 730-733.

Dedrick, R. M., B. E. Smith, M. Cristinziano, K. G. Freeman, D. Jacobs-Sera, Y. Belessis, A. Whitney Brown, K. A. Cohen, R. M. Davidson, D. van Duin, A. Gainey, C. B. Garcia, C. R. Robert George, G. Haidar, W. Ip, J. Iredell, A. Khatami, J. S. Little, K. Malmivaara, B. J. McMullan, D. E. Michalik, A. Moscatelli, J. A. Nick, M. G. Tupayachi Ortiz, H. M. Polenakovik, P. D. Robinson, M. Skurnik, D. A. Solomon, J. Soothill, H. Spencer, P. Wark, A. Worth, R. T. Schooley, C. A. Benson and G. F. Hatfull (2023). "Phage Therapy of Mycobacterium Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **76**(1): 103-112.

Dedrick, R. M., B. E. Smith, R. A. Garlena, D. A. Russell, H. G. Aull, V. Mahalingam, A. M. Divens, C. A. Guerrero-Bustamante, K. M. Zack, L. Abad, C. H. Gauthier, D. Jacobs-Sera and G. F. Hatfull (2021). "Mycobacterium abscessus Strain Morphotype Determines Phage Susceptibility, the Repertoire of Therapeutically Useful Phages, and Phage Resistance." mBio **12**(2).

Degiacomi, G., A. Benjak, J. Madacki, F. Boldrin, R. Provvedi, G. Palu, J. Kordulakova, S. T. Cole and R. Manganelli (2017). "Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on Mycobacterium tuberculosis gene expression." Scientific reports **7**: 43495.

Degiacomi, G., J. C. Sammartino, L. R. Chiarelli, O. Riabova, V. Makarov and M. R. Pasca (2019). "Mycobacterium abscessus, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients." International journal of molecular sciences **20**(23).

delaVega, A. L. and A. H. Delcour (1995). "Cadaverine induces closing of E. coli porins." The EMBO journal **14**(23): 6058-6065.

Deshayes, C., H. Bach, D. Euphrasie, R. Attarian, M. Coureuil, W. Sougakoff, F. Laval, Y. Av-Gay, M. Daffe, G. Etienne and J. M. Reyrat (2010). "MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in Mycobacterium smegmatis." Molecular microbiology **78**(4): 989-1003.

Di, A., M. E. Brown, L. V. Deriy, C. Li, F. L. Szeto, Y. Chen, P. Huang, J. Tong, A. P. Naren, V. Bindokas, H. C. Palfrey and D. J. Nelson (2006). "CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity." Nature cell biology **8**(9): 933-944.

Dick, T., S. J. Shin, W. J. Koh, V. Dartois and M. Gengenbacher (2020). "Rifabutin Is Active against Mycobacterium abscessus in Mice." Antimicrobial agents and chemotherapy **64**(2).

Dousa, K. M., D. C. Nguyen, S. G. Kurz, M. A. Taracila, C. R. Bethel, W. Schinabeck, B. N. Kreiswirth, S. T. Brown, W. H. Boom, R. S. Hotchkiss, K. E. Remy, F. J. Jacono, C. L. Daley, S. M. Holland, A. A. Miller and R. A. Bonomo (2022). "Inhibiting Mycobacterium abscessus Cell Wall Synthesis: Using a Novel Diazabicyclooctane beta-Lactamase Inhibitor To Augment beta-Lactam Action." mBio **13**(1): e0352921.

Drlica, K., M. Malik, R. J. Kerns and X. Zhao (2008). "Quinolone-mediated bacterial death." Antimicrobial agents and chemotherapy **52**(2): 385-392.

Drlica, K. and X. Zhao (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **61**(3): 377-392.

Du, K., M. Sharma and G. L. Lukacs (2005). "The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR." Nature structural & molecular biology **12**(1): 17-25.

Dubee, V., 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 and M. Arthur (2015). "beta-Lactamase inhibition by avibactam in Mycobacterium abscessus." The Journal of antimicrobial chemotherapy **70**(4): 1051-1058.

Dubois, V., A. Viljoen, L. Laencina, V. Le Moigne, A. Bernut, F. Dubar, M. Blaise, J. L. Gaillard, Y. Guerardel, L. Kremer, J. L. Herrmann and F. Girard-Misguich (2018). "MmpL8(MAB) controls Mycobacterium abscessus virulence and production of a previously unknown glycolipid family." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **115**(43): E10147-E10156.

Dudek, M., J. Romanowska, T. Witula and J. Trylska (2014). "Interactions of amikacin with the RNA model of the ribosomal A-site: computational, spectroscopic and calorimetric studies." Biochimie **102**: 188-202.

Dulberger, C. L., E. J. Rubin and C. C. Boutte (2020). "The mycobacterial cell envelope - a moving target." Nature reviews. Microbiology **18**(1): 47-59.

Dupont, C., A. Viljoen, F. Dubar, M. Blaise, A. Bernut, A. Pawlik, C. Bouchier, R. Brosch, Y. Guerardel, J. Lelievre, L. Ballell, J. L. Herrmann, C. Biot and L. Kremer (2016). "A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in Mycobacterium abscessus." Molecular microbiology **101**(3): 515-529.

Dupont, C., A. Viljoen, S. Thomas, F. Roquet-Baneres, J. L. Herrmann, K. Pethe and L. Kremer (2017). "Bedaquiline Inhibits the ATP Synthase in Mycobacterium abscessus and Is Effective in Infected Zebrafish." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(11).

Dutta, S., R. K. Malla, S. Bandyopadhyay, C. D. Spilling and C. M. Dupureur (2010). "Synthesis and kinetic analysis of some phosphonate analogs of cyclophostin as inhibitors of human acetylcholinesterase." Bioorganic & medicinal chemistry **18**(6): 2265-2274.

Efthimiou, J., M. J. Smith, M. E. Hodson and J. C. Batten (1984). "Fatal pulmonary infection with Mycobacterium fortuitum in cystic fibrosis." British journal of diseases of the chest **78**(3): 299-302.

El Helou, G., G. M. Viola, R. Hachem, X. Y. Han and Raad, II (2013). "Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections." The Lancet. Infectious diseases **13**(2): 166-174.

Engelhardt, H., C. Heinz and M. Niederweis (2002). "A tetrameric porin limits the cell wall permeability of Mycobacterium smegmatis." The Journal of biological chemistry **277**(40): 37567-37572.

Esteban, J., N. Z. Martin-de-Hijas, D. Garcia-Almeida, A. Bodas-Sanchez, I. Gadea and R. Fernandez-Roblas (2009). "Prevalence of erm methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria." Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **15**(10): 919-923.

Etienne, G., W. Malaga, F. Laval, A. Lemassu, C. Guilhot and M. Daffe (2009). "Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in mycobacteria." Journal of bacteriology **191**(8): 2613-2621.

Eydoux, C., J. De Caro, F. Ferrato, P. Boullanger, D. Lafont, R. Laugier, F. Carriere and A. De Caro (2007). "Further biochemical characterization of human pancreatic lipase-related protein 2 expressed in yeast cells." Journal of lipid research **48**(7): 1539-1549.

Falkinham, J. O., 3rd (2015). "Environmental sources of nontuberculous mycobacteria." Clinics in chest medicine **36**(1): 35-41.

FDA (2010). "FDA Drug Safety Communication: Increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections."

Fennelly, K. P., C. Ojano-Dirain, Q. Yang, L. Liu, L. Lu, A. Progulske-Fox, G. P. Wang, P. Antonelli and G. Schultz (2016). "Biofilm Formation by Mycobacterium abscessus in a Lung Cavity." American journal of respiratory and critical care medicine **193**(6): 692-693.

Floss, H. G. and T. W. Yu (2005). "Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis." Chemical reviews **105**(2): 621-632.

Floto, R. A., K. N. Olivier, L. Saiman, C. L. Daley, J. L. Herrmann, J. A. Nick, P. G. Noone, D. Bilton, P. Corris, R. L. Gibson, S. E. Hempstead, K. Koetz, K. A. Sabadosa, I. Sermet-Gaudelus, A. R. Smyth, J. van Ingen, R. J. Wallace, K. L. Winthrop, B. C. Marshall and C. S. Haworth (2016a). "US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis." Thorax **71 Suppl 1**(Suppl 1): i1-22.

Floto, R. A., K. N. Olivier, L. Saiman, C. L. Daley, J. L. Herrmann, J. A. Nick, P. G. Noone, D. Bilton, P. Corris, R. L. Gibson, S. E. Hempstead, K. Koetz, K. A. Sabadosa, I. Sermet-Gaudelus, A. R. Smyth, J. van Ingen, R. J. Wallace, K. L. Winthrop, B. C. Marshall and C. S. Haworth (2016b). "US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary." Thorax **71**(1): 88-90.

Frank, J., J. Zhu, P. Penczek, Y. Li, S. Srivastava, A. Verschoor, M. Radermacher, R. Grassucci, R. K. Lata and R. K. Agrawal (1995). "A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome." Nature **376**(6539): 441-444.

Fujiwara, K., M. Yoshida, Y. Murase, A. Aono, K. Furuuchi, Y. Tanaka, K. Ohta, M. Ato, S. Mitarai and K. Morimoto (2022). "Potential Cross-Transmission of Mycobacterium abscessus among Non-Cystic Fibrosis Patients at a Tertiary Hospital in Japan." Microbiology spectrum **10**(3): e0009722.

Fukuda, T., T. Matsumura, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, T. Kinoshita and Y. S. Morita (2013). "Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis." mBio **4**(1): e00472-00412.

Gadsby, D. C. and A. C. Nairn (1994). "Regulation of CFTR channel gating." Trends in biochemical sciences **19**(11): 513-518.

Gadsby, D. C., P. Vergani and L. Csanady (2006). "The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis." Nature **440**(7083): 477-483.

Ganapathy, U. S., V. Dartois and T. Dick (2019). "Repositioning rifamycins for Mycobacterium abscessus lung disease." Expert opinion on drug discovery **14**(9): 867-878.

