

Université de Montréal

**Structure-fonction des transporteurs transmembranaires
de la famille MmpL3 de *Mycobacterium tuberculosis***

Par Amira Yazidi

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

en Biochimie et Médecine Moléculaire

option Biologie Structurale

Avril, 2019

© Amira Yazidi, 2019

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Structure-fonction des transporteurs transmembranaires de la famille MmpL3 du
Mycobacterium tuberculosis

Présentée par:

Amira Yazidi

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Luis Rokeach, président-rapporteur

John Pascal, directeur de recherche

Joelle Pelletier, membre du jury

Frédéric Veyrier, examinateur externe

Zoha Kibar, représentante de la doyenne

Thèse acceptée le

30 Avril, 2019

Résumé

L'émergence de la résistance à une multitude d'agents antimicrobiens chez des bactéries pathogènes est considérée comme une menace majeure pour la santé publique (2). Ces souches sont reconnues comme des organismes multirésistants aux médicaments ou **MDR** (*multidrug-resistant*) (4). Les recherches progressent chez les bactéries, à Gram positif, à Gram négatif et acido-alcool-résistantes au vu de l'ampleur de la menace pour la santé publique, ces bactéries multirésistantes sont devenues les cibles potentielles à cette fin de recherche. De ce fait, les objectifs de la présente étude ont consisté en la caractérisation structurale et fonctionnelle de différents transporteurs transmembranaires de la famille des **RND** (*Resistance-Nodulation-Division*) encore énigmatiques, à savoir: le MmpL3 chez *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) via l'étude de son orthologue CmpL1 chez *Corynebacterium glutamicum* (*Cgl*) et le TriAxB chez *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Ainsi, comme première démarche présentée dans le **chapitre 2**, la structure du transporteur MmpL3 *Mtb* (un transporteur d'acides mycoliques – sous forme de tréhalose de monomycolates (ou *TMM*) - essentiel pour la viabilité de *Mtb*) (5) et celle de son orthologue CmpL1 *Cgl* ont été prédites via le serveur *I-TASSER* (6-8). Ces structures ont été validées par la suite en comparant à la carte électronique générée pour CmpL1 (18 Å) par des analyses de microscopie électronique en transmission à coloration négative (*TEM*). La caractérisation du transporteur CmpL1 purifié par chromatographie à exclusion stérique a confirmé le complexe trimérique de taille avoisinant les 315 KDa (incluant la couronne du détergent) en accord avec des analyses par gel SDS-PAGE. Des études génétiques et biochimiques en collaboration ont d'autre part identifié des résidus engagés dans le transport du *TMM* chez MmpL3 ainsi que d'autres impliqués dans la résistance à des inhibiteurs ciblant ce transporteur. L'ensemble de ces données a mis en évidence la localisation des résidus essentiels au transport et à la résistance au niveau du canal central du modèle trimérique de MmpL3. La région de MmpL3 activant le transport par force protomotrice a été localisée au niveau d'une cavité centrale qui est une caractéristique intrinsèque de la famille des **RND**. Les cartes électroniques de faible résolution déjà obtenues pour la protéine CmpL1 font de ce projet une des directions futures du laboratoire.

Dans le **chapitre 3**, nous illustrons le deuxième aspect du présent projet qui repose sur l'extension de l'étude du potentiel thérapeutique du ciblage du transporteur transmembranaire MmpL3 chez les différentes souches de *Mycobacterium*. Nos collaborateurs ont effectué une analyse biochimique de l'effet thérapeutique des inhibiteurs les plus prometteurs du transporteur MmpL3 *Mtb* sur certaines souches mycobactériennes non-tuberculeuses (*NTB*) multi-résistantes. Basés sur nos modélisations structurales comparatives obtenues par *I-TASSER* (6-8), nous avons pu compléter les informations biochimiques en soulignant les similitudes et les différences de structure entre les souches *TB* et *NTB* ainsi que leurs impacts fonctionnels. Ce chapitre met en évidence l'intérêt du ciblage thérapeutique de MmpL3 chez les espèces *NTB*. En effet, l'efficacité de certains inhibiteurs de MmpL3 *Mtb* sélectionnés sur le traitement des infections pulmonaires *NTB* promet de pouvoir généraliser cette nouvelle voie de traitement pour d'autres souches multi-résistantes *NTB* voire à contribuer à remédier à la problématique de la résistance aux antibiotiques et décomplexifier le traitement actuel.

D'autres études en collaboration entreprenant les mêmes approches d'études structurales ont été réalisées pour les transporteurs tripartites TriAxB (*P. aeruginosa*), des pompes à efflux appartenant à la famille des *RND*. Le but du **chapitre 4** était de générer une structure du complexe et de déchiffrer son mode d'assemblage et d'expulsion des antibiotiques vers le milieu externe. Un modèle à structure quaternaire de TriAxB a été prédit par *I-TASSER* (6-8) et validé contre sa carte électronique à 4.3 Å générée en *Cryo-EM*. Le complexe TriAxB a été également caractérisé par filtration sur gel confirmant une taille approximative de 620 KDa et sa composition en trimère par visualisation sur gel SDS-PAGE.

En conclusion, nous avons pu à travers cette étude combiner différentes approches biochimiques, génétiques et structurales soutenant la nécessité d'une approche multidisciplinaire pour l'approfondissement de la compréhension de la structure et du mode de fonctionnement des transporteurs *RND*. Ces derniers demeurent toujours énigmatiques; toutefois, nos avancées et d'autres à venir permettront la génération de nouveaux médicaments spécifiques traitant les bactéries multirésistantes.

Mots-clés : *Mycobacterium*, *tuberculosis*, MmpL3, *RND*, *XDR*, *TMM*, acide mycolique, *Mycobacterium non tuberculeux*, TriAxB, pompe à efflux, Triclosan, *I-TASSER*, microscopie électronique, *Cryo-EM*.

Abstract

The emergence of resistance to a multitude of antimicrobial agents in pathogenic bacteria is considered a major threat to public health (2). These strains are recognized as multidrug resistant organisms (MDR) (4). Research is progressing in Gram positive, Gram positive high GC and Gram negative bacteria, and given the scale of the public health threat, these MDR have become potential targets for this research. The objectives of the present study consist of the structural and functional characterization of various transmembrane transporters of the still enigmatic RND (Resistance-Nodulation-Division) family, namely: MmpL3 in *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) via the study of its ortholog CmpL1 in *Corynebacterium glutamicum* (*Cgl*) and TriAxB in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

The first component of this project, presented in **Chapter 2**, studies the structure of the transporter MmpL3 *Mtb* (a TMM mycolic acid transporter essential for the viability of *Mtb* (5) and that of its CmpL1 *Cgl* orthologue, which have been predicted via the I-Tasser Pack (6-8). These structures were subsequently validated by comparing to the electronic map generated for CmpL1 (18 Å) by negative staining transmission electron microscopy (TEM). Characterization of the purified CmpL1 transporter by size exclusion chromatography confirmed the trimeric complex size around 315 KDa (including the detergent crown) corroborated by SDS-PAGE gel analyses. Collaborative genetic and biochemical studies have also identified residues involved in the transport of TMM in MmpL3 as well as those residues conferring antibiotic resistance. This data highlighted the location of the essential residues of transport and resistance in the central channel of the trimeric MmpL3 model. The MmpL3 region activating proto-motor transport has been located at a central cavity, which is an intrinsic feature of the RND family. The low-resolution electronic maps obtained for the protein CmpL1 may serve as the foundation of future studies.

In **Chapter 3** we explore the therapeutic potential of the targeting of the transmembrane transporter MmpL3 in different *Mycobacterium* strains. Our collaborators studied the therapeutic effect of the most promising inhibitors of the MmpL3 *Mtb* transporter on certain multi-resistant mycobacterial non-tuberculous (NTB) strains. Based on our comparative structural modeling obtained by I-TASSER (6-8), we supplemented the biochemical data by highlighting the structural similarities and differences between the TB and NTB strains as well as their functional impacts. This chapter highlights the interest of direct or indirect targeting of MmpL3 in NTB species. Indeed, the efficacy of certain selected MmpL3 *Mtb* inhibitors on the treatment of NTB pulmonary infection have potential as generalizable treatment options for other NTB multi-resistant strains, or even to help address the problem of resistance to antibiotics and simplify current combination approaches.

Other collaborative studies undertaking the same structural approaches were carried out for TriAxBC tripartite carriers (*P. aeruginosa*), efflux pumps belonging to the RND family. The purpose of **Chapter 4** was to generate a structure of the complex and decipher its mode of assembly and expulsion of antibiotics from the intracellular environment. A quaternary structure model of TriAxBC was predicted by I-TASSER (6-8) and validated against its 4.3 Å electronic map generated by Cryo-EM. The TriAxBC complex was also characterized by gel filtration confirming an approximate size of 620 KDa and its trimer composition by SDS-PAGE.

In conclusion, this study is combining different biochemical, genetic and structural approaches to highlight the need for a multidisciplinary approach to characterizing the structure function of RND transporters. The latter remain enigmatic; however, our contribution and the progress of others will allow the generation of new specific drugs targeting multiresistant strains.

Keywords: *Mycobacterium, tuberculosis*, MmpL3, RND, XDR, TMM, mycolic acid, non tuberculosis *Mycobacterium*, TriAxBC, efflux pump, Triclosan, I-TASSER, electronic microscopy, Cryo-EM.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des sigles	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xvii
Chapitre 1: Introduction et objectifs de la thèse	1
1.1 Les <i>Actinobactéries</i>	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.2 Les corynébactéries.....	2
1.1.3 Les mycobactéries.....	3
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis (Mtb)</i>	15
1.2.1 Description de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
1.2.2 Pathogénicité de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
1.3 L'enveloppe cellulaire mycobactérienne	20
1.4 Les acides mycoliques (AMs).....	22
1.4.1 Structure et composition des acides mycoliques	22
1.4.2 Diversité des acides mycoliques	24
1.4.3 Vue comparative entre l'acide mycolique et l'acide corynomycolique.....	26
1.4.4 Le rôle et la biosynthèse des acides mycoliques chez le <i>Mycobacterium</i>	28
1.4.5 Le transport des acides mycoliques	31
1.4.6 Utilité de l'inhibition des acides mycoliques chez la mycobactérie.....	35
1.5 Problématique de la résistance aux antibiotiques	37
1.5.1 Développement des antibiotiques antituberculeux	37
1.5.2 La résistance aux antibiotiques : la <i>MDR (Multidrug Resistance)</i>	40
1.5.3 Développement de nouveaux médicaments.....	48
1.6 Les transporteurs membranaires <i>RND (Resistance-Nodulation-Division)</i>	50

1.6.1	Introduction au transport membranaire.....	50
1.6.2	Vue d'ensemble des transporteurs <i>RND</i>	51
1.6.3	Les pompes à efflux <i>RND</i>	53
1.6.4	Les transporteurs <i>CMN</i>	62
1.7	Les objectifs du projet et la méthodologie adoptée	72
1.7.1	Les objectifs ciblés.....	72
1.7.2	Méthodologie générale.....	74
1.7.3	Synopsis	81
Chapitre 2: Article 1.....		82
Chapitre 3: Article 2.....		130
Chapitre 4: Article 3.....		149
Chapitre 5: Discussion et conclusion.....		195
5.1.	Structure-fonction du transporteur MmpL3 et son inhibition.....	195
5.1.1	Validation de la caractérisation structurale du transporteur MmpL3	196
5.1.2	Validation des résidus fonctionnels du transporteur MmpL3	202
5.1.3.	Inhibition du transporteur d'acide mycolique MmpL3.....	205
5.1.4.	Proposition d'un mode de transport de l'acide mycolique par MmpL3 de <i>M. tuberculosis</i>	208
5.2.	Structure-Fonction du TriABC	214
5.3.	La prédiction de la topologie du transporteur par <i>I-TASSER</i>	218
5.3.1.	La modélisation par homologie : Utilité de la prédiction par <i>I-TASSER</i>	218
5.3.2.	Évaluation de la prédiction par <i>I-TASSER</i> : performances et limites	219
5.3.3.	Alternatives et perspectives	222
5.4.	Révolution de la <i>Cryo-EM</i>	223
5.4.1.	Révolution de la <i>Cryo-EM</i>	223
5.4.2.	La <i>Cryo-EM</i> versus la cristallographie aux rayons X et la RMN	224
5.5	Conclusion générale.....	225
Annexe 1: Schématisation des étapes de purification de la protéine CmpL1		i
Annexe 2:		ii

(A)	Enveloppe SAXS CmpL1 de <i>C. glutamicum</i> à basse résolution.....	ii
(B)	Données SAXS pour l'échantillon CmpL1 analysé.....	iii
	Annexe 3: Visualisation de la protéine CmpL1 de <i>C. glutamicum</i> par <i>Cryo-EM</i>	iv
	Annexe 4: Résumé des différents inhibiteurs ciblant les composants du <i>Mycobacterium</i>	v
	Annexe 5: Structure cristallographique du transporteur MmpL3 de <i>M. smegmatis</i> (PDB 6AJF) et proposition d'un mécanisme de transport du <i>TMM</i>	xiv
	Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Exemples de pathogènes <i>Corynebacterium</i> et leurs maladies.	3
Tableau 1-2. Pathogènes CMT et MNT causant des maladies pulmonaires.	4
Tableau 1-3. Les régimes thérapeutiques de la tuberculose.	10
Tableau 1-4. Diversité des acides mycoliques chez les différentes espèces.	25
Tableau 1-5. Vue comparative entre les acides mycoliques de <i>Mtb</i> et <i>Corynebacterium</i>	26
Tableau 1-6. Fonctions des protéines <i>MmpL</i> chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	69
Tableau 1-7. Les <i>CmpLs</i> de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	70
Table 2. Real-space refinement of CmpL1 model against the EM envelope.	101
Table S2-1. I-TASSER free modeling.	121
Table S2-2. Drug susceptibility of <i>MsmgΔmmpL3</i> strains expressing mutated variants of ΔCysMmpL3.	122
Table 3. MICs of MmpL3 inhibitors against <i>M. tuberculosis</i> [<i>Mtb</i>], <i>M. abscessus</i> complex species (<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 [<i>Mabs</i>]; <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> CIP 108297 [<i>Mmas</i>]; <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> ATCC 14472 [<i>Mbol</i>]), <i>M. avium</i> 104 [<i>Mav</i>] and <i>M. smegmatis</i> recombinant strains expressing different <i>mmpL3</i> orthologs.	140
Table S3. Interaction of indole-2-carboxamides with other antimycobacterial drugs and experimental compounds against <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> CIP 108297 as determined by REMA checkerboard.	145
Table 4. Summary of the real-space refinement by Phenix (<i>version dev 2932</i>) of the TriAxBC atomic model against the cryo-EM map.	177
Table S4-1. Antimicrobial susceptibility of <i>E. coli</i> Δ9-Pore ^a cells producing the plasmid-borne AcrAB, TriABC and TriAxBC efflux pumps.	187
Table S4-2. Workflow for cryo-EM particle analysis.	188
Table S4-3. I-TASSER homology modeling of TriC model.	189
Tableau 5-1. Validation des structures tridimensionnelles de CmpL1 et TriAxBC avant et après affinement dans l'espace par <i>Phenix</i>	221
Tableau 5-2. Avantages et inconvénients des techniques de caractérisation structurale: cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN et <i>Cryo-EM</i>	224

Liste des figures

Figure 1-1. Relation phylogénétique et pathogénicité entre les différentes espèces de mycobactéries.....	5
Figure 1-2. Voie de transmission de la tuberculose chez l'hôte infecté.....	7
Figure 1-3. Résultats des traitements (en nombres absolus) pour les nouveaux cas de tuberculose apparus et ceux qui ont été réduits pour la période de 2000 à 2015.....	11
Figure 1-4. Estimation de l'incidence mondiale de la tuberculose (TB) en 2016 et de son taux de mortalité pour la période de 2000 à 2016.....	12
Figure 1-5. La tuberculose au Canada: incidence et taux de mortalité.....	14
Figure 1-6. Micrographie de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> obtenue par microscopie électronique à balayage. Mag 15549X. CDC.....	15
Figure 1-7. Les différents destins de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> intracellulaire.....	16
Figure 1-8. La physiopathologie du cycle infectieux de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Figure 1-9. Voies d'acquisition de la résistance antituberculeuse chez <i>Mtb</i>	19
Figure 1-10. Modèle de la paroi cellulaire mycobactérienne.....	20
Figure 1-11. Structures des acides mycoliques mycobactériens et celles de certains composés contenant du mycolate.....	23
Figure 1-12. Quelques exemples de classes d'acides mycoliques.....	24
Figure 1-13. Vue comparative entre les acides mycoliques et corynomycoliques.....	27
Figure 1-14. Voies de biosynthèse des acides mycoliques (AMs).....	29
Figure 1-15. Les différents types d'acides mycoliques retrouvés chez <i>M. tuberculosis</i>	30
Figure 1-16. Modèles de transport des lipides chez la mycobactérie.....	31
Figure 1-17. Diagramme schématique du transport de l'acide mycolique TMM à travers l'enveloppe cellulaire du <i>Mycobacterium</i>	33
Figure 1-18. Les voies de transport de l'acide mycolique chez <i>Corynebacterium</i>	34
Figure 1-19. Biosynthèse, inhibition et régulation des acides mycoliques mycobactériens.....	36
Figure 1-20. Représentation schématique des médicaments anti-TB de première ligne et de leurs dates de découverte.....	38

Figure 1-21. Représentation schématique des médicaments anti-tuberculose de seconde ligne et de leurs dates de découverte.	39
Figure 1-22. Représentation schématique des cinq familles des pompes à efflux.	41
Figure 1-23. Vue globale des souches résistantes aux antibiotiques anti-TB, 2016.	44
Figure 1-24. Estimation de l'incidence des <i>MDR/RR-TB</i> en 2016, pour les pays rapportant un minimum de 1000 cas d'incidence.	45
Figure 1-25. Schématisation des anciennes et nouvelles cibles (indiquées en bleu et en rouge respectivement) de la thérapie anti-TB.	46
Figure 1-26. Processus général de la génération de nouveaux médicaments.	48
Figure 1-27. Pipeline global de génération des médicaments anti-TB.	50
Figure 1-28. Structure et topologie d'un transporteur de la famille <i>RND</i>	52
Figure 1-29. Structure du transporteur AcrB en état monomérique et trimérique.	54
Figure 1-30. Structure asymétrique <i>Cryo-EM</i> (5.9 Å) de la pompe AcrAB-TolC-AcrZ en présence de l'antibiotique puromycine.	55
Figure 1-31. Description schématique du mécanisme de rotation fonctionnelle d'AcrB.	57
Figure 1-32. Structures des composants du complexe MexAB-OprM.	60
Figure 1-33. Les oligomères des protéines <i>MmpL</i> formant un canal à travers la membrane.	63
Figure 1-34. La topologie des protéines <i>MmpL</i> et leur modélisation par homologie.	64
Figure 1-35. Présentation des <i>MmpLs</i> à fonctions connues chez <i>M. tuberculosis</i>	66
Figure 1-36. Topologies membranaires prédites pour les <i>CmpLs</i> de <i>Corynebacterium glutamicum</i> (<i>Cgl</i>).	71
Figure 1-37. Organigramme résumant les principales étapes de la modélisation par le logiciel <i>I-TASSER</i>	80
Figure 2-1. Negative staining electron microscopy of CmpL1.	102
Figure 2-2. Superposition of the refined CmpL1 modeled structure onto the 3D negative staining EM maps.	103
Figure 2-3. Structural model for the MmpL3 transporter.	104
Figure 2-4. Transmembrane topology of MmpL3.	105
Figure 2-5. Functional analysis of MmpL3 mutants in <i>M. smegmatis</i>	107
Figure 2-6. Effect of silencing <i>tmaT</i> on <i>Msmg</i> growth and mycolic acid export.	108

Figure 2-7. Stereo image showing resistance mutations in MmpL3 superimposed on the MmpL3 model displaying the functional mutations located in the transmembrane region as shown in Fig. 3b.....	110
Figure S2-1. Purification and characterization of CmpL1 and MmpL3.....	111
Figure S2-2. MmpL3 quaternary structure derived by superposition of the MmpL3 subunits onto the CmpL1 trimer.....	112
Figure S2-3. Transmembrane topology of MmpL3.....	113
Figure S2-4. Multiple alignments of MmpL proteins from <i>Mtb</i> and <i>Cgl</i>	119
Figure S2-5. Effect of thiol-reactive probes on mycolic acid export by <i>MsmgΔmmpL3</i> strains expressing MmpL3 mutants with cysteine substitutions at positions Q40, Y235, P625 and V694.....	120
Figure 3-1. Structural comparison of NTM and <i>M. tuberculosis</i> MmpL3 transporters.....	144
Figure S3-1. Level of expression of the <i>M. smegmatis</i> , <i>M. tuberculosis</i> and <i>M. abscessus</i> MmpL3 orthologs in <i>MsmgΔmmpL3</i>	146
Figure S3-2. Amino acid sequence alignment of MmpL3 from <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. abscessus</i> ATCC19977, <i>M. avium</i> 104 and <i>M. smegmatis</i> mc2155 using PSI/TM-Coffee.....	147
Figure 4-1. The structure of TriAxBC trimer as determined using single particle cryo-EM. (A-B).....	178
Figure 4-2. The structural model of TriAxBC interpreted from the 4.33 Å resolution cryo-EM map.....	179
Figure 4-3. A. Residual density of TriAxBC not interpreted as the TriC polypeptide sequence, B. Modelling of the TriA N-terminal and C-terminal membrane proximal region to the residual electron density map, C. Tripalmitoylated TriA N-terminus.....	180
Figure 4-4. Structural comparison of the TriC and AcrB protomers.....	181
Figure 4-5. Intramolecular water-accessible channels in the TriAxBC trimer.	183
Figure 4-6. Charged residues in the central transmembrane domains of TriC and AcrB.	184
Figure 4-7. <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> proteolytic profiles of TriA and TriB.	185
Figure 4-8. Proposed mechanism and states of the tripartite TriAxBC efflux pumps in Gram negative bacteria.....	186

Figure S4-1. Kinetics of intracellular accumulation of the membrane fluorescent probe Nile Red (NR) in hyperporinated efflux-deficient <i>E. coli</i> $\Delta 9$-Pore overproducing AcrAB, TriABC and TriAxBC pumps.....	190
Figure S4-2. SDS-PAGE and SEC chromatogram of TriAxBC sample used for cryo-EM studies.....	191
Figure S4-3. TriAxBC EM-map and its high-resolution refined model.	192
Figure S4-4. Agreement of the refined TriAxBC trimeric structure to the single particle cryo-EM density.....	193
Figure S4-5. Expression of TriAxBC and its TriC variants in <i>E. coli</i> $\Delta 9$-Pore cells.	194
Figure 5-1. Validation de la modélisation <i>I-TASSER</i> de MmpL3 de <i>M. tuberculosis</i>.....	200
Figure 5-2. Vue de dessus des structures tridimensionnelles du transporteur MmpL3 de <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. smegmatis</i>.....	204
Figure 5-3. Cartographie des résidus impliqués dans l'interaction MmpL3-SQ109.....	206
Figure 5-4. Modèle proposé pour le mode de transport du <i>TMM</i> par MmpL3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	209
Figure 5-5. Détection des canaux chez TriAxBC de <i>P. aeruginosa</i> et AcrB d'<i>E. coli</i>.....	216

Liste des sigles

Aa : acide aminé
ACCCase: Acétyl-CoA carboxylase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AG: Arabinogalactane
Ag85: Antigène 85
AM: Acide mycolique
ATP: Adénosine triphosphate
BAAR : Bacille acido-alcool résistant
BCG: Bacille Calmette Guerin
C. glutamicum (Cgl): Corynebacterium glutamicum
CM: *Cell Membrane*
CMN: Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia
CmpL: Corynebacterial membrane protein Large
CMT: Complexe Mycobacterium tuberculosis
Cryo-EM: Cryo-Electron Microscopy
DAT: *Diacyl trehalose*
DBP: *Distal binding pocket*
E. coli: Escherichia coli
EMB: *Ethambutol*
FAS: *Fatty Acid Synthase*
FPM: Force proto-motrice
GL : Glycolipides
IM: *Inner membrane*
INH: *Isoniazide*
IRIS : Inflammatoire de reconstitution immune
I-TASSER: *Iterative Threading ASSEmblY Refinement*
LAM: *lipoarabinomannan*
LOS: *Lipooligosaccharides*
MABSC: Mycobacterium abscessus complex

MAC: *Mycobacterium avium complex*
ManLAM: *Mannose-capped lipoarabinomannan*
MAPc: *Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan*
MATE: *Multidrug and toxic compound extrusion family*
MDR: *Multidrug-resistant*
MDR/RR-TB: *Multi-drug Resistant/Rifampicin Resistance - Tuberculosis*
MDR-TB: *Multi-drug Resistant-Tuberculosis*
MFP: *Membrane Fusion Protein*
MFS: *Major facilitator superfamily*
MIC: *Minimum Inhibition Concentration*
MMDAG: *Monomeromycolyl diacylglycerol*
MmpL: *Mycobacterial membrane protein Large*
MmpS: *Mycobacterial Membrane Protein Small*
MNT: *Mycobactéries non-tuberculeuses*
MODS: *Microscopic-Observation Drug-Susceptibility*
M. tuberculosis (Mtb): Mycobacterium tuberculosis
MTBC: *Mycobacterium tuberculosis complex*
NTB: *Non tuberculeuses*
OM: *Outer membrane*
OMF: *Outer Membrane Factor*
OMS : *Organisation mondiale de la Santé*
PACE: *Proteobacterial antimicrobial compound extrusion family*
P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa
PAT: *Pentacyl trehalose*
PBP: *Proximal binding pocket*
PDB: *Protein Data Bank*
PDIM: *Phthiocerol dimycocerosate*
PG: *Peptidoglycane*
PGL: *Phenolic glycolipid*
PI: *Phosphatidylinositol*
PIM: *Phosphatidylinositol mannoside*

PKS13: *Polyketide synthase*
PL: Phospholipides
PZA : Pyrazinamide
RCSB : Banque de données des protéines
RR: *Rifampicin Resistance*
RR-TB: *Rifampicin Resistance – Tuberculosis*
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RMP : *Rifampicin*
RND: *Resistance-Nodulation-Division*
TB: Tuberculose
TDCM: *Trehalose dicorynomycolate*
TDM: *Trehalose dimycolate*
TEM: *Transmission electron microscopy*
TM: domaine transmembranaire
TMCM: *Trehalose monocorynomycolate*
TMM: Trehalose monomycolate
TPP: *Trehalose polyphleates*
Transporteur ABC : Transporteur *ATP-Binding Cassette*
SAXS: *Small-Angle X-ray Scattering* - diffusion des rayons X aux petits angles
SEC : *Size-Exclusion Chromatography* - chromatographie d'exclusion stérique
SLI: Sulfolipid-I
SMR: Small multidrug resistance family
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
XDR: Extensively drug-resistant
XDR-TB: Extensively drug resistant-Tuberculosis

Liste des abréviations

Etc. : Et cætera
Ex. : Exemple
Prof. : Professeur (e)

Cette thèse est dédiée à mes précieux parents

Abdelhamid Yazidi et Dalila Madhi

À mes chers frères

Zouhaier et Mahmoud Yazidi

À mon adorable sœur

Intissar Yazidi

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les différents membres du jury de ma soutenance qui ont accepté l'évaluation de mon travail de thèse. Je nomme : le Prof. Luis Rokeach (président-rapporteur), le Prof. John Pascal (directeur de recherche), Prof. Joelle Pelletier (membre du jury), le Prof. Frédéric Veyrier (examineur externe) et Prof. Zoha Kibar (représentante de la doyenne).

Mes plus vifs remerciements s'adressent aux membres de mon comité de thèse qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours d'études doctorales. Je remercie donc le Prof. Christian Baron (UdeM), le Dr. Nazzareno D'Avanzo (GEPRM) et le Prof. Peter Pawelek (Université de Concordia).

Je souligne ma reconnaissance envers nos collaborateurs au Canada et à l'étranger. Je remercie ainsi nos collaboratrices aux États-Unis, le Prof. Mary Jackson et le Prof. Helen Zgurskaya pour leurs fructueuses collaborations. Je tiens à remercier aussi le Prof. Isabelle Rouiller et Dr. Joaquin Ortega (Université McGill) pour l'initiation à la microscopie électronique et leur supervision. Je remercie également Mr Richard Gillilan pour son assistance pour les expériences SAXS à MacChess d'Ithaca aux États-Unis.

Je remercie mon ancien directeur de recherche, le Prof. Jurgen Sygusch, pour son encadrement tout au long de mon parcours de doctorat. Je tiens à remercier également le Prof. John Pascal pour avoir accepté de prendre le relais de direction pour la finalisation de mes études.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire de recherche du Prof. Sygusch. Leur présence m'était indispensable pour travailler en harmonie avec un bon esprit d'équipe. Je remercie mes deux collègues Benoit J. et Paul H. pour les bons moments de partage. J'exprime mes sincères remerciements pour ma précieuse collègue Clotilde L.K. pour son amitié et pour sa présence.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la finalisation de mes études. J'exprime ma forte reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué au déblocage de la démarche de finalisation de mes études doctorales. Je tiens à remercier en particulier, Mme Linda d'Astous, le Prof. Luc DesGroseillers et le Prof. Luis Rokeach.

Je remercie aussi tous les membres du GEPROM pour leur collaboration. Je présente ma reconnaissance particulière envers le Dr Nazzeno D'Avanzo. Je spécifie également mes remerciements pour Yoann L.

Je remercie aussi toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de proche ou de loin tout au long de mes études et surtout mes amis Yasmeeen B. et Haytham W. Je remercie tout mon entourage en dehors de l'Université pour leurs encouragements et soutiens.

Je présente toute ma gratitude à ma précieuse famille pour leur amour et leur soutien. J'exprime ma forte reconnaissance pour leur compréhension et leurs encouragements pendant toutes ces six années de parcours d'études doctorales. Sans vous je ne serais certainement pas arrivée jusqu'ici!

Chapitre 1: Introduction et objectifs de la thèse

1.1 Les *Actinobactéries*

1.1.1 Généralités

Le phylum *Actinobactéries* (ou *Actinobacteria*) se divise en six classes, à savoir: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubroacteria* et *Thermoleophilia* (9, 10). Il englobe ainsi un total de 219 genres et 57 familles (11) qui diffèrent du point de vue morphologique, physiologique et métabolique (9, 12, 13). La morphologie de ces bactéries varie entre des formes coccales, en bâtonnet, filamenteuses et hyphales (14, 15). La plupart des actinobactéries sont aérobies. Elles sont essentiellement des bactéries à Gram positif, à forte teneur en GC et acido-résistantes (16, 17). Elles se caractérisent par une croissance sous forme de filaments ramifiés et se retrouvent ubiquitairement dans l'écosystème marin et terrestre. Elles représentent l'une des plus grandes divisions du règne bactérien (9).

Citons la classe des *Actinobacteria* la plus large, et qui contient actuellement 15 ordres (11). Parmi ces ordres, figurent les Actinomycétales de la sous-classe *Actinobacteridae* (16) qui comprend à son tour les genres *Streptomyces*, *Frankia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium*. Certaines actinobactéries présentent une importance biotechnologique majeure particulièrement dans le domaine de la médecine et de l'agriculture. Elles se démarquent par un métabolisme secondaire extensif à l'origine de leur implication dans la production de la majorité des antibiotiques dérivés naturellement, mais aussi d'une variété de composés antifongiques et anticancéreux (18-21). Toutefois, le phylum *Actinobactéries* comporte quelques genres pathogènes à l'origine de maladies sévères chez l'humain et l'animal: *Propionibacterium*, *Tropheryma*, *Nocardia*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium* (20, 22-24). Spécifions pour cette thèse, les genres *Corynebacterium* et *Mycobacterium* (ou *Corynébactéries* et *Mycobactéries* respectivement).