Garneau-Tsodikova, S. and K. J. Labby (2016). "Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives." MedChemComm **7**(1): 11-27.

Geiman, D. E., T. R. Raghunand, N. Agarwal and W. R. Bishai (2006). "Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven Mycobacterium tuberculosis whiB-like genes." Antimicrobial agents and chemotherapy **50**(8): 2836-2841.

Geurtsen, J., S. Chedammi, J. Mesters, M. Cot, N. N. Driessen, T. Sambou, R. Kakutani, R. Ummels, J. Maaskant, H. Takata, O. Baba, T. Terashima, N. Bovin, C. M. Vandenbroucke-Grauls, J. Nigou, G. Puzo, A. Lemassu, M. Daffe and B. J. Appelmelk (2009). "Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation." Journal of immunology **183**(8): 5221-5231.

Gilleron, M., M. Lepore, E. Layre, D. Cala-De Paepe, N. Mebarek, J. A. Shayman, S. Canaan, L. Mori, F. Carriere, G. Puzo and G. De Libero (2016). "Lysosomal Lipases PLRP2 and LPLA2 Process Mycobacterial Multi-acylated Lipids and Generate T Cell Stimulatory Antigens." Cell chemical biology **23**(9): 1147-1156.

Gilleron, M., V. F. Quesniaux and G. Puzo (2003). "Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response." The Journal of biological chemistry **278**(32): 29880-29889.

Gilleron, M., C. Ronet, M. Mempel, B. Monsarrat, G. Gachelin and G. Puzo (2001). "Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells." The Journal of biological chemistry **276**(37): 34896-34904.

Goh, B. C., S. Larsson, L. C. Dam, Y. H. S. Ling, W. L. P. Chua, R. Abirami, S. Singh, J. L. E. Ong, J. W. P. Teo, P. Ho, P. W. Ingham, K. Pethe and P. C. Dedon (2023). "Rifaximin potentiates clarithromycin against Mycobacterium abscessus in vitro and in zebrafish." JAC-antimicrobial resistance **5**(3): dlad052.

Goh, B. C., X. Xiang, J. Lescar and P. C. Dedon (2022). "Crystal structure and functional analysis of mycobacterial erythromycin resistance methyltransferase Erm38 reveals its RNA-binding site." The Journal of biological chemistry **298**(2): 101571.

Gopalaswamy, R., S. Shanmugam, R. Mondal and S. Subbian (2020). "Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment." Journal of biomedical science **27**(1): 74.

Gorzynski, M., T. Week, T. Jaramillo, E. Dzalamidze and L. Danelishvili (2021). "Mycobacterium abscessus Genetic Determinants Associated with the Intrinsic Resistance to Antibiotics." Microorganisms **9**(12).

Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(12): 5547-5551.

Greenwood, D. J., M. S. Dos Santos, S. Huang, M. R. G. Russell, L. M. Collinson, J. I. MacRae, A. West, H. Jiang and M. G. Gutierrez (2019). "Subcellular antibiotic visualization reveals a dynamic drug reservoir in infected macrophages." Science **364**(6447): 1279-1282.

Griffith, D. E., T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace, Jr. and K. Winthrop (2007). "An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases." American journal of respiratory and critical care medicine **175**(4): 367-416.

Griffith, D. E. and C. L. Daley (2022). "Treatment of Mycobacterium abscessus Pulmonary Disease." Chest **161**(1): 64-75.

Guerin, M. E., J. Kordulakova, P. M. Alzari, P. J. Brennan and M. Jackson (2010). "Molecular basis of phosphatidyl-myo-inositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria." The Journal of biological chemistry **285**(44): 33577-33583.

Guillemin, I., E. Cambau and V. Jarlier (1995). "Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus Mycobacterium: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones." Antimicrobial agents and chemotherapy **39**(9): 2145-2149.

Guillemin, I., V. Jarlier and E. Cambau (1998). "Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **42**(8): 2084-2088.

Gunnison, J. B., M. C. Shevky, J. A. Bruff, V. R. Coleman and E. Jawetz (1953). "Studies on antibiotic synergism and antagonism: the effect in vitro of combinations of antibiotics on bacteria of varying resistance to single antibiotics." Journal of bacteriology **66**(2): 150-158.

Guo, H., G. M. Courbon, S. A. Bueler, J. Mai, J. Liu and J. L. Rubinstein (2021). "Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline." Nature **589**(7840): 143-147.

Guo, Q., J. Chen, S. Zhang, Y. Zou, Y. Zhang, D. Huang, Z. Zhang, B. Li and H. Chu (2020). "Efflux Pumps Contribute to Intrinsic Clarithromycin Resistance in Clinical, Mycobacterium abscessus Isolates." Infection and drug resistance **13**: 447-454.

Gupta, R. S., B. Lo and J. Son (2018). "Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera." Frontiers in microbiology **9**: 67.

Gutierrez, A. V., M. Richard, F. Roquet-Baneres, A. Viljoen and L. Kremer (2019). "The TetR Family Transcription Factor MAB_2299c Regulates the Expression of Two Distinct MmpS-MmpL Efflux Pumps Involved in Cross-Resistance to Clofazimine and Bedaquiline in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(10).

Gutierrez, A. V., A. Viljoen, E. Ghigo, J. L. Herrmann and L. Kremer (2018). "Glycopeptidolipids, a Double-Edged Sword of the Mycobacterium abscessus Complex." Frontiers in microbiology **9**: 1145.

Haagsma, A. C., I. Podasca, A. Koul, K. Andries, J. Guillemont, H. Lill and D. Bald (2011). "Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase." PloS one **6**(8): e23575.

Halloum, I., A. Viljoen, V. Khanna, D. Craig, C. Bouchier, R. Brosch, G. Coxon and L. Kremer (2017). "Resistance to Thiacetazone Derivatives Active against Mycobacterium abscessus Involves Mutations in the MmpL5 Transcriptional Repressor MAB_4384." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(4).

Hansen, L. H., P. Mauvais and S. Douthwaite (1999). "The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA." Molecular microbiology **31**(2): 623-631.

Hellinger, W. C. and N. S. Brewer (1999). "Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam." Mayo Clinic proceedings **74**(4): 420-434.

Hill, U. G., R. A. Floto and C. S. Haworth (2012). "Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis." Journal of the Royal Society of Medicine **105 Suppl 2**: S14-18.

Howard, S. T., E. Rhoades, J. Recht, X. Pang, A. Alsup, R. Kolter, C. R. Lyons and T. F. Byrd (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**(Pt 6): 1581-1590.

Huang, C. W., J. H. Chen, S. T. Hu, W. C. Huang, Y. C. Lee, C. C. Huang and G. H. Shen (2013). "Synergistic activities of tigecycline with clarithromycin or amikacin against rapidly growing mycobacteria in Taiwan." International journal of antimicrobial agents **41**(3): 218-223.

Huber, L., S. Giguere, N. M. Slovis, S. Alvarez-Narvaez, K. A. Hart, M. Greiter, E. R. A. Morris and N. D. Cohen (2020). "The novel and transferable erm(51) gene confers macrolides, lincosamides and streptogramins B (MLS(B)) resistance to clonal Rhodococcus equi in the environment." Environmental microbiology **22**(7): 2858-2869.

Hurst-Hess, K., P. Rudra and P. Ghosh (2017). "Mycobacterium abscessus WhiB7 Regulates a Species-Specific Repertoire of Genes To Confer Extreme Antibiotic Resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(11).

Hurst-Hess, K. R., G. A. Phelps, L. A. Wilt, R. E. Lee and P. Ghosh (2023). "Mab2780c, a TetV-like efflux pump, confers high-level spectinomycin resistance in mycobacterium abscessus." Tuberculosis **138**: 102295.

Huss, M., G. Ingenhorst, S. Konig, M. Gassel, S. Drose, A. Zeeck, K. Altendorf and H. Wieczorek (2002). "Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c." The Journal of biological chemistry **277**(43): 40544-40548.

Ippolito, J. A., Z. F. Kanyo, D. Wang, F. J. Franceschi, P. B. Moore, T. A. Steitz and E. M. Duffy (2008). "Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit." Journal of medicinal chemistry **51**(12): 3353-3356.

Jackson, M. (2014). "The mycobacterial cell envelope-lipids." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **4**(10).

Jarand, J., A. Levin, L. Zhang, G. Huitt, J. D. Mitchell and C. L. Daley (2011). "Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for Mycobacterium abscessus pulmonary disease." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **52**(5): 565-571.

Jarlier, V. and H. Nikaido (1990). "Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonei." Journal of bacteriology **172**(3): 1418-1423.

Jean-Pierre, F., A. Vyas, T. H. Hampton, M. A. Henson and G. A. O'Toole (2021). "One versus Many: Polymicrobial Communities and the Cystic Fibrosis Airway." mBio **12**(2).

Jean, S. S., S. C. Hsueh, W. S. Lee and P. R. Hsueh (2019). "Cefiderocol: a promising antibiotic against multidrug-resistant Gram-negative bacteria." Expert review of anti-infective therapy **17**(5): 307-309.

Johansen, M. D., W. Daher, F. Roquet-Baneres, C. Raynaud, M. Alcaraz, F. P. Maurer and L. Kremer (2020b). "Rifabutin Is Bactericidal against Intracellular and Extracellular Forms of Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **64**(11).

Johansen, M. D., J. L. Herrmann and L. Kremer (2020a). "Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus." Nature reviews. Microbiology **18**(7): 392-407.

Johnson, G. (2017). "The alpha/beta Hydrolase Fold Proteins of Mycobacterium tuberculosis, with Reference to their Contribution to Virulence." Current protein & peptide science **18**(3): 190-210.

Johnson, M. M. and J. A. Odell (2014). "Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections." Journal of thoracic disease **6**(3): 210-220.

Jong, B. E., T. S. Wu, N. Y. Chen, C. H. Yang, C. C. Shu, L. S. Wang, T. L. Wu, J. J. Lu, C. H. Chiu, H. C. Lai and W. H. Chung (2022). "Impact on Macrolide Resistance of Genetic Diversity of Mycobacterium abscessus Species." Microbiology spectrum **10**(6): e0274922.

Jonsson, B. E., M. Gilljam, A. Lindblad, M. Ridell, A. E. Wold and C. Welinder-Olsson (2007). "Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis." Journal of clinical microbiology **45**(5): 1497-1504.

Jouan Y., S.-T. M., Guillon A. (2017). "Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation." Méd. Intensive Réa **26**: 11–20.

Kannan, K., P. Kanabar, D. Schryer, T. Florin, E. Oh, N. Bahroos, T. Tenson, J. S. Weissman and A. S. Mankin (2014). "The general mode of translation inhibition by macrolide antibiotics." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(45): 15958-15963.

Kannan, K., N. Vazquez-Laslop and A. S. Mankin (2012). "Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel." Cell **151**(3): 508-520.

Kim, K. H., D. R. An, J. Song, J. Y. Yoon, H. S. Kim, H. J. Yoon, H. N. Im, J. Kim, D. J. Kim, S. J. Lee, H. M. Lee, H. J. Kim, E. K. Jo, J. Y. Lee and S. W. Suh (2012). "Mycobacterium tuberculosis Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(20): 7729-7734.

Kim, S. Y., B. W. Jhun, S. M. Moon, S. H. Shin, K. Jeon, O. J. Kwon, I. Y. Yoo, H. J. Huh, C. S. Ki, N. Y. Lee, S. J. Shin, C. L. Daley, G. Y. Suh and W. J. Koh (2018). "Mutations in gyrA and gyrB in Moxifloxacin-Resistant Mycobacterium avium Complex and Mycobacterium abscessus Complex Clinical Isolates." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(9).

Kohanski, M. A., D. J. Dwyer and J. J. Collins (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nature reviews. Microbiology **8**(6): 423-435.

Koteva, K., G. Cox, J. K. Kelso, M. D. Surette, H. L. Zubyk, L. Ejim, P. Stogios, A. Savchenko, D. Sorensen and G. D. Wright (2018). "Rox, a Rifamycin Resistance Enzyme with an Unprecedented Mechanism of Action." Cell chemical biology **25**(4): 403-412 e405.

Kothavade, R. J., R. S. Dhurat, S. N. Mishra and U. R. Kothavade (2013). "Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria." European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **32**(2): 161-188.

Kramer, J., O. Ozkaya and R. Kummerli (2020). "Bacterial siderophores in community and host interactions." Nature reviews. Microbiology **18**(3): 152-163.

Kubica, G. P., I. Baess, R. E. Gordon, P. A. Jenkins, J. B. Kwapinski, C. McDurmont, S. R. Pattyn, H. Saito, V. Silcox, J. L. Stanford, K. Takeya and M. Tsukamura (1972). "A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria." Journal of general microbiology **73**(1): 55-70.

Kurokawa, T., K. Suzuki, T. Hayaoka, T. Nakagawa, T. Izawa, M. Kobayashi and N. Harada (1993). "Cyclophostin, acetylcholinesterase inhibitor from Streptomyces lavendulae." The Journal of antibiotics **46**(8): 1315-1318.

Kusunoki, S. and T. Ezaki (1992). "Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: Mycobacterium abscessus comb. nov." International journal of systematic bacteriology **42**(2): 240-245.

Laencina, L., V. Dubois, V. Le Moigne, A. Viljoen, L. Majlessi, J. Pritchard, A. Bernut, L. Piel, A. L. Roux, J. L. Gaillard, B. Lombard, D. Loew, E. J. Rubin, R. Brosch, L. Kremer, J. L. Herrmann and F. Girard-Misguich (2018). "Identification of genes required for Mycobacterium abscessus growth in vivo with a prominent role of the ESX-4 locus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **115**(5): E1002-E1011.

Lamichhane, G., S. Tyagi and W. R. Bishai (2005). "Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of Mycobacterium tuberculosis in mouse lungs." Infection and immunity **73**(4): 2533-2540.

Lan, T., U. S. Ganapathy, S. Sharma, Y. M. Ahn, M. Zimmerman, V. Molodtsov, P. Hegde, M. Gengenbacher, R. H. Ebright, V. Dartois, J. S. Freundlich, T. Dick and C. C. Aldrich (2022). "Redesign of Rifamycin Antibiotics to Overcome ADP-Ribosylation-Mediated Resistance." Angewandte Chemie **61**(45): e202211498.

Laws, M., A. Shaaban and K. M. Rahman (2019). "Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions." FEMS microbiology reviews **43**(5): 490-516.

Le Moigne, V., A. L. Roux, A. Jobart-Malfait, L. Blanc, K. Chaoui, O. Burlet-Schiltz, J. L. Gaillard, S. Canaan, J. Nigou and J. L. Herrmann (2020). "A TLR2-Activating Fraction From Mycobacterium abscessus Rough Variant Demonstrates Vaccine and Diagnostic Potential." Frontiers in cellular and infection microbiology **10**: 432.

Le Moigne, V., A. L. Roux, H. Mahoudo, G. Christien, A. Ferroni, O. Dumitrescu, G. Lina, J. P. Bouchara, P. Plesiat, J. L. Gaillard, S. Canaan, G. Hery-Arnaud and J. L. Herrmann (2022a). "Serological biomarkers for the diagnosis of Mycobacterium abscessus infections in cystic fibrosis patients." Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society **21**(2): 353-360.

Le Moigne, V., A. L. Roux, H. Mahoudo, G. Christien, A. Ferroni, O. Dumitrescu, G. Lina, J. P. Bouchara, P. Plesiat, J. L. Gaillard, S. Canaan, G. Hery-Arnaud and J. L. Herrmann (2022b). "IgA Serological Response for the Diagnosis of Mycobacterium abscessus Infections in Patients with Cystic Fibrosis." Microbiology spectrum **10**(3): e0019222.

Le Run, E., M. Arthur and J. L. Mainardi (2018). "In Vitro and Intracellular Activity of Imipenem Combined with Rifabutin and Avibactam against Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(8).

Le Run, E., H. Atze, M. Arthur and J. L. Mainardi (2020). "Impact of relebactam-mediated inhibition of Mycobacterium abscessus BlaMab beta-lactamase on the in vitro and intracellular efficacy of imipenem." The Journal of antimicrobial chemotherapy **75**(2): 379-383.

Leclercq, R. and P. Courvalin (1991). "Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification." Antimicrobial agents and chemotherapy **35**(7): 1267-1272.

Lee, M. R., A. Cheng, Y. C. Lee, C. Y. Yang, C. C. Lai, Y. T. Huang, C. C. Ho, H. C. Wang, C. J. Yu and P. R. Hsueh (2012). "CNS infections caused by Mycobacterium abscessus complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates." The Journal of antimicrobial chemotherapy **67**(1): 222-225.

Lee, M. R., W. H. Sheng, C. C. Hung, C. J. Yu, L. N. Lee and P. R. Hsueh (2015). "Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans." Emerging infectious diseases **21**(9): 1638-1646.

Lefebvre, A. L., V. Le Moigne, A. Bernut, C. Veckerle, F. Compain, J. L. Herrmann, L. Kremer, M. Arthur and J. L. Mainardi (2017). "Inhibition of the beta-Lactamase Bla(Mab) by Avibactam Improves the In Vitro and In Vivo Efficacy of Imipenem against Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(4).

Lehmann, K. and R. Neumann (1896). "Lehmann's Med. Handatlanten, X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik. JF Lehmann, München, Text." Aufl. 1, Teil II: 448.

Leitch, A. E. and H. C. Rodgers (2013). "Cystic fibrosis." The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh **43**(2): 144-150.

Lenfant, N., T. Hotelier, Y. Bourne, P. Marchot and A. Chatonnet (2013). "Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily." Chemico-biological interactions **203**(1): 266-268.

Lerat I., T. C., Veziris N. (2011). "*Mycobacterium abscessus* infections: Epidemiology, clinical presentation and treatment." Journal des Anti-infectieux **13**(1): 49-55.

Li, B., M. Ye, Q. Guo, Z. Zhang, S. Yang, W. Ma, F. Yu and H. Chu (2018). "Determination of MIC Distribution and Mechanisms of Decreased Susceptibility to Bedaquiline among Clinical Isolates of Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(7).

Li, P., Y. Gu, J. Li, L. Xie, X. Li and J. Xie (2017). "Mycobacterium tuberculosis Major Facilitator Superfamily Transporters." The Journal of membrane biology **250**(6): 573-585.

Li, X. Y., R. Yu, C. Xu, Y. Shang, D. Li and X. D. Du (2022). "A Small Multihost Plasmid Carrying erm(T) Identified in Enterococcus faecalis." Frontiers in veterinary science **9**: 850466.

Li, X. Z., P. Plesiat and H. Nikaido (2015). "The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria." Clinical microbiology reviews **28**(2): 337-418.

Limoli, D. H. and L. R. Hoffman (2019). "Help, hinder, hide and harm: what can we learn from the interactions between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus during respiratory infections?" Thorax **74**(7): 684-692.

Lipworth, S., N. Hough, L. Leach, M. Morgan, K. Jeffery, M. Andersson, E. Robinson, E. G. Smith, D. Crook, T. Peto and T. Walker (2019). "Whole-Genome Sequencing for Predicting Clarithromycin Resistance in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(1).

Liu, F., Z. Zhang, L. Csanady, D. C. Gadsby and J. Chen (2017). "Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel." Cell **169**(1): 85-95 e88.

Liu, J., C. E. Barry, 3rd, G. S. Besra and H. Nikaido (1996a). "Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall." The Journal of biological chemistry **271**(47): 29545-29551.

Liu, J., H. E. Takiff and H. Nikaido (1996b). "Active efflux of fluoroquinolones in Mycobacterium smegmatis mediated by LfrA, a multidrug efflux pump." Journal of bacteriology **178**(13): 3791-3795.