Nous nous intéresserons particulièrement à *Mycobacterium tuberculosis* de la famille des *Mycobacteriaceae*. Le génome de cette espèce code pour des transporteurs d'acides mycoliques ciblés par cette étude. Les acides mycoliques sont présents dans la membrane externe du *Mycobacterium* et sont à l'origine de son imperméabilité (25). La contribution de ces acides au renforcement de la résistance des mycobactéries aux traitements, notamment *M. tuberculosis*, en a fait une cible alternative des médicaments anti-tuberculeux.

Ainsi, nous aborderons dans les sections suivantes l'incidence de l'infection tuberculeuse et l'implication du pathogène *M. tuberculosis*. L'architecture de la membrane mycobactérienne démarquée par la présence des acides mycoliques sera également décrite. Pour finir, nous aborderons la problématique de résistance aux médicaments chez les souches *MDR* (*Multi-Drug Resistance*) et l'implication de leurs transporteurs. Pour une mise en contexte général, commençons par une brève description des genres *Corynébactéries* et *Mycobactéries*.

1.1.2 Les corynébactéries

i. Aperçu des corynébactéries

Le genre *Corynebacterium* appartient à la famille des *Corynebacteriaceae* du sous-ordre des *Actinomycétales* (26). Les corynébactéries sont des bacilles immobiles, de formes irrégulières, à Gram positif et à forte teneur en GC (27). Elles peuvent se trouver chez l'homme, l'animal et dans divers environnements (28). Leur besoin en oxygène ainsi que leur forme varient selon l'espèce. Le genre *Corynebacterium* comprend actuellement 110 espèces (29). Certaines corynébactéries sont propices aux productions industrielles à grande échelle, ou elles sont particulièrement utiles pour la production alimentaire humaine et animale ainsi que pour la fabrication de certains produits pharmaceutiques (ex. *C. glutamicum*, *C. crenatum* et *C. callunae*) (30-34). Cependant, certaines espèces de *Corynebacterium* peuvent être pathogènes.

ii. Pathogénicité des corynébactéries et leur incidence

Mise à part les corynébactéries utilisées par l'homme, d'autres espèces sont des pathogènes à l'origine de maladies sévères (29, 35) (tableau 1-1).

Tableau 1-1. Exemples de pathogènes *Corynebacterium* et leurs maladies.

Sources bibliographiques : (29, 35-43).

<i>Corynebacterium</i> pathogène	Maladies
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	La toxi-infection : la diphtérie
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	La toxi-infection : la diphtérie (chez l'immunodéprimé)
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	La lymphadénite caséuse (Chez les ovins et les caprins)
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Infection opportuniste (nosocomiale)

iii. *Corynebacterium glutamicum*

Parmi les espèces du genre *Corynebacterium*, nous pouvons mentionner *Corynebacterium glutamicum*. Il s'agit d'une corynébactérie non-pathogène et en forme de bâtonnet. Elle est utilisée pour la production industrielle des acides aminés L-glutamate et L-lysine (44, 45) et se caractérise par la présence d'acides mycoliques à courtes chaînes (C22-C36) dans sa membrane externe (25). L'export des acides corynomycoliques à travers la membrane cytoplasmique de *C. glutamicum* implique l'activité du transporteur transmembranaire CmpL1 (46). Ce dernier nous a servi de prototype pour la caractérisation de son orthologue MmpL3, le transporteur d'acides mycoliques chez *M. tuberculosis*.

1.1.3 Les mycobactéries

i. Aperçu des mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales, sous-ordre des *Corynebacterineae*. Elles représentent l'unique genre *Mycobacterium* appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae*. Le *Mycobacterium* est un bacille aérobie acido-alcool résistant (ou **BAAR**) qui résiste à la décoloration par les acides forts et les alcools, d'où le recours à la coloration de Ziehl-Neelsen (47). Les mycobactéries se démarquent des autres procaryotes par la complexité et l'imperméabilité de leur enveloppe dues à sa forte teneur en lipides et en acides mycoliques : une caractéristique à l'origine de la virulence de certaines d'entre elles (48, 49).

Avec plus de 100 espèces de mycobactéries reconnues, ces bactéries sont subdivisées en deux principaux groupes: le groupe des **mycobactéries atypiques (MA)** nommées aussi **mycobactéries non-tuberculeuses (MNT)** et les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (**CMT**) qui se séparent à leur tour en neuf espèces (50-53).

ii. Pathogénicité des mycobactéries et leur incidence

Les mycobactéries peuvent être à l’origine de graves maladies humaines comme la lèpre, l’ulcère de Buruli, la tuberculose et d’autres infections non-tuberculeuses (54). Dans le cadre de la présente thèse, nous nous intéresserons à *M. tuberculosis* qui est le principal agent de la tuberculose. Ce dernier ainsi que les autres pathogènes tuberculeux *M. bovis* et *M. africanum*, appartiennent à la famille des CMT (figure 1-1). Ils se distinguent par leur virulence accentuée chez l’être humain, et ce par opposition aux MNT qui sont principalement des pathogènes opportunistes et ne présentent des pathogénicités qu’occasionnellement (voir au tableau 1-2) (55). Les maladies causées par ces dernières sont majoritairement pulmonaires, mais il existe d’autres maladies non-pulmonaires que nous n’aborderons pas dans cette section.

Tableau 1-2. Pathogènes CMT et MNT causant des maladies pulmonaires.
Sources bibliographiques : (55-66).

Pathogènes tuberculeux (CMT)	Principaux pathogènes non-tuberculeux (MNT)
Infections pulmonaires tuberculeuses chez l’être humain (ex. la tuberculose et la tuberculose bovine) causées par le <i>M. tuberculosis complex (CMT)</i> : - <i>Mycobacterium tuberculosis (tuberculose)</i> - <i>Mycobacterium bovis (tuberculose bovine)</i> - <i>Mycobacterium africanum (tuberculose dans certaines régions africaines)</i>	Infections pulmonaires non-tuberculeuses chez l’être humain (fibrose kystique, la bronchectasie et la bronchopneumopathie chronique obstructive) causées par: le <i>Mycobacterium abscessus complex (MABSC)</i> (<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> , <i>Mycobacterium abscessus bolletii</i> et <i>Mycobacterium abscessus massiliense</i>) et le <i>Mycobacterium avium complex (MAC)</i> (<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> et <i>M. chimaera</i>)

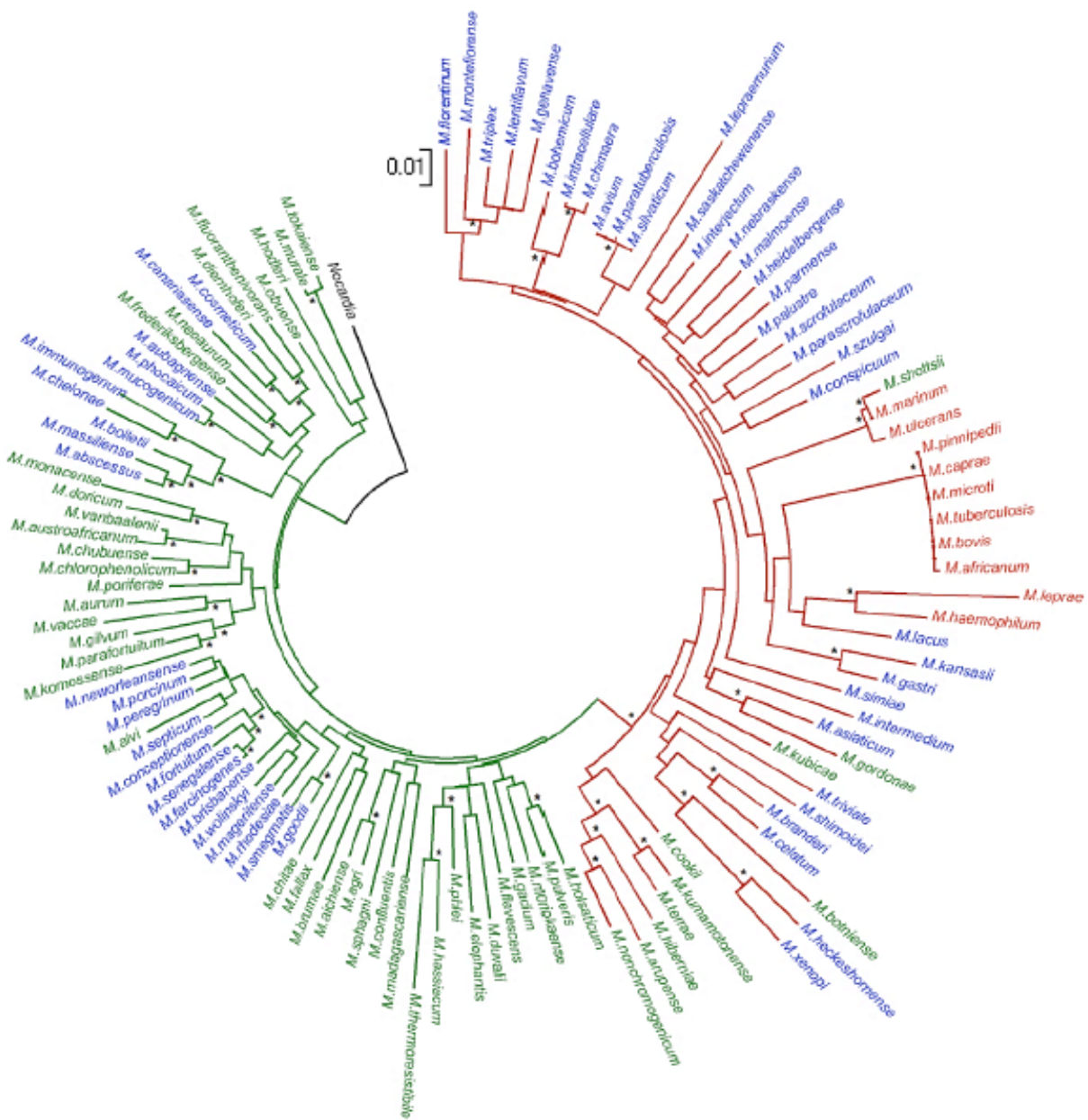


Figure 1-1. Relation phylogénétique et pathogénicité entre les différentes espèces de mycobactéries.

Arbre phylogénétique entre 119 espèces de mycobactéries basé sur l'ARNr 16S, le gène *Hsp 65* et *rpoB*. Les espèces illustrées en vert sont des saprophytes, les pathogènes opportunistes sont colorés en bleu. Quant aux pathogènes stricts, ils sont illustrés en rouge. Les mycobactéries à *croissance lente* (qui mettent plus de 7 jours à générer une colonie sur boîte de Petri) sont représentées par des branches d'arbre rouges et celles à *croissance rapide* (qui mettent moins de 7 jours à générer une colonie sur boîte de Petri) par des branches d'arbre vertes. Image reproduite de (Gutierrez et al., 2009) (67).

iii. La Tuberculose

➤ *Origine de la tuberculose*

La tuberculose est une maladie très ancienne qui précède l'ère de l'Égypte antique (68). Cette infection mortelle et contagieuse cible à la fois l'être humain et les animaux (69-72). Désignée au XVII^e siècle sous l'appellation de « peste blanche », cette maladie attaque souvent les poumons et parfois d'autres organes (reins, os et ganglions). Vu son passé lointain, cette maladie qui a fait des ravages durant l'antiquité gréco-latine a été confondue avec la maladie de « phtisie » qui présentait à l'époque les mêmes symptômes marquants d'amaigrissement (73). Cette confusion a perduré jusqu'en 1733 alors que Pierre Desault (74) a déterminé que les diverses formes de phtisie étaient presque toutes liées entre elles par les symptômes d'un même tubercule, mais pouvait aussi servir à décrire bien d'autres maladies non reliées (75) (76) (77).

Au XIX^e siècle, des travaux de recherche sur la tuberculose se sont succédé, des lésions par Laennec (1819) à l'appellation Tuberculose par Schönlein (1839) (73) (78). Les résultats scientifiques du Dr Robert Koch en 1882 (79, 80), en complémentarité à ceux du microbiologiste Louis Pasteur (81), ont mis en évidence le « bacille tuberculeux » ou « bacille de Koch » à partir de lésions humaines (82) (83) (77) (71). Cette découverte a été couronnée par le prix Nobel en physiologie attribué au Dr Koch en 1905, ce qui a ouvert la porte à la création de la fondation pour les recherches sur la tuberculose. D'autres efforts de recherche menés par le physicien Wilhelm Röntgen en 1895 ont été récompensés par la découverte des rayons X et les techniques d'imagerie associées qui ont permis le diagnostic précoce et la détection des personnes infectées par ce pathogène (84, 85).

➤ *Pathogénèse de la tuberculose*

La tuberculose est une infection connue depuis des millénaires, mais qui continue à préoccuper l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**) par sa virulence, sa très haute incidence mondiale ainsi que son taux de mortalité (86). En effet, la tuberculose figure sur le podium des dix causes de mortalité par infection à l'échelle mondiale. Cet aspect de morbidité et mortalité est dû à l'infection par les agents du complexe *MTBC* (*Mycobacterium Tuberculosis Complex*) (65, 87) induisant le décès de millions d'individus aux quatre coins du monde (88).

La tuberculose humaine est principalement causée par *Mycobacterium tuberculosis* mais peut être causée par d'autres agents du *MTBC*. Par exemple, *Mycobacterium africanum* est responsable des infections tuberculeuses humaines dans certaines zones d'Afrique (89). Ainsi, *M. tuberculosis* et *M. africanum* sont des pathogènes humains obligatoires. Quant au *Mycobacterium bovis*, il est capable d'affecter l'homme et les animaux (90).

Il s'agit d'une infection principalement pulmonaire (70% des cas) (91) et qui peut être également extra-pulmonaire (92, 93) et altérer divers autres organes. Nous citons à titre d'exemple les ganglions lymphatiques, le cerveau, les méninges, les reins, la colonne vertébrale et les os (91, 94-96). La tuberculose pulmonaire se transmet par voie aérienne à la suite de l'inhalation de fines particules d'aérosol renfermant des bactéries provenant d'un patient infecté par le *Mycobacterium*. La réaction immunitaire issue du contact entre la mycobactérie et l'hôte génère le recrutement des macrophages alvéolaires. Le processus de phagocytose de *Mtb* par ces derniers aura ensuite lieu. Par la suite, des sécrétions de chimiokines par les macrophages déclenchent à leur tour le recrutement d'autres cellules immunitaires. C'est ainsi qu'on assistera à la formation du granulome après développement des cellules (figure 1-2).

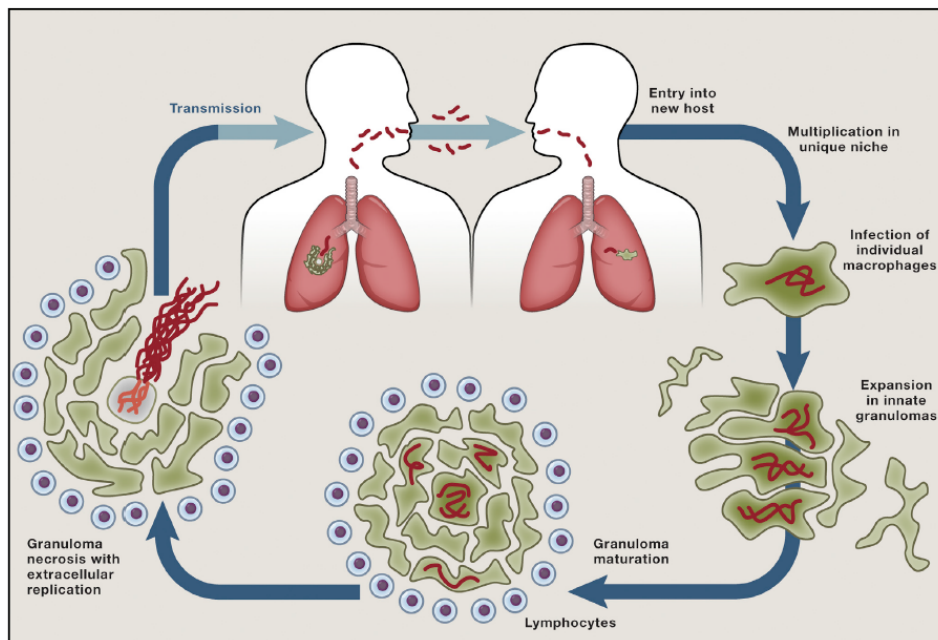


Figure 1-2. Voie de transmission de la tuberculose chez l'hôte infecté.

Voie de transmission de la tuberculose et cycle infectieux de *Mtb*. Image reproduite de (Cambier et al., 2014) (97).

La maturation et la multiplication de l'amas de macrophages modifiés et contenant l'infection génèrera le granulome caséeux. Ce dernier, en se rompant, va disperser dans les poumons le contenu de son centre caséeux riche en bactéries capables de se multiplier. Cette étape active la tuberculose et déclenche par conséquent le stade contagieux de l'infection : *la tuberculose active* (98). Dans le cas d'une *tuberculose latente* (99), on assiste à la survie de certaines mycobactéries lorsque leurs granulomes restent au stade dormant, mais seront capables de se réactiver en réponse à une faiblesse immunitaire (100-103). Parmi ces tuberculoses latentes, seulement 5 à 10% se réactiveront durant leur cycle de vie (91, 104, 105). Ceci explique l'énorme différence entre les nombres d'infections latentes et actives (2 milliards contre 9.2 millions respectivement) (91).

➤ *Symptôme de la tuberculose*

L'infection tuberculeuse pulmonaire active se manifeste par un ensemble de symptômes. Le patient infecté peut présenter une toux aiguë prolongée, des sueurs nocturnes, un épuisement chronique, une perte de poids, de la fièvre et une forte douleur au niveau de la poitrine. L'endommagement des tissus au niveau du site actif de l'infection est également observable. Également, des crachats de sang sont caractéristiques d'un stade d'infection plus avancé (106).

➤ *Diagnostic de l'infection active*

Il existe différents processus de diagnostic de la tuberculose (TB). Des démarches cliniques (symptomatologie) ou paracliniques (radiographie) peuvent être réalisées pour l'évaluation de l'origine de l'infection. D'autres outils biologiques sont également employés pour diagnostiquer la TB comme la bacilloscopie (examen microscopique), la bactériologie (culture des cellules, ciblage de l'ADN du bacille ou test d'amplification des acides nucléiques), l'immunologie (tests de libération de l'interféron gamma) et la biologie moléculaire (107-109). Concernant le diagnostic de la tuberculose multirésistante, il peut être réalisé soit par simple antibiogrammes (épreuve de sensibilité à la rifampicine et l'isoniazide en particulier) ou le test **MODS** (**M**icroscopic-**O**bservation **D**rug-**S**usceptibility). Cette observation microscopique permet d'avoir des résultats en une dizaine de jours avec une indication directe sur la résistance des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques rifampicine et isoniazide (108-110).

➤ *Traitement de la tuberculose active*

La tuberculose est connue depuis l'antiquité (71, 72) du fait de son taux de mortalité élevé. De ce fait, plusieurs nominations ont été attribuées à cette maladie dû à sa morbidité et ses sévères symptômes, comme; «Consomption», «Absorbent», «Pulmonaris de phtisie», «Wasting Disease», «Peste blanche», «Koch d'Alzheimer» et «Tuberculose: TB».

Au fil des années, suivant la découverte du bacille de Koch, plusieurs efforts ont été entrepris afin de combattre ce pathogène. L'année 1940 a marqué la première utilisation d'antibiotiques contre la tuberculose (84). De même, de nouvelles procédures de traitement comme l'utilisation du «Pneumothorax» (111) et la «Thoracoplasty» (112, 113), ciblant les poumons, ont été exploitées pour l'amélioration de la respiration chez les patients. Par la suite, une nouvelle pratique a été adoptée avec succès pour le traitement de la tuberculose (TB) : appelés «Sanatoriums» (114). Cette dernière consiste en un isolement des patients affectés par *Mtb* actif pour de longues périodes de cure à l'écart de leur entourage. Cette procédure dispendieuse et lente a démontré une meilleure efficacité pour le traitement de la TB mais son efficacité était en dépit de la santé morale, du temps et du budget des patients (115).

Ensuite, de nouvelles recherches ont porté fruit et d'autres alternatives de traitement de la tuberculose ont émergé. Un des évènements marquants de l'histoire de la tuberculose fut la découverte du vaccin *Bacille Calmette Guerin (BCG)* par Calmette et Guérin en 1921, généré à partir d'une souche *Mycobacterium bovis* atténuée (116, 117).

De nos jours, tout diagnostic positif affirmant une infection tuberculeuse active déclenche le début d'une antibiothérapie. Il s'agit d'une thérapie de longue haleine exigeant un minimum de six mois de traitement rigoureux. Ce traitement standard se déroule en deux phases: une première phase d'attaque de deux mois et une deuxième dite d'entretien pendant quatre mois. Durant ces six mois de polyantibiothérapie, le patient est contraint d'administrer par voie orale une association de quatre antibiotiques selon les régimes détaillés dans le tableau 1-3.

Tableau 1-3. Les régimes thérapeutiques de la tuberculose.

Abréviations : INH : Isoniazid; RMP :Rifampicin; PZA :Pyrazinamide et EMB: Ethambutol.
Reproduit du site internet : <http://publications.msss.gouv.qc.ca/msss/fichiers/2017/17-271-05W.pdf> (109).

	Phase initiale	Phase de continuation	Durée totale
Option 1 Traitement continu	INH/RMP/PZA ± EMB* chaque jour x 2 mois	INH/RMP chaque jour x 4 mois	6 mois
Option 2 Traitement intermittent[†]	INH/RMP/PZA ± EMB* chaque jour (ou 5 fois/semaine [‡]) x 2 mois	INH/RMP 3 fois/semaine x 4 mois	6 mois

Le régime présenté dans le tableau 1-3 représente le schéma standard suivi pour le traitement de la tuberculose active. Cependant, il existe d'autres régimes thérapeutiques particuliers dépendant de l'état du patient ainsi que d'autres facteurs de résistance, d'intolérance, d'allergie ou de co-infection avec le VIH (109).

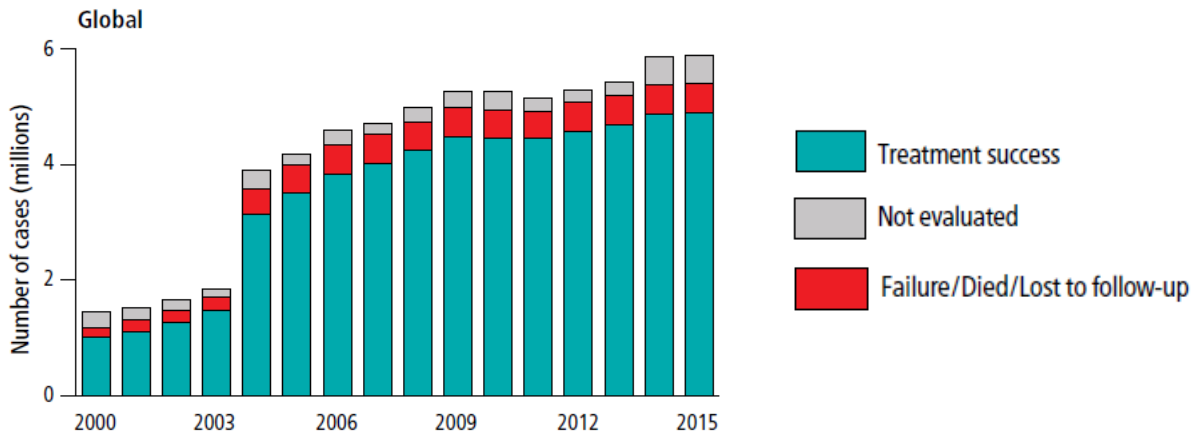


Figure 1-3. Résultats des traitements (en nombres absolus) pour les nouveaux cas de tuberculose apparus et ceux qui ont été réduits pour la période de 2000 à 2015.
Image reproduite de (OMS, 2017) (86).

Selon les dernières statistiques de l’OMS (86), le traitement de la tuberculose progresse annuellement en termes d’efficacité depuis l’année 2000 (Figure 1-3). Cependant, le nombre total des cas d’infections par la TB reste tout de même élevé et ne cesse d’augmenter. Cela dit, nous sommes loin de l’éradication de la TB malgré l’optimisation des traitements. Ainsi, des efforts soutenus de l’OMS restent indispensables.

iv. Incidence mondiale de la tuberculose

En 2016, le nombre mondial des nouveaux cas d’infections par la TB a atteint 10.6 millions de personnes (118). *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* a également entraîné la mort de 44 millions de patients séronégatifs au VIH et de 9 millions de patients séropositifs et ce entre les années 2000 et 2016 selon les statistiques de l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2017 (119) (figure 1-4). Des chiffres alarmants, malgré tous les efforts déployés pour l’atténuation du taux d’infection et de mortalité causé par la tuberculose. D’où l’urgence de l’élaboration de nouvelles stratégies pour la lutte contre *Mtb*.

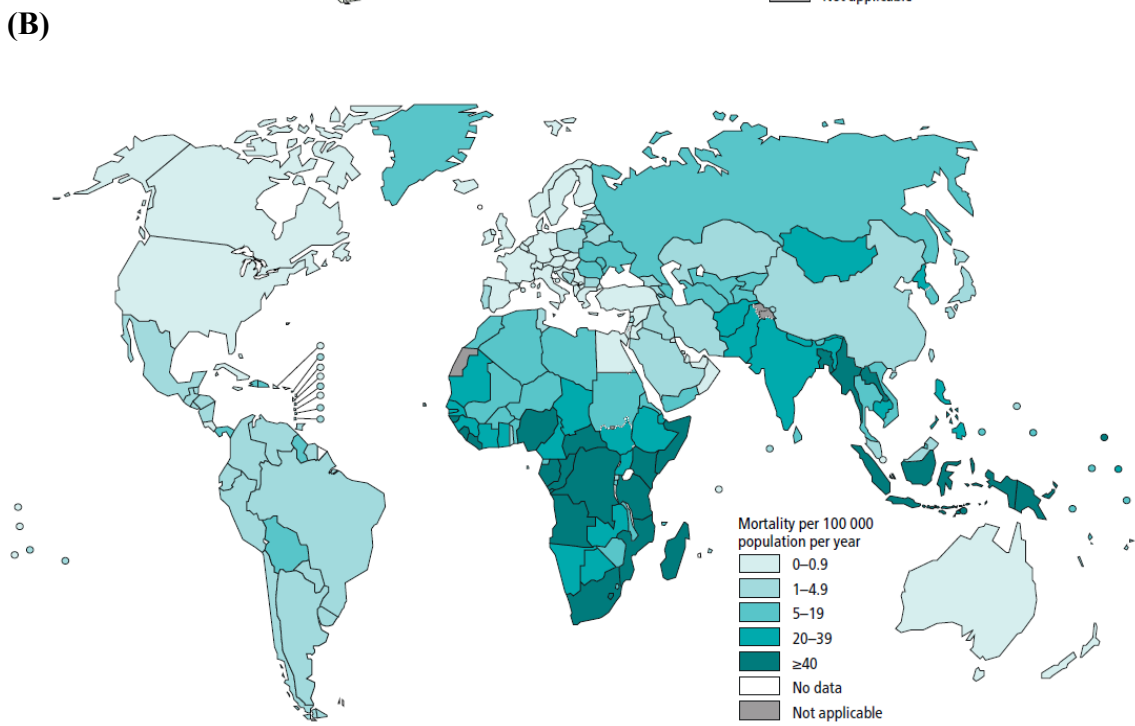
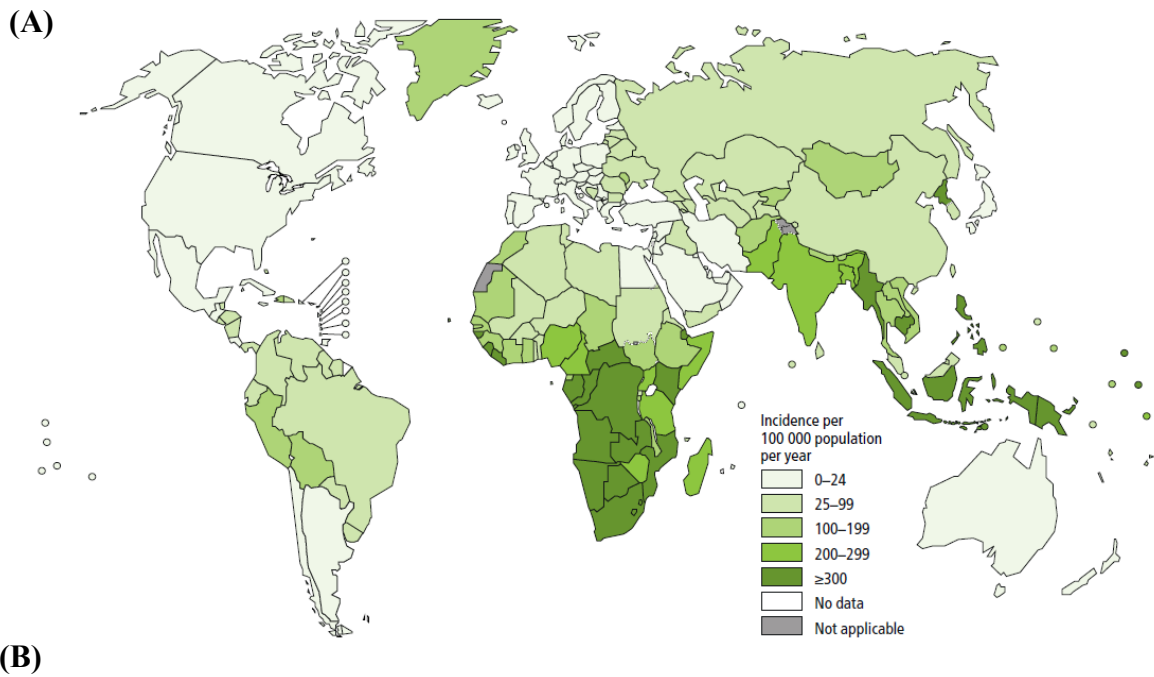


Figure 1-4. Estimation de l'incidence mondiale de la tuberculose (TB) en 2016 et de son taux de mortalité pour la période de 2000 à 2016.

(A) Estimation du taux d'incidence mondiale de la tuberculose en 2016. (B) Estimation du taux de mortalité causé par la tuberculose, 2016. Le nombre exclut la co-infection par le VIH/TB. Image reproduite de (OMS, 2017) (86).

v. Incidence de la tuberculose au Canada

Selon le diagramme circulaire de la figure 1-5-A, publié par l’OMS (l’Organisation Mondiale de la Santé), parmi les 1737 cas de tuberculose active rapportés en 2016 au Canada, les individus nés à l’étranger comptent pour eux seuls 70% (n=1.213) des cas. Concernant le reste du pourcentage, il se répartit comme suit : 19% (n=333) des cas pour les autochtones nés au Canada, 8% (n=135) affectent la population non-autochtone née au Canada, 2% (n=34) concernent les Canadiens nés avec un statut autochtone inconnu et finalement le 1% (n=22) attribué pour les individus d’origine inconnue (1).

Même si le taux d’efficacité du traitement de la tuberculose au Canada a atteint les 85% (des cas enregistrés) et 87% (des cas *MDR/RR-TB*) pour les années 2015 et 2014 respectivement (3), la TB figure dans la liste des préoccupations de l’OMS au Canada. Ceci peut être expliqué par sa retombée globale et son taux de mortalité illustrés dans la figure 1-5, C. De plus, une moyenne de 5 a été notée pour le taux d’incidence de la tuberculose par 100 000 d’individus au Canada, de 2006 à 2016. Aussi, pendant ces dix ans, des augmentations de 84 cas et de 0.3 du taux d’incidence par 100 000 d’individus ont été enregistrées (Figures 1-5, B et C) (3).