Llorens-Fons, M., M. Perez-Trujillo, E. Julian, C. Brambilla, F. Alcaide, T. F. Byrd and M. Luquin (2017). "Trehalose Polyphleates, External Cell Wall Lipids in Mycobacterium abscessus, Are Associated with the Formation of Clumps with Cording Morphology, Which Have Been Associated with Virulence." Frontiers in microbiology **8**: 1402.

Loddenkemper, R., M. Lipman and A. Zumla (2015). "Clinical Aspects of Adult Tuberculosis." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **6**(1): a017848.

Longhi, S., M. Mannesse, H. M. Verheij, G. H. De Haas, M. Egmond, E. Knoops-Mouthuy and C. Cambillau (1997). "Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue." Protein science : a publication of the Protein Society **6**(2): 275-286.

Louw, G. E., R. M. Warren, N. C. Gey van Pittius, C. R. McEvoy, P. D. Van Helden and T. C. Victor (2009). "A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**(8): 3181-3189.

Lubelski, J., W. N. Konings and A. J. Driessen (2007). "Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **71**(3): 463-476.

Luo, R. F., C. Curry, N. Taylor, I. Budvytiene and N. Banaei (2015). "Rapid Detection of Acquired and Inducible Clarithromycin Resistance in Mycobacterium abscessus Group by a Simple Real-Time PCR Assay." Journal of clinical microbiology **53**(7): 2337-2339.

Luthra, S., A. Rominski and P. Sander (2018). "The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance." Frontiers in microbiology **9**: 2179.

Ma, S., Y. Huang, F. Xie, Z. Gong, Y. Zhang, A. Stojkoska and J. Xie (2020). "Transport mechanism of Mycobacterium tuberculosis MmpL/S family proteins and implications in pharmaceutical targeting." Biological chemistry **401**(3): 331-348.

Madani, A., J. N. Ridenour, B. P. Martin, R. R. Paudel, A. Abdul Basir, V. Le Moigne, J. L. Herrmann, S. Audebert, L. Camoin, L. Kremer, C. D. Spilling, S. Canaan and J. F. Cavalier (2019). "Cyclipostins and Cyclophostin Analogues as Multitarget Inhibitors That Impair Growth of Mycobacterium abscessus." ACS infectious diseases **5**(9): 1597-1608.

Madsen, C. T., L. Jakobsen, K. Buriankova, F. Doucet-Populaire, J. L. Pernodet and S. Douthwaite (2005a). "Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in Mycobacterium tuberculosis." The Journal of biological chemistry **280**(47): 38942-38947.

Madsen, C. T., L. Jakobsen and S. Douthwaite (2005b). "Mycobacterium smegmatis Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(9): 3803-3809.

Magnet, S. and J. S. Blanchard (2005). "Molecular insights into aminoglycoside action and resistance." Chemical reviews **105**(2): 477-498.

Mahapatra, S., H. Scherman, P. J. Brennan and D. C. Crick (2005). "N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of Mycobacterium spp. is altered by drug treatment." Journal of bacteriology **187**(7): 2341-2347.

Malhotra-Kumar, S., A. Mazzariol, L. Van Heirstraeten, C. Lammens, P. de Rijk, G. Cornaglia and H. Goossens (2009). "Unusual resistance patterns in macrolide-resistant Streptococcus pyogenes harbouring erm(A)." The Journal of antimicrobial chemotherapy **63**(1): 42-46.

Malla, R. K., S. Bandyopadhyay, C. D. Spilling, S. Dutta and C. M. Dupureur (2011). "The first total synthesis of (+/-)-cyclophostin and (+/-)-cyclipostin P: inhibitors of the serine hydrolases acetyl cholinesterase and hormone sensitive lipase." Organic letters **13**(12): 3094-3097.

Mallick, I., P. Santucci, I. Poncin, V. Point, L. Kremer, J. F. Cavalier and S. Canaan (2021). "Intrabacterial lipid inclusions in mycobacteria: unexpected key players in survival and pathogenesis?" FEMS microbiology reviews **45**(6).

Malone, T., R. M. Blumenthal and X. Cheng (1995). "Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes." Journal of molecular biology **253**(4): 618-632.

Maravic, G. (2004). "Macrolide resistance based on the Erm-mediated rRNA methylation." Current drug targets. Infectious disorders **4**(3): 193-202.

Marsollier, L. A., A.; Carbonnelle, E.; Canaan, S.; Laencina, L.; Misguisch, F.; Cambau, E.; Herrmann, J.L (2019). "« Mycobactérioses cutanées dues à Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium marinum, Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae et autres mycobactéries non tuberculeuses »."

Martin, B. P., E. Vasilieva, C. M. Dupureur and C. D. Spilling (2015). "Synthesis and comparison of the biological activity of monocyclic phosphonate, difluorophosphonate and phosphate analogs of the natural AChE inhibitor cyclophostin." Bioorganic & medicinal chemistry **23**(24): 7529-7534.

Martinez-Irujo, J. J., M. L. Villahermosa, E. Alberdi and E. Santiago (1996). "A checkerboard method to evaluate interactions between drugs." Biochemical pharmacology **51**(5): 635-644.

Martiniano, S. L., J. A. Nick and C. L. Daley (2022). "Nontuberculous Mycobacterial Infections in Cystic Fibrosis." Clinics in chest medicine **43**(4): 697-716.

Maurer, F. P., V. L. Bruderer, C. Castelberg, C. Ritter, D. Scherbakov, G. V. Bloemberg and E. C. Bottger (2015). "Aminoglycoside-modifying enzymes determine the innate susceptibility to aminoglycoside antibiotics in rapidly growing mycobacteria." The Journal of antimicrobial chemotherapy **70**(5): 1412-1419.

Maurer, F. P., V. L. Bruderer, C. Ritter, C. Castelberg, G. V. Bloemberg and E. C. Bottger (2014a). "Lack of antimicrobial bactericidal activity in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **58**(7): 3828-3836.

Maurer, F. P., C. Castelberg, C. Quiblier, E. C. Bottger and A. Somoskovi (2014b). "Erm(41)-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of Mycobacterium abscessus." The Journal of antimicrobial chemotherapy **69**(6): 1559-1563.

McCarter, J. and E. G. Hastings (1935). "The Morphology of the Mycobacteria." Journal of bacteriology **29**(5): 503-513.

McNeil, M., M. Daffe and P. J. Brennan (1990). "Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls." The Journal of biological chemistry **265**(30): 18200-18206.

Medjahed, H., J. L. Gaillard and J. M. Reyrat (2010). "Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field." Trends in microbiology **18**(3): 117-123.

Medjahed, H. and J. M. Reyrat (2009). "Construction of Mycobacterium abscessus defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools." Applied and environmental microbiology **75**(5): 1331-1338.

Meehan, C. J., R. A. Barco, Y. E. Loh, S. Cogneau and L. Rigouts (2021). "Reconstituting the genus Mycobacterium." International journal of systematic and evolutionary microbiology **71**(9).

Mignard, S. and J. P. Flandrois (2008). "A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees." International journal of systematic and evolutionary microbiology **58**(Pt 6): 1432-1441.

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

Mishra, M. N. and L. Daniels (2013). "Characterization of the MSMEG_2631 gene (mmp) encoding a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family protein in Mycobacterium smegmatis and exploration of its polyspecific nature using biolog phenotype microarray." Journal of bacteriology **195**(7): 1610-1621.

Miyasaka, T., H. Kunishima, M. Komatsu, K. Tamai, K. Mitsutake, K. Kanemitsu, Y. Ohisa, H. Yanagisawa and M. Kaku (2007). "In vitro efficacy of imipenem in combination with six antimicrobial agents against Mycobacterium abscessus." International journal of antimicrobial agents **30**(3): 255-258.

Mizuuchi, K., L. M. Fisher, M. H. O'Dea and M. Gellert (1980). "DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **77**(4): 1847-1851.

Monego, F., R. S. Duarte and A. W. Biondo (2012). "gyrA and gyrB gene mutation in ciprofloxacin-resistant Mycobacterium massiliense clinical isolates from Southern Brazil." Microbial drug resistance **18**(1): 1-6.

Moore, M. and J. B. Frerichs (1953). "An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, Mycobacterium abscessus, n. sp." The Journal of investigative dermatology **20**(2): 133-169.

Morris, R. P., L. Nguyen, J. Gatfield, K. Visconti, K. Nguyen, D. Schnappinger, S. Ehrt, Y. Liu, L. Heifets, J. Pieters, G. Schoolnik and C. J. Thompson (2005). "Ancestral antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(34): 12200-12205.

Mukherjee, D., M. L. Wu, J. W. P. Teo and T. Dick (2017). "Vancomycin and Clarithromycin Show Synergy against Mycobacterium abscessus In Vitro." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(12).

Murphy, E. (1985). "Nucleotide sequence of ermA, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in Staphylococcus aureus." Journal of bacteriology **162**(2): 633-640.

Nash, K. A. (2003). "Intrinsic macrolide resistance in Mycobacterium smegmatis is conferred by a novel erm gene, erm(38)." Antimicrobial agents and chemotherapy **47**(10): 3053-3060.

Nash, K. A., B. A. Brown-Elliott and R. J. Wallace, Jr. (2009). "A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**(4): 1367-1376.

Nash, K. A., Y. Zhang, B. A. Brown-Elliott and R. J. Wallace, Jr. (2005). "Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of Mycobacterium fortuitum." The Journal of antimicrobial chemotherapy **55**(2): 170-177.

Nessar, R., E. Cambau, J. M. Reyrat, A. Murray and B. Gicquel (2012). "Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare." The Journal of antimicrobial chemotherapy **67**(4): 810-818.

Nessar, R., J. M. Reyrat, A. Murray and B. Gicquel (2011b). "Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in Mycobacterium abscessus." The Journal of antimicrobial chemotherapy **66**(8): 1719-1724.

Neumann, R., Peter, H.H. (1987). "Insecticidal organophosphates: Nature made them first." Experientia **43**: 1235-1237.

Neuschlova, M., M. Vladarova, J. Kompanikova, V. Sadlonova and E. Novakova (2017). "Identification of Mycobacterium Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry." Advances in experimental medicine and biology **1021**: 37-42.