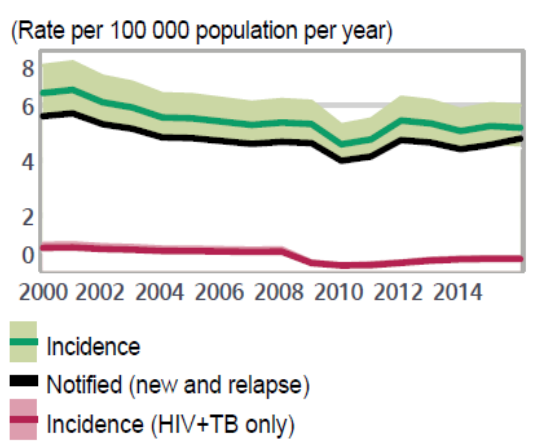
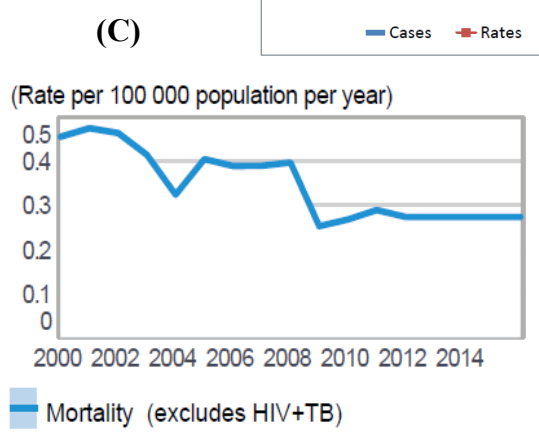
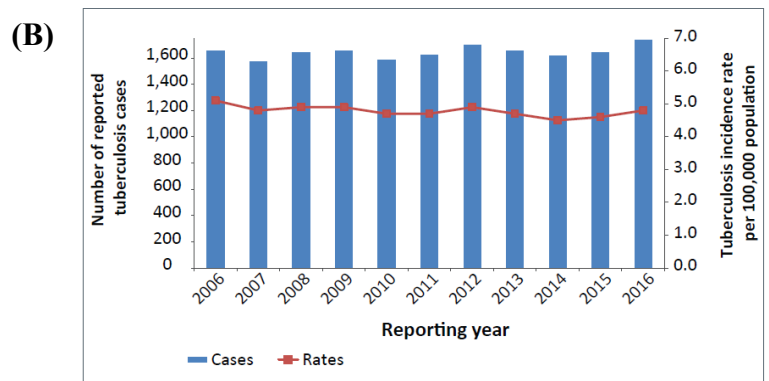
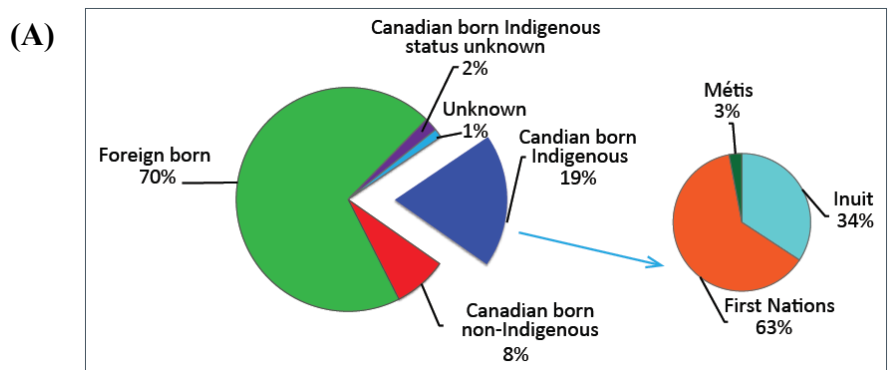


Figure 1-5. La tuberculose au Canada: incidence et taux de mortalité.

(A) Distribution des cas de tuberculose active par origine (nouveaux et re-traités), Canada, 2016. Image reproduite de (Vachon et al., 2018) (1).

(B) Le nombre et l'incidence par tranche de 100 000 patients des cas rapportés de tuberculose active (les nouveaux cas et les re-traités), Canada, de 2006 à 2016. Image reproduite de (Vachon et al., 2018) (1).

(C) Incidence et taux de mortalité de la tuberculose, Canada, de 2000 à 2014. Image reproduite du site d'internet de l'Organisation nationale de la Santé (https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=CA&LAN=EN&outtype=html) (3).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

1.2.1 Description de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) est l'agent responsable de la tuberculose chez l'être humain (120). Ce pathogène appartient à la classe *Actinobacteria*, à l'ordre des *Corynebacteriales* et à la famille *Mycobacteriaceae*. Mtb a été découvert par Robert Koch en 1882 (79, 80) et son génome, renfermant 4000 gènes, a été complètement séquencé en 1998 (121). C'est un bacille aérobie strict, non sporulé, immobile et acido-alcool-résistant. Il se présente sous forme droite ou légèrement courbée. Il possède une longueur de 2 à 4 µm et une largeur de 0.2 à 0.3 µm (figure 1-6).

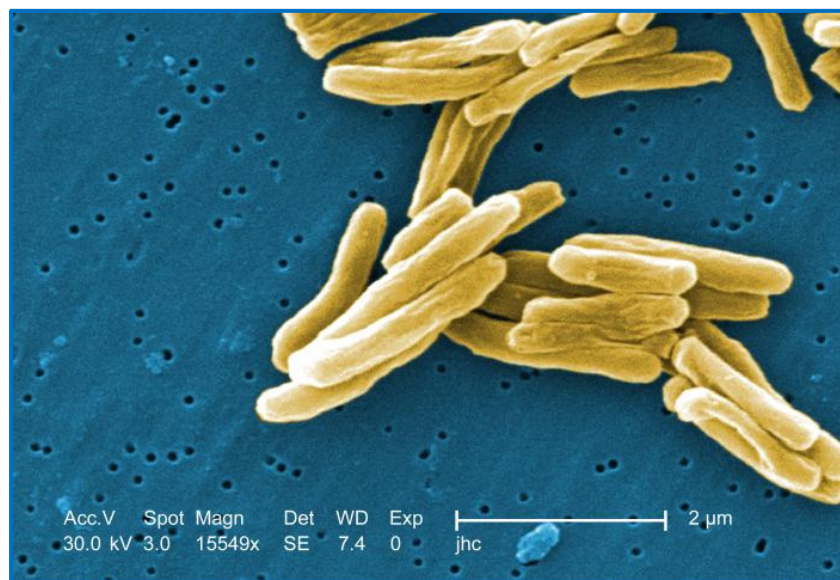


Figure 1-6. Micrographie de *Mycobacterium tuberculosis* obtenue par microscopie électronique à balayage. Mag 15549X. CDC.

Image reproduite du site internet <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html> (122).

1.2.2 Pathogénicité de *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb est capable de manipuler et de contourner la réponse immunitaire de sa cellule hôte ce qui lui confère sa virulence (97, 123). En effet, il est en mesure à la fois de s'évader de la machinerie défensive des macrophages et de se répliquer avec persistance dans ces cellules (97, 123-127). Le schéma de son parcours intracellulaire est illustré par la figure (1-7).

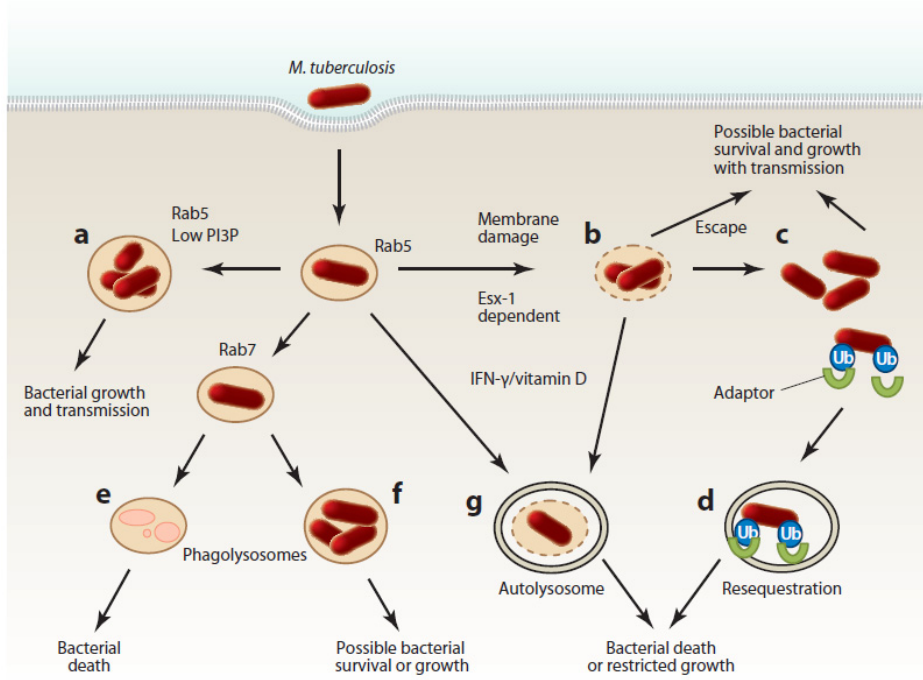


Figure 1-7. Les différents destins de *Mycobacterium tuberculosis* intracellulaire.

(a) *M. tuberculosis* peut prévenir la maturation des phagosomes et croître dans un compartiment semblable à l'endosome précoce par inhibition de la génération du *phosphatidylinositol 3-phosphate* (*PI3P*) sur le phagosome et en altérant le recrutement de la Rab7 active liée à la GTP tout en maintenant la Rab5. (b) Le système Esx-1 perméabilise la membrane phagosomale, permettant un accès cytosolique direct. (c) Dans certains cas, ce processus peut entraîner la fuite des bactéries dans le cytosol. L'étendue de la croissance cytosolique peut dépendre du type de la cellule. (d) Dans le cas de *M. marinum*, les bactéries cytosoliques sont reconnues par le système de l'ubiquitine hôte et sont séquestrées dans un compartiment lié à la membrane. (e) Certaines bactéries ingérées ne parviennent pas à éviter la maturation du phagosome et sont livrées au lysosome où leur répllication sera réduite. (f) Cependant, dans certains contextes, elles peuvent être capables de se développer dans les lysosomes. (g) L'interféron (IFN)- γ et la vitamine D peuvent surmonter l'arrêt précoce de *M. tuberculosis* semblable à l'endosome, favorisant ainsi l'administration des bactéries aux autolysosomes où la croissance sera écourtée. Image reproduite de (Philips et Ernst, 2012) (124).

À titre d'information additionnelle sur la virulence de *Mtb*, nous exposons son cycle infectieux dans la figure 1-8. La transmission de l'infection prend place dès le premier contact entre un individu porteur de la TB active et un individu sain, et ce par transfert de sécrétions contaminées. La reconnaissance immunitaire des mycobactéries virulentes induit le recrutement des macrophages alvéolaires qui vont les phagocyter. Les macrophages ainsi infectés vont déclencher des cycles de contamination répétitifs par recrutement de nouvelles cellules immunitaires à la suite de la sécrétion de chimiokines et de cytokines. C'est ainsi qu'on assiste au développement des granulomes.

Des structures gorgées de lipides et protégées par des fibres de collagène se forment par la suite : les macrophages spumeux infectés. À ce stade, il s'agit d'une infection latente traduite par l'arrêt du processus de réplication des bacilles (128). L'infection évoluera en une TB active dès la réactivation bactérienne qui peut être due à une faiblesse immunitaire ou à une co-infection (ex. VIH) (99). Dans ce cas, les bactéries seront libérées du granulome dégradé et dispersées dans les poumons (figure 1-8) (100, 101).

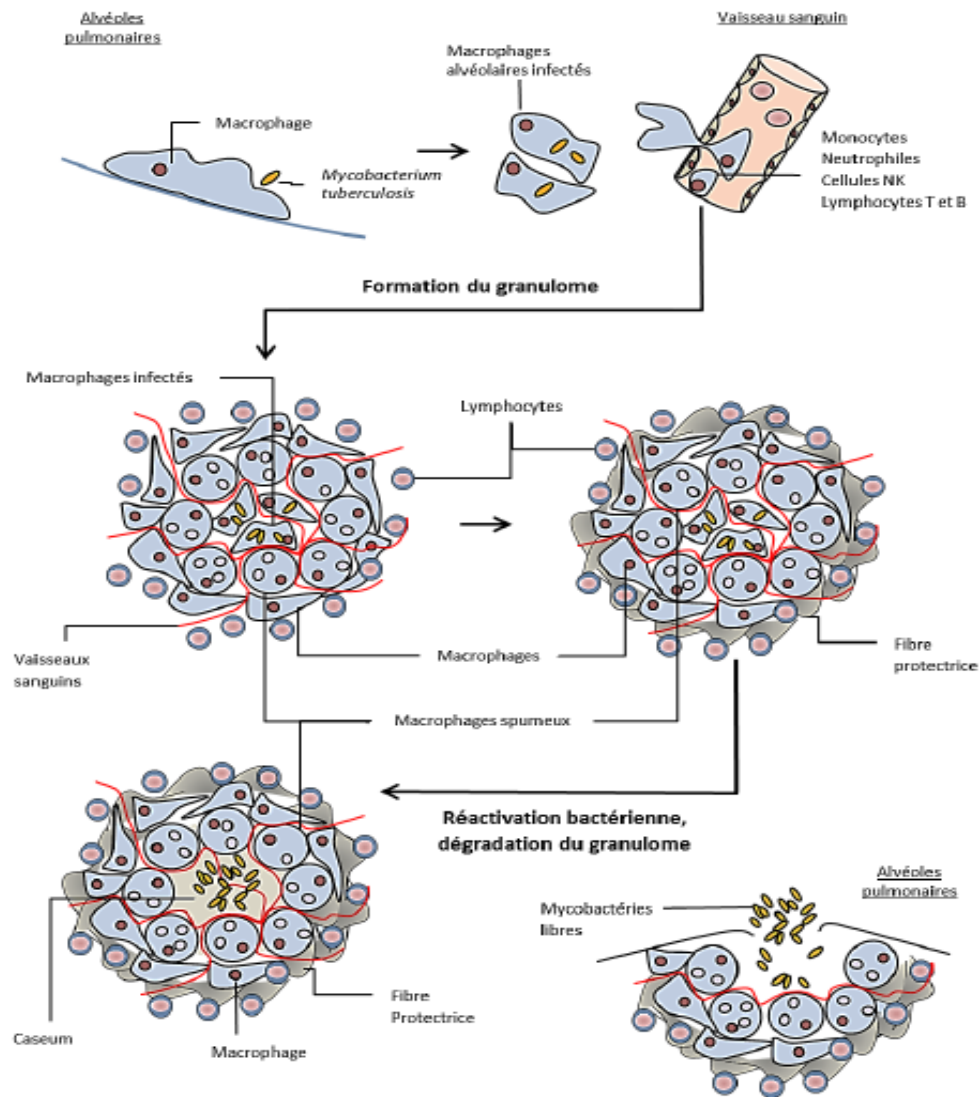


Figure 1-8. La physiopathologie du cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*.
Image reproduite de (Dupont, 2016) (101); Source d'origine (Russel, 2007) (100).

Le taux de mortalité élevé causé par *Mtb* n'est pas uniquement dû à son contournement de l'action des macrophages. En effet, cet aspect est en plus renforcé par sa capacité à développer une résistance contre les antibiotiques destinés au traitement de la maladie qu'il cause, c'est-à-dire la tuberculose. Cette acquisition de la résistance aux antibiotiques est le résultat d'une multitude de facteurs comme l'illustre la figure 1-9.

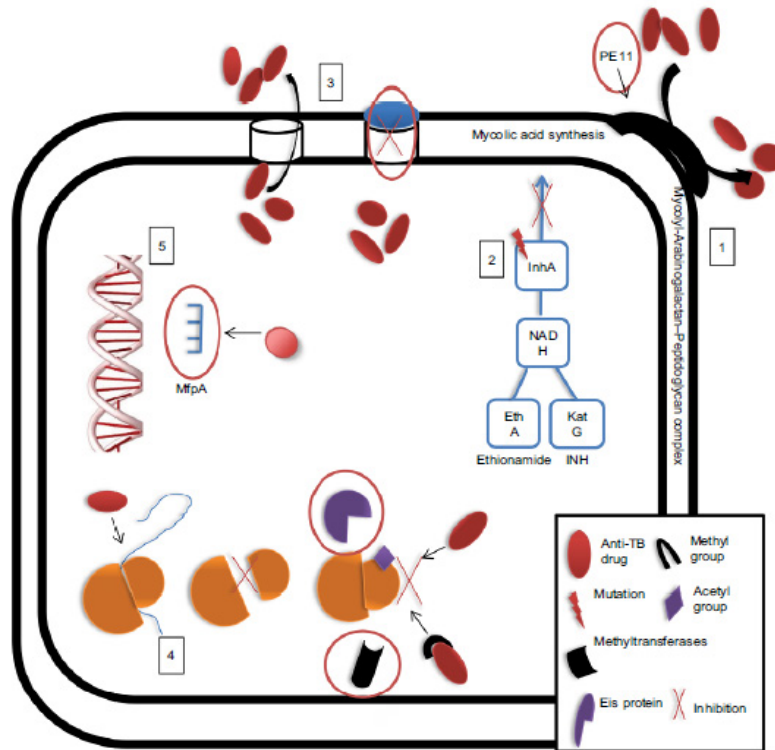


Figure 1-9. Voies d'acquisition de la résistance antituberculeuse chez *Mtb*.

Mtb peut acquérir de la résistance aux médicaments grâce à une: **1**, réduction intrinsèque de la perméabilité de la paroi cellulaire; **2**, acquisition de mutations qui bloquent l'entrée du médicament; **3**, expulsion des médicaments par les pompes à efflux; **4**, modification du médicament ou de sa cible, ou **5**, mimétisme de la cible. (INH : isoniazide et TB : tuberculose). Image reproduite de (Al-Saeedi et Al-Hajoj, 2017) (129).

Il existe également l'éventualité du développement de mutations spontanées au cours de la réplication de *Mtb* ou l'échange de gènes de résistances entre les cellules (129). Il faudra noter aussi que la longue durée d'exposition de *Mtb* aux antibiotiques durant le traitement favorise en grande partie l'adaptation du *Mycobacterium* et le développement de sa résistance. Enfin, il est important de rappeler l'imperméabilité de l'enveloppe de *Mtb* qui sert de première ligne de défense ainsi que l'action des pompes à efflux de médicaments. Certaines de ces voies sont décrites dans la figure (1-9). Ainsi, *Mtb* bénéficie d'une armature que lui confère son enveloppe externe complexe et résistante à un grand nombre de menaces externes. Cette propriété contribue à sa considérable virulence et en fait l'un des pathogènes les plus mortels pour l'être humain. La composition complexe de la membrane externe mycobactérienne sera brièvement introduite dans la prochaine section.

1.3 L'enveloppe cellulaire mycobactérienne

L'affiliation de la mycobactérie au groupe des *Corynebacterineae* la caractérise par une enveloppe cellulaire complexe d'un point de vue composition et organisation. En effet, la mycobactérie se démarque des autres procaryotes par une enveloppe cellulaire unique (130). Cette dernière présente à la fois des caractéristiques communes avec les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (131). La complexité de cette enveloppe et sa richesse en lipides explique la classification de la mycobactérie en tant que bacille acido-alcool résistant (section 1.1.3).

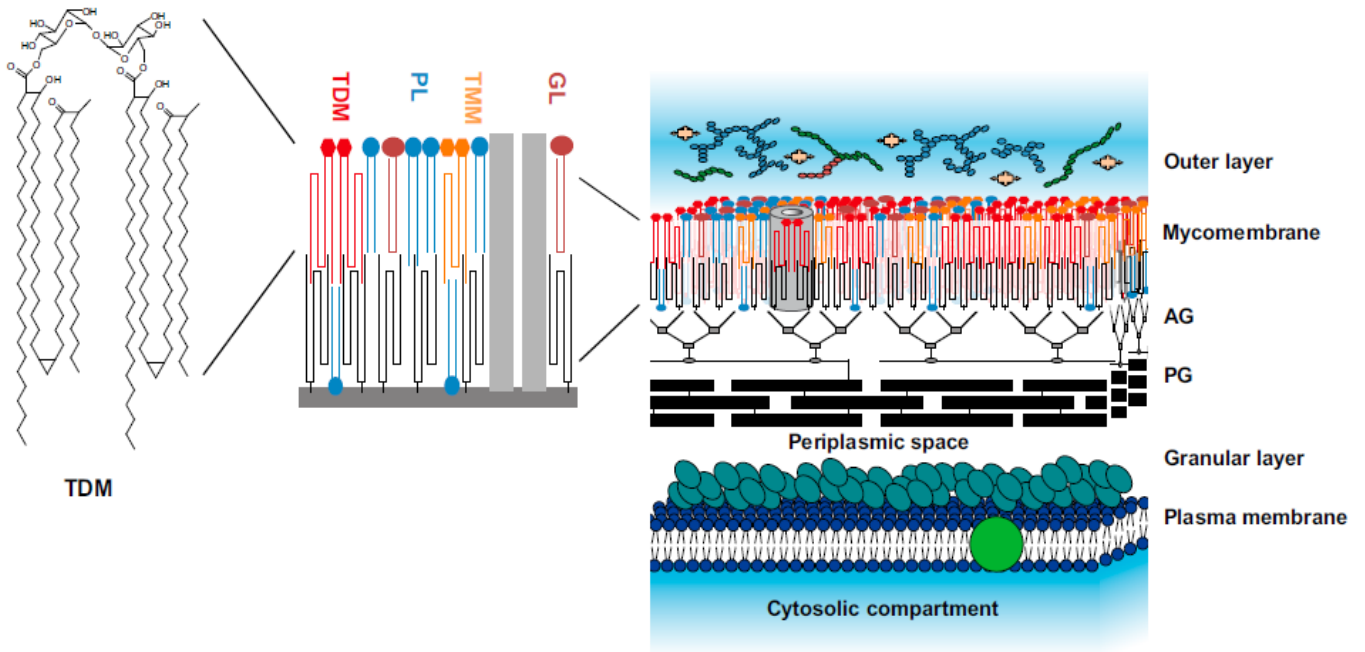


Figure 1-10. Modèle de la paroi cellulaire mycobactérienne.

TDM: tréhalose de **dimycolates**; **TMM** : tréhalose de **monomycolates**; **PL**: **phospholipides** ; **GL** : **glycolipides**; **AG** : **arabinogalactane** et **PG** : **peptidoglycane**. Image reproduite de (Marrakchi et al., 2014) (132).

Comme l'illustre la figure (1-10), l'enveloppe mycobactérienne renferme une membrane cytoplasmique typique composée d'une bicouche phospholipidique, une deuxième membrane externe nommée mycomembrane riche en acides gras mycoliques avec des glycolipides intercalés et une couche externe ou capsule constituée essentiellement de polysaccharides, de protéines et de lipides en faible quantité dont la composition diffère entre les espèces pathogènes et les non-pathogènes (133, 134) (135) (136) (137). Ainsi, ce qui différencie la mycobactérie des bactéries à Gram positif est leur mycomembrane, absente chez ces dernières (130). En revanche, l'analyse du comportement conformationnel des acides mycoliques de la mycomembrane par cryo-microscopie électronique a souligné une ressemblance avec la membrane externe des microorganismes à Gram négatif (134) (138).

L'enveloppe mycobactérienne présente également un espace périplasmique compris entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe et qui s'organise sous la forme de **peptidoglycane (PG)** lié de façon covalente à un polysaccharide, l'**arabinogalactane (AG)**. Cette liaison est assurée par le biais d'unités de liaison de *phosphoryl-N-acétylglucosaminosyl-rhamnosyle* entre le galactane et le C6 de l'acide N-glycolyle muramique du PG (102, 115, 139). La structure du PG ou glycane alterne entre des unités N-acétylglucosamine et des résidus d'acide muramique souvent présents sous une forme N-acétylée ou N-glycosylée. La structure du glycane se complexifie davantage par fixation du térapeptide L-Alanine-D-isoglutaminyl-méso-diaminopimétyl-D-alanine au niveau du groupement carbonyle des acides muramiques (101, 115, 140).

Quant à l'hétéropolysaccharide AG, il présente des chaînes linéaires ramifiées d'une trentaine de résidus D-arabinofuranosyle, appelées domaine d'arabinane liées à un domaine galactane composé d'unités linéaires de D-galactofuranosyle (101, 141). L'AG est estérifié aux extrémités non-réductrices par des acides gras à longues chaînes (C₆₀- C₉₀) appelés **acides mycoliques (AMs)** (142). Ces AMs, composant le feuillet interne de la mycomembrane, seront à leurs tours capables d'interagir avec des lipides extractibles au niveau du feuillet externe de cette membrane. L'ensemble est connu sous le nom du complexe *mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan (MAPc)* (142-147). De ce fait, le squelette **PG-AG-AM** fournit à l'enveloppe cellulaire du genre *Mycobacterium* un environnement lipidique dense où des lipoglycane et des (glyco)lipides s'intercalent de façon non-covalente. Parmi ces composés, nous pouvons

également citer chez *Mtb* les dimycocérosates phthiocérols (**PDIMs**: *phthiocerol dimycocerosates*), les glycolipides phénoliques (**PGLs**: *phenolic glycolipids*), les mannosides phosphatidylinositols (**PIMs**: *phosphatidylinositol mannosides*) et les lipoarabinomannanes à terminaison mannose (**ManLAMs**: *mannose-capped lipoarabinomannanes*) (49, 132, 148). Ces derniers ont fait l'objet de différentes recherches scientifiques pour leur rôle dans le processus infectieux. Nous retrouvons aussi des lipides connus sous le nom de sulfolipides-I (**SLs-I**: *Sulfolipids-I*), **polyacyltréhaloses (PATs)** et **diacyltréhaloses (DATs)**. Parmi les formes les plus éminentes, on retrouve aussi les esters de tréhalose-mycolates: tréhaloses de **monomycolates (TMMs)** et tréhaloses de **dimycolates (TDMs)** (148, 149).

Cette mosaïque structurale confère au genre *Mycobacterium* une barrière extrêmement imperméable aux enzymes de dégradation de l'hôte, aux ions radicalaires et aux antibiotiques, rendant ces pathogènes particulièrement redoutables (143, 150-154). Nombre de lipides mycobactériens ont d'autre part démontré une contribution dans la virulence de *M. tuberculosis* (155-159). Dans le contexte de la présente étude, nous nous intéressons particulièrement aux **acides mycoliques (AMs)**. Ces composants principaux et essentiels de la mycomembrane contribuent en grande partie à l'imperméabilité de l'enveloppe mycobactérienne (139) (49).

1.4 Les acides mycoliques (AMs)

1.4.1 Structure et composition des acides mycoliques

Les acides mycoliques ont été isolés pour une première fois en 1938, au département de chimie de l'Université de Yale, par Andersen et ses collaborateurs et ce d'un extrait de *Mtb* humain (160). Ce n'est qu'en 1950 qu'Asselineau a pu découvrir la structure des acides mycoliques (161). Il a pu démontrer la ramification de ces derniers sous forme de chaînes β -hydroxy- α -alkyl (161, 162).

Ce sont de longs acides gras séparés en 500 classes suivant leur teneur en atomes de carbone (143, 152, 161, 163). Ils peuvent exister à l'état libre (acide) dans la mycomembrane (ex. «MA keto» sur la figure 1-11) mais la plupart sont retrouvés estérifiés soit à l'arabinogalactane comme décrit précédemment soit dans une variété de lipides comme décrit dans la Figure 1-11.

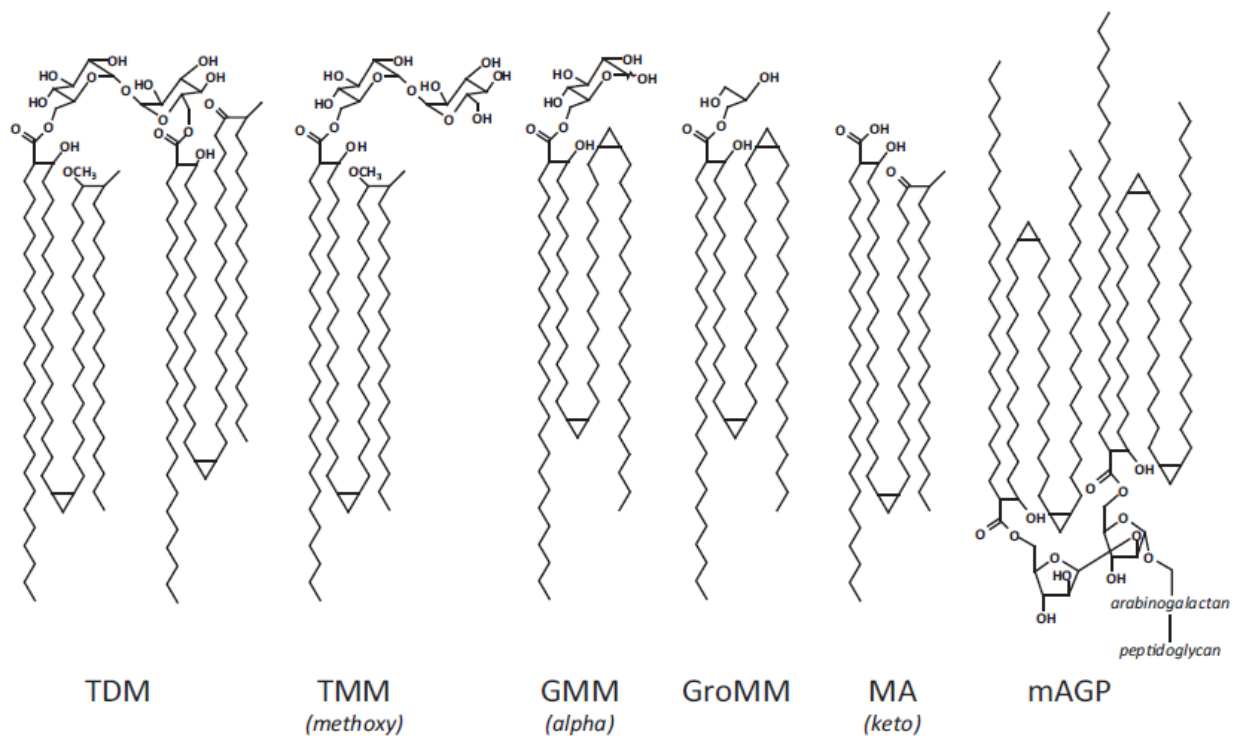


Figure 1-11. Structures des acides mycoliques mycobactériens et celles de certains composés contenant du mycolate.

Image reproduite de (Quémard Annaïk, 2016) (164).

Comme le montre la figure 1-11, les AMs se distinguent par de longues chaînes de carbones. Les chaînes renfermant entre 60 et 90 atomes de carbones particularisent le *Mycobacterium* et sont connues sous le nom « d’acides mycoliques ou acides eumycoliques ». Quant à celles présentant 22 à 60 atomes de carbones, elles caractérisent les espèces de *Nocardia* (appelés acides nocardomycoliques, 44-60 carbones) et *Corynebacterium* (nommés acides corynomycoliques, 22-36 carbones) (132, 152). Les acides mycoliques se caractérisent par un nombre varié de liaisons doubles et la présence d’anneaux de cyclopropane. Ils peuvent également présenter des groupes ester, cétone et époxyde ainsi qu’un élément méthoxy (160) (figure 1-12).

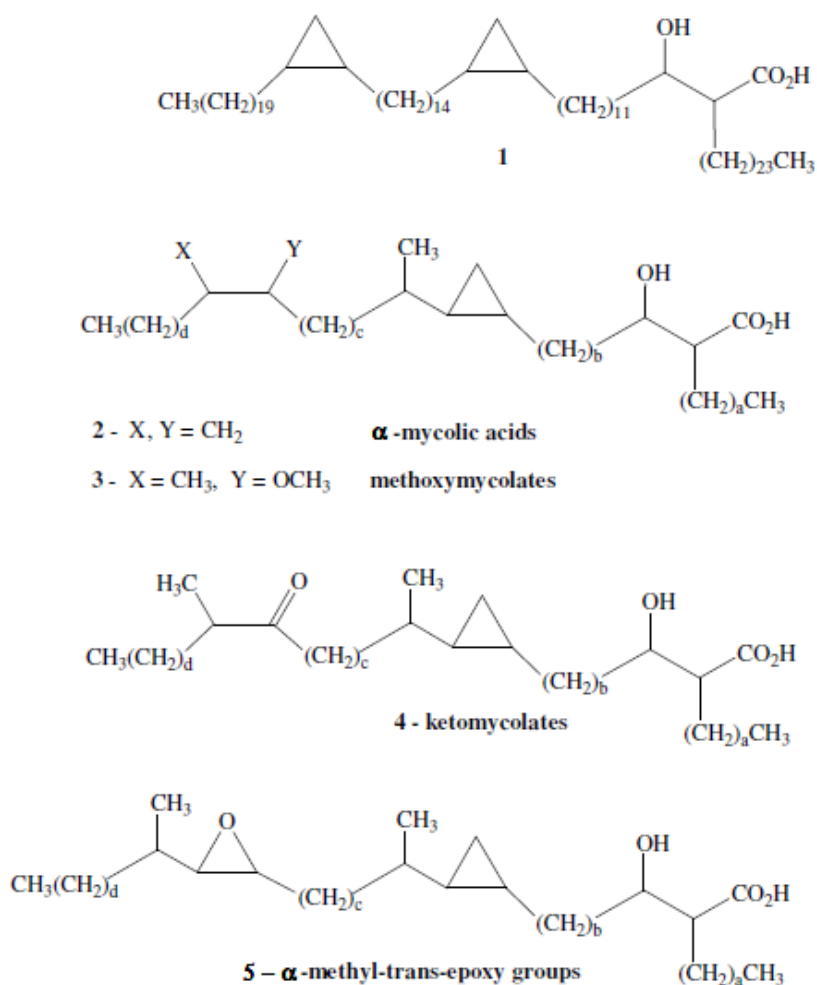


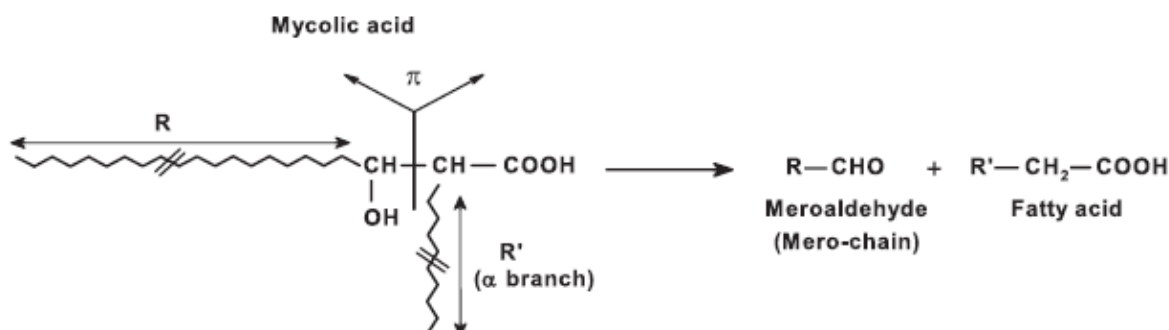
Figure 1-12. Quelques exemples de classes d'acides mycoliques.
 Image reproduite de (de Souza et al., 2008) (160).

1.4.2 Diversité des acides mycoliques

L'acide mycolique représente un élément clé pour la stabilité de l'architecture membranaire des différentes espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium* (143). Cette essentialité a poussé les chercheurs à mettre en place de nouvelles stratégies pour la lutte contre les pathologies causées par ces espèces en ciblant la biosynthèse des acides mycoliques et leur transport vers la membrane externe. Ceci marque davantage l'importance de notre sujet de recherche qui vise le déchiffrement du mode de transport des acides mycoliques chez *Mtb* avec pour objectif de l'inhiber. En effet, une fois ce mécanisme bien défini, la stratégie d'inhibition pourrait être généralisée pour toutes les espèces citées au tableau (1-4).

Tableau 1-4. Diversité des acides mycoliques chez les différentes espèces.

Tableau reproduit de (Marrakchi et al., 2014) (132).



Genus or Species	Total Carbon	Mero-Chain	FA	Unsaturation Degree ^a	Reference	Kas	Had
<i>Corynebacterium</i>	22–36	8–18	8–18	0–2	Collins et al., 1982	–	–
<i>Dietzia</i>	34–38 ^b	19:1	15–17 ^b	0,1	Nishiuchi et al., 2000		
<i>Hoyosella</i>	30–35 ^b	20–25 ^c	9–12 ^b	0,1	Lanéelle et al., 2012	A	A,B
<i>Amycolicoccus</i>	30–36 ^b	20–25 ^c	9–12 ^b	0,1	Lanéelle et al., 2012	A	A,B
<i>Rhodococcus</i>	30–54		12–16	0–2	Nishiuchi et al., 2000	A	A,B
<i>Rhodococcus equi</i>	30–50	14–34	14,16	0–2	Hsu et al., 2011	A	A,B
<i>Tomitella</i>	42–52				Katayama et al., 2010		
<i>Smaragdicooccus</i>	43–49				Adachi et al., 2007		
<i>Millisia</i>	44–52				Soddell et al., 2006		
<i>Williamsia</i>	50–56		16,18		Kämpfer et al., 1999		
<i>Nocardia</i>	46–60	32–40	12–18	0–3	Nishiuchi et al., 1999	A	A,B fused
<i>Skermania</i>	58–64	42–48	16–20	2–6	Chun et al., 1997		
<i>Gordonia</i>	46–66		16,18	1–4	Nishiuchi et al., 2000	A	A,B fused
<i>Tsukamurella</i>	64–78	44–58	20:1,22:1	1–6	Tomiyasu and Yano, 1984	A	A,B
<i>Mycobacterium</i>	60–90	42–62	22–26	1,2	(Barry et al., 1998)	A,B	A,B,C
<i>Segniliparus</i>	60–100	40–76	22,24	1–3	Hong et al., 2012; Lanéelle et al., 2013	A,B	A,B1,B2,C

MAs are characterized by their overall chain lengths and their pyrolysis products. Pyrolytic cleavage (π) at the C₂–C₃ carbon atoms releases a meroaldehyde and a FA; R and R' indicate long hydrocarbon chains.

^aUnsaturation degree refers to the number of double bonds and/or cyclopropanes.

^bMAs containing even and odd carbons were detected in these genera.

^cThe (24:1), corresponding to C₂₄ with one unsaturation, was identified as the major homolog. The occurrence of the FAS-II genes involved in the early and late elongation steps of the mero-chain were searched in the available genomes (right): genes encoding the KasA and KasB (β -ketoacyl-ACP synthase) and Had (β -hydroxyacyl-ACP dehydratase) activities are indicated; A, B and C are subunits of Had.

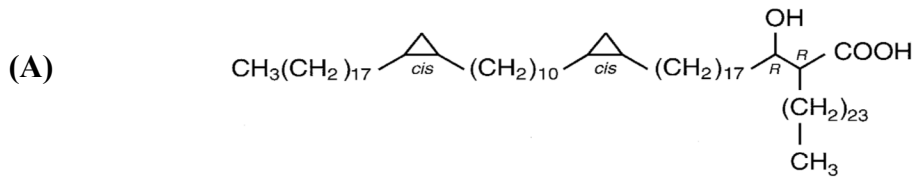
1.4.3 Vue comparative entre l'acide mycolique et l'acide corynomycologique

Dans le cadre de notre étude, il est primordial d'aborder la diversité des acides mycoliques entre les deux espèces du *Mycobacterium* et celles du *Corynebacterium*. En effet, nous avons entrepris les caractérisations structurales et biochimiques sur un orthologue de MmpL3 de *Mtb* nommé CmpL1 provenant de *Corynebacterium glutamicum* (*Cgl*) pour des raisons d'optimisation de taux d'expression et de rendement de purification du transporteur. Le tableau (1-5) présente certaines différences des acides mycoliques de *Mtb* et de *Cgl*.

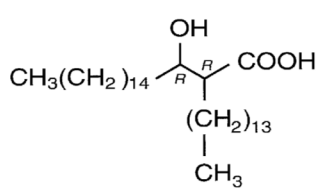
Tableau 1-5. Vue comparative entre les acides mycoliques de *Mtb* et *Corynebacterium*.

<i>Mycobacterium</i> (ex. <i>Mtb</i>)	<i>Corynebacterium</i> (ex. <i>Cgl</i>)
Acide mycolique	Acide corynomycologique
C60-C90	C22-C36
Longs	Petits et larges
Forme complexe	Forme simple
Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides mycoliques	
FAS I + FASII + Pks13	FASI + Pks13
Pourcentage des acides mycoliques liés à l'arabinogalactane	
Plus que 10%	Moins que 1-2.5%
Essentiel pour la viabilité de <i>Mtb</i>	Pas essentiel pour la viabilité de <i>Cgl</i>
<i>Sources bibliographiques:</i> Daffé M. et Draper P., 1998 (143); Brennan P.J., 2003 (165); Portevin et al., 2004 (166), 2005 (167) et <i>Handbook of corynebacterium glutamicum</i> (168).	

Comme première différence, les acides mycoliques (AMs) sont nettement moins complexes chez *Cgl* avec des chaînes de 22 à 36 atomes versus 60 à 90 chez *Mtb* (132). Ensuite, les AMs sont massivement liés à l'arabinogalactane ainsi qu'au niveau de la mosaïque de la paroi externe chez *Mtb*. Ces derniers sont moins abondants chez *Cgl* (figure 1-13). Cependant, ce qui démarque *Mtb* est l'essentialité des AMs pour sa viabilité ce qui n'est pas le cas pour *Cgl* (169). En effet, la suppression de la production ou du transport des AMs induit la mort de *Mtb* (170, 171). D'autres différences sont listées dans le tableau (1-4) ci-dessus.



α -Mycolic acid
(*Mycobacterium*)



Corynomylcolic acid
(*Corynebacterium*)

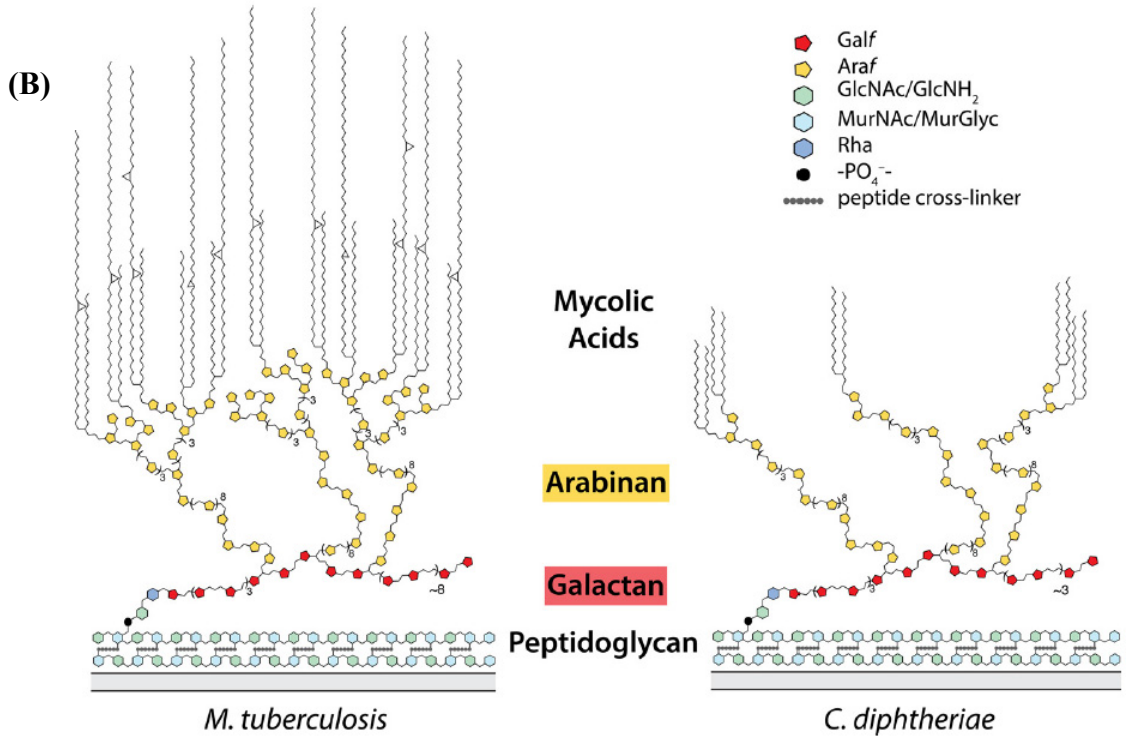


Figure 1-13. Vue comparative entre les acides mycoliques et corynomylcoliques.
(A) Structure d'un acide α -mycolique chez *M. tuberculosis* et celle d'un acide corynomylcolique chez *C. matruchotti*. Image reproduite de (Lee et al., 1997) (172). **(B)** Modèles comparatifs de la structure du complexe arabinogalactane-acides mycoliques chez *M. tuberculosis* et *C. diphtheriae*. Image reproduite de (Wesener et al., 2017) (173).

1.4.4 Le rôle et la biosynthèse des acides mycoliques chez le *Mycobacterium*

i. Le rôle des acides mycoliques

Les acides mycoliques (AMs) sont des composés majeurs de la membrane externe de *Mtb* et jouent un rôle essentiel dans le maintien de sa physiologie ainsi que dans ses interactions avec l'hôte (143, 159). Ceux-ci contribuent à l'efficacité de *Mtb* durant sa croissance à l'intérieur des macrophages du système immunitaire de l'hôte (174). De plus, ces AMs créent dans la membrane externe une barrière fortement hydrophobe excluant tout composé hydrophile. Cette caractéristique différencie le *Mycobacterium* des autres procaryotes (139, 165). Ainsi, l'acide mycolique représente pour le *Mycobacterium* un composé remarquable impliqué dans la synthèse de son enveloppe et un élément critique pour sa viabilité et sa pathogénicité (170, 171). Se basant sur ces caractéristiques, des efforts pharmaceutiques considérables ont été entrepris visant à générer de nouveaux médicaments anti-TB ciblant ces acides mycoliques. Afin de parvenir à cette fin, une bonne connaissance de la voie de biosynthèse des AMs et des transporteurs impliqués dans cette cascade est indispensable.

ii. La biosynthèse des acides mycoliques

Au fil des années, la complémentarité de différentes recherches a pu contribuer à l'avancement dans la compréhension de la voie de biosynthèse des acides mycoliques (49, 132, 164, 175). Nous illustrons dans la figure (1-14) un schéma récapitulatif de l'ensemble des étapes de biosynthèse des acides mycoliques. La biosynthèse de l'acide mycolique implique une panoplie d'enzymes. Elle se base essentiellement sur l'intervention de deux synthases d'acide gras nommées «FAS» dont le rôle est de catalyser des réactions de condensation de Claisen. Ces réactions sont définies par une condensation successive d'unités de malonyl-coenzymeA (CoA) sur une amorce d'acétyl-CoA (176).

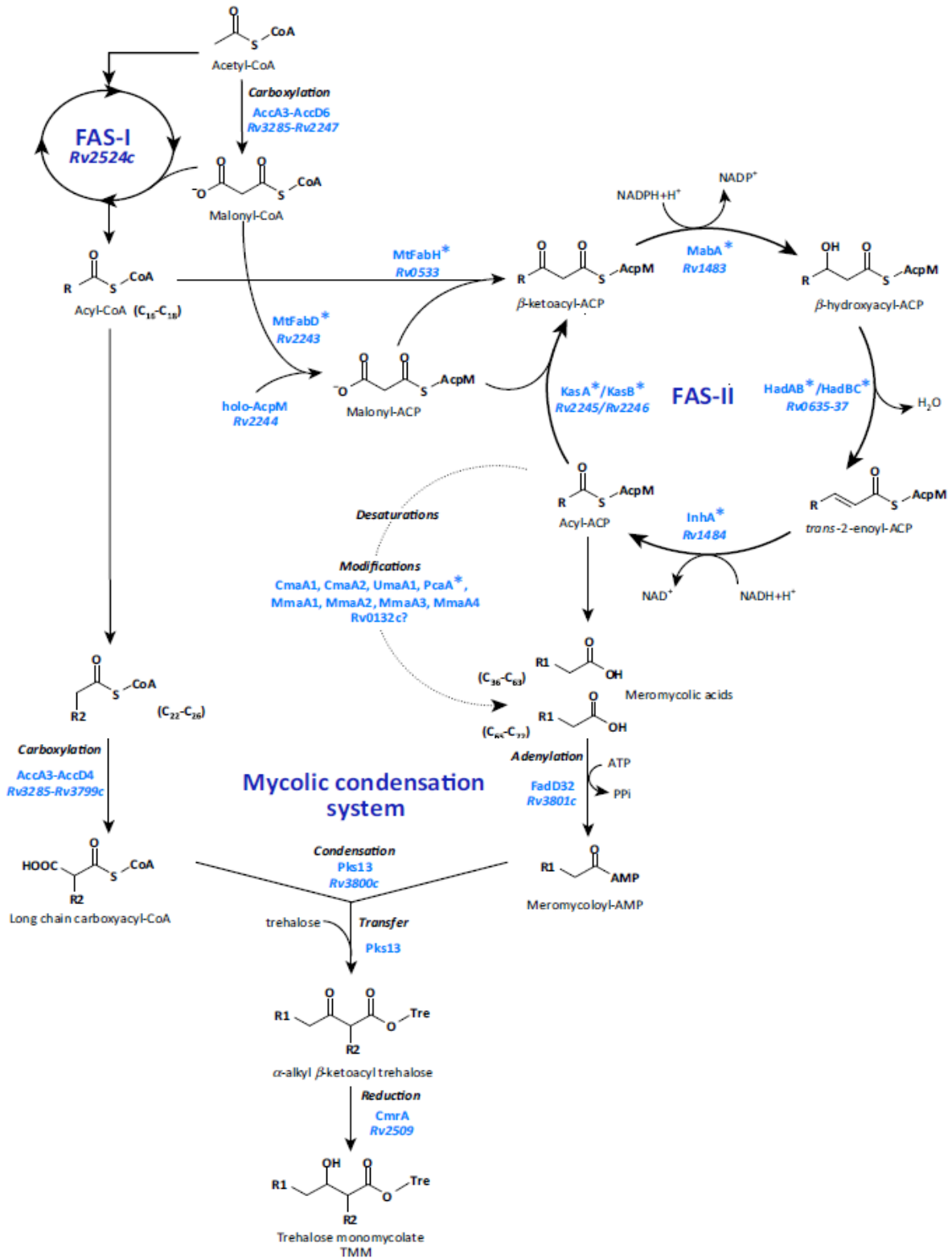


Figure 1-14. Voies de biosynthèse des acides mycoliques (AMs).

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des AMs sont en bleu clair et leurs gènes d'expression en bleu clair italique. Image reproduite de (Quémard, 2016) (164).

Le malonyl-CoA est le produit de la carboxylation des acétyl-CoA, une réaction catalysée par les acétyl-CoA carboxylases (ACCases). Ce sont des enzymes très exprimées et indispensables pour la majorité des organismes vivants (177) et à l'origine de la diversité des acides mycoliques chez *M. tuberculosis* (178-182) (figure 1-15).

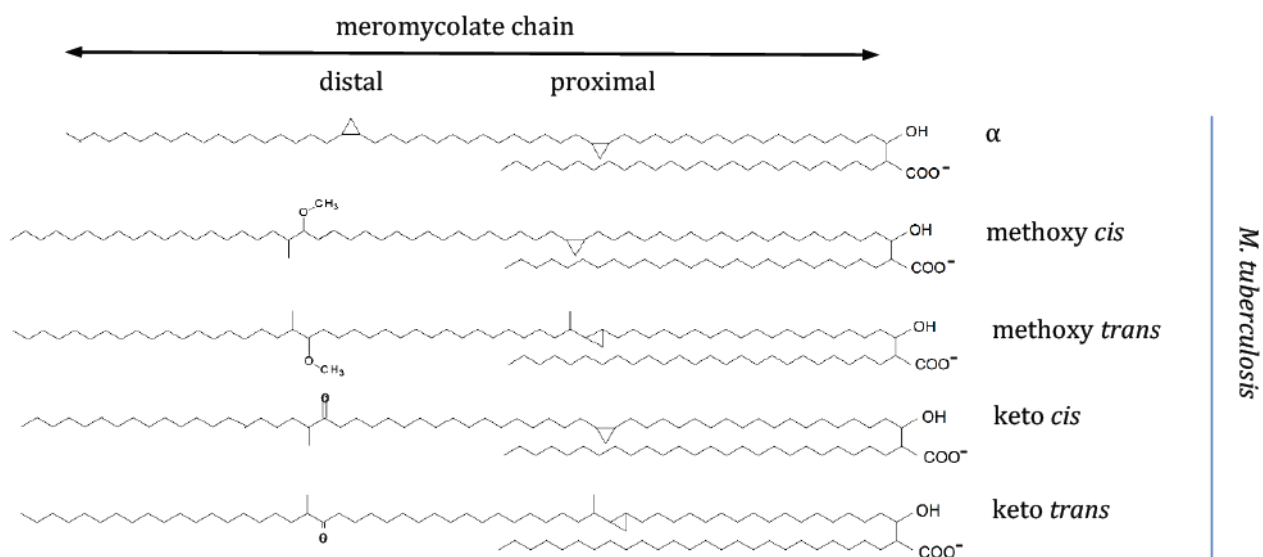


Figure 1-15. Les différents types d'acides mycoliques retrouvés chez *M. tuberculosis*.
Image reproduite de (Madacki et al., 2018) (183).

Il existe deux variantes de synthèses FAS: la FAS type-I et la FAS type-II (176, 184). La synthase d'acide gras I (FAS-I) est une protéine multi-domaines composée de sous-unités typiquement eucaryotique. Elle initie la biosynthèse des AMs par la production d'acides gras à distribution bimodale de type C₁₆ à C₁₈ et C₂₄ à C₂₆ par élongation des groupes acétyles (176). Les chaînes C₂₄-C₂₆ représenteront par la suite la «branche α» des acides mycoliques. Quant au complexe enzymatique caractéristique des bactéries, appelé synthase d'acide gras II (FAS-II), il renferme un ensemble d'enzymes solubles capables de réagir ensemble pour la poursuite de l'élongation des acides gras. La FAS-II prend le relais d'élongation à partir des unités C₁₆₋₁₈ pour être à l'origine des plus longues chaînes méromycoliques affichées dans la figure (1-15) (184). Ce cycle d'élongation par FAS-II fait intervenir les enzymes condensases *KasA/B*, en premier lieu, suivies des déhydratases *HadAB et HadBC*. On assiste également à des réactions de réduction (par *InhA*), ou encore à des étapes de désaturation et modifications (par les *CmaA1/2*, *MmaA1/2/3/4*, la *PcaA* et la *UmaA1*).

Une fois l'élongation et la différenciation des chaînes méromycoliques ont eu lieu, la condensation de ces dernières est débutée. Ainsi, la condensation de Claisen de ces chaînes méromycoliques complétée, la condensation de Claisen de ces dernières avec les branches α générera les motifs mycoliques 2-alkyle et 3-hydroxyle des acides mycoliques (132, 175). Après condensation, la polyketide synthase Pks13 transfère l'acide mycolique sur le tréhalose générant l' α -alkyl β -ketoacyl tréhalose. Enfin, la biosynthèse est clôturée par une étape de réduction de ce dernier par la *CmrA* afin de produire le tréhalose de monomycolate TMM (figure 1-14) (164, 175).

1.4.5 Le transport des acides mycoliques

Il est évident que la quasi-totalité de la voie de biosynthèse des AMs a été élucidée. Cependant, les pièces du puzzle n'ont pas toutes été réunies. En particulier, le mécanisme d'export des AMs à travers la membrane plasmique et jusqu'à la membrane externe reste énigmatique, ce qui représente un des objectifs de la présente étude.

i. Vue d'ensemble du transport des lipides de la membrane externe mycobactérienne

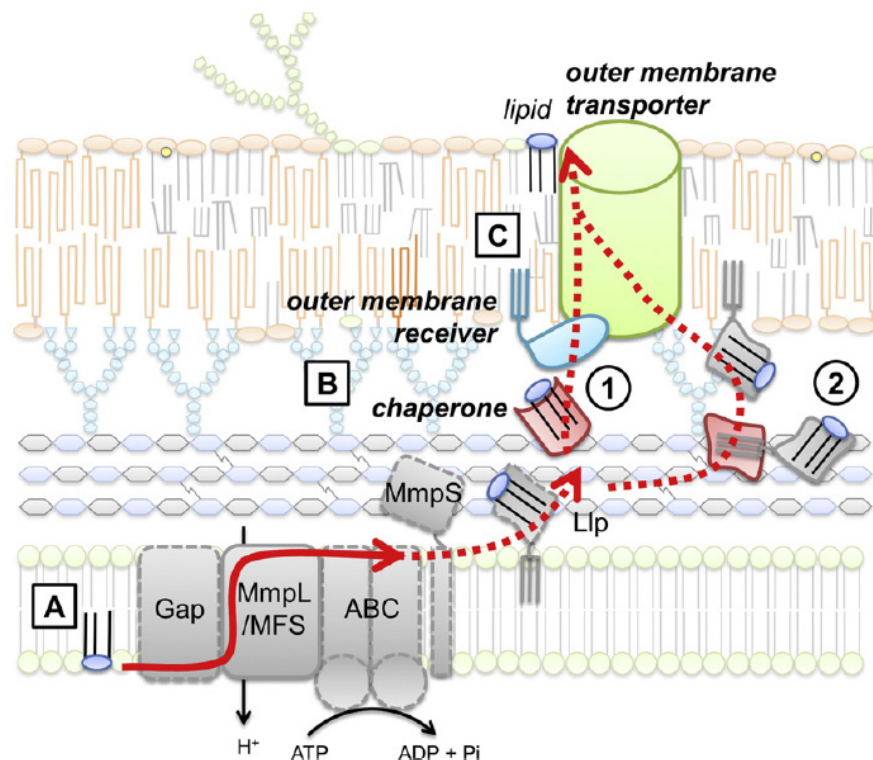


Figure 1-16. Modèles de transport des lipides chez la mycobactérie.
Image reproduite de (Touchette et Seeliger, 2017) (148).

Un schéma proposé pour le processus général de transport des lipides chez la mycobactérie est présenté en figure 1-16. Le processus serait initié par le passage du lipide à travers la membrane interne au moyen d'une pompe à efflux de type *RND* ou *MFS* (étape A). D'autres protéines comme des transporteurs *ABC* ou des protéines accessoires *MmpS* peuvent dans certains cas intervenir comme intermédiaires de son transfert vers les protéines périplasmiques. Ensuite, des protéines chaperonnes interviendraient au niveau de l'espace périplasmique lors de la maturation du lipide et de son acheminement jusqu'à l'interface externe (étape B). Enfin, le transfert du lipide à l'extérieur de la membrane externe et/ou son insertion dans cette dernière pourrait être réalisé par des canaux à feuillet bêta (étape C) (148).

ii. Transport de l'acide mycolique TMM à travers la membrane cytoplasmique du *Mycobacterium*

De premières études publiées en 2012 ont démontré l'implication du transporteur MmpL3 dans le transport (ou basculage lipidique) du glycolipide **TMM** à travers la membrane de *Mtb* (185). Il a été montré que des inhibiteurs de MmpL3 inhibent la translocation du TMM, provoquant l'accumulation de ce lipide du côté cytoplasmique de la membrane plasmique (186). Certains de ces inhibiteurs, *AUI235* [1-(2-adamantyl)-3-(2,3,4-trifluorophenyl) urea] (185) et *SQ109* (187), sont issus de criblages phénotypiques contre *Mtb* et leur mode d'action a été confirmé par une panoplie d'approches génétiques, métaboliques et physico-chimiques (187).

À titre d'exemple, la génération de mutants spontanés de *Mtb* résistants à ces nouveaux inhibiteurs (185) a systématiquement présenté des mutations uniques au niveau du gène codant pour MmpL3. D'autres auteurs ont suggéré l'interférence de l'inhibiteur *AUI235* avec le gradient de protons à la suite du repérage d'une mutation G253E conférant la résistance à l'inhibiteur. Cette résistance a été observée au niveau d'une même zone conservée chez tous les transporteurs *RND* (185, 188-190). Le transporteur impliqué dans le transfert du TMM synthétisé au niveau du cytoplasme mycobactérien (175) vers le périplasma a donc été désigné et scruté par plusieurs études (186, 187, 191). Cependant, le mécanisme reste indéchiffrable: *Comment le transporteur transmembranaire MmpL3 de Mtb parviendra-t-il à transporter l'énorme glycolipide TMM à travers la membrane cytoplasmique ? Quels sont les détails mécanistiques de son parcours complet jusqu'à la membrane externe mycobactérienne ?*

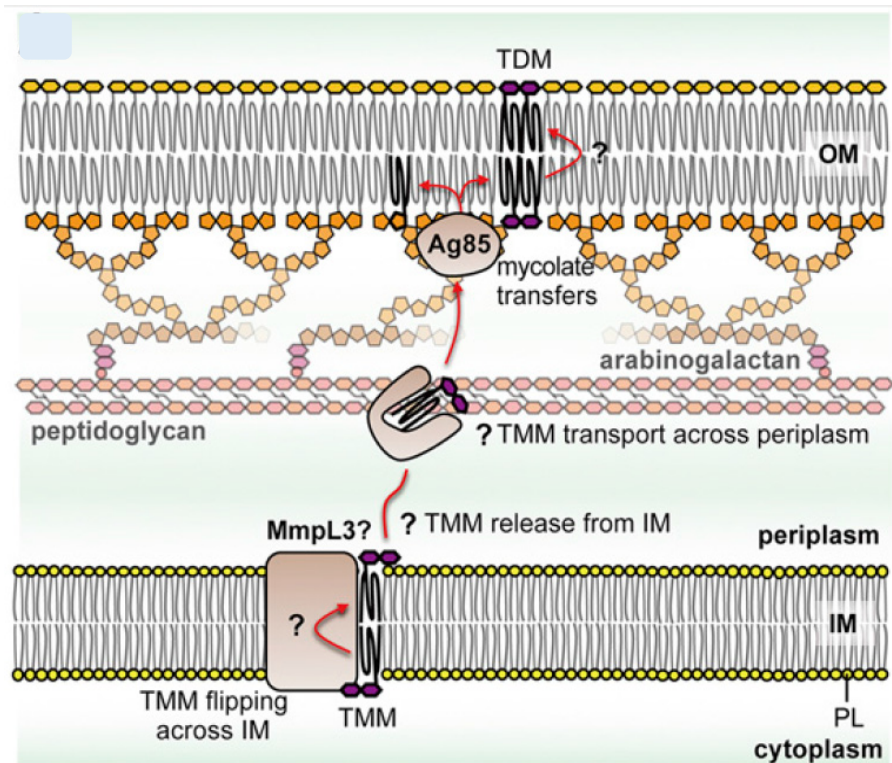


Figure 1-17. Diagramme schématisique du transport de l'acide mycolique TMM à travers l'enveloppe cellulaire du *Mycobacterium*.

Abréviations : TMM : tréhalose de monomycolate; TDM : tréhalose de dimycolate; Ag85: le complexe antigène 85; IM: membrane interne; OM: membrane externe et PL : phosphatidylinositol. Image reproduite de (Xu et al., 2017) (186).