Nguyen, P. C., V. Delorme, A. Benarouche, B. P. Martin, R. Paudel, G. R. Gnawali, A. Madani, R. Puppo, V. Landry, L. Kremer, P. Brodin, C. D. Spilling, J. F. Cavalier and S. Canaan (2017). "Cyclipostins and Cyclophostin analogs as promising compounds in the fight against tuberculosis." Scientific reports **7**(1): 11751.

Nguyen, P. C., A. Madani, P. Santucci, B. P. Martin, R. R. Paudel, S. Delattre, J. L. Herrmann, C. D. Spilling, L. Kremer, S. Canaan and J. F. Cavalier (2018a). "Cyclophostin and Cyclipostins analogues, new promising molecules to treat mycobacterial-related diseases." International journal of antimicrobial agents **51**(4): 651-654.

Nguyen, P. C., V. S. Nguyen, B. P. Martin, P. Fourquet, L. Camoin, C. D. Spilling, J. F. Cavalier, C. Cambillau and S. Canaan (2018b). "Biochemical and Structural Characterization of TesA, a Major Thioesterase Required for Outer-Envelope Lipid Biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis." Journal of molecular biology **430**(24): 5120-5136.

Niederweis, M. (2003). "Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes." Molecular microbiology **49**(5): 1167-1177.

Niederweis, M., S. Ehrt, C. Heinz, U. Klocker, S. Karosi, K. M. Swiderek, L. W. Riley and R. Benz (1999). "Cloning of the mspA gene encoding a porin from Mycobacterium smegmatis." Molecular microbiology **33**(5): 933-945.

Noller, H. F. (1984). "Structure of ribosomal RNA." Annual review of biochemistry **53**: 119-162.

Odds, F. C. (2003). "Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them." The Journal of antimicrobial chemotherapy **52**(1): 1.

OMS (2013). The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: interim policy

guidance. I. Communication. Geneva, Switzerland, World Health Organization.

OMS (2020). "Résistance aux antibiotiques."

OMS (2023). Global Tuberculosis Report. O. M. d. l. Santé.

Osman, M. M., A. J. Pagan, J. K. Shanahan and L. Ramakrishnan (2020). "Mycobacterium marinum phthiocerol dimycocerosates enhance macrophage phagosomal permeabilization and membrane damage." PloS one **15**(7): e0233252.

Palmer, M. V. and W. R. Waters (2011). "Bovine tuberculosis and the establishment of an eradication program in the United States: role of veterinarians." Veterinary medicine international **2011**: 816345.

Park, I. K., A. P. Hsu, H. Tettelin, S. J. Shallom, S. K. Drake, L. Ding, U. I. Wu, N. Adamo, D. R. Prevots, K. N. Olivier, S. M. Holland, E. P. Sampaio and A. M. Zelazny (2015a). "Clonal Diversification and Changes in Lipid Traits and Colony Morphology in Mycobacterium abscessus Clinical Isolates." Journal of clinical microbiology **53**(11): 3438-3447.

Park, I. K. and K. N. Olivier (2015b). "Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis." Seminars in respiratory and critical care medicine **36**(2): 217-224.

Patel, U., Y. P. Yan, F. W. Hobbs, Jr., J. Kaczmarczyk, A. M. Slee, D. L. Pompliano, M. G. Kurilla and E. V. Bobkova (2001). "Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation." The Journal of biological chemistry **276**(40): 37199-37205.

Paulowski, L., K. S. H. Beckham, M. D. Johansen, L. Berneking, N. Van, Y. Degefu, S. Staack, F. V. Sotomayor, L. Asar, H. Rohde, B. B. Aldridge, M. Aepfelbacher, A. Parret, M. Wilmanns, L. Kremer, K. Combrink and F. P. Maurer (2022). "C25-modified rifamycin derivatives with improved activity against Mycobacterium abscessus." PNAS nexus **1**(4): pgac130.

Pavlenok, M., I. M. Derrington, J. H. Gundlach and M. Niederweis (2012). "MspA nanopores from subunit dimers." PloS one **7**(6): e38726.

Pawlik, A., G. Garnier, M. Orgeur, P. Tong, A. Lohan, F. Le Chevalier, G. Sapriel, A. L. Roux, K. Conlon, N. Honore, M. A. Dillies, L. Ma, C. Bouchier, J. Y. Coppee, J. L. Gaillard, S. V. Gordon, B. Loftus, R. Brosch and J. L. Herrmann (2013). "Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent Mycobacterium abscessus." Molecular microbiology **90**(3): 612-629.

Perraud, Q., P. Cantero, B. Roche, V. Gasser, V. P. Normant, L. Kuhn, P. Hammann, G. L. A. Mislin, L. Ehret-Sabatier and I. J. Schalk (2020). "Phenotypic Adaption of Pseudomonas aeruginosa by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms." Molecular & cellular proteomics : MCP **19**(4): 589-607.

Pestka, S. and R. A. Lemahieu (1974). "Effect of erythromycin analogues on binding of [14C]erythromycin to Escherichia coli ribosomes." Antimicrobial agents and chemotherapy **6**(4): 479-488.

Petit, J. F., A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, E. Lederer and J. M. Ghuysen (1969). "Chemical structure of the cell wall of Mycobacterium smegmatis. I. Isolation and partial characterization of the peptidoglycan." Biochemical and biophysical research communications **35**(4): 478-485.

PHE (2015). "Guidance: Health matters: antimicrobial resistance ".

Philley, J. V., R. J. Wallace, Jr., J. L. Benwill, V. Taskar, B. A. Brown-Elliott, F. Thakkar, T. R. Aksamit and D. E. Griffith (2015). "Preliminary Results of Bedaquiline as Salvage Therapy for Patients With Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease." Chest **148**(2): 499-506.

Piddock, L. J. (2006). "Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance." Nature reviews. Microbiology **4**(8): 629-636.

Pitarque, S., G. Larrouy-Maumus, B. Payre, M. Jackson, G. Puzo and J. Nigou (2008). "The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface." Tuberculosis **88**(6): 560-565.

Point, V., R. K. Malla, F. Carriere, S. Canaan, C. D. Spilling and J. F. Cavalier (2013). "Enantioselective inhibition of microbial lipolytic enzymes by nonracemic monocyclic enolphosphonate analogues of cyclophostin." Journal of medicinal chemistry **56**(11): 4393-4401.

Point, V., R. K. Malla, S. Diomande, B. P. Martin, V. Delorme, F. Carriere, S. Canaan, N. P. Rath, C. D. Spilling and J. F. Cavalier (2012). "Synthesis and kinetic evaluation of cyclophostin and cyclipostins phosphonate analogs as selective and potent inhibitors of microbial lipases." Journal of medicinal chemistry **55**(22): 10204-10219.

Pokkunuri, I. and W. S. Champney (2007). "Characteristics of a 50S ribosomal subunit precursor particle as a substrate for ermE methyltransferase activity and erythromycin binding in Staphylococcus aureus." RNA biology **4**(3): 147-153.

Porvaznik, I., I. Solovic and J. Mokry (2017). "Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy." Advances in experimental medicine and biology **944**: 19-25.

Prammananan, T., P. Sander, B. A. Brown, K. Frischkorn, G. O. Onyi, Y. Zhang, E. C. Bottger and R. J. Wallace, Jr. (1998). "A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae." The Journal of infectious diseases **177**(6): 1573-1581.

Prinzis, S., B. Rivoire and P. J. Brennan (1994). "Search for the molecular basis of morphological variation in Mycobacterium avium." Infection and immunity **62**(5): 1946-1951.

Pryjma, M., J. Burian, K. Kuchinski and C. J. Thompson (2017). "Antagonism between Front-Line Antibiotics Clarithromycin and Amikacin in the Treatment of Mycobacterium abscessus Infections Is Mediated by the whiB7 Gene." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(11).

Pryjma, M., J. Burian and C. J. Thompson (2018). "Rifabutin Acts in Synergy and Is Bactericidal with Frontline Mycobacterium abscessus Antibiotics Clarithromycin and Tigecycline, Suggesting a Potent Treatment Combination." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(8).

Puchelle, E., O. Bajolet and M. Abely (2002). "Airway mucus in cystic fibrosis." Paediatric respiratory reviews **3**(2): 115-119.

Quigley, J., V. K. Hughitt, C. A. Velikovsky, R. A. Mariuzza, N. M. El-Sayed and V. Briken (2017). "The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of Mycobacterium tuberculosis." mBio **8**(2).

Qvist, T., S. Eickhardt, K. N. Kragh, C. B. Andersen, M. Iversen, N. Hoiby and T. Bjarnsholt (2015). "Chronic pulmonary disease with Mycobacterium abscessus complex is a biofilm infection." The European respiratory journal **46**(6): 1823-1826.

Qvist, T., T. Pressler, N. Hoiby and T. L. Katzenstein (2014). "Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis." Respiratory research **15**(1): 41.

Qvist, T., D. Taylor-Robinson, E. Waldmann, H. V. Olesen, C. R. Hansen, I. H. Mathiesen, N. Hoiby, T. L. Katzenstein, R. L. Smyth, P. J. Diggle and T. Pressler (2016). "Comparing the harmful effects of nontuberculous mycobacteria and Gram negative bacteria on lung function in patients with cystic fibrosis." Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society **15**(3): 380-385.

Ramon-Garcia, S., I. Otal, C. Martin, R. Gomez-Lus and J. A. Ainsa (2006). "Novel streptomycin resistance gene from Mycobacterium fortuitum." Antimicrobial agents and chemotherapy **50**(11): 3920-3922.

Rasmussen, J. L., D. A. Odelson and F. L. Macrina (1986). "Complete nucleotide sequence and transcription of ermF, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from Bacteroides fragilis." Journal of bacteriology **168**(2): 523-533.

Rastogi, N., E. Legrand and C. Sola (2001). "The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis." Revue scientifique et technique **20**(1): 21-54.

Raynaud, C., K. G. Papavinasasundaram, R. A. Speight, B. Springer, P. Sander, E. C. Bottger, M. J. Colston and P. Draper (2002). "The functions of OmpATb, a pore-forming protein of Mycobacterium tuberculosis." Molecular microbiology **46**(1): 191-201.