Pour résumer, une fois le TMM exporté par MmpL3 vers l'espace périplasmique (186), il sera pris en charge par le complexe de l'antigène 85 (Ag85) (192). Le passage entre MmpL3 et l'Ag85 devrait être logiquement assuré par une protéine périplasmique de type chaperonne encore inconnue. Ensuite, le rôle du complexe Ag85 (ou mycolyltransférases FbpA, FbpB et FbpC) résidera dans le transfert de la chaîne mycolate pour assurer la biosynthèse des lipides de la membrane externe contenant des mycolates et l'attachement des acides mycoliques à l'arabinogalactane (figure 1-17). Le rôle spécifique de chacune des trois mycolyltransférases du complexe Ag85ABC n'est toutefois pas encore complètement élucidé (164, 186, 193).

iii. Transport de l'acide mycolique *TMCM* à travers la membrane cytoplasmique du *Corynebacterium*

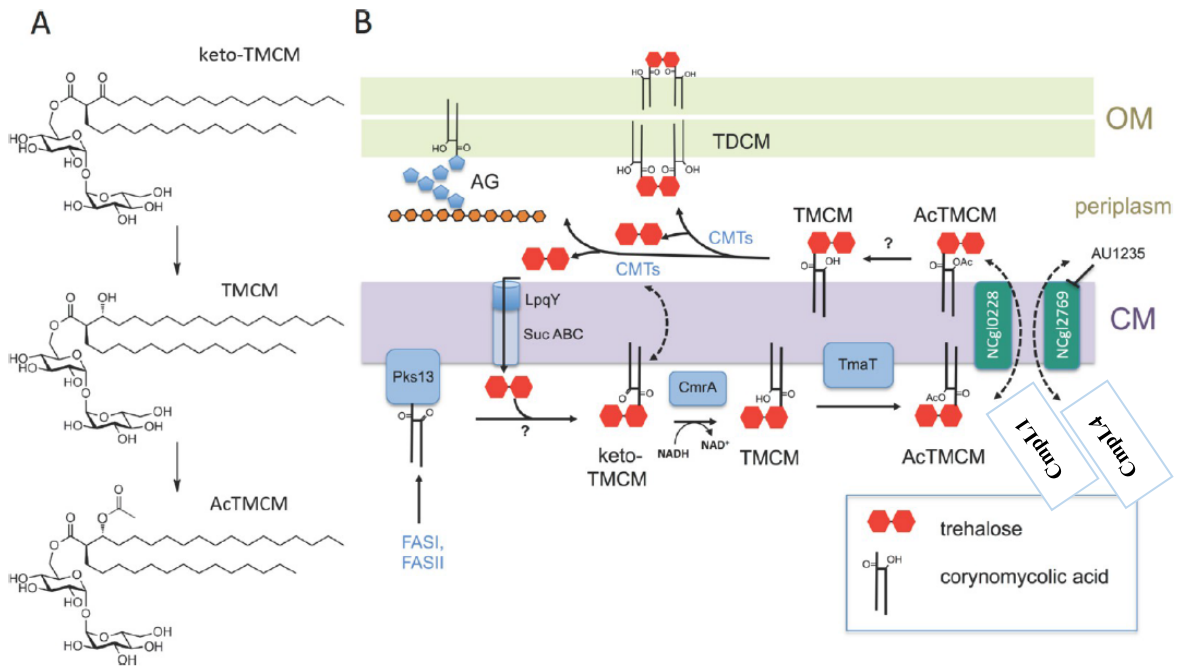


Figure 1-18. Les voies de transport de l'acide mycolique chez *Corynebacterium*.

(A) Structures chimiques et voies de transition des intermédiaires clés de l'acide corynomycolique transporté à travers la membrane interne. (B) Parcours des intermédiaires de l'acide corynomycolique de leur synthèse à leur transfert vers la membrane externe. Abréviations : *TMCM* : tréhalose de *monocorynomycolate*; *TDCM*; tréhalose de *dicorynomycolate* *AG* : Arabinogalactane; *OM* : membrane externe et *CM* : membrane cytoplasmique. Image reproduite de (Yamaryo-Botte et al., 2015) (191).

➤ Synthèse du tréhalose de *monocorynomycolate* (*TMCM*)

Le *TMCM* chez *Corynebacterium glutamicum* (*Cgl*), l'équivalent du *TMM* chez *Mtb*, est synthétisé au niveau du cytoplasme de *Cgl*. Sa biosynthèse est initiée par des séries d'élongations via la *FAS-I* exclusivement, générant ainsi des chaînes C22-C36 d'acides gras (*FAS-I* et *II* chez *Mtb*) (176, 194). Ces acides gras seront convertis ensuite en acides corynomycoliques sous l'action de la synthase de polycétide, *Pks13* à l'interface membranaire interne. Ensuite, le tréhalose sera transféré par une *transférase de mycolyl* encore inconnue pour former le *céto-TMCM*. Par la suite, le groupe céto sera réduit par *CmrA* pour produire le *TMCM*. Une étape additionnelle d'acétylation de ce dernier par la protéine membranaire intégrale *TmaT* (*TMCM acétyltransférase de mycolyl*) permettra de former l'*AcTMCM* (figure 1-18) (191).

➤ *Transport membranaire du TCM*

En se référant aux études de Yamaryo-Botte et ses collègues (191), le transport du *TCM* à travers la membrane cytoplasmique du *Corynebacterium* implique la combinaison de l'activité des deux transporteurs (CmpL1, NCgl2769) et (CmpL4, NCgl0228) (les deux orthologues de MmpL3 de *Mtb*) (46, 195). Ce cas de figure est donc différent de l'exclusivité de MmpL3 chez *Mtb* pour le transport du *TMM*. Leurs études ont également démontré l'indispensabilité de l'acétylation du *TCM* par la *TmaT* en *AcTCM* pour faciliter son exportation. En effet, ils suggèrent que les transporteurs CmpL1 et CmpL4 vont reconnaître l'AM sous une forme acétylée *AcTCM* plus compacte, ce qui va faciliter son transport membranaire (196). Une fois rendu au niveau de l'espace périplasmique, il sera dépourvu de son groupement acétyle (par une enzyme inconnue) et pris en charge par de potentielles chaperonnes puis les *mycolyltransférases CMTs* (équivalent du complexe Ag85 *Mtb*) (197), afin de lier les chaînes mycolates à l'arabinogalactane ou de les transacyler à une deuxième molécule de *TCM* pour générer le glycolipide tréhalose de **dicorynomycolate (TDCM)** de la membrane externe. Enfin, le tréhalose libéré dans le périplasme sera recyclé par le complexe *LpqY-SucABC* (198) (figure 1-18).

1.4.6 Utilité de l'inhibition des acides mycoliques chez la mycobactérie

i. Intérêt du ciblage d'inhibiteurs de la synthèse et du transport des AMs chez les espèces TB et NTB

Les espèces CMT et MNT présentent des similitudes du point de vue abondance et pertinence de leurs **acides mycoliques (AMs)** : des éléments clés pour leurs voies de biosynthèse et de protection *via* l'imperméabilisation de leur membrane externe (152, 199, 200). D'autre part, il a été démontré que toutes les mycobactéries présentent le même type de transporteur transmembranaire des AMs à travers leur membrane cytoplasmique, à savoir des transporteurs de type MmpL3 (186). Ces points de similitude chez les mycobactéries rendent utile l'adoption d'une stratégie commune de criblage d'inhibiteurs de la biosynthèse des AMs. Bien que des antibiotiques ciblant cet aspect de la physiologie des mycobactéries aient déjà prouvé leur efficacité clinique (figure 1-19), la complexité et la longueur du traitement (entre 6 et 18 mois) ainsi que l'émergence des souches multirésistantes a compliqué la tâche, ce qui dénote l'urgence de mettre en place de nouvelles stratégies.

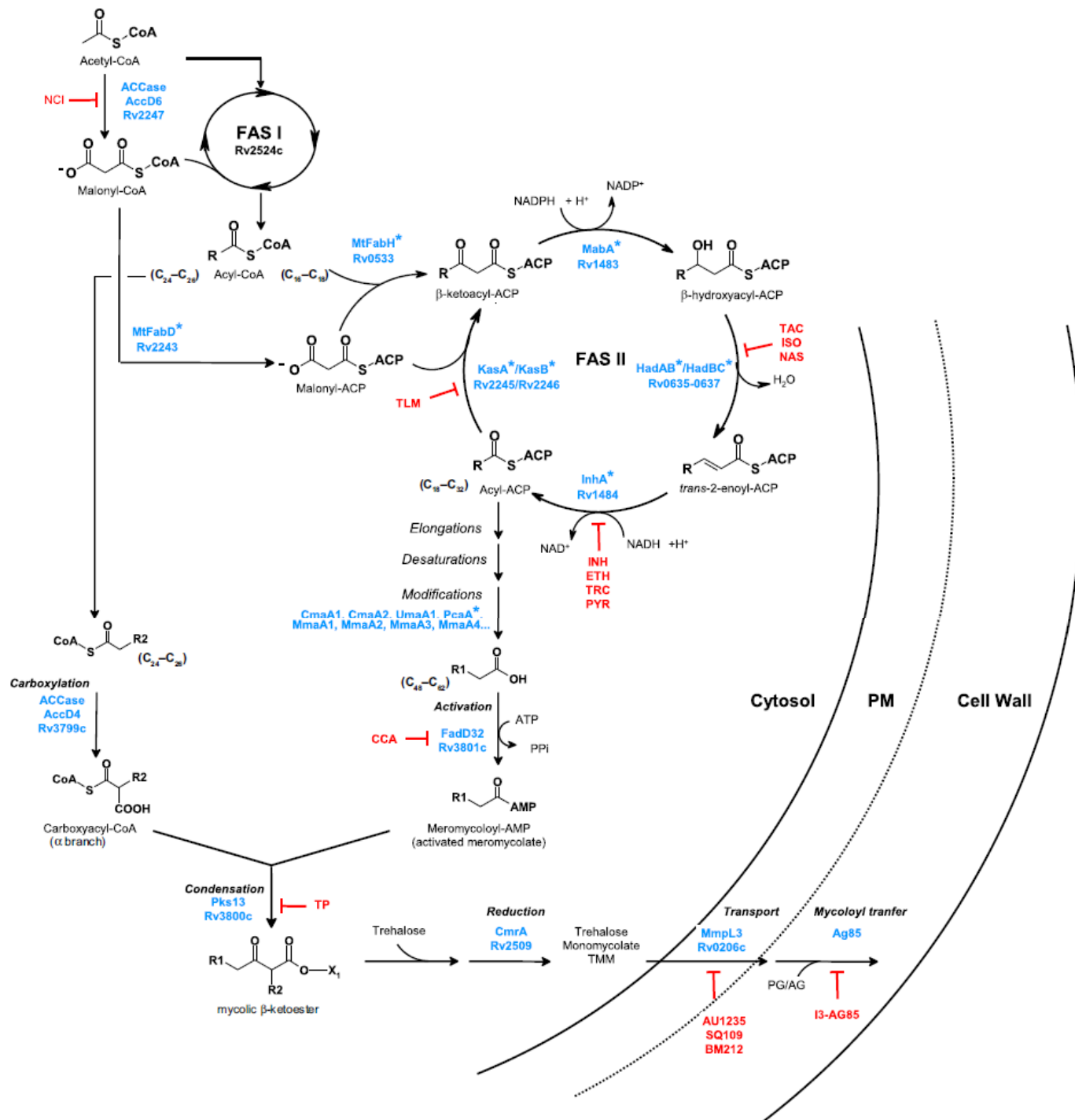


Figure 1-19. Biosynthèse, inhibition et régulation des acides mycoliques mycobactériens.

Abréviations : NCI-172033 (NCI); Thiolactomycine (TLM); Thiacétazone (TAC); Isoxyl (ISO); Isoniazide (INH); Éthionamide (ETH); Pyridomycine (PYR); NAS-21/NAS-94 (NAS); Triclosan (TRC); 4,6-diaryl-5,7-diméthyl coumarine 34 (CCA34) et Thiophène (TP).

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse et leurs gènes sont marqués en bleu clair. Les inhibiteurs connus sont écrits en rouge et placés près de leurs cibles. Image reproduite de (Marrakchi et al., 2014) (132).

En ce sens, la découverte depuis 2012 de plus de 10 séries de nouveaux inhibiteurs ciblant l'exportation des acides mycoliques médiée par le transporteur MmpL3 a représenté une approche particulièrement prometteuse. Ajoutons à ceci, les résultats de nos récents travaux de recherche réalisés en collaboration, présentés dans le troisième chapitre, qui ont pu mettre en évidence l'efficacité de certains inhibiteurs ciblant MmpL3 *Mtb* pour l'inhibition de certains pathogènes MNT (201), des résultats prometteurs pour la génération d'une thérapie anti-*MDR* standardisée contre les pathogènes mycobactériens.

1.5 Problématique de la résistance aux antibiotiques

1.5.1 Développement des antibiotiques antituberculeux

i. Évolution de la génération des antibiotiques antituberculeux

La découverte des antibiotiques visant la tuberculose (TB) date de 78 ans. En effet, la découverte de la première substance antituberculeuse, l'*actinomycine*, a été réalisée en 1940 (202) par le microbiologiste américain «Selman Waksman» et a été suivie par celle de la *streptothricine* en 1943 (203). Une année s'est écoulée pour qu'il trouve la *streptomycine*: le premier antibiotique à toxicité réduite pouvant être validé pour une thérapie humaine efficace contre la tuberculose (114, 204). Suite à ces découvertes, le professeur Waksman a reçu le prix Nobel en physiologie et médecine en 1952 (203). Certes, il s'agissait d'un traitement d'une grande efficacité, mais la douleur associée à l'injection de la streptomycine a exigé de nouvelles investigations vers des antibiotiques plus efficaces.

Au fil des années, l'orientation de ces efforts a permis de concevoir de nouveaux médicaments anti-TB. Afin de parvenir à cet objectif, différentes cibles ont été étudiées dans le but d'attaquer *Mtb* à l'état actif ou dormant. Ainsi, tout élément (ex. enzyme, récepteur, transporteur, protéine, etc..) impliqué dans la réplication ou la persistance du pathogène représente encore une alternative viable pour optimiser la thérapie anti-TB. Nous pouvons mentionner l'isoniazide (INH), découvert par le Dr H. Herbert Fox en 1952 (205), qui fut un agent antituberculeux utilisé avec un grand succès pour la thérapie anti-TB. Toutefois, la détermination de son mode d'action n'a pu être réalisée qu'après quelques années de recherches.

Ces études ont prouvé que l'INH cible l'*inhA*, une enzyme clé pour la synthèse des acides gras et des acides mycoliques (206). L'INH reste un pilier pour le traitement de la tuberculose jusqu'à nos jours malgré le taux de résistance enregistré: environ 4% des souches de *Mtb* chez les patients encore jamais traités sont résistantes à l'INH; ce taux peut atteindre plus de 20% chez les patients qui ont déjà reçu un traitement anti-TB. Ainsi, la durée du traitement standard actuel disponible (> 6 mois) et la résistance aux antibiotiques anti-TB démontrent la nécessité d'optimiser la thérapie antibiotique actuelle.

ii. Les médicaments antituberculeux fabriqués

Il existe deux types d'agents antituberculeux : soit les médicaments de première ligne ou ceux de seconde ligne. Les premiers ciblent plus efficacement la TB active et sont en général associés avec moins d'effets secondaires que les antibiotiques de deuxième ligne. Mais certains cas n'ont pas l'effet antituberculeux escompté et l'on doit alors réorienter le traitement thérapeutique vers la deuxième catégorie des médicaments, ceux de deuxième ligne.

➤ *Les médicaments antituberculeux de première ligne*



Figure 1-20. Représentation schématique des médicaments anti-TB de première ligne et de leurs dates de découverte.

Informations extraites de (Islam et al., 2017) (207).

Les antibiotiques de 1^{re} ligne figurent dans la liste des médicaments de la thérapie anti-TB standard. Ils possèdent une grande efficacité mais présentent un fort potentiel de génération d'effets secondaires indésirables. Parmi ces antibiotiques, nous pouvons citer: l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol (figure 1-20) dont leurs mécanismes de résistance sont détaillés dans l'étude de (Islam et al., 2017) (207).

➤ *Les médicaments antituberculeux de seconde ligne*

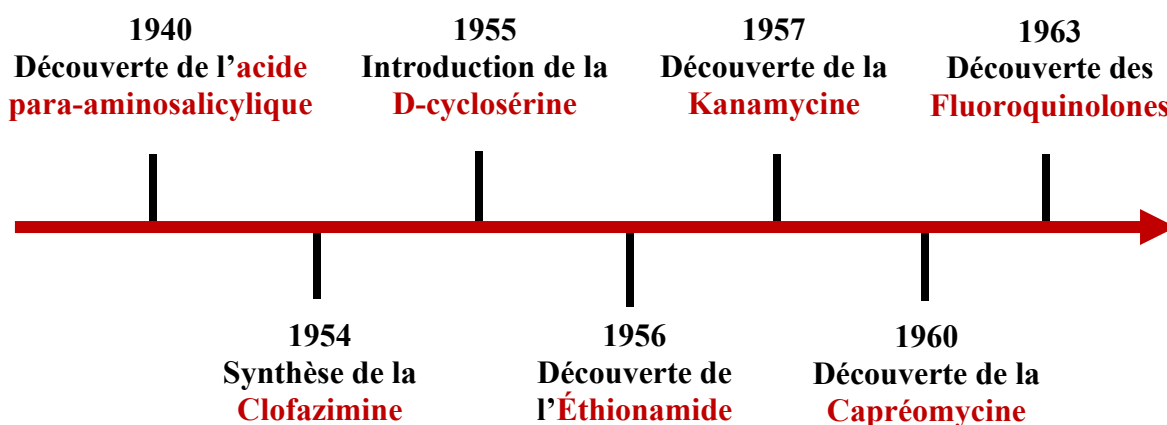


Figure 1-21. Représentation schématique des médicaments anti-tuberculose de seconde ligne et de leurs dates de découverte.

Informations extraites de (Islam et al., 2017) (207).

Il s'agit du second plan de traitement de la tuberculose se substituant au 1^{er} traitement qui serait inefficace ou imposant des effets secondaires intolérables au patient durant la thérapie standard initiale. La seconde ligne de traitement peut aussi présenter plus ou moins d'effets secondaires. Dans cette liste, nous retrouvons la kanamycine, l'éthionamide et la capréomycine pour n'en nommer que quelques-uns (figure 1-21). Une liste plus exhaustive se retrouve dans l'étude de (Islam et al., 2017) (207) où sont aussi présentés leurs modes d'action. Il est évident que l'ensemble des médicaments antituberculeux a bien contribué à l'atténuation de la morbidité de la TB. Effectivement, les statistiques de l'OMS en 2017 témoignent de ce progrès (86). En revanche, l'apparition des souches *MDR-TB* continue à compliquer la tâche d'éradication de la TB et amplifie la menace sur la santé mondiale.

1.5.2 La résistance aux antibiotiques : la *MDR* (*Multidrug Resistance*)

i. Introduction générale des souches MDR

Il existe de nos jours, des souches présentant des résistances croissantes aux traitements et ces dernières sont reconnues comme des organismes multi-résistants aux médicaments ou *MDR* (*multidrug-resistant*) (4, 208). Plusieurs mécanismes peuvent conduire à la résistance à un ou plusieurs antibiotiques simultanément (209, 210). Ceci justifie la préoccupation mondiale en raison de l'absence de nouvelles classes de médicaments et l'émergence des souches *MDR* à une vitesse alarmante. Pour tenter de contrer ce problème, une multitude de recherches s'est orientée vers le décryptage des facteurs de causalité de cette multi-résistance responsable de la mort de milliers de personnes.

Comme premières études, la cause de la résistance a été attribuée à la nature complexe de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif. Effectivement, ces souches possèdent des enveloppes externes imperméables aux molécules hydrophobes (130, 211) formant ainsi un obstacle additionnel pour la majorité des antibiotiques courants. Par la suite, des recherches plus avancées ont pu mettre en évidence l'existence des systèmes à efflux (212) qui se ramifient en six principales superfamilles à savoir; les protéines de type *ATP-binding cassette superfamily* (*ABC*), *major facilitator superfamily* (*MFS*), *small multidrug resistance family* (*SMR*), *multidrug and toxic compound extrusion family* (*MATE*), *proteobacterial antimicrobial compound extrusion family* (*PACE*) et *Resistance-Nodulation-Division superfamily* (*RND*) (213-215) (216) (217) (218, 219) (figure 1-22).

Ces transporteurs représentent les protéines clés impliquées dans l'éjection des antibiotiques et des agents thérapeutiques vers l'extérieur de la cellule. Leur mécanisme de transport est actif, dépendant de l'ATP (chez les transporteurs *ABC*), ou alimenté par un gradient protonique (pour les *MFS*, *SMR* et *RND*) ou à la fois ionique et protonique transmembranaire (ex. le sodium pour la pompe *MATE*) (220). Les transporteurs *ABC* sont des pompes à efflux, majoritairement chez les cellules mammifères (213, 214, 221, 222) mais peu répandues chez les bactéries (223, 224). Quant à la famille des *MFSs*, elle contient des protéines *MDR* qui sont amplement caractérisées chez les cellules bactériennes (216, 217).

Milieu extracellulaire

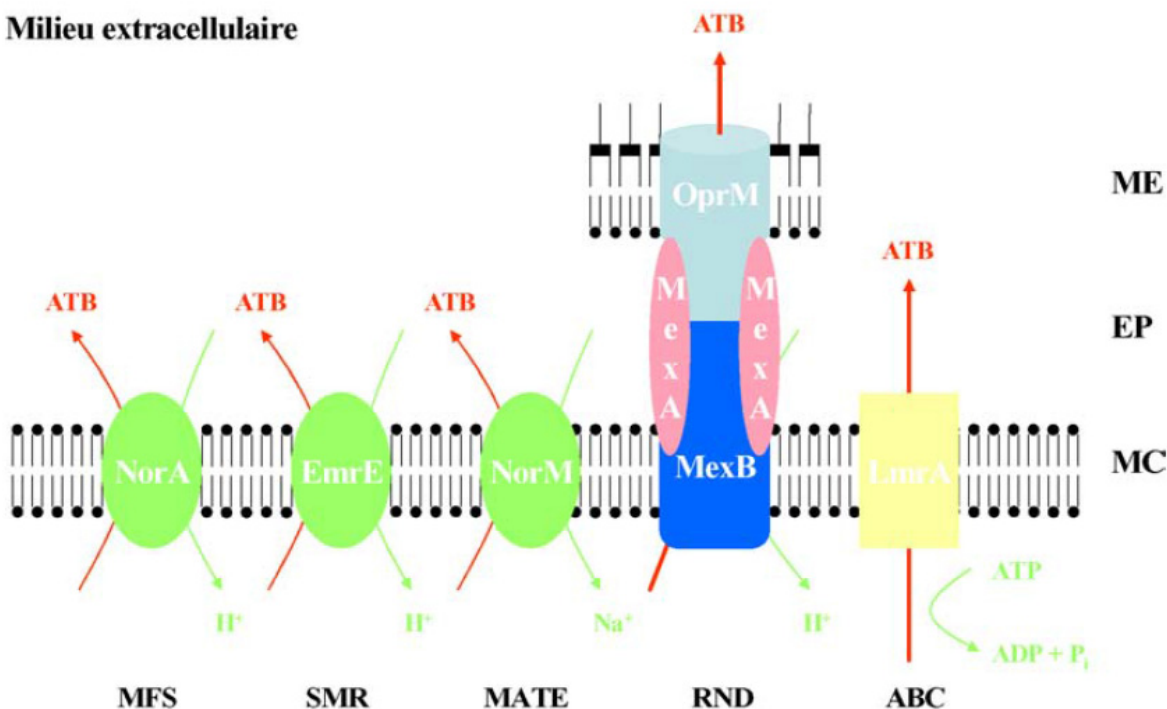


Figure 1-22. Représentation schématique des cinq familles des pompes à efflux.

MFS ou *major facilitator superfamily* (ex. *NorA* chez *Staphylococcus aureus*) ; *SMR* ou *small multidrug resistance* (ex. *EmrE* chez *Escherichia coli*) ; *MATE* ou *multidrug and toxic compound extrusion* (ex. *NorM* chez *Vibrio parahaemolyticus*) ; *RND* ou *resistance-nodulation cell division* (ex. *MexB* chez *Pseudomonas aeruginosa*) avec *MexA* (*membrane fusion protein*) et *OprM* (*outer membrane factor*) ; *ABC* ou *ATP-binding cassette* (ex. *LmrA* chez *Lactococcus lactis*). Abréviations : *ME* et *EP* : *membrane externe* et *espace périplasmique* des bactéries à Gram négatif ; *MC* : *membrane cytoplasmique* et *ATB* : *substrat antibiotique*.

Image reproduite de (Cattoir, 2004) (220).

Chez les bactéries à Gram positif, les pompes appartiennent principalement aux familles des *MFS*, *SMR* et *MATE*, alors que chez les bactéries à Gram négatif, la famille des protéines *RND* est le groupe dominant (225). Le caractère de résistance que confèrent ces *RNDs* par leur action de «*multi-drug efflux*» en fait d'elles une des cibles principales des études visant la conception de nouveaux médicaments (226, 227).

Les pompes *RND* fonctionnent souvent, chez les bactéries à Gram négatif, en complexe avec d'autres protéines pour faciliter le transport à travers la membrane. De ce fait, pour qu'une protéine *RND* fonctionne, il lui faudra une protéine périplasmique *MFP* (*Membrane Fusion Protein*) pour joindre les membranes ensemble et une porine de la membrane extérieure pour expulser le médicament. Ainsi, le complexe tertiaire «*RND-Outer membrane channel-MFP* » sera la forme d'un transporteur *MDR* fonctionnel (228) (229).

Récemment, des efforts se sont focalisés sur le combat de la résistance aux antibiotiques chez les souches à Gram positif, dont la famille des transporteurs *RND* chez les *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* (*CMN*) (46). Cependant, ces derniers semblent être impliqués davantage dans la biosynthèse de l'enveloppe bactérienne que dans l'export des médicaments à l'extérieur de la cellule (46, 189).

ii. *Émergence de la MDR-Tuberculose (MDR-TB)*

Les recherches progressent chez les deux types des *MDRs* provenant des bactéries à Gram positif et négatif. Étant donné l'ampleur de la menace pour la santé publique, les bactéries à Gram négatif, vu leurs pompes à efflux de médicaments (ex. AcrB-TolC et MexAB-OprM), restent toujours les cibles prépondérantes de ces recherches. En revanche, l'augmentation du nombre des nouveaux cas de résistance aux antibiotiques liés à des bacilles acido-alcooloresistants (**BAAR**) et de leurs taux de mortalité menaçants, a récemment orienté davantage l'attention des organismes de santé publique vers la lutte à la résistance aux médicaments chez ces *MDRs*.

Dans le contexte de la présente étude, nous évoquons l'exemple de *Mycobacterium tuberculosis* appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae*. Ce dernier, mise à part son enveloppe mycolique externe servant de première ligne de défense contre les antibiotiques, a pu développer une résistance impressionnante pour les traitements anti-TB. Ce qui n'a fait qu'augmenter l'inquiétude de l'organisation mondiale de la santé (**OMS**) d'où sa déclaration: « *La pharmacorésistance aux médicaments antituberculeux est un problème majeur de santé publique qui compromet les succès remportés en matière de lutte contre la tuberculose.* » (230, 231). Sur ces entrefaites, l'apparition de ces nouvelles souches multirésistantes aux antibiotiques anti-TB, désignées par les *MDRs-TB*, présente une des principales préoccupations de l'OMS. En effet, la lutte contre ces pathogènes s'affiche parmi ses principaux objectifs publiés dans son rapport annuel (86).

Cette problématique de résistance est aussi connue sous le nom d'antibiorésistance. Chez *Mtb*, l'antibiorésistance se subdivise en deux types: la *MDR-TB* (*Multi-drug Resistant Tuberculosis*) et la *XDR-TB* (*Extensively drug-resistant Tuberculosis*) (231). La *MDR-TB* se définit par la résistance de *Mtb* aux deux plus puissants antibiotiques anti-TB : l'isoniazide et la rifampicine (232, 233). Quant à la *XDR-TB*, elle indique une ultra-résistance à un ensemble d'antibiotiques, à savoir: l'isoniazide, la rifampicine, la fluoroquinolone ainsi que certains médicaments de deuxième ligne comme la capréomycine, la kanamycine ou l'amikacine (233, 234). Selon les statistiques du rapport annuel de l'OMS en 2017, un nombre estimé de 600 000 de cas d'incidence de la *MDR/RR-TB* (**RR**: *rifampicin resistance*) a été rapporté dont 82% du total concernent la *MDR-TB* (figure 1-23).

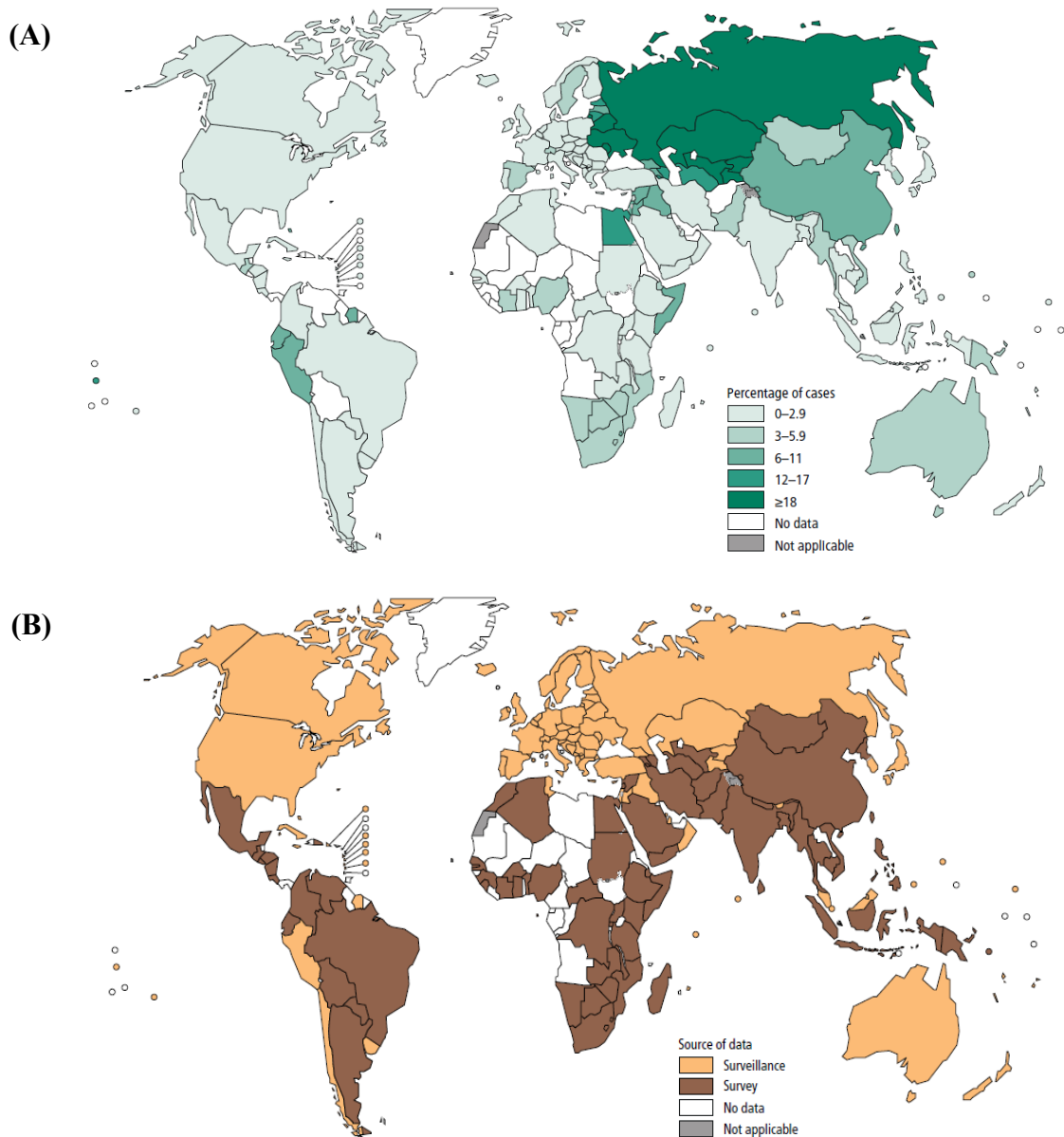


Figure 1-23. Vue globale des souches résistantes aux antibiotiques anti-TB, 2016.