Recazens, E., E. Mouisel and D. Langin (2021). "Hormone-sensitive lipase: sixty years later." Progress in lipid research **82**: 101084.

Rees, D. C., E. Johnson and O. Lewinson (2009). "ABC transporters: the power to change." Nature reviews. Molecular cell biology **10**(3): 218-227.

Rhoades, E. R., A. S. Archambault, R. Greendyke, F. F. Hsu, C. Streeter and T. F. Byrd (2009). "Mycobacterium abscessus Glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-myo-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF-alpha by preventing interaction with TLR2." Journal of immunology **183**(3): 1997-2007.

Richard, M., A. V. Gutierrez and L. Kremer (2020). "Dissecting erm(41)-Mediated Macrolide-Inducible Resistance in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **64**(2).

Richard, M., A. V. Gutierrez, A. Viljoen, D. Rodriguez-Rincon, F. Roquet-Baneres, M. Blaise, I. Everall, J. Parkhill, R. A. Floto and L. Kremer (2019). "Mutations in the MAB_2299c TetR Regulator Confer Cross-Resistance to Clofazimine and Bedaquiline in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(1).

Richard, M., A. V. Gutierrez, A. J. Viljoen, E. Ghigo, M. Blaise and L. Kremer (2018). "Mechanistic and Structural Insights Into the Unique TetR-Dependent Regulation of a Drug Efflux Pump in Mycobacterium abscessus." Frontiers in microbiology **9**: 649.

Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou and et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-1073.

Ripoll, F., C. Deshayes, S. Pasek, F. Laval, J. L. Beretti, F. Biet, J. L. Risler, M. Daffe, G. Etienne, J. L. Gaillard and J. M. Reyrat (2007). "Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in Mycobacterium abscessus and M. chelonae." BMC genomics **8**: 114.

Ripoll, F., S. Pasek, C. Schenowitz, C. Dossat, V. Barbe, M. Rottman, E. Macheras, B. Heym, J. L. Herrmann, M. Daffe, R. Brosch, J. L. Risler and J. L. Gaillard (2009). "Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen Mycobacterium abscessus." PloS one **4**(6): e5660.

Roberts, M. C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. B. Jensen, J. Rood and H. Seppala (1999). "Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants." Antimicrobial agents and chemotherapy **43**(12): 2823-2830.

Rock, J. R., S. H. Randell and B. L. Hogan (2010). "Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling." Disease models & mechanisms **3**(9-10): 545-556.

Rodrigues, L., C. Villellas, R. Bailo, M. Viveiros and J. A. Ainsa (2013). "Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in Mycobacterium tuberculosis." Antimicrobial agents and chemotherapy **57**(2): 751-757.

Rominski, A., A. Roditscheff, P. Selchow, E. C. Bottger and P. Sander (2017a). "Intrinsic rifamycin resistance of Mycobacterium abscessus is mediated by ADP-ribosyltransferase MAB_0591." The Journal of antimicrobial chemotherapy **72**(2): 376-384.

Rominski, A., P. Selchow, K. Becker, J. K. Brulle, M. Dal Molin and P. Sander (2017b). "Elucidation of Mycobacterium abscessus aminoglycoside and capreomycin resistance by targeted deletion of three putative resistance genes." The Journal of antimicrobial chemotherapy **72**(8): 2191-2200.

Rosato, A. E., B. S. Lee and K. A. Nash (2001). "Inducible macrolide resistance in Corynebacterium jeikeium." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(7): 1982-1989.

Roux, A. L., E. Catherinot, F. Ripoll, N. Soismier, E. Macheras, S. Ravilly, G. Bellis, M. A. Vibet, E. Le Roux, L. Lemonnier, C. Gutierrez, V. Vincent, B. Fauroux, M. Rottman, D. Guillemot and J. L. Gaillard (2009). "Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france." Journal of clinical microbiology **47**(12): 4124-4128.

Roux, A. L., E. Catherinot, N. Soismier, B. Heym, G. Bellis, L. Lemonnier, R. Chiron, B. Fauroux, M. Le Bourgeois, A. Munck, I. Pin, I. Sermet, C. Gutierrez, N. Veziris, V. Jarlier, E. Cambau, J. L. Herrmann, D. Guillemot and J. L. Gaillard (2015). "Comparing Mycobacterium massiliense and Mycobacterium abscessus lung infections in cystic fibrosis patients." Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society **14**(1): 63-69.

Roux, A. L., A. Ray, A. Pawlik, H. Medjahed, G. Etienne, M. Rottman, E. Catherinot, J. Y. Coppee, K. Chaoui, B. Monsarrat, A. Toubert, M. Daffe, G. Puzo, J. L. Gaillard, R. Brosch, N. Dulphy, J. Nigou and J. L. Herrmann (2011). "Overexpression of proinflammatory TLR-2-signalling lipoproteins in hypervirulent mycobacterial variants." Cellular microbiology **13**(5): 692-704.

Roux, A. L., A. Viljoen, A. Bah, R. Simeone, A. Bernut, L. Laencina, T. Deramaudt, M. Rottman, J. L. Gaillard, L. Majlessi, R. Brosch, F. Girard-Misguich, I. Vergne, C. de Chastellier, L. Kremer and J. L. Herrmann (2016). "The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages." Open biology **6**(11).

Rubio, M., F. March, M. Garrigo, C. Moreno, M. Espanol and P. Coll (2015). "Inducible and Acquired Clarithromycin Resistance in the Mycobacterium abscessus Complex." PloS one **10**(10): e0140166.

Rudra, P., K. Hurst-Hess, P. Lappierre and P. Ghosh (2018). "High Levels of Intrinsic Tetracycline Resistance in Mycobacterium abscessus Are Conferred by a Tetracycline-Modifying Monooxygenase." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(6).

Runyon, E. H. (1959). "Anonymous mycobacteria in pulmonary disease." The Medical clinics of North America **43**(1): 273-290.

Ruth, M. M., J. J. N. Sangen, L. J. Pennings, J. A. Schildkraut, W. Hoefsloot, C. Magis-Escurra, H. F. L. Wertheim and J. van Ingen (2018). "Minocycline Has No Clear Role in the Treatment of Mycobacterium abscessus Disease." Antimicrobial agents and chemotherapy **62**(10).

Ryu, Y. J., W. J. Koh and C. L. Daley (2016). "Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives." Tuberculosis and respiratory diseases **79**(2): 74-84.

Samuel, L. P., C. H. Song, J. Wei, E. A. Roberts, J. L. Dahl, C. E. Barry, E. K. Jo and R. L. Friedman (2007). "Expression, production and release of the Eis protein by Mycobacterium tuberculosis during infection of macrophages and its effect on cytokine secretion." Microbiology **153**(Pt 2): 529-540.

Sanchez-Chardi, A., F. Olivares, T. F. Byrd, E. Julian, C. Brambilla and M. Luquin (2011). "Demonstration of cord formation by rough Mycobacterium abscessus variants: implications for the clinical microbiology laboratory." Journal of clinical microbiology **49**(6): 2293-2295.

Sani, M., E. N. Houben, J. Geurtsen, J. Pierson, K. de Punder, M. van Zon, B. Wever, S. R. Piersma, C. R. Jimenez, M. Daffe, B. J. Appelmelk, W. Bitter, N. van der Wel and P. J. Peters (2010). "Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins." PLoS pathogens **6**(3): e1000794.

Santucci, P., B. Aylan, L. Botella, E. M. Bernard, C. Bussi, E. Pellegrino, N. Athanasiadi and M. G. Gutierrez (2022). "Visualizing Pyrazinamide Action by Live Single-Cell Imaging of Phagosome Acidification and Mycobacterium tuberculosis pH Homeostasis." mBio **13**(2): e0011722.

Santucci, P., D. J. Greenwood, A. Fearns, K. Chen, H. Jiang and M. G. Gutierrez (2021). "Intracellular localisation of Mycobacterium tuberculosis affects efficacy of the antibiotic pyrazinamide." Nature communications **12**(1): 3816.

Sarrazin, M., B. P. Martin, R. Avellan, G. R. Gnawali, I. Poncin, H. Le Guenno, C. D. Spilling, J. F. Cavalier and S. Canaan (2022). "Synthesis and Biological Characterization of Fluorescent Cyclipostins and Cyclophostin Analogues: New Insights for the Diagnosis of Mycobacterial-Related Diseases." ACS infectious diseases **8**(12): 2564-2578.

Sarro, Y. D. S., M. A. Butzler, F. Sanogo, O. Kodio, M. Tolofoudie, M. S. Goumane, B. Baya, S. Diabate, I. B. Diallo, D. Daniogo, B. P. P. Dembele, I. Camara, A. Kumar, E. Dembele, B. Kone, C. J. Achenbach, G. Theron, K. Ouattara, Y. Toloba, B. Diarra, S. Doumbia, B. Taiwo, J. L. Holl, R. L. Murphy, S. Diallo, S. M. McFall and M. Maiga (2021). "Development and clinical evaluation of a new multiplex PCR assay for a simultaneous diagnosis of tuberculous and nontuberculous mycobacteria." EBioMedicine **70**: 103527.

Schafle, D., P. Selchow, B. Borer, M. Meuli, A. Rominski, B. Schulthess and P. Sander (2021). "Rifabutin Is Inactivated by Mycobacterium abscessus Arr." Antimicrobial agents and chemotherapy **65**(3).

Schildkraut, J. A., L. J. Pennings, M. M. Ruth, A. P. de Brouwer, H. F. Wertheim, W. Hoefsloot, A. de Jong and J. van Ingen (2019). "The differential effect of clarithromycin and azithromycin on induction of macrolide resistance in Mycobacterium abscessus." Future microbiology **14**: 749-755.

Schless, R. A. (1932). "Staphylococcus aureus meningitis: treatment with specific bacteriophage." American Journal of Diseases of Children **44**(4): 813-822.

Schorey, J. S. and L. Sweet (2008). "The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis." Glycobiology **18**(11): 832-841.