(A) Pourcentage des nouveaux cas de tuberculose avec la résistance aux antibiotiques (*MDR/RR-TB*). *TB* pour *tuberculosis*; *MDR-TB* pour *multidrug resistance TB*; *RR-TB* pour *rifampicin-resistant TB*. **(B)** Les sources d'informations disponibles pour l'estimation de la résistance aux antibiotiques antituberculeux (ces données concernent uniquement les nouveaux cas de tuberculose). Image reproduite de (OMS, 2017) (86).

iii. Incidence mondiale de la MDR-Tuberculose

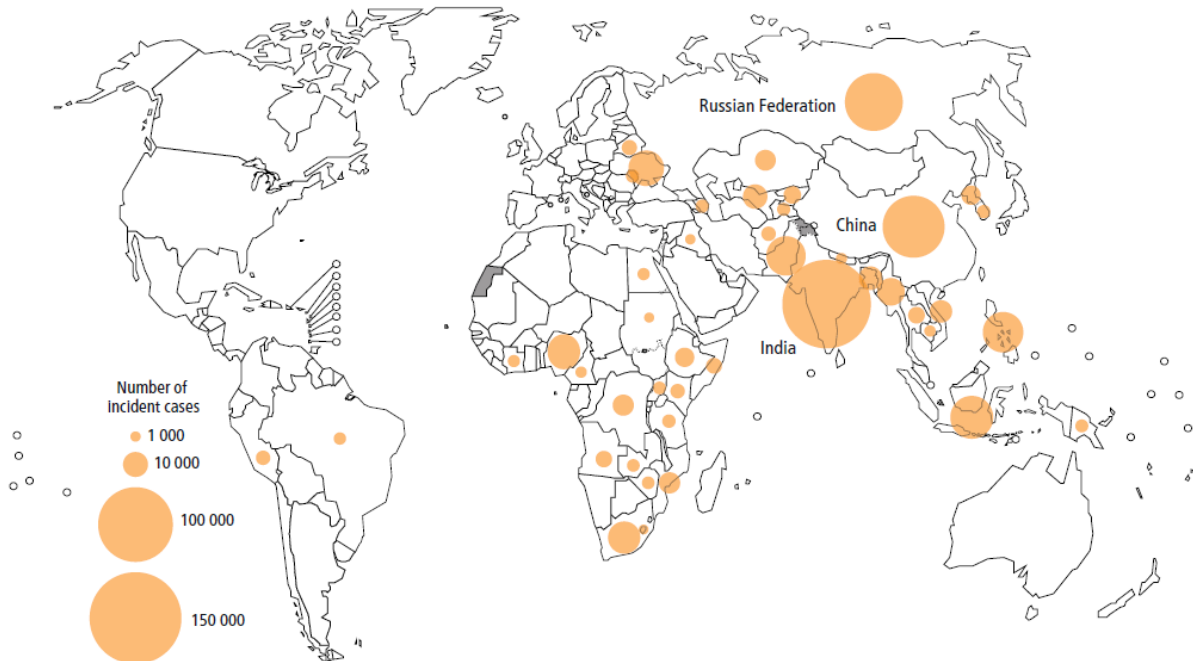


Figure 1-24. Estimation de l'incidence des MDR/RR-TB en 2016, pour les pays rapportant un minimum de 1000 cas d'incidence.

MDR/RR-TB pour (Multi-drug Resistant/Rifampicin Resistance-Tuberculosis).

Image reproduite de (OMS, 2017) (86).

Selon la répartition sur la carte illustrée par la figure (1-24), l'OMS (86) estime que le plus grand nombre de cas de MDR/RR-TB (47% du total global) est observé en Chine, en Russie et en Inde avec ce dernier pays au sommet du podium avec 150 000 cas d'incidence. Ce qui est le plus inquiétant dans ces statistiques est qu'en 2016, environ 240 000 \pm 100 000 des cas de décès sont causés par la MDR/RR-TB malgré les progrès réalisés dans la thérapie anti-TB. Rajoutons à ces données, le nombre menaçant de 350 000 \pm 20 000 cas de MDR/RR-TB enregistrés parmi des patients souffrant de la tuberculose rien que pour l'année 2016 (86). Là encore, ces chiffres découlent d'une estimation indirecte des cas d'incidence de la tuberculose à travers le monde et ne peuvent en aucun cas refléter l'impact réel de cette infection.

En conclusion, l'alarme a sonné pour investir davantage dans le domaine du développement de nouveaux antibiotiques pour les *MDRs/XDRs-TB* en particulier et pour les *MDRs* de manière générale. Afin de remédier à cette menace pour la santé publique mondiale (Figure 1-24), des efforts de génération de nouvelles stratégies d'affrontement des *MDRs/XDRs-TB* ont été consentis (86).

iv. Stratégies de lutte contre la MDR-TB

«La Stratégie mondiale pour mettre fin à la tuberculose vise à mettre un terme à l'épidémie mondiale de tuberculose en réduisant le nombre de décès de 95% et l'incidence de 90% entre 2015 et 2035 et en faisant en sorte que plus aucune famille ne supporte de coûts catastrophiques liés à la tuberculose. Elle a été adoptée par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2014». Organisation mondiale de la santé (OMS) (230) (235).

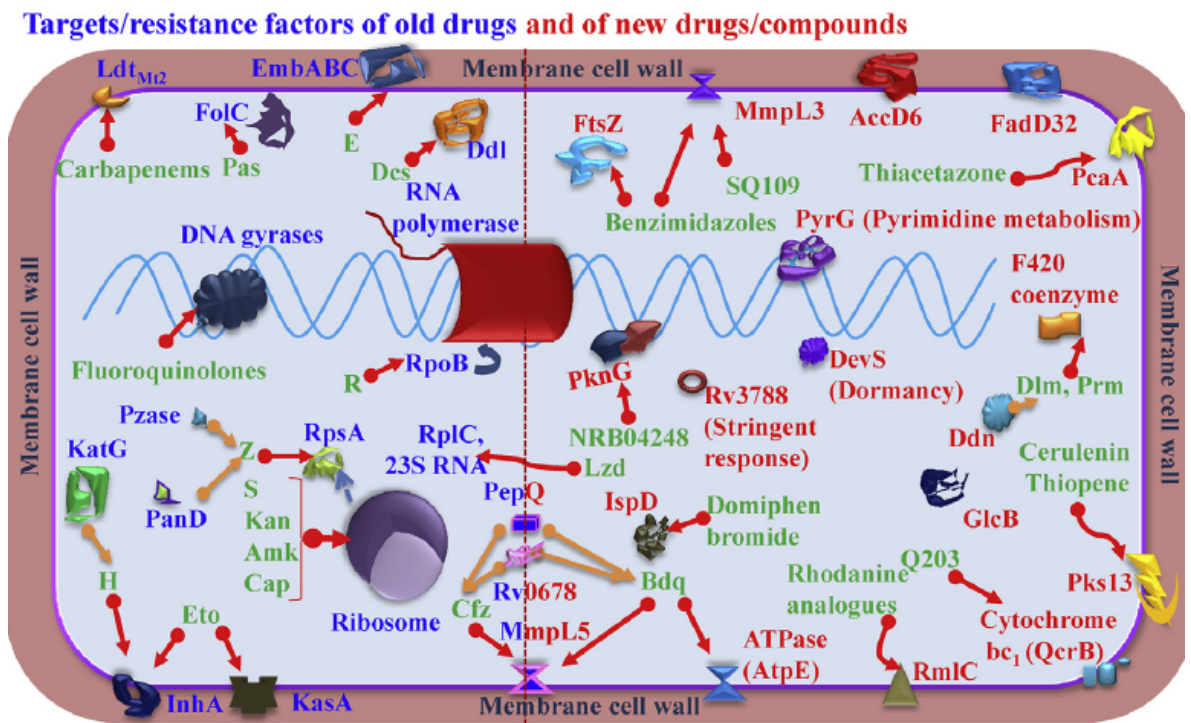


Figure 1-25. Schématisation des anciennes et nouvelles cibles (indiquées en bleu et en rouge respectivement) de la thérapie anti-TB.
Image reproduite de (Islam et al., 2017) (207).

Dans le même contexte politique mondial adopté par l’OMS, de nouvelles études se sont penchées sur la mise en œuvre d’autres stratégies anti-TB et particulièrement anti-*MDR/XDR-TB*. De ce fait, de récentes recherches ont fixé comme objectifs la simplification et l’optimisation des traitements préexistants ainsi que la réduction de leurs durée et toxicité. D’autres se sont focalisées sur la découverte et le développement de nouveaux médicaments anti-TB par exploitation de nouvelles voies d’inhibition et de nouvelles cibles (Figure 1-25). Par conséquent, des protéines impliquées dans la biosynthèse de l’acide mycolique ou la conception de l’architecture de l’enveloppe mycobactérienne (ex. Pks13, PcaA, FadD32 et AccD6) ainsi que des transporteurs (ex. MmpL3 et MmpL5) engagés dans ces voies ont été ciblés pour la génération de nouveaux médicaments anti-TB plus compétents. En date d’aujourd’hui, quelques mécanismes moléculaires et mutations impliqués dans la *MDR-TB* ont été élucidés mais le schéma global reste incomplet (236, 237). En effet, la complexité de *Mtb* et l’hétérogénéité de son évolution compliquent la tâche (238).

1.5.3 Développement de nouveaux médicaments

i. Principe global de la génération de nouveaux médicaments

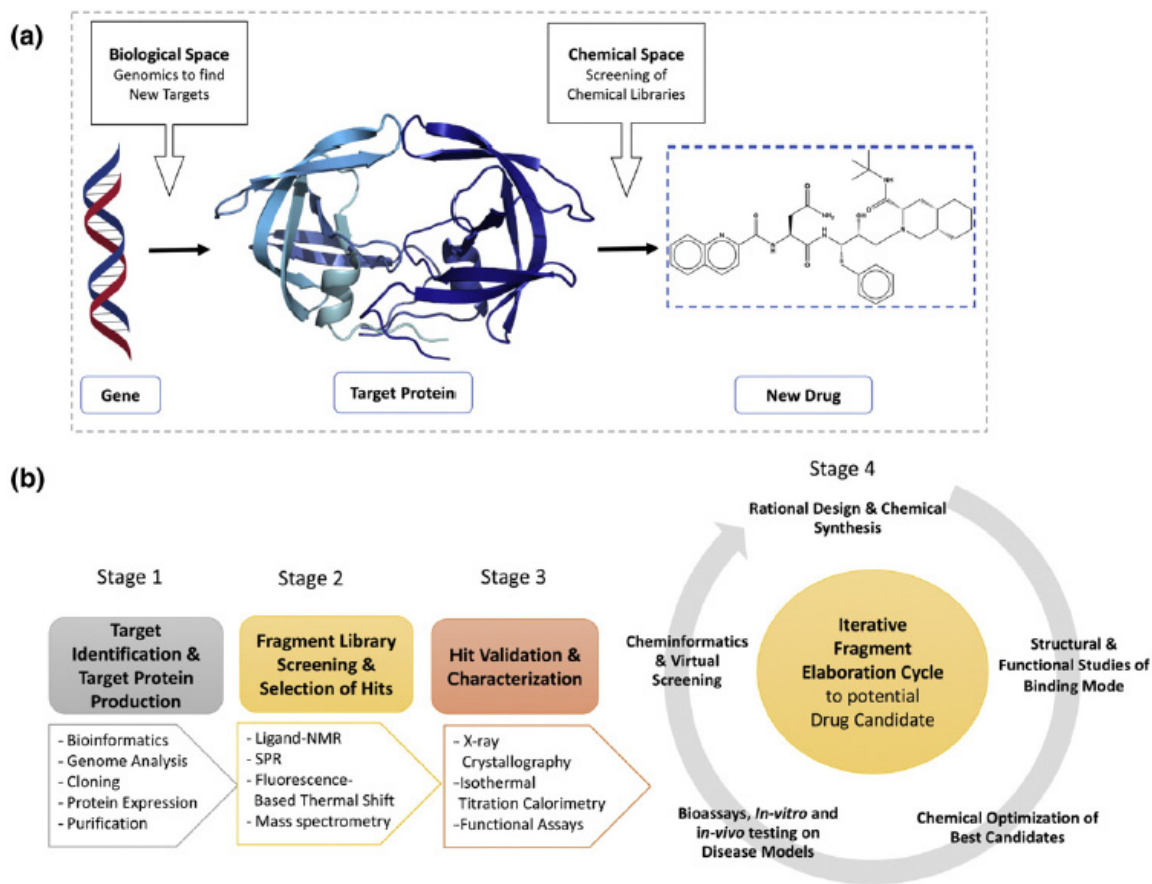


Figure 1-26. Processus général de la génération de nouveaux médicaments.
Image reproduite de (Thomas et al., 2017) (239).

La génération de nouveaux médicaments est devenue une démarche multidisciplinaire englobant différents outils biochimiques, biologiques, génétiques, structuraux et informatiques (figure 1-26). En effet, la complémentarité de ces disciplines a permis de tirer profit du progrès technologique et scientifique pour l'avancement dans le domaine médical.

ii. Progression dans le développement des médicaments antituberculeux

➤ Mise à jour des médicaments antituberculeux

Au cours des années suivant la découverte du bacille de Koch (79), le progrès illustré par la mise en place d'une stratégie de chimiothérapie et de vaccination **BCG** (*Bacillus Calmette–Guérin*) (117) visant la tuberculose a bien contribué à la réduction de cette infection. Actuellement, le traitement recommandé par l'organisation mondiale de la santé (**OMS**) contre la tuberculose est une thérapie en deux phases. Certes, cette dernière a démontré une bonne efficacité (environ 85% de succès), mais elle favorise la probabilité de réactivation de l'infection latente et le développement d'une résistance chez les souches de *Mtb* dû en partie à sa longueur (6 mois au minimum) (240). D'où l'importance de la mise à jour des médicaments antituberculeux. Ainsi, des agents anti-TB ont été récemment développés et repropasés comme la bédaquiline, le pretomanid, le delamanid et le SQ109 dont les mécanismes de résistance sont abordés dans l'étude de (Islam et al., 2017) (207).

➤ Les avancements de la démarche anti-TB

Malgré l'existence de ce traitement (*isoniazide-rifampicine-pyrazinamide-éthambutol*) efficace depuis plus d'une quarantaine d'années, la TB continue à marquer les esprits par ses taux de morbidité et mortalité ascendants et alarmants. Ainsi, depuis la prise de conscience de cette problématique, plusieurs efforts ont été entrepris par l'OMS, des avocats, des chercheurs et leurs commanditaires afin de relever le défi de générer des médicaments antimycobactériens plus efficaces. En conséquence, des composés pharmaceutiques ont été conçus et sont actuellement le sujet de développement clinique ou préclinique vers l'attestation de leur efficacité contre la TB. La figure ci-bas, extraite de la publication de Tiberi et Coll. (2018) permet d'illustrer un pipeline global menant à la génération des médicaments anti-TB (240) (figure 1-27).

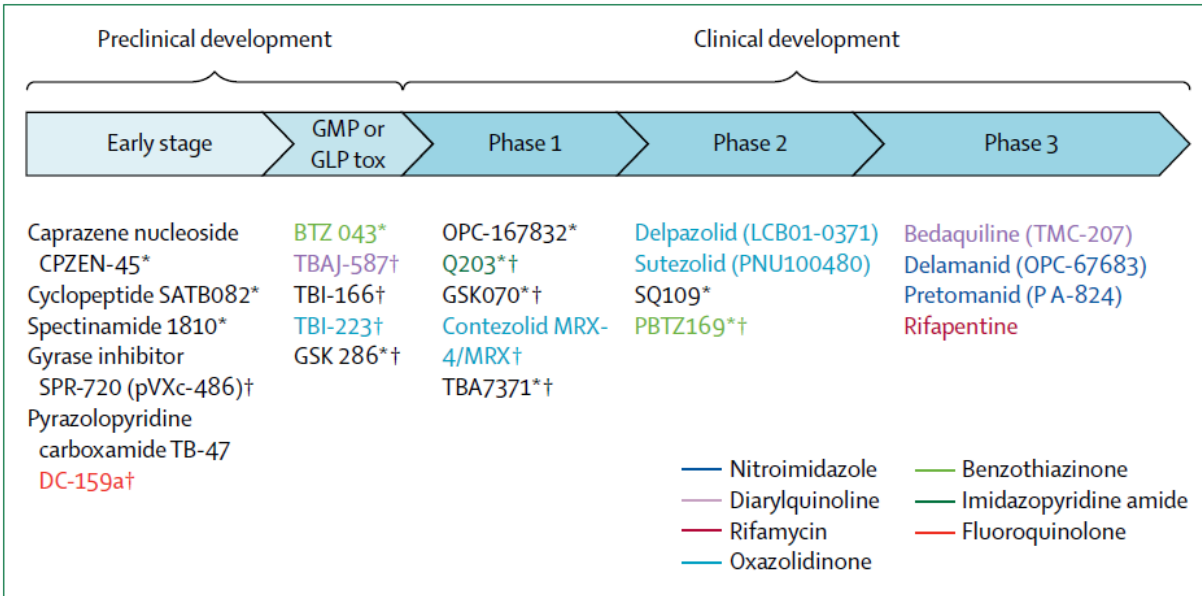


Figure 1-27. Pipeline global de génération des médicaments anti-TB.

Image reproduite de (Tiberi et al., 2018) (240) provenant originalement de *Stop TB Partnership's Working Group on New TB Drugs* (241).

1.6 Les transporteurs membranaires *RND* (*Resistance-Nodulation-Division*)

1.6.1 Introduction au transport membranaire

Le transport d'un composé à travers la membrane cytoplasmique, dans le cas d'un transport actif, implique l'intervention d'un transporteur membranaire et d'une source d'énergie. Le transporteur est une protéine membranaire qui peut être soit un canal, un transporteur membranaire ou une pompe. Nous retrouvons principalement deux types de protéines membranaires : les protéines intégrales (incrystées dans la membrane par au moins un domaine transmembranaire) et les protéines périphériques (ancrées à une protéine intégrale ou au groupe polaire d'un lipide) (242). Le transport peut être réalisé par une diffusion facilitée grâce à des canaux ioniques spécifiques ou par activation de sources énergétiques *via* des pompes. Selon la nature de la source d'énergie utilisée, on parle de transporteurs primaires (des transporteurs ABC qui hydrolysent de l'ATP comme source d'énergie) ou secondaires (grâce à la force des gradients électrochimiques) (243, 244) (245) (246, 247) (248).

Dans le cadre de la présente thèse, nous nous focalisons sur la description des transporteurs secondaires de la famille des *RND*. Notre projet de recherche va porter sur deux transporteurs transmembranaires, à savoir: **MmpL3**, membre de la famille *RND*, de la classe des *CMNs* et **TriABC**, membre de la même famille *RND* mais de type pompe à efflux du médicament (*multi-drug efflux pump*). L'activité de l'ensemble de ces transporteurs repose sur un transport actif via l'activation d'un gradient de protons.

1.6.2 Vue d'ensemble des transporteurs *RND*

Les transporteurs *RND* existent chez les archées, les bactéries et les eucaryotes (249). Ils se ramifient en dix différentes familles. Les premières trois familles phylogénitiques (famille 1, 2 et 3) sont majoritairement restreintes aux bactéries à Gram négatif. Parmi ces *RNDs*, citons les pompes *HME* (*heavy metal efflux*) de la première famille qui sont spécialisées dans l'exportation des métaux lourds. Spécifions également le rôle des membres de la deuxième et troisième famille dans la catalyse de l'export d'une multitude de médicaments et de lipooligosaccharides, respectivement. En ce qui concerne la quatrième famille, elle est représentée par les protéines *SecDF* impliquées dans la sécrétion des protéines. Ces dernières sont présentes chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que chez les archées. Quant à la cinquième famille, elle représente les pompes *HAE-1* (*hydrophobe/amphiphile efflux*) présentes exclusivement chez les bactéries à Gram positif. La sixième famille, très diverse, comporte des protéines eucaryotiques dont certaines interviennent dans le transport des lipides, du cholestérol ainsi que des hormones stéroïdiennes comme les transporteurs des stérols eucaryotes (*eukaryotic sterol transporter: EST*). Citons aussi à titre d'exemple la protéine Niemann-Pick C1, un exportateur de cholestérol et de lipides à partir des lysosomes, qui est responsable de la maladie NPC (250). Nous retrouvons aussi les protéines d'*archaeal plus spirochete* présentant la septième famille (218). Une huitième famille récemment identifiée semble être impliquée dans l'export des pigments chez les bactéries à Gram négatif (251). La neuvième famille, elle, est représentée par les protéines impliquées dans le développement de la signalisation chez les hérissons par exportation de la portion amine terminale (249). Nous terminons avec la dixième famille qui n'a pas encore été caractérisée et provient des actinobactéries (249, 252, 253).

Les transporteurs *RND* présentent une topologie similaire consistant en douze hélices transmembranaires (TM), deux extrémités C et N-terminales cytoplasmiques et un large domaine périplasmique formé par une paire de boucles spécifiques au substrat se situant entre les hélices TM 1-2 et TM 7-8 et (218, 254, 255). Le domaine périplasmique se subdivise à son tour en sous-domaines PC/PN du pore (*P*: *Porter domain*) et en sous-domaines DC/DN du domaine d'arrimage (*D*: *Docking domain*) des extrémités C et N-terminales respectivement (figure 1-28).

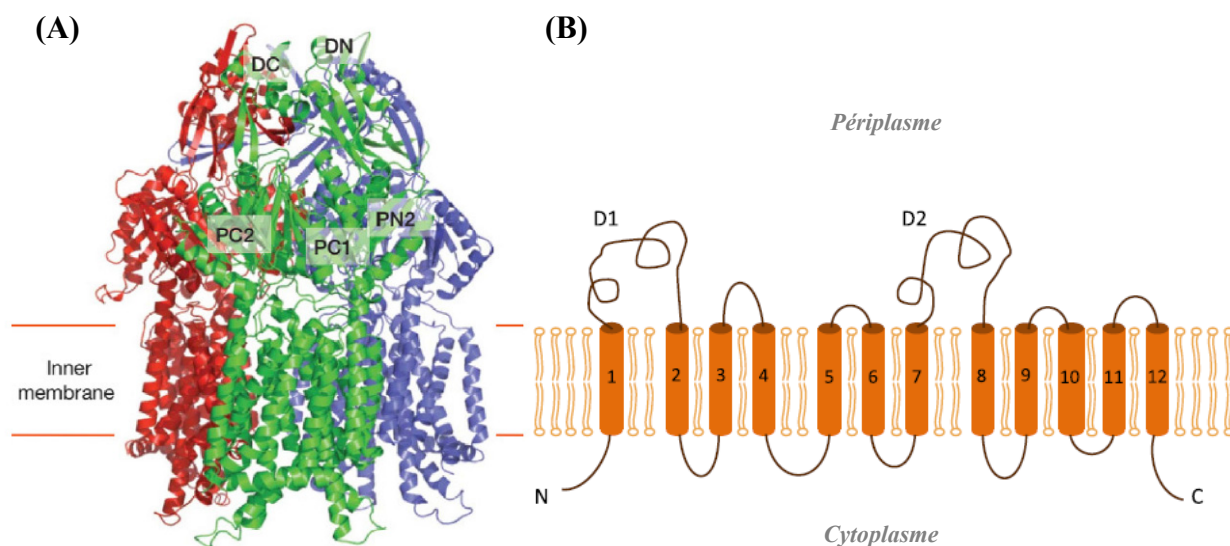


Figure 1-28. Structure et topologie d'un transporteur de la famille *RND*.

*Abréviations : DC/DN: sous-domaines du domaine pore côté C et N terminal respectivement; PC/PN: sont des sous-domaines du domaine d'arrimage côté C et N terminal respectivement; D1 et D2 : les boucles périplasmiques; N : N-terminal et C : C-terminal. (A) Exemple d'une structure tridimensionnelle d'un transporteur *RND* : structure cristallographique du CusA (appartenant à la famille *HME*). Image reproduite de (Long et al., 2010) (256). (B) Topologie de la famille des *RND*. Image reproduite de (Szekely et Cole, 2016) (257).*

Ces pompes sont souvent fonctionnelles sous forme d'homotrimères capables de transporter différents types de substrats *via* un mécanisme d'antiport où les contre ions sont des protons. Le transport de ces derniers s'effectue à travers les domaines transmembranaires de la pompe. Quant aux sites de liaison du substrat à exporter, ils se localisent au niveau des boucles périplasmiques du transporteur *RND* (249, 258). Chez les bactéries à Gram négatif, ces transporteurs sont majoritairement des pompes à efflux de plusieurs médicaments, appartenant à la famille des *HAE-1* (218, 259, 260). Ainsi, leur implication dans ce type d'export contribue à la résistance des bactéries aux médicaments.

1.6.3 Les pompes à efflux *RND*

Ces protéines fonctionnent souvent, chez les bactéries à Gram négatif, en complexe avec d'autres protéines pour faciliter le transport à travers la membrane (261). De ce fait, pour qu'une protéine *RND* fonctionne, il lui faut: une protéine périplasmique *MFP* (*Membrane Fusion Protein*) pour traverser le périplasma, et un canal membranaire pour expulser le substrat. Ainsi, le complexe tertiaire «*RND-Outer membrane channel-MFP* » prendra la forme d'un complexe *MDR* fonctionnel (228) (229). Plusieurs recherches ont été consacrées aux transporteurs *RND* procaryotiques et les mieux caractérisés sont la *AcrB* d'*E. coli* et la *MexB* de *Pseudomonas aeruginosa* (188) (262). Ces études ont permis de mettre en lumière leurs structures et modes d'actions mais bien d'autres recherches seront nécessaires pour approfondir les autres transporteurs *RND*.

i. La pompe RND : AcrB

Parmi les complexes les mieux caractérisés actuellement, nous citons le complexe de la pompe à efflux *AcrAB-TolC* d'*E. coli* (*Escherichia coli*). Cette bactérie est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour et les connaissances des dernières décennies ont vu le nombre d'études expérimentales et computationnelles visant le complexe *AcrAB-TolC* s'amplifier. La majorité de ces travaux se sont penchés particulièrement à l'étude structurale et fonctionnelle du transporteur *AcrB*. En effet, ce transporteur représente l'entité active qui permet la liaison sélective des substrats et de transduction énergétique nécessaire à l'expulsion (254, 263). Des recherches ont montré qu'*AcrB* est capable de déplacer un large éventail de substrats incluant des solvants (264), des colorants, des détergents et des antibiotiques lipophiliques (265, 266). Pour ce faire, la présence de deux sites à liaison des substrats au niveau d'*AcrB* renfermant à leurs tours une multitude de zones à affinités variées permettant la reconnaissance des substrats contribue à cette grande diversité (267).

Depuis peu, des études se sont concentrées sur la structure et les interactions dynamiques entre le transporteur AcrB, ses substrats et ses inhibiteurs (263, 268-272). D'autre part, des recherches se sont intéressées à la caractérisation du mode d'interactions du transporteur AcrB avec AcrA et TolC. Au fil des études, plusieurs aspects de la structure, de l'état d'oligomérisation et du mécanisme de transport de l'AcrAB-TolC à l'échelle moléculaire ont continué d'être révélés. Celles-ci ont généré des structures tridimensionnelles des éléments du complexe (AcrA, AcrB et TolC) (263, 268, 269, 271, 273-283). Pour illustrer ces avancées, nous présentons deux structures publiées récemment pour le transporteur AcrB (figure 1-29) et le complexe AcrAB-TolC-AcrZ (figure 1-30). Nous aborderons ensuite brièvement le mécanisme d'expulsion du substrat par la pompe AcrAB-TolC (figure 1-31).

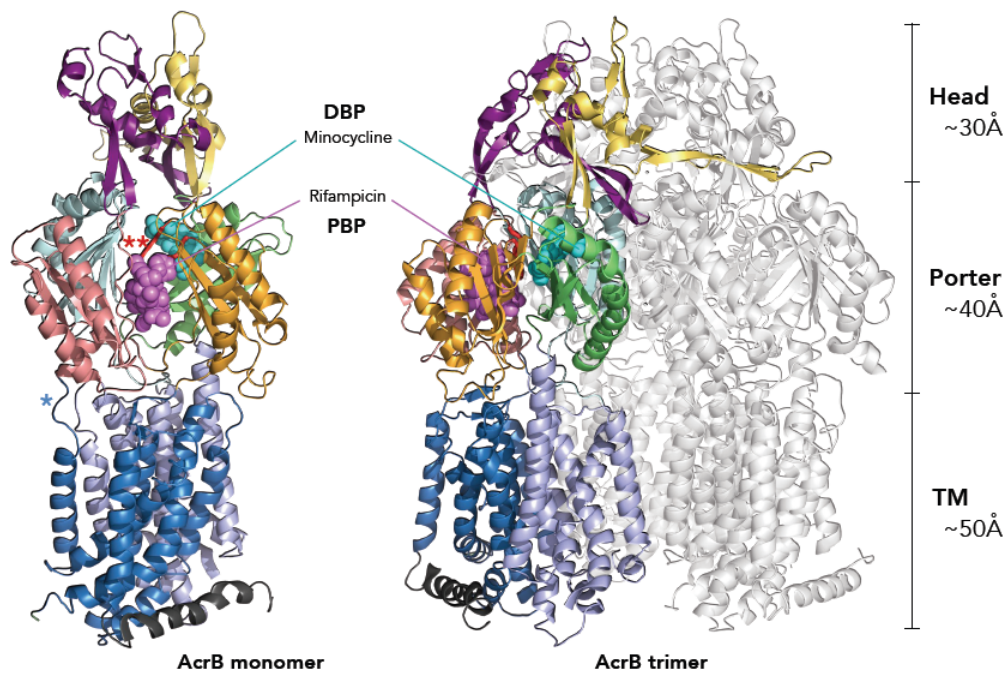


Figure 1-29. Structure du transporteur AcrB en état monomérique et trimérique.

Les TMs : bleu, PN1: cyan clair; PN2 : vert; PC1: orange; PC2: rose clair; DN: jaune et DC : mauve. Abréviations : *TM* : *Transmembrane*; *PC/PN* : *Porter subdomains* et *DN/DC* : *Docking subdomains*. Image reproduite de (Zwama et Yamaguchi, 2018) (225) et la structure cristallographique provient de (Nakashima et al., 2011) (284).

En se référant à la figure 1-29, nous constatons que le transporteur transmembranaire AcrB est sous une forme homotrimérique. Chaque monomère est constitué de trois principaux domaines : le domaine **TM**, le domaine du pore (**Porter**) et le domaine d'arrimage ou *docking* (**Head**). L'ensemble de ces domaines est divisé en deux moitiés : le côté N-terminal (**N**) et le côté C-terminal (**C**). De ce fait, nous comptons six sous-domaines pour les régions périplasmiques N- et C-terminales réparties comme suit : **DN**, **DC** pour la zone **Docking** et **PN1**, **PN2**, **PC1**, **PC2** pour la région **Porter** (225, 285, 286).

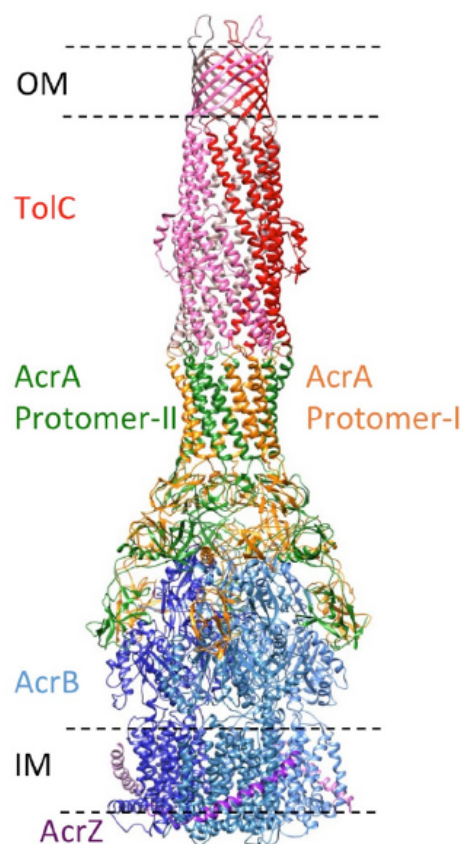


Figure 1-30. Structure asymétrique Cryo-EM (5.9 Å) de la pompe AcrAB-TolC-AcrZ en présence de l'antibiotique puromycine.

Structure présentée en vue latérale où les sous-unités sont colorées comme suit : le canal TolC en rouge/rose, la protéine AcrA en orange/vert, le transporteur AcrB en bleu et AcrZ en violet. Image reproduite de (Wang et al., 2017) (287).

Ce n'est qu'en 2006 que les résultats d'une série de recherches (263, 272, 273) ont pu détailler le mécanisme de transport de la pompe et mettre en évidence le couplage de la translocation avec un changement conformationnel (225). Actuellement, la majorité des recherches les plus récentes ont pu converger vers la même structure (figure 1-29) et définir un mécanisme d'action standard pour la pompe AcrAB-TolC (figure 1-31) (225, 284, 285, 287, 288). Il reste toutefois une divergence d'opinions quant à la répartition du nombre d'oligomères formant le complexe de l'*OMF* (*outer membrane factor*). Néanmoins, le modèle qui fait consensus actuellement est celui qui propose l'arrangement du complexe pompe *RND* comme suit : 3 *RND*, 6 *MFP* et 3 *OMF* (277, 289, 290).

Comme l'illustre la figure 1-30, l'homotrimère AcrB (le transporteur *RND*) s'associe au canal externe TolC (*OMF*, *outer membrane factor*) par l'intermédiaire de la protéine de fusion (*MFP*), nommément, AcrA afin d'outrepasser l'espace périplasmique et expulser le substrat de la cellule (277, 286, 291-293). La reconnaissance du substrat se fait de manière sélective grâce aux deux sites de liaison d'AcrB désignés comme *distal binding pocket* (*DBP*) et *proximal binding pocket* (*PBP*) pouvant aussi être nommés « portes » (283, 284). Ces deux sites de liaison permettent au transporteur AcrB de sélectionner ses substrats en fonction de leurs caractéristiques (ex. taille, hydrophobicité, composition en acides aminés, etc...) (267, 284).

Le processus d'expulsion des substrats et médicaments par la pompe AcrAB-TolC est désigné par le mécanisme de « rotation fonctionnelle » adopté par le transporteur transmembranaire AcrB (225, 263, 272). Ce mécanisme exige absolument, pour être efficace, un transporteur AcrB trimérique selon des études mutationnelles (294, 295) et d'autres résultats de caractérisations thermodynamiques (225, 296). Durant le cycle rotationnel, chaque monomère AcrB présentera une conformation fonctionnelle spécifique. Par conséquent, ce dernier alternera *via* ses trois monomères entre le mode d'accès (*access*), de liaison (*binding*) et d'expulsion (*extrusion*) (figure 1-31).

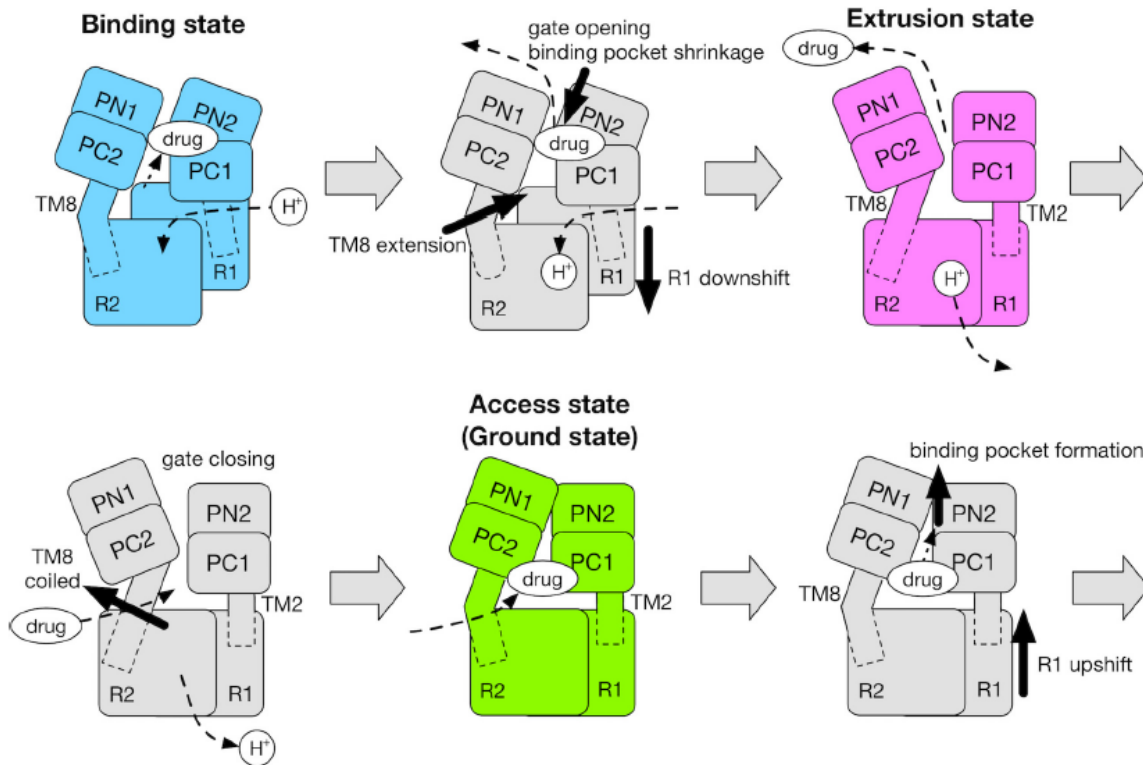


Figure 1-31. Description schématique du mécanisme de rotation fonctionnelle d'AcrB.

Chaque flèche noire épaisse reflète les mouvements de l'hélice (TM8) et d'un domaine. Les domaines sont les suivants : le domaine **TM** (constitué des répétitions **R1** :TM1-TM7 et **R2** :TM8-TM12) et le domaine **Porter** (formé des sous-domaines **PN1**, **PN2**, **PC1** et **PC2**). Pour des raisons de simplification, le domaine entonnoir du transporteur a été omis. Les flèches noires pointillées montrent les voies d'accès ou de sortie.

Image reproduite de (Matsunaga et al., 2018) (288).

Le mécanisme est initié par l'induction d'un changement conformationnel sous l'effet d'une **force proton-motrice (FPM)**. Ainsi, chaque monomère AcrB dispose de trois acides aminés essentiels à son activité de transport qui sont l'Asp407 et l'Asp408 du TM 4 et la Lys940 du TM10. Leur répartition en paires d'ions au centre du domaine transmembranaire leur permet de déclencher un gradient protonique transmembranaire maintenu également par l'action des résidus Thr978 du TM11 et Ser481 du TM6 (297, 298). L'entrée des protons dans la région transmembranaire est simultanément couplée à l'accès du substrat au site de liaison du domaine du pore. Ensuite, sous l'effet de la FPM, un changement conformationnel au niveau de la pompe aura lieu, observé par l'élongation ou le rétrécissement des extrémités N-terminales des TM2 et TM8 vers le domaine du pore périplasmique (225).

En se référant à la figure 1-31, le cycle de rotation fonctionnelle peut être résumé comme suit : en premier lieu, l'accès du substrat au **PBP** (*proximal binding pocket*) périplasmique sera couplé à une force proton-motrice transmembranaire qui va provoquer l'extension et l'inclinaison du TM8 qui va à son tour altérer la conformation du sous-domaine du pore PC2. De ce fait, les sous-domaines PC1-PC2 du monomère en mode d'accès seront bien distants facilitant ainsi la liaison du substrat au **PBP** délimité par ces derniers. Ensuite, le transfert en mode de liaison se manifeste simultanément par le mouvement du sous-domaine PN2 en haut et l'ouverture de la boucle (*switch loop* ou *gate-loop*) afin de faciliter l'accès au **DBP** (*distal binding pocket*), localisé entre PN1 et PN2. Il est à noter que la connexion entre les deux sites de liaisons **PBP** et **DBP** est assurée par le mouvement de cette boucle riche en glycines (225, 283). La prochaine étape du changement conformationnel du monomère en mode d'expulsion sera reflétée par l'orientation des deux sous-domaines PC1 et PC2 l'un en face de l'autre avec un léger mouvement du PN2 ce qui va entraîner le rétrécissement des deux poches **PBP** et **DBP**. De cette manière, le substrat sera finalement expulsé grâce à la mobilité du PC2 (299) par un mouvement péristaltique le poussant à travers l'entonnoir du monomère AcrB durant son cycle d'exportation (225, 263, 272). Un léger redressement de l'hélice TM8 permettra à la fois de rétrécir les deux cavités **PBP/DBP** et de faciliter l'expulsion du substrat. Pour finir, l'acheminement de ce dernier à l'extérieur de la bactérie se fera à travers le tunnel formé par la jonction AcrA-TolC. Durant le cycle d'exportation du substrat, les sous-domaines PN1 et PC2 restent à l'état rigide, et ce contrairement au PN2 qui se déplace pour dégager l'entrée du tunnel.

Il existe deux orthologues cliniques majeurs du système AcrAB-TolC chez la bactérie à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit des complexes MexAB-OprM (300, 301) et MexXY-OprM (302-305). Nous retrouvons également d'autres homologues comme la pompe TriABC-OpmH exprimée chez *Pseudomonas aeruginosa* (306) ainsi que CusCBA d'*E. coli* (307-309) et MtrCDE de *Neisseria gonorrhoeae* (310-312). Certaines structures tridimensionnelles comme celles d'AcrB (313), MexB (188), CusA (309) et MtrD (310) ont été résolues et ces données ont pu contribuer à la compréhension du fonctionnement des *RNDs*. Ainsi, l'intérêt d'aborder le transporteur AcrB, le mieux caractérisé, dans le cadre de la présente étude est de pouvoir déceler les points de convergence et divergence entre les différentes pompes à efflux chez les *RNDs* afin de conclure quant à leur mode de transport et leur réarrangement structural. En plus du transporteur AcrB qui nous a servi comme modèle structural et fonctionnel de la présente étude, nous nous pencherons brièvement sur son orthologue MexB qui a également servi comme référence ainsi que la pompe TriC qui représente le sujet de notre quatrième chapitre.

ii. La pompe RND : MexB

À titre d'information, la figure 1-32 présente la structure du complexe MexAB-OprM qui permet de visualiser des similitudes structurales avec le système AcrAB-TolC. L'arrangement spatial entre ces deux pompes *RND* est d'une ressemblance certaine puisque nous retrouvons les mêmes domaines transmembranaires (les 12 TMs de MexB) ainsi que les différents sous-domaines périplasmiques (PC, PN, DC et DN). D'un point de vue fonctionnel, la pompe MexB est capable d'expulser différentes classes d'antibiotiques (314-316). Similairement à AcrB, elle adopte le mode de « rotation fonctionnelle » pour l'expulsion des substrats hors de la cellule (188, 317). Le même principe de génération de gradient protonique transmembranaire par protonation/déprotonation est accompli chez MexB. Pour ce dernier, il implique trois acides aminés Asp407, Asp408 et Lys939 qui sont répartis au niveau du TM 4 et TM10 au centre du domaine transmembranaire (318). La force proton-motrice ainsi créée sera couplée à un changement conformationnel du complexe afin de faciliter l'expulsion du substrat à travers la jonction établie entre le canal externe OprM et la membrane de fusion AcrA.

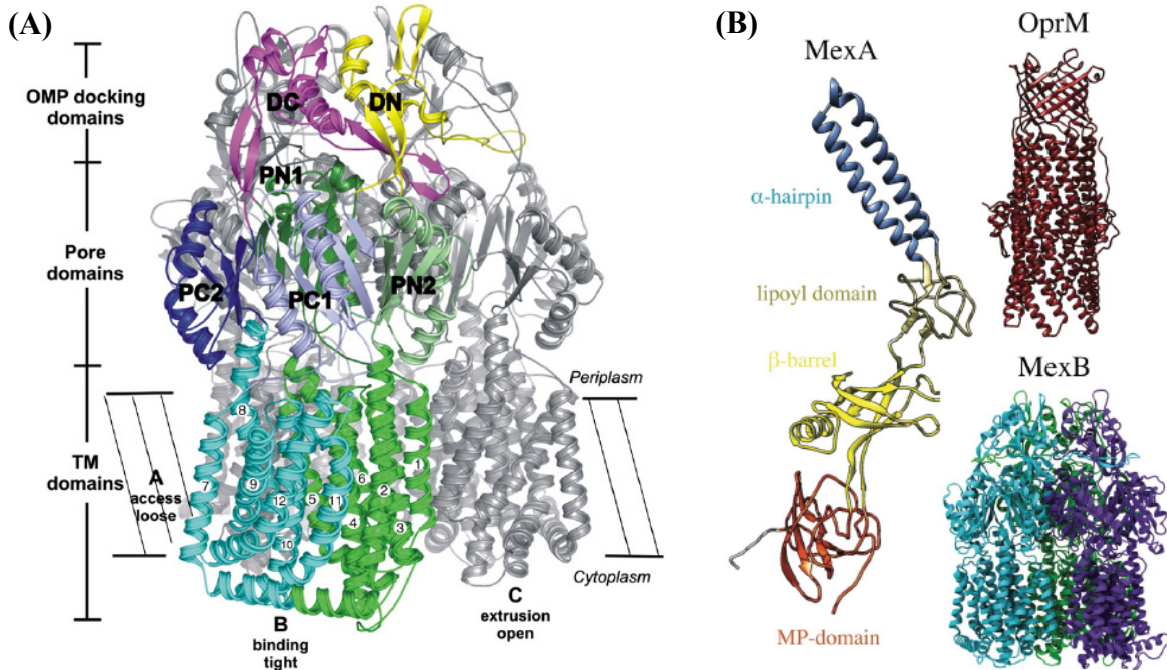


Figure 1-32. Structures des composants du complexe MexAB-OprM.

(A) Structure et architecture de MexB. Image adaptée de (Sennhauser et al., 2009) (188). Abréviations : *PC1/PC2* et *PN1/PN2* sont des sous-domaines du domaine du pore côté C et N terminal respectivement; *DC/DN* : sous-domaines du domaine d'arrimage côté C et N terminal respectivement. (B) Topologie des composants protéiques de la pompe à efflux MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*. Image reproduite de (Lopez et al., 2017) (319).

iii. La pompe RND : *TriC*

TriABC-OpmH est une pompe à efflux exprimée chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* et qui lui confère une résistance au triclosan assez considérable (MIC dépassant le 1 mg/ml) selon les études réalisées en 2007 par Mima et ses collaborateurs (306). Ces derniers ont mis en évidence l'existence de cette pompe et lui ont attribué le nom de *TriABC* pour la différencier de ses homologues *RND* exprimés chez *P. aeruginosa* (ex. *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEF-OprN* et *MexJK-OpmH*). En effet, le complexe *TriABC-OpmH* a été classé au cinquième rang parmi les pompes à efflux du triclosan, mais elle est la seule qui possède deux protéines membranaires de fusion ou *MFP* (306). Ainsi, du fait de son appartenance à la famille des *RNDs*, *TriABC-OpmH* présente une grande similarité structurale avec ses homologues d'autres souches comme l'*AcrAB-TolC* d'*E. coli* et le *MexAB-OprM* de *P. aeruginosa*.

Au même titre que les autres *RNDs*, le complexe TriABC-OpmH est constitué de TriC, un transporteur *RND* transmembranaire, d'OpmH, un canal *OMF* et de deux *MFP* (TriA et TriB). Par conséquent, un mécanisme similaire de translocation du substrat hors de la bactérie a été proposé par analogie à celui qui a été établi pour AcrAB-TolC (288). Il va sans dire que l'expulsion du substrat devrait impliquer un changement conformationnel du transporteur induit par une force proton-motrice transmembranaire.

En examinant la similarité entre les pompes TriC et AcrB (24 % d'identité et 42% de similitude), cette proposition semble valide. La première confirmation concerne la similitude de la répartition spatiale des résidus du centre transmembranaire. On retrouve au niveau du TM4 et TM10 les trois résidus essentiels et conservés chez les *RNDs* (265, 297, 298, 320, 321), à savoir : deux aspartates (Asp405, Asp406) et une arginine (Arg925) à la place d'une lysine (ex. Lys940 chez AcrB) qui tout de même accomplit le même rôle pour le cycle de protonation/déprotonation en présence d'un gradient de protons. Comme deuxième preuve, nous retrouvons les deux sites **PBP** (*proximal binding pocket*) et **DBP** (*distal binding pocket*) ainsi que la boucle « *switch-loop* » similaires à celles mises en évidence chez les homologues cités antérieurement. Les *PBP* et *DBP* représentent les deux sites qui assurent la liaison sélective du substrat au niveau des deux boucles périplasmiques du transporteur.

Finalement, nous pouvons constater une forte similitude d'organisation des domaines transmembranaires (TM1 à TM12) et périplasmiques (2 boucles périplasmiques, les sous-domaines du pore PC/PN et les sous-domaines d'arrimage DC/DN) entre TriC et les autres pompes à efflux *RND*. Toutefois, les quelques différences retrouvées soulignent une probable divergence dans le mode d'arrangement des différents éléments du complexe TriABC-OpmH. Comme précédemment mentionné, sa divergence structurale se situe dans la présence de deux *MPF*, TriA et TriB, et une fourchette de substrats plus restreinte (289), et nous suggérons que ceci va forcément interférer dans le mode d'assemblage du complexe ainsi que dans le recrutement de l'*OMF* OpmH. Ce point renforce l'intérêt de nos études entreprises au chapitre trois.

1.6.4 Les transporteurs *CMN*

i. Les transporteurs MmpL

➤ *Petit aperçu des MmpLs*

Les protéines *MmpL* (*Mycobacterial membrane protein Large*) sont des transporteurs transmembranaires appartenant à la superfamille des *RNDs* (*Resistance-Nodulation-Division*) perméases (322). Ces dernières sont des transporteurs ubiquitaires présents chez les eucaryotes, les archées et les bactéries. Fidèles à leur affiliation aux *RNDs*, leur activité de transport à travers la membrane cytoplasmique sera alimentée par la force proton-motrice (249). Les *MmpLs* sont capables de transporter une variété de substrats à travers la membrane cytoplasmique y compris des polymères et des lipides (189). Chez les microorganismes de la classe des *CMNs* (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*), ces pompes se spécialisent dans le transport des lipides associés à l'enveloppe cellulaire. En effet, elles interviennent dans l'export de différents glycolipides vers la surface cellulaire bactérienne. L'intégralité de la membrane externe étant essentielle à l'imperméabilité et à la survie de la bactérie, elle souligne l'importance des *MmpLs* chez les *CMNs*.

En résumé, les protéines *MmpL* participent d'une manière directe ou indirecte à la multirésistance des souches mycobactériennes tuberculeuses et non-tuberculeuses. Elles contribuent ainsi à la problématique des *MDRs*, ce qui fait d'elles de nouvelles cibles thérapeutiques. En contrepartie, leur structure ainsi que leur mode de transport restent ambigus. Des études visant le décodage de cette énigme seront d'une grande utilité médicale, soulignant l'intérêt de la présente thèse. Finalement, les résultats d'études récentes ciblant les *MmpLs* ont permis de rassembler quelques données préliminaires sur la structure et la fonction de certaines d'entre elles. L'ensemble de ces informations sera récapitulé dans les sections suivantes mais l'emphase sera portée sur le transporteur d'acides mycoliques *MmpL3* essentiel pour la viabilité de *M. tuberculosis* (5, 185), et qui sera au cœur des études présentées aux deuxième et troisième chapitres.

➤ *Structure des MmpLs*

Sur la base de l'appartenance des *MmpLs* à la famille des transporteurs *RND*, des données préliminaires de prédictions topologiques de leur structure tridimensionnelle ont été proposées. Ces dernières suggèrent que les *MmpLs* disposent de douze domaines transmembranaires, deux extrémités C et N-terminales cytoplasmiques et deux boucles périplasmiques (D1 et D2) (figures 1-33-A et 1-34-A).

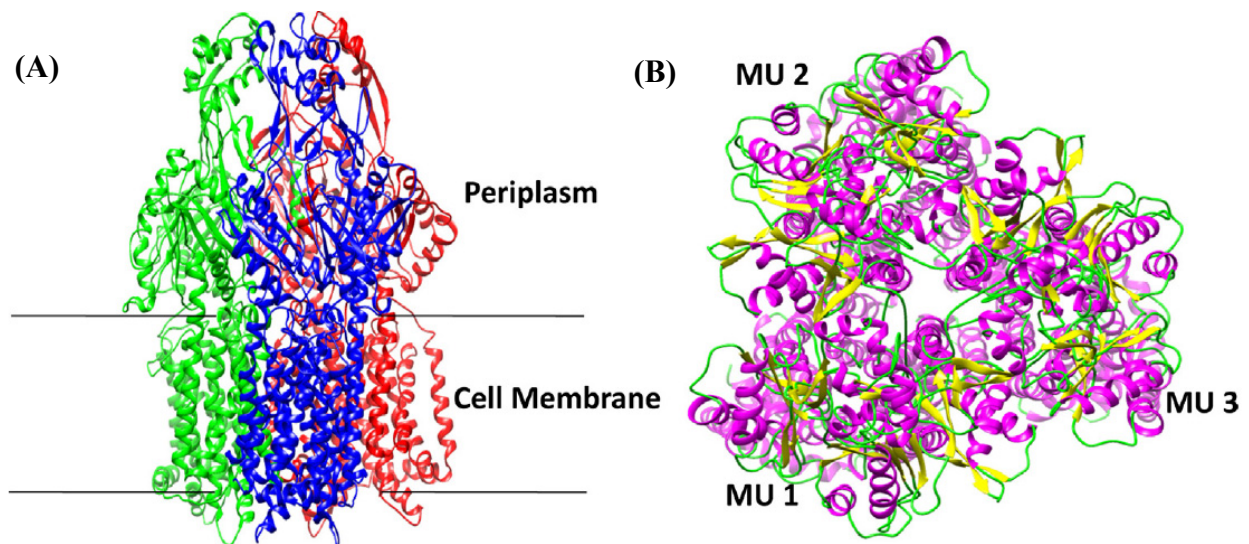


Figure 1-33. Les oligomères des protéines *MmpL* formant un canal à travers la membrane. (A) Représentation de la structure d'une protéine *MmpL* positionnée dans la membrane cellulaire. Les différents monomères sont distingués par coloration. (B) Vue de face de l'oligomère *MmpL* montrant le canal central formé par ses trois différents monomères (MU1, MU2 et MU3). Image reproduite de (Sandhu et Akhter, 2015) (323).

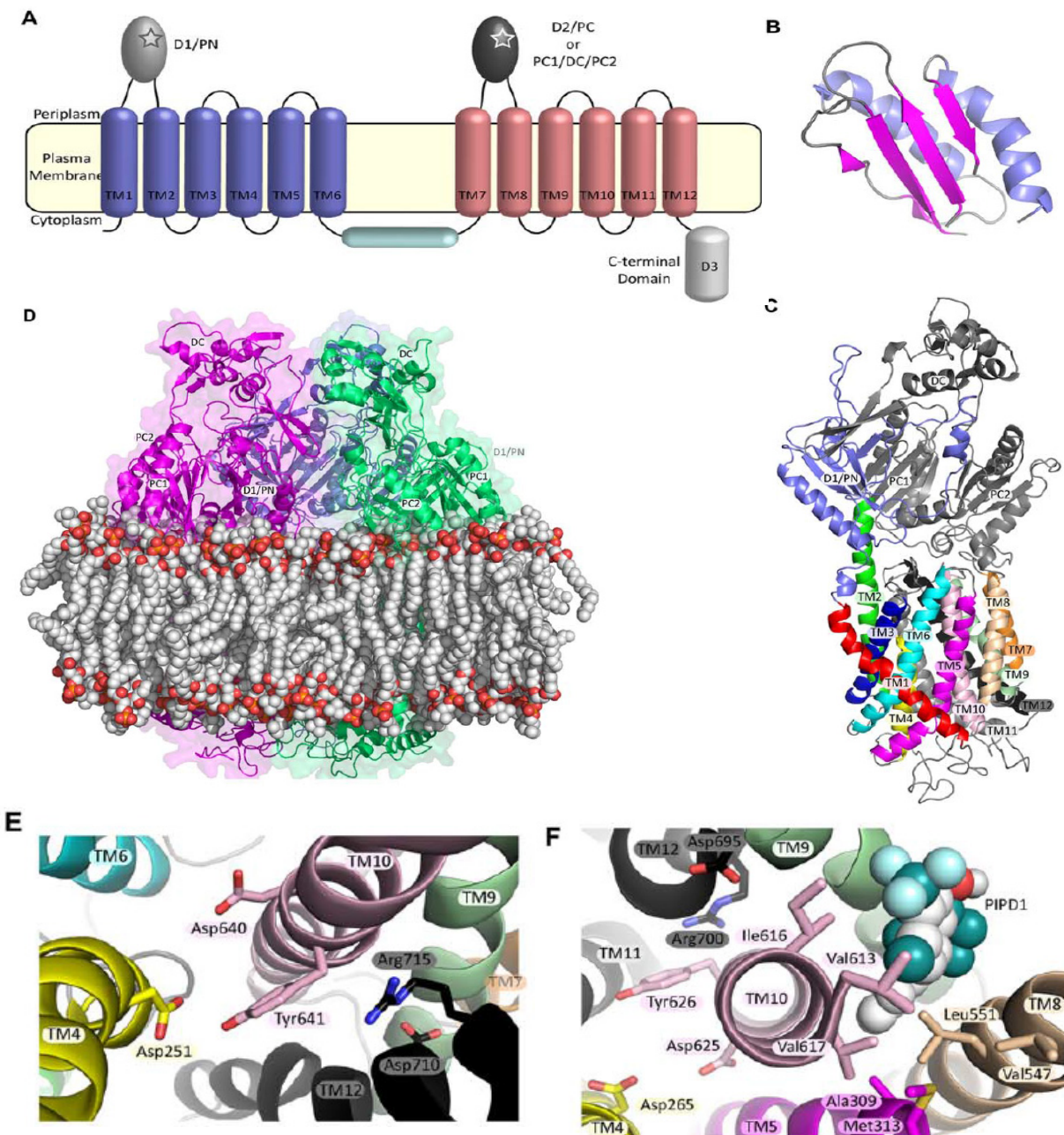


Figure 1-34. La topologie des protéines *MmpL* et leur modélisation par homologie.

(A) Topologie prédite pour les *MmpLs*. (B) Structure cristallographique du domaine D2 de *MmpL11* de *M. tuberculosis*. (C) et (D) Modélisation tridimensionnelle par homologie de *MmpL4a* de *M. boletii* monomérique et homotrimerique respectivement. (E) Cartographie des résidus impliqués dans le processus de la force proton-motrice chez *MmpL3* de *M. tuberculosis*. (F) Le site de liaison du PIPD1 chez *MmpL3* de *M. abscessus* localisé à proximité des résidus impliqués dans le gradient protonique. Abréviations : *D1/PN*, *DC*, *PC1* et *PC2* : les sous-domaines périplasmiques; *D3* : Domaine C-terminal; *TM* de 1 à 12 : les hélices alpha transmembranaires; *D1* et *D2* : les boucles périplasmiques. Image reproduite de (Viljoen et al., 2017) (322).

D'un point de vue oligomérique, ces transporteurs s'organisent souvent sous forme d'homotrimères créant un canal central au niveau de la membrane cytoplasmique (figure 1-33-B). Cependant, leur topologie reste hypothétique et exige des avancements dans leur caractérisation structurale et fonctionnelle: l'objectif principal du présent travail. Néanmoins, certaines similitudes topologiques des *MmpLs* avec la famille des *RNDs* ont pu être mises en évidence. À titre d'exemple, la résolution cristallographique du domaine D2 de MmpL11 (figure 1-34-B) élaborée par l'équipe de Chim en 2015 (324) a pu confirmer l'analogie de ce domaine avec ceux de ses homologues *RND*. Certes leur arrangement structural semble être similaire à celui d'un transporteur *RND* (figures 1-34-C et D), mais les mêmes auteurs ont pu souligner certaines divergences structurales. D'un côté, leur caractérisation structurale des deux boucles périplasmiques D1 (de toutes les *MmpLs*) et D2 (de MmpL3 et MmpL11 chez *M. tuberculosis*) a démontré qu'elles sont similaires à celles des transporteurs *RND* mais plus courtes. D'un autre côté, ces auteurs ont remarqué l'extension de la région C-terminale du transporteur *MmpL* (ex. le domaine D3 de MmpL3 présenté dans la figure 1-34-A). Leur hypothèse laisse suggérer l'implication de ce domaine dans l'interaction avec des protéines accessoires durant le processus d'exportation des mycolates facilitée par sa longueur.

Par analogie avec les *RNDs*, nous prévoyons que les *MmpLs* forment un complexe tripartite s'arrimant à une *MPF* pour outrepasser le périplasma, ainsi que d'un canal externe pour l'expulsion du substrat hors du cytoplasme. Contrairement aux *RNDs*, les *MmpLs* sont impliqués dans le transport de lipides endogènes (257, 325) ce qui laisse supposer un assemblage différent. Au moment de la rédaction de cette thèse, aucune étude définitive n'a été publiée quant au mode d'arrangement ou au mécanisme de transport de notre cible de recherche: MmpL3 de *M. tuberculosis*. Toutefois, deux structures cristallographiques de l'orthologue MmpL3 de *M. smegmatis* ont été récemment résolues par le groupe de Zhang (326) (PDB 6AJF) et (Su et Yu, 2019, à publier) (PDB 6N40) à 2.7 et 3.3 Å respectivement. Ainsi, certaines ambiguïtés structurales et fonctionnelles concernant l'orthologue MmpL3 ont été levées. Ces structures seront discutées dans le cinquième chapitre de la présente thèse.

➤ *Fonctions des MmpLs*

Le génome de *M. tuberculosis* (*Mtb*) code pour 14 protéines *MmpL* (121, 189, 327) dont la fonction de seulement quelques membres a été caractérisée. Les protéines *MmpL* sont présentées dans la littérature comme étant des pompes à efflux de certains antibiotiques et métaux mais principalement en tant que transporteurs lipidiques essentiels pour la formation de la membrane externe mycobactérienne (figure 1-35).

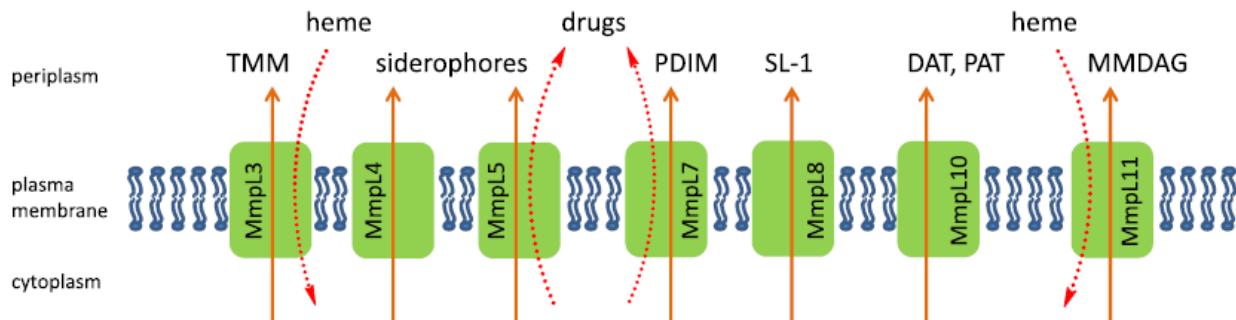


Figure 1-35. Présentation des *MmpLs* à fonctions connues chez *M. tuberculosis*.

Abréviations : TMM : tréhalose de monomycolate; PDIM : phthiocerol dimycocerosate; SLI : sulfolipid-I; DAT : diacyl trehaloses; PAT : pentacyl trehaloses et MMDAG : monomeromycolyl diacylglycerol. Image reproduite de (Szekely et Cole, 2016) (257).