Schue, M., L. G. Dover, G. S. Besra, J. Parkhill and N. L. Brown (2009). "Sequence and analysis of a plasmid-encoded mercury resistance operon from Mycobacterium marinum identifies MerH, a new mercuric ion transporter." Journal of bacteriology **191**(1): 439-444.

Schulthess, B., F. N. Akdogan Kittana, R. Homke and P. Sander (2022). "In Vitro Bedaquiline and Clofazimine Susceptibility Testing in Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **66**(5): e0234621.

Schump, M. D., D. M. Fox, C. R. Bertozzi and L. W. Riley (2017). "Subcellular Partitioning and Intramacrophage Selectivity of Antimicrobial Compounds against Mycobacterium tuberculosis." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(3).

Scotet, V., I. Dugueperoux, P. Saliou, G. Rault, M. Roussey, M. P. Audrezet and C. Ferec (2012). "Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France." Orphanet journal of rare diseases **7**: 14.

Sebastian, A., L. Rishishwar, J. Wang, K. F. Bernard, A. B. Conley, N. A. McCarty and I. K. Jordan (2013). "Origin and evolution of the cystic fibrosis transmembrane regulator protein R domain." Gene **523**(2): 137-146.

Seddon, P., K. Fidler, S. Raman, H. Wyatt, G. Ruiz, C. Elston, F. Perrin, K. Gyi, D. Bilton, F. Drobniewski and M. Newport (2013). "Prevalence of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis clinics, United Kingdom, 2009." Emerging infectious diseases **19**(7): 1128-1130.

Seibert, G., Toti, L., Wink, J. (2009). USE OF CYCLIPOSTIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF MYCOBACTERIAL INFECTIOUS DISEASES, Sanofi-Aventis. **US 7,923,438 B2**.

Senaratne, R. H., H. Mobasheri, K. G. Papavinasasundaram, P. Jenner, E. J. Lea and P. Draper (1998). "Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from Mycobacterium tuberculosis H37Rv." Journal of bacteriology **180**(14): 3541-3547.

Sethiya, J. P., M. A. Sowards, M. Jackson and E. J. North (2020). "MmpL3 Inhibition: A New Approach to Treat Nontuberculous Mycobacterial Infections." International journal of molecular sciences **21**(17).

Shinnick, T. M. and R. C. Good (1994). "Mycobacterial taxonomy." European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology **13**(11): 884-901.

Silhavy, T. J., D. Kahne and S. Walker (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**(5): a000414.

Skinner, R., E. Cundliffe and F. J. Schmidt (1983). "Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics." The Journal of biological chemistry **258**(20): 12702-12706.

Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg and M. J. Welsh (1996). "Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid." Cell **85**(2): 229-236.

Soehnlein, O. and L. Lindbom (2010). "Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation." Nature reviews. Immunology **10**(6): 427-439.

Sonden, B., D. Kocincova, C. Deshayes, D. Euphrasie, L. Rhayat, F. Laval, C. Frehel, M. Daffe, G. Etienne and J. M. Reyrat (2005). "Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface." Mol Microbiol **58**(2): 426-440.

Song, H., J. Huff, K. Janik, K. Walter, C. Keller, S. Ehlers, S. H. Bossmann and M. Niederweis (2011). "Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to acidic environments." Molecular microbiology **80**(4): 900-918.

Song, L. and X. Wu (2016). "Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy." International journal of antimicrobial agents **47**(6): 421-429.

Soroka, D., V. Dubee, O. Soulier-Escrihuela, G. Cuinet, J. E. Hugonnet, L. Gutmann, J. L. Mainardi and M. Arthur (2014). "Characterization of broad-spectrum Mycobacterium abscessus class A beta-lactamase." The Journal of antimicrobial chemotherapy **69**(3): 691-696.

Sothiselvam, S., S. Neuner, L. Rigger, D. Klepacki, R. Micura, N. Vazquez-Laslop and A. S. Mankin (2016). "Binding of Macrolide Antibiotics Leads to Ribosomal Selection against Specific Substrates Based on Their Charge and Size." Cell reports **16**(7): 1789-1799.

Spilling, C. D. (2019). "The Chemistry and Biology of Cyclophostin, the Cyclipostins and Related Compounds." Molecules **24**(14).

Spilling, C. D., B. P. Martin, S. Canaan and J. F. Cavalier (2015). Fluorescent Labeled Inhibitors.

Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, X. Pan, B. N. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. R. Jacobs, Jr., A. Telenti and J. M. Musser (1997). "Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations." Antimicrobial agents and chemotherapy **41**(8): 1677-1681.

Stahl, C., S. Kubetzko, I. Kaps, S. Seeber, H. Engelhardt and M. Niederweis (2001). "MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of Mycobacterium smegmatis." Molecular microbiology **40**(2): 451-464.

Stephenson, D., A. Perry, M. R. Appleby, D. Lee, J. Davison, A. Johnston, A. L. Jones, A. Nelson, S. J. Bourke, M. F. Thomas, A. De Soyza, J. L. Lordan, J. Lumb, A. E. Robb, J. R. Samuel, K. E. Walton and J. D. Perry (2019). "An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation." BMC pulmonary medicine **19**(1): 19.

Stsiapanava, A. and M. Selmer (2019). "Crystal structure of ErmE - 23S rRNA methyltransferase in macrolide resistance." Scientific reports **9**(1): 14607.

Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J. G. Morris, Jr. (2001). "Bacteriophage therapy." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(3): 649-659.

Summers, W. C. (1999). Felix dHerelle and the origins of molecular biology, Yale University Press.

Summers, W. C. (2012). "The strange history of phage therapy." Bacteriophage **2**(2): 130-133.

Surette, M. G. (2014). "The cystic fibrosis lung microbiome." Annals of the American Thoracic Society **11 Suppl 1**: S61-65.

Sutcliffe, J., T. Grebe, A. Tait-Kamradt and L. Wondrack (1996). "Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR." Antimicrobial agents and chemotherapy **40**(11): 2562-2566.

Svetlov, M. S., E. A. Syroegin, E. V. Aleksandrova, G. C. Atkinson, S. T. Gregory, A. S. Mankin and Y. S. Polikanov (2021). "Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance." Nature chemical biology **17**(4): 412-420.

Szekely, R. and S. T. Cole (2016). "Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function." Molecular microbiology **99**(5): 831-834.

Takei, S., H. Ihara, S. Togo, A. Nakamura, Y. Fujimoto, J. Watanabe, K. Kurokawa, K. Shibayama, I. Sumiyoshi, Y. Ochi, M. Iwai, T. Okabe, M. Chonan, S. Misawa, A. Ohsaka and K. Takahashi (2020). "The synergetic effect of Imipenem-clarithromycin combination in the Mycobacteroides abscessus complex." BMC microbiology **20**(1): 316.

Tally, F. T., G. A. Ellestad and R. T. Testa (1995). "Glycylcyclines: a new generation of tetracyclines." The Journal of antimicrobial chemotherapy **35**(4): 449-452.

Tannock, G. W., J. B. Luchansky, L. Miller, H. Connell, S. Thode-Andersen, A. A. Mercer and T. R. Klaenhammer (1994). "Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from Lactobacillus reuteri 100-63." Plasmid **31**(1): 60-71.

Tauch, A., F. Kassing, J. Kalinowski and A. Puhler (1995). "The Corynebacterium xerosis composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene ermCX." Plasmid **34**(2): 119-131.

Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser and W. R. Jacobs, Jr. (1997). "The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol." Nature medicine **3**(5): 567-570.

Thakker-Varia, S., W. D. Jenssen, L. Moon-McDermott, M. P. Weinstein and D. T. Dubin (1987). "Molecular epidemiology of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci." Antimicrobial agents and chemotherapy **31**(5): 735-743.

Thompson, A. B., R. A. Robbins, D. J. Romberger, J. H. Sisson, J. R. Spurzem, H. Teschler and S. I. Rennard (1995). "Immunological functions of the pulmonary epithelium." The European respiratory journal **8**(1): 127-149.

Thomson, R., C. Tolson, R. Carter, C. Coulter, F. Huygens and M. Hargreaves (2013). "Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM." Journal of clinical microbiology **51**(9): 3006-3011.

Tortoli, E., B. A. Brown-Elliott, J. D. Chalmers, D. M. Cirillo, C. L. Daley, S. Emler, R. A. Floto, M. J. Garcia, W. Hoefsloot, W. J. Koh, C. Lange, M. Loebinger, F. P. Maurer, K. Morimoto, S. Niemann, E. Richter, C. Y. Turenne, R. Vasireddy, S. Vasireddy, D. Wagner, R. J. Wallace, Jr., N. Wengenack and J. van Ingen (2019). "Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria." The European respiratory journal **54**(1).

Tortoli, E., T. Fedrizzi, C. J. Meehan, A. Trovato, A. Grottola, E. Giacobazzi, G. F. Serpini, S. Tagliazucchi, A. Fabio, C. Bettua, R. Bertorelli, F. Frascaro, V. De Sanctis, M. Pecorari, O. Jousson, N. Segata and D. M. Cirillo (2017). "The new phylogeny of the genus Mycobacterium: The old and the news." Infect Genet Evol **56**: 19-25.

Tortoli, E., T. A. Kohl, B. A. Brown-Elliott, A. Trovato, S. C. Leao, M. J. Garcia, S. Vasireddy, C. Y. Turenne, D. E. Griffith, J. V. Philley, R. Baldan, S. Campana, L. Cariani, C. Colombo, G. Taccetti, A. Teri, S. Niemann, R. J. Wallace, Jr. and D. M. Cirillo (2016). "Emended description of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and Mycobacteriumabscessus subsp. bolletii and designation of Mycobacteriumabscessus subsp. massiliense comb. nov." International journal of systematic and evolutionary microbiology **66**(11): 4471-4479.

Trias, J., V. Jarlier and R. Benz (1992). "Porins in the cell wall of mycobacteria." Science **258**(5087): 1479-1481.

Ung, K. L., H. Alsarraf, V. Olieric, L. Kremer and M. Blaise (2019). "Crystal structure of the aminoglycosides N-acetyltransferase Eis2 from Mycobacterium abscessus." The FEBS journal **286**(21): 4342-4355.

Ung, K. L., L. Kremer and M. Blaise (2021). "Structural analysis of the N-acetyltransferase Eis1 from Mycobacterium abscessus reveals the molecular determinants of its incapacity to modify aminoglycosides." Proteins **89**(1): 94-106.

van Kessel, J. C. and G. F. Hatfull (2007). "Recombineering in Mycobacterium tuberculosis." Nature methods **4**(2): 147-152.

Varela, C., D. Rittmann, A. Singh, K. Krumbach, K. Bhatt, L. Eggeling, G. S. Besra and A. Bhatt (2012). "MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria." Chemistry & biology **19**(4): 498-506.

Varghese, B., S. E. Shajan, M. O. Al and S. A. Al-Hajoj (2012). "First case report of chronic pulmonary lung disease caused by Mycobacterium abscessus in two immunocompetent patients in Saudi Arabia." Annals of Saudi medicine **32**(3): 312-314.

Vasilieva, E., S. Dutta, R. K. Malla, B. P. Martin, C. D. Spilling and C. M. Dupureur (2015). "Rat hormone sensitive lipase inhibition by cyclipostins and their analogs." Bioorganic & medicinal chemistry **23**(5): 944-952.

Vazquez-Laslop, N. and A. S. Mankin (2018). "How Macrolide Antibiotics Work." Trends in biochemical sciences **43**(9): 668-684.

Vertesy, L., B. Beck, M. Bronstrup, K. Ehrlich, M. Kurz, G. Muller, D. Schummer and G. Seibert (2002). "Cyclipostins, novel hormone-sensitive lipase inhibitors from Streptomyces sp. DSM 13381. II. Isolation, structure elucidation and biological properties." The Journal of antibiotics **55**(5): 480-494.

Vester, B. and S. Douthwaite (2001). "Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(1): 1-12.

Vianna, J. S., D. Machado, I. B. Ramis, F. P. Silva, D. V. Bierhals, M. A. Abril, A. von Groll, D. F. Ramos, M. C. S. Lourenco, M. Viveiros and P. E. A. da Silva (2019). "The Contribution of Efflux Pumps in Mycobacterium abscessus Complex Resistance to Clarithromycin." Antibiotics **8**(3).

Viljoen, A., V. Dubois, F. Girard-Misguich, M. Blaise, J. L. Herrmann and L. Kremer (2017). "The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments." Molecular microbiology **104**(6): 889-904.

Viljoen, A., C. Raynaud, M. D. Johansen, F. Roquet-Baneres, J. L. Herrmann, W. Daher and L. Kremer (2019). "Verapamil Improves the Activity of Bedaquiline against Mycobacterium abscessus In Vitro and in Macrophages." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(9).

Viljoen, A., M. Richard, P. C. Nguyen, P. Fourquet, L. Camoin, R. R. Paudal, G. R. Gnawali, C. D. Spilling, J. F. Cavalier, S. Canaan, M. Blaise and L. Kremer (2018). "Cyclipostins and cyclophostin analogs inhibit the antigen 85C from Mycobacterium tuberculosis both in vitro and in vivo." The Journal of biological chemistry **293**(8): 2755-2769.

VLM (2023). "Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2022."

Vollmer, W., D. Blanot and M. A. de Pedro (2008). "Peptidoglycan structure and architecture." FEMS microbiology reviews **32**(2): 149-167.

Wallace, R. J., Jr., B. A. Brown-Elliott, C. J. Crist, L. Mann and R. W. Wilson (2002). "Comparison of the in vitro activity of the glycylcycline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **46**(10): 3164-3167.

Wallace, R. J., Jr., G. Dukart, B. A. Brown-Elliott, D. E. Griffith, E. G. Scerpella and B. Marshall (2014). "Clinical experience in 52 patients with tigecycline-containing regimens for salvage treatment of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae infections." The Journal of antimicrobial chemotherapy **69**(7): 1945-1953.

Wallace, R. J., Jr., A. Meier, B. A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G. O. Onyi and E. C. Bottger (1996). "Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **40**(7): 1676-1681.

Walsh, D. S., F. Portaels and W. M. Meyers (2011). "Buruli ulcer: Advances in understanding Mycobacterium ulcerans infection." Dermatologic clinics **29**(1): 1-8.

Wang, G., J. Tang, J. Feng, W. Dong, X. Huo, H. Lu, C. Wang, W. Lu, X. Wang, H. Chen and C. Tan (2021). "Activity of Oritavancin and Its Synergy with Other Antibiotics against Mycobacterium abscessus Infection In Vitro and In Vivo." International journal of molecular sciences **22**(12).

Wani, S. R., C. Wattal and R. Raveendran (2020). "Epidemiology and risk factors associated with NTM pulmonary and extrapulmonary infections in a high tuberculosis endemic Region." Indian journal of medical microbiology **38**(2): 169-175.

Weber, J. M. and R. Losick (1988). "The use of a chromosome integration vector to map erythromycin resistance and production genes in Saccharopolyspora erythraea (Streptomyces erythraeus)." Gene **68**(2): 173-180.

Weinstein, E. A., T. Yano, L. S. Li, D. Avarbock, A. Avarbock, D. Helm, A. A. McColm, K. Duncan, J. T. Lonsdale and H. Rubin (2005). "Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(12): 4548-4553.

Wetzstein, N., M. Diricks, T. A. Kohl, T. A. Wichelhaus, S. Andres, L. Paulowski, C. Schwarz, A. Lewin, J. Kehrmann, B. C. Kahl, K. Dichtl, C. Hugel, O. Eickmeier, C. Smaczny, A. Schmidt, S. Zimmermann, L. Nahrlich, S. Hafkemeyer, S. Niemann, F. P. Maurer and M. Hogardt (2022). "Molecular Epidemiology of Mycobacterium abscessus Isolates Recovered from German Cystic Fibrosis Patients." Microbiology spectrum **10**(4): e0171422.

Whang, J., Y. W. Back, K. I. Lee, N. Fujiwara, S. Paik, C. H. Choi, J. K. Park and H. J. Kim (2017). "Mycobacterium abscessus glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D." Cell death & disease **8**(8): e3012.

Wink, J., F. R. Schmidt, G. Seibert and W. Aretz (2002). "Cyclipostins: novel hormone-sensitive lipase inhibitors from Streptomyces sp. DSM 13381. I. Taxonomic studies of the producer microorganism and fermentation results." The Journal of antibiotics **55**(5): 472-479.

Wipf, J. R. K., M. C. Riley, S. A. Kania, D. A. Bemis, S. Andreis, S. Schwendener and V. Perreten (2017). "New Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Gene erm(48) on the Novel Plasmid pJW2311 in Staphylococcus xylosus." Antimicrobial agents and chemotherapy **61**(7).

Withers-Martinez, C., F. Carriere, R. Verger, D. Bourgeois and C. Cambillau (1996). "A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig." Structure **4**(11): 1363-1374.

Wolinsky, E. and T. K. Rynearson (1968). "Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains." The American review of respiratory disease **97**(6): 1032-1037.

Yan, N. (2015). "Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters." Annual review of biophysics **44**: 257-283.

Yano, T., S. Kassovska-Bratinova, J. S. Teh, J. Winkler, K. Sullivan, A. Isaacs, N. M. Schechter and H. Rubin (2011). "Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH:quinone oxidoreductase: a pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species." The Journal of biological chemistry **286**(12): 10276-10287.

Ye, M., L. Xu, Y. Zou, B. Li, Q. Guo, Y. Zhang, M. Zhan, B. Xu, F. Yu, Z. Zhang and H. Chu (2019). "Molecular Analysis of Linezolid-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium abscessus." Antimicrobial agents and chemotherapy **63**(2).

Yoshimura, K., H. Nakamura, B. C. Trapnell, C. S. Chu, W. Dalemans, A. Pavirani, J. P. Lecocq and R. G. Crystal (1991). "Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin." Nucleic acids research **19**(19): 5417-5423.

Yu, J., V. Tran, M. Li, X. Huang, C. Niu, D. Wang, J. Zhu, J. Wang, Q. Gao and J. Liu (2012). "Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of Mycobacterium marinum." Infection and immunity **80**(4): 1381-1389.

Yu, L., A. M. Petros, A. Schnuchel, P. Zhong, J. M. Severin, K. Walter, T. F. Holzman and S. W. Fesik (1997). "Solution structure of an rRNA methyltransferase (ErmAM) that confers macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotic resistance." Nature structural biology **4**(6): 483-489.

Zapun, A., C. Contreras-Martel and T. Vernet (2008). "Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance." FEMS microbiology reviews **32**(2): 361-385.

Zeth, K. and M. Thein (2010). "Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations." The Biochemical journal **431**(1): 13-22.

Zhanel, G. G., A. R. Golden, S. Zelenitsky, K. Wiebe, C. K. Lawrence, H. J. Adam, T. Idowu, R. Domalaon, F. Schweizer, M. A. Zhanel, P. R. S. Lagace-Wiens, A. J. Walkty, A. Noreddin, J. P. Lynch Iii and J. A. Karlowsky (2019). "Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli." Drugs **79**(3): 271-289.

Zhang, M., C. Sala, N. Dhar, A. Vocat, V. K. Sambandamurthy, S. Sharma, G. Marriner, V. Balasubramanian and S. T. Cole (2014). "In vitro and in vivo activities of three oxazolidinones against nonreplicating Mycobacterium tuberculosis." Antimicrobial agents and chemotherapy **58**(6): 3217-3223.

Zhang, Z., F. Liu and J. Chen (2018). "Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **115**(50): 12757-12762.

Zhang, Z., J. Lu, M. Liu, Y. Wang, Y. Zhao and Y. Pang (2017). "In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense." International journal of antimicrobial agents **49**(3): 383-386.

Zuber, B., M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths and M. Daffe (2008). "Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state." Journal of bacteriology **190**(16): 5672-5680.