Ainsi, nous citons l'exemple de MmpL8 qui a été décrit comme un transporteur du sulfolipide **SL-I** (328, 329). Quant aux MmpL4 et 5, ils interviennent au niveau du transport des sidérophores (330, 331). Concernant MmpL10, il est impliqué dans l'export des tréhaloses acylés (148, 332, 333) tandis que MmpL12, lui, c'est le transport des lipooligosaccharides (334, 335). En ce qui a trait au MmpL11, il a été récemment impliqué dans le transport du **monoméromycolyl diacylglycerol (MMDAG)** et de l'ester de mycolate mais également dans l'endocytose de l'hème (336, 337). MmpL7 est impliqué dans le transport du **PDIM (Pthiocerol dimycocerosate)** (338, 339).

L'activité des transporteurs *MmpL* nécessite parfois l'intervention de protéines accessoires de type *MmpS* (**Mycobacterial Membrane Protein Small**) (195). Cinq *MmpS* sont codées par le génome de *M. tuberculosis*, à savoir: MmpS1 (Rv0403c), MmpS2 (Rv0506), MmpS3 (Rv2198c), MmpS4 (Rv0451c) et MmpS5 (Rv0677c) (325). Mais la fonction des *MmpS* n'a pas encore été déchiffrée mis à part celle des MmpS4 et MmpS5. Ces dernières sont les protéines accessoires pour les transporteurs MmpL4 et MmpL5 respectivement (340) (341) (342). Mise à part leur rôle indispensable dans le transport des lipides essentiels pour l'enveloppe bactérienne, certaines *MmpLs* ont été impliquées dans l'efflux d'antibiotiques (343), à l'instar des transporteurs *RND* chez les bactéries à Gram négatif. En effet, les travaux de l'équipe de Briffotiaux en 2017 (340) ont pu mettre en évidence que MmpL5 est également une pompe à efflux expulsant une variété de médicaments chez le genre *Mycobacterium* (340) (344) (345). La même fonction de pompe à efflux de médicaments anti-TB a été attribuée au MmpL7 (346).

Finalement, partant de la similitude des MmpL11 et MmpL3 (25%) (347), la même fonction d'entrée de l'hème a été suggérée pour MmpL3 par l'équipe de Tillius en 2011 (347) et revisitée par celle d'Owens en 2013 (337). D'autres auteurs (185) (187) ont également proposé, pour MmpL3, une deuxième fonction de transport, cette fois d'un glycolipide, et ont réussi à démontrer son implication dans le transport du **TMM (Tréhalose de monomycolate)** à travers la membrane de *Mtb*. Ils sont parvenus à inhiber la translocation du *TMM* hors de la cellule de *Mtb* menant à une accumulation cytoplasmique ainsi qu'à la synthèse du **TDM (Tréhalose de dimycolate)** grâce à l'effet de nouveaux inhibiteurs, tels **AUI235** (185) et **SQ109** (187).

D'un point de vue structural, MmpL3 présente douze domaines transmembranaires α -hélicaux, des extrémités C- et N-terminales cytoplasmiques (D3 pour le domaine C-terminal) et deux boucles périplasmiques entre les hélices TM 1-2 (D1) et TM 7-8 (D2) (324, 348) (figure 1-34-A). Les boucles périplasmiques D1 et D2 semblent jouer un rôle crucial dans la sélection du substrat à transporter (195) (337) (349) (254). Un rôle d'interaction probable de MmpL3 avec des protéines accessoires à travers son domaine D3 a été élucidé récemment (350). Il est à noter que Chim et ses co-auteurs (324) ont distingué les deux transporteurs MmpL3 et MmpL11 de *Mtb* des autres *MmpLs* dû à la présence de ce domaine extracytoplasmique (D3) et d'une boucle périplasmique (D2) topologiquement différente. Ainsi, mise à part la différence de leur fonction, les *MmpLs* présentent certaines divergences topologiques. De ce fait, une analyse poussée de l'impact de ces variations structurales sur la fonction des *MmpLs* sera indispensable.

Pour le caractère fonctionnel de MmpL3 de *M. tuberculosis*, nos données d'analyses biochimiques et structurales, publiées en 2016 (348), valident l'hypothèse d'un mécanisme de transport actif qui reçoit l'énergie pour la translocation du *TMM* d'un gradient protonique électrochimique. Nous avons ainsi proposé pour cet homotrimère le maintien de la force proton-motrice grâce aux résidus essentiels Asp251 du TM4, la paire Asp640/Tyr641 du TM10 et les Asp710/Arg715 du TM12. Ceci a été proposé par analogie avec les résidus essentiels pour la force proton-motrice chez les *RNDs* à Gram négatif, à savoir: les Asp407/408 du TM4, la Lys940 du TM10, la Thr978 du TM11 et la Ser481 du TM6 chez AcrB (297, 298). Cette analogie a été corroborée par nos résultats biochimiques et de mutagenèse dirigée et leurs effets sur le flux de transport du *TMM* par MmpL3 exprimé chez *M. smegmatis*. La répartition structurale de ces résidus est illustrée par la figure 1-34-E. Une répartition similaire des résidus essentiels chez MmpL3 de *M. abscessus* a été observée (figure 1-34-F). Le même mode de transport par force proton-motrice a été également appuyé par les études du groupe de Bernut en 2016 (351). Récemment, Zhang et ses co-auteurs ont mis en évidence par des analyses de diffraction aux rayons X l'implication de deux paires Asp-Tyr dans la translocation du flux des protons dans le canal transmembranaire du transporteur MmpL3 de *M. smegmatis* (326). Ces auteurs ont également suputé pour ce transporteur un mécanisme d'interaction avec certains inhibiteurs y compris le *SQI09* et *AUI235* évoqués précédemment. L'ensemble de ces notions sera abordé dans la section de discussion (chapitre 5).

Une récapitulation des différentes fonctions attribuées à certaines protéines *MmpL*, dévoilées en date d'aujourd'hui, est présentée dans le tableau 1-6.

Tableau 1-6. Fonctions des protéines *MmpL* chez *Mycobacterium tuberculosis*.

Abréviations : acide aminé (aa); locus (Rv-).

Protéine <i>MmpL</i>	Activité de transport	Référence bibliographique
MmpL3 (Rv0206c ; 944 aas)	<i>Tréhalose de monomycolate (TMM)</i> <i>Endocytose de l'hème</i>	Grzegorzewicz et al., 2012 (185) Tahlan et al., 2012 (187) Tullius et al., 2011 (347) Owens et al., 2013 (337)
MmpL4 (Rv0450c ; 967 aas)	<i>Sidérophores</i>	Domenech et al., 2005 (189) Jones et al., 2014 (330) Wells et al., 2013 (331)
MmpL5 (Rv0676c ; 964 aas)	<i>Sidérophores et efflux d'antibiotiques</i>	Jones et al., 2014 (330) Wells et al., 2013 (331) Hartkoorn et al., 2014 (344)
MmpL7 (Rv2942 ; 920 aas)	<i>Phthiocérol de dimycolate (PDIM) et efflux d'antibiotiques</i>	Jain et Cox, 2005 (338) Coet al., 1999 (352) Camacho et al., 2001 (339) Camacho et al., 1999 (353)
MmpL8 (Rv3823c ; 1089 aas)	<i>Les sulfolipides SL-N, le précurseur du SL-1</i>	Domenech et al., 2004 (328) Gilleron et al., 2004 (354) Converse et al., 2003 (355) Seeliger et al., 2012 (329)
MmpL10 (Rv1183 ; 1002 aas)	<i>Diacyl de tréhalose (DAT) et/ou Pentaacyl de tréhalose (PAT) et/ou Tréhalose de polyphléates (TPP)</i>	Belardinelli et al., 2014 (332) Touchette et al., 2015 (356) Burbaud et al., 2016 (333)
MmpL11 (Rv0202c ; 966 aas)	<i>Monomérycolyl de diacylglycérol (MMDAG) et/ou Ester de mycolate</i> <i>Endocytose de l'hème</i>	Pacheco et al., 2013 (336) Tullius et al., 2011 (347) Owens et al., 2013 (337)
MmpL12 (Rv1522c ; 1146 aas)	<i>Lipooligosaccharides (LOS)</i>	Ren et al., 2007 (334) Etienne et al., 2009 (335) Boritsch et al., 2016 (357)
<i>Fonction encore inconnue</i>		
MmpL1 (Rv0402c ; 958 aas) ; MmpL2 (Rv0507 ; 968 aas) ; MmpL6 (Rv1557 ; 397 aas) ; MmpL9 (Rv2339 ; 962 aas) et MmpL13 a/b : a (Rv1145; 303 aas) et b (Rv1146; 470 aas).		

ii. Les transporteurs *CmpL* (*Corynebacterial membrane proteins Large*)

Corynebacterium glutamicum est une souche phylogénétiquement proche du pathogène *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Toutefois, cette dernière ne présente que quatre *MmpLs* nommées *CmpLs* (*Corynebacterial membrane proteins Large*) (tableau 1-7) tandis que *Mtb* en possède quatorze (46, 121). Une vue comparative de ces deux souches *CMN* a été présentée dans la section (1.4.3) de la présente thèse.

Tableau 1-7. Les *CmpLs* de *Corynebacterium glutamicum*
Reproduit de (Yang et al., 2014) (46).

Nom	Numéro d'accès pour <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Taille en acides aminés	L'homologue le plus proche chez <i>M. tuberculosis</i> (identité, similarité)
CmpL1	Ncgl2769	772	MmpL3 (43%, 61%)
CmpL2	Ncgl0887	791	MmpL4 (31%, 47%)
CmpL3	Ncgl0599	730	MmpL8 (37%, 58%)
CmpL4	Ncgl0228	801	MmpL13 (28%, 47%)

Les protéines *MmpL* sont désignées comme éléments clés pour la stabilité de la structure membranaire des *CMNs* (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*). Ce principal rôle est accompli *via* la translocation des lipides essentiels à l'assemblage de la membrane externe. La même fonction est préservée chez *Corynebacterium glutamicum* (46, 195). L'expression combinée des deux transporteurs *CmpL1* et *CmpL4* en particulier est requise pour la translocation du *TMCM* (*Tréhalose de monocorynomycolate*) et d'autres mycolates à travers la membrane cytoplasmique (46, 195). Ceci contribue à l'imperméabilisation de la membrane du *Corynebacterium* et le renforcement de sa résistance aux antibiotiques. Finalement, Zhang et al. en ont conclu à un transport transmembranaire usant d'une force proton-motrice, comme toute protéine *RND*, sur la base de l'inhibition de la fonction de transport des protéines *CmpL* par le *CCCP*, un dissipateur de *PMF* (218).

Depuis la récente découverte de l'implication des *MmpLs* dans la virulence chez *Mtb* (189) et l'efflux de certains antibiotiques (358), des études y compris la nôtre se sont focalisées davantage sur leur caractérisation. En effet, les *MmpLs* représentent de nouvelles cibles prometteuses pour le développement d'antibiotiques plus efficaces contre les souches multi-résistantes. Nous abordons les *CmpLs* puisque le CmpL1 a servi d'homologue de MmpL3 *Mtb* pour nos expériences de purification de protéine ainsi que pour sa caractérisation structurale. Les raisons de ce choix seront plus détaillées dans la section (1.7.2) de notre méthodologie. La forte homologie entre ces deux protéines (43% d'identité, 61% de similarité) nous a permis d'élaborer des analyses comparatives de point de vue structure et fonction du transporteur. Enfin, une similitude topologique entre les *CmpLs* et le MmpL3 a été prédite par Varela et ses collaborateurs (figure 1-36) (195).

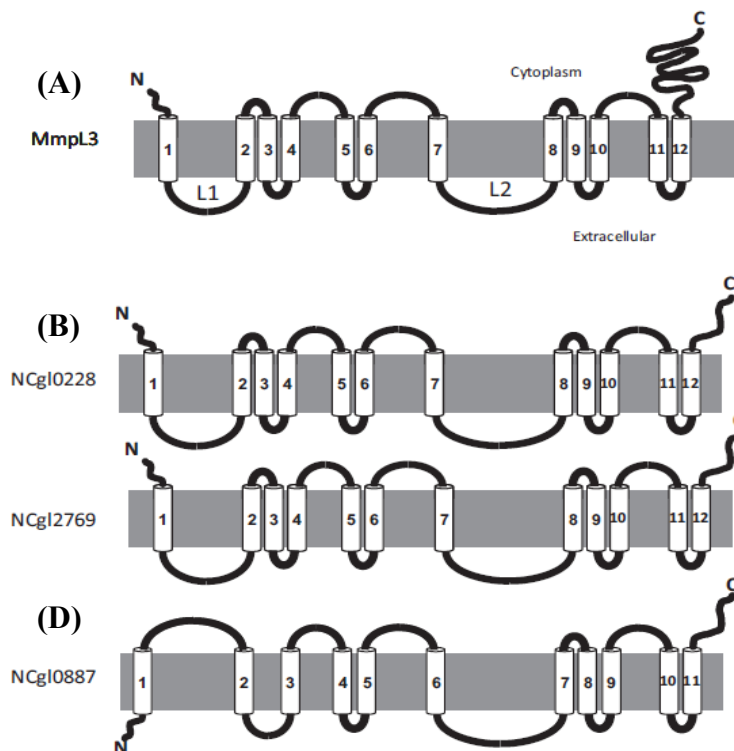


Figure 1-36. Topologies membranaires prédites pour les *CmpLs* de *Corynebacterium glutamicum* (*Cgl*).

Présentation des différentes topologies prédites pour : (A) MmpL3 de *M. tuberculosis*; (B) CmpL4 (Ncgl0228) de *Cgl*; (C) CmpL1 (Ncgl2769) de *Cgl* et (D) CmpL2 (Ncgl0887) de *Cgl*. Le serveur Mobylye@Pasteur a été utilisé pour la prédiction topologique (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>).

Image reproduite de (Varela et al., 2012) (195).

Comme l'illustre la figure 1-36, il a été suggéré pour la topologie des *CmpLs* la conservation de la répartition en douze domaines transmembranaires, deux boucles périplasmiques entre les hélices TM 1-2 et TM 7-8 (à l'exception de la boucle L1 de CmpL2 prédite cytoplasmique), deux extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques (sauf pour le domaine N-terminal de CmpL2 prédit périplasmique).

1.7 Les objectifs du projet et la méthodologie adoptée

1.7.1 Les objectifs ciblés

Chez les mycobactéries, plusieurs études ont pu démontrer la contribution de leur membrane externe à la résistance aux antibiotiques. En effet, elle présente une composition très complexe qui la rend imperméable à l'accès d'antibiotiques, caractère menant à la multirésistance. En considérant le taux croissant de résistance aux antibiotiques de ces mycobactéries, il devient urgent et prioritaire d'élaborer de nouvelles stratégies pour éradiquer ce fléau mondial en visant les mycolates. Bien que la voie de biosynthèse de ces derniers et leur insertion dans la paroi externe aient été bien caractérisées chez le *Mycobacterium* (175), l'acheminement reste, à ce jour, indéchiffré. De plus, même si d'autres chercheurs sont parvenus à inhiber la biosynthèse de l'acide mycolique chez *Mtb* via l'isoniazide (INH) (359) ou encore la synthèse des ramifications d'arabinane formant la paroi cellulaire par l'éthambutol (EMB) (360, 361), la tuberculose continue à progresser mondialement. Ainsi, l'augmentation de la résistance aux médicaments rend le ciblage de la voie de transport des acides mycoliques, encore inexploitée, une alternative pertinente.

Récemment, le gène *mmpL3*, conservé chez les mycobactéries tuberculeuses et non-tuberculeuses, a été identifié comme séquence codante pour un transporteur d'acide mycolique *TMM* (259). Cette identification a ouvert la porte à de nouvelles études alternatives des mécanismes de transport des lipides chez le *Mycobacterium* encore inconnus. Afin de résoudre cette énigme, nous avons mis l'accent sur le transporteur MmpL3 de *Mtb* pour le décodage de sa structure à l'échelle moléculaire et transposer ceci en un mode d'action.

Notre principale stratégie, présentée dans le chapitre 2, a été basée sur une caractérisation structurale et fonctionnelle de MmpL3 en appliquant une approche expérimentale multidisciplinaire. La combinaison de la biochimie, de la génétique et de la biologie structurale nous a permis de comprendre certaines bases moléculaires de ce transporteur. D'un point de vue plus général, nous avons adopté la même stratégie que celle utilisée pour la caractérisation d'un deuxième transporteur de la même famille des *RNDs*. Il s'agit du transporteur TriC qui représente la partie active de la pompe à efflux TriABC chez *Pseudomonas aeruginosa* (présenté dans le chapitre 4).

L'objectif du présent projet, était de fournir des informations importantes au sujet de la protéine MmpL3 et de confirmer son appartenance à la famille des transporteurs *RND* de point de vue structure et fonction. Ainsi, nous envisageons conclure sur le mode d'efflux pour les deux transporteurs transmembranaires MmpL3 et TriC en nous basant sur des analyses analogiques avec les pompes *RND*. Nous prévoyons pour ces deux transporteurs une activité d'efflux endogène ou exogène du substrat à travers la membrane cytoplasmique sous l'effet d'un gradient de protons transmembranaire. Nous avons tiré profit des données structurales et mécanistiques élaborées pour des pompes à efflux *RND* à Gram négatif déjà bien caractérisées pour valider nos résultats. Nous citons à titre d'exemple: les pompes AcrB d'*E. coli* et MexB de *P. aeruginosa*.

Dans le but de faire face à l'émergence inéluctable des souches *MDR*, nous avons orienté notre recherche vers les mycobactéries non-tuberculeuses tout en gardant la même cible, à savoir MmpL3. Nous avons réalisé un criblage d'une panoplie d'inhibiteurs provenant de bibliothèques de dérivés actifs contre *Mtb* pour leur effet d'inhibition *in vivo* sur certaines souches du complexe *Mycobacterium abscessus*. Ce dernier nous a permis de déduire une série de chémotypes prometteurs. Il s'avère que *M. abscessus* est vulnérable à certains inhibiteurs ciblant MmpL3 de *M. tuberculosis*. Ainsi, dans le chapitre 3 de cette thèse, nous proposons des études de divergence d'effets de ces mêmes inhibiteurs de MmpL3 sur les deux souches mycobactériennes. L'intérêt de cette démarche réside dans l'analyse de la faisabilité d'utiliser ces inhibiteurs tuberculeux pour traiter des infections à espèces mycobactériennes multirésistantes non-tuberculeuses. En effet, nous rappelons l'impact de la pathogénicité et la multirésistance du *Mycobacterium abscessus complex (MABSC)* et du *Mycobacterium avium complex (MAC)* sur la santé humaine, qui rappelle l'urgence d'identifier de nouveaux

traitements contre ces infections. Ainsi se résume l'ensemble des résultats des trois chapitres de la présente thèse qui visent à fournir de nouvelles perspectives sur la corrélation entre la structure et le mode de fonctionnement des protéines *RND*, et ce, dans un but général de concevoir de nouveaux médicaments anti-*MDR*. L'exploitation du potentiel thérapeutique de MmpL3 pourrait donc être d'une grande portée dans le domaine médical.

1.7.2 Méthodologie générale

Dans le cadre de nos recherches, nous avons opté pour la bactérie *Corynebacterium glutamicum* pour l'expression et la purification de l'homologue de notre cible MmpL3 de *Mtb* : CmpL1. Ce choix se justifie de plusieurs manières : d'une part, nos conditions de laboratoire ne nous permettaient pas de manipuler le pathogène *Mtb* (agent de classe 3) au vu du niveau de sécurité biologique exigé. D'autre part, *C. glutamicum* fournissait un meilleur rendement de purification pour la protéine CmpL1 (3 à 4 mg/L) comparativement à MmpL3 (0.3 mg/L) exprimé dans *C. glutamicum* ou dans d'autres hôtes d'expression tels *E. coli* et *M. smegmatis*. Finalement, CmpL1 présente 43% d'identité et 61% de similarité avec notre cible d'étude MmpL3 *Mtb* (tableau 1-6) ce qui nous facilite l'élaboration d'une analogie structurale et fonctionnelle. *M. smegmatis* a été utilisé comme modèle pour les études biochimiques et génétiques réalisées en collaboration.

i. Les collaborations locales et internationales

Le présent travail a été réalisé en collaboration internationale avec les deux professeures Mary Jackson (*Colorado State University*) et Helen I. Zgurskaya (*Oklahoma University*). La contribution du groupe de recherche du Prof. Jackson consistait à nous fournir les plasmides et les souches pour l'expression de la protéine CmpL1 afin que nous puissions la purifier dans notre laboratoire, ainsi que les données biochimiques et/ou mutationnelles. La purification de la protéine a été débutée en se référant à leur protocole de purification (résumé en annexe 1) que nous avons pris le soin d'optimiser afin d'en améliorer le rendement et la monodispersité. Concernant la contribution du laboratoire de recherche du Prof. Zgurskaya, elle concernait les expériences de mutations dirigées, les essais fonctionnels et l'apport du complexe TriAxBC et de la protéine TriC purifiés. L'ensemble des contributions est illustré en plus de détails dans les chapitres (2, 3 et 4) de la présente thèse.

Une autre collaboration a été nouée au synchrotron d'Ithaca (ou MacChess, aux États-Unis), pour des expériences de diffraction aux rayons X à petits angles (**SAXS** : *Small Angle X ray Scattering*) avec l'assistance du scientifique Richard Gillilan. D'autres travaux ont été effectués en collaboration au Canada. Mon initiation à la purification de la protéine membranaire CmpL1 a été effectuée au sein du groupe d'étude des protéines membranaires (GEPROM) sous l'encadrement du Prof. Nazzareno D'Avanzo (Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal). Une deuxième collaboration locale a eu lieu à l'Université McGill pour la réalisation des analyses par microscopie électronique à coloration négative et cryogène (*Cryo-EM*). Les essais de caractérisation structurale à faible résolution par microscopie électronique à coloration négative (pour CmpL1 et CmpL3, en collaboration et par moi-même) et ceux par *Cryo-EM* (pour TriAxBC, leur collaboration) ont été entamés dans le laboratoire du Prof. Isabelle Rouiller (département d'anatomie et biologie cellulaire, Université de McGill). À la suite du départ du Prof. Rouiller en septembre 2017, une nouvelle collaboration a été entreprise avec le Prof. Joaquin Ortega à l'Université McGill. Durant cette collaboration, j'ai pu poursuivre les essais de microscopie à coloration négative pour la protéine CmpL1 et eu l'opportunité d'apprendre la technique de caractérisation de cette dernière par *Cryo-EM*. Les expériences ont été réalisées sous la supervision du Prof. Ortega.

ii. La contribution de notre laboratoire de recherche

Les deux grands axes de notre travail au laboratoire tout au long de mes études doctorales étaient la purification des protéines membranaires d'intérêt et leur caractérisation structurale.

➤ Les expériences de purification et caractérisation biochimique des protéines membranaires

Afin de caractériser le transporteur CmpL1 exprimé dans *C. glutamicum* (l'orthologue de MmpL3 *Mtb*), il est essentiel de bien purifier la protéine, une étape délicate et cruciale pour la réussite des essais de biologie structurale. En effet, une bonne résolution structurale est corrélée au degré de pureté protéique et à sa monodispersité. Puisqu'il s'agit d'une protéine transmembranaire, la protéine a été solubilisée dans du détergent où sa stabilité et son taux de purification étaient limités par le pouvoir de ce dernier.

La protéine CmpL1 marquée par un « *Strep tag II* » a été surexprimée dans *C. glutamicum* transformée par électroporation et son expression a été induite avec de l'*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)*. L'extraction de la protéine a nécessité plusieurs cycles de lyse des cellules et des séries de centrifugations et homogénéisation. Par la suite, cette dernière a été solubilisée dans du détergent *n-Dodécyl β -D-maltoside (DDM)* et éluée à travers une colonne Superdex 200 3.2 10/30 (*GE Healthcare*) renfermant de la résine agarose Superflux strep-tactin (de chez *iba solutions for life sciences*). Une étape de concentration de la protéine a précédé son passage à travers la colonne pour son analyse par chromatographie par exclusion de taille (*SEC : Size-exclusion chromatography*). La monodispersité de CmpL1 a été vérifiée par une électrophorèse sur gel SDS-PAGE et coloration avec du bleu de Coomassie ou du nitrate d'argent. Une deuxième validation de la protéine a été faite par la détection de son étiquetage peptidique « *Strep tag II* » au niveau de son extrémité C-terminale par immunobuvardage de type Western (*Western blot*). L'ensemble de ces étapes est détaillé dans la section des méthodes supplémentaires du deuxième chapitre. Cette étape utilise pour l'extraction de la membrane cellulaire des produits chimiques dénaturants ainsi que des protocoles de purification initialement conçus pour des protéines solubles. Il peut ainsi en résulter une perte d'orientations nécessaires pour la liaison de la protéine avec d'autres molécules solubles, l'agrégation de la protéine ou même la présence de lipides résiduels dans les micelles de détergents. Toutefois, nous avons réussi à optimiser notre protocole de purification tout au long de nos expériences et maîtrisé la reproductibilité de nos résultats.

Le même protocole a été appliqué pour la purification de deux autres orthologues de CmpL1 chez *C. glutamicum*: CmpL3 et CmpL4. Cependant, les résultats n'étaient pas très prometteurs et nous avons décidé de focaliser nos efforts sur CmpL1 qui est l'orthologue principal de notre cible MmpL3 *Mtb*. Pour notre deuxième projet en collaboration, le complexe TriAxBC a été également purifié au sein de notre laboratoire puis caractérisé par *SEC*. Un protocole spécifique a été suivi et la protéine était détectable en immunobuvardage de type Western par le *His tag* placé en C-terminal. Enfin, son élution a été réalisée à la suite de l'application d'un gradient d'imidazole.

➤ *Les expériences de biologie structurale et caractérisation biophysique*

Une caractérisation biophysique des transporteurs CmpL1 et TriAxBc a été réalisée afin de déterminer leurs poids moléculaires, état d'oligomérisation et la topologie de leur enveloppe moléculaire *via* des essais **SAXS** (362, 363). Il s'agit d'une technique simple qui demeure encore le tremplin privilégié pour les modélisations des microstructures (364) et qui n'est pas cantonnée par les limites de la résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, le **SAXS** permet de déterminer la dimension et la forme d'une protéine en solution, de l'ordre de 1 à 150 nm, par une simple diffraction aux rayons X. Nos résultats de SAXS pour CmpL1 et TriAxBc étaient prometteurs mais pas assez concluants pour être publiés, nécessitant la poursuite et l'optimisation des expériences. Ainsi, ces résultats ne seront pas abordés dans le contexte de ma thèse. Toutefois, les résultats **SAXS** pour CmpL1 seront brièvement discutés et des données supplémentaires seront présentées en annexe 2 témoignant de nos efforts.

Nous avons aussi décidé de nous concentrer sur la caractérisation des échantillons par microscopie électronique : une technique en pleine émergence et qui permet l'obtention de résolutions structurales plus élevées. Ceci justifie notre choix de la technique de microscopie électronique pour l'analyse structurale de nos transporteurs CmpL1 et TriAxBc. Pour cette partie de travail, nous avons entrepris deux types d'essais sur les instruments de l'Université McGill. Le premier consistait en une caractérisation structurale à faible résolution par microscopie électronique à coloration négative en utilisant le microscope *FEI Tecnai 12 BioTwin 120 kV TEM*. Cette étape nous permettait de générer une carte de densité électronique à faible résolution de la protéine d'intérêt après sélection et classification des particules et leur traitement par des logiciels spécifiques. Elle a servi également pour la vérification de la dilution et la monodispersité de l'échantillon avant sa congélation pour les essais *Cryo-EM*. Cette dernière technique représente notre deuxième type d'essai de microscopie électronique qui permet la caractérisation structurale de la protéine à de plus hautes résolutions. La visualisation des grilles congelées contenant l'échantillon se réalise au moyen du microscope *FEI Tecnai G2 F20 200 kV Cryo-STEM*. Quant au traitement des images et l'analyse poussée des particules, ils sont réalisés à l'aide du microscope *FEI Titan Krios 300 kV Cryo-STEM*. L'ensemble des outils utilisés pour l'analyse et le traitement des résultats de la microscopie électronique seront détaillés dans la section des procédures expérimentales des chapitres deux et quatre.

Pour finir, tenant compte de la complexité de la génération d'une structure tridimensionnelle expérimentalement, la prédiction a été choisie comme premier recours. Les méthodes de prédiction se divisent en deux catégories: les méthodes de modélisation comparative et celles dites *ab initio*. La modélisation comparative nécessite une ou plusieurs matrices homologues entre la séquence de la protéine à prédire et celles résolues expérimentalement. Quant aux méthodes *ab initio*, elles permettent de générer de nouveaux repliements pour des protéines à faible pourcentage d'identité de séquences. La démarche *ab initio* se divise à son tour en deux types de méthodes : *ab initio* pures (basées uniquement sur des notions physiques) et *de novo* (usant de certaines informations disponibles dans des bases de données) (365-367).

Selon Floudas et al. (365, 368), les méthodes dites *de novo* sont actuellement les plus performantes pour aboutir à des modèles prédits généralement à moyenne résolution. Elles se répartissent en deux catégories: les méthodes d'assemblage de fragments et les méthodes hybrides. Afin de parvenir à la modélisation topologique des transporteurs ciblés dans cette thèse, nous nous sommes basés sur une méthode de prédiction hybride. L'avantage d'une telle méthodologie réside dans la combinaison de la démarche d'assemblage des fragments et des simulations de repliement. Ainsi, nous avons opté pour le logiciel *I-TASSER* (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) mis en place par Jeffrey Sholnick et Yang Zhang (7). Il s'agit de la démarche hybride la plus aboutie dans la catégorie de la modélisation par homologie *de novo*. En effet, le « serveur Zhang » incluant l'algorithme informatique *I-TASSER* et ses méthodes dérivées, a été classé au premier rang lors des sept derniers concours *CASP* (*CASP7-13*). Le *CASP* (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*) est un comité ayant mis en place une procédure d'évaluation objective de la performance des méthodes de prédiction (369). L'ensemble de ces résultats de classement est disponible dans la page web *CASP* (<http://www.predictioncenter.org/>).

Cet outil bio-informatique permet la prédiction de la fonction d'une protéine et sa modélisation par analogie structurale à partir de sa séquence d'acides aminés. Il en résulte une classification des modèles homologues en fonction de leurs scores de similitude avec la cible. Le « serveur Zhang » met en œuvre une combinaison de logiciels: *LOMETS* (370), *I-TASSER* (6, 8) et *QUARK* (371). L'algorithme *QUARK* est un outil informatique utilisé pour la prédiction *ab initio* de la structure d'une protéine ainsi que du repliement de ses peptides. L'utilisateur aura recours à cette alternative de prédiction si aucune donnée n'est disponible pour la modélisation de la protéine ciblée à part sa séquence en acides aminés. Quant à *I-TASSER*, il se base sur une banque de données structurales (la banque PDB). *I-TASSER* identifie les matrices homologues (ou *templates*) à la suite d'un processus d'enfilage (ou *threading*) au moyen du programme *LOMETS*. La fragmentation des structures et l'assemblage du modèle prédit se font grâce à des simulations *Monte-Carlo* (372) ainsi que par affinement par les logiciels *REMO* (373) et *FG-MD* (*fragment-guided MD*) (374). La procédure est initiée par la soumission de la séquence d'acides aminés de la protéine à modéliser et la création d'un compte en visitant la page web <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. La procédure de modélisation par *I-TASSER* ainsi lancée, se résume en quatre principales étapes, à savoir : **(1)** identification du modèle; **(2)** assemblage de structure par simulation itérative; **(3)** construction du modèle par affinement à l'échelle atomique et **(4)** prédiction de la fonction de la protéine. L'ensemble des étapes de la démarche *I-Tasser* est illustré par la figure 1-37 et résumé dans le texte de sa légende.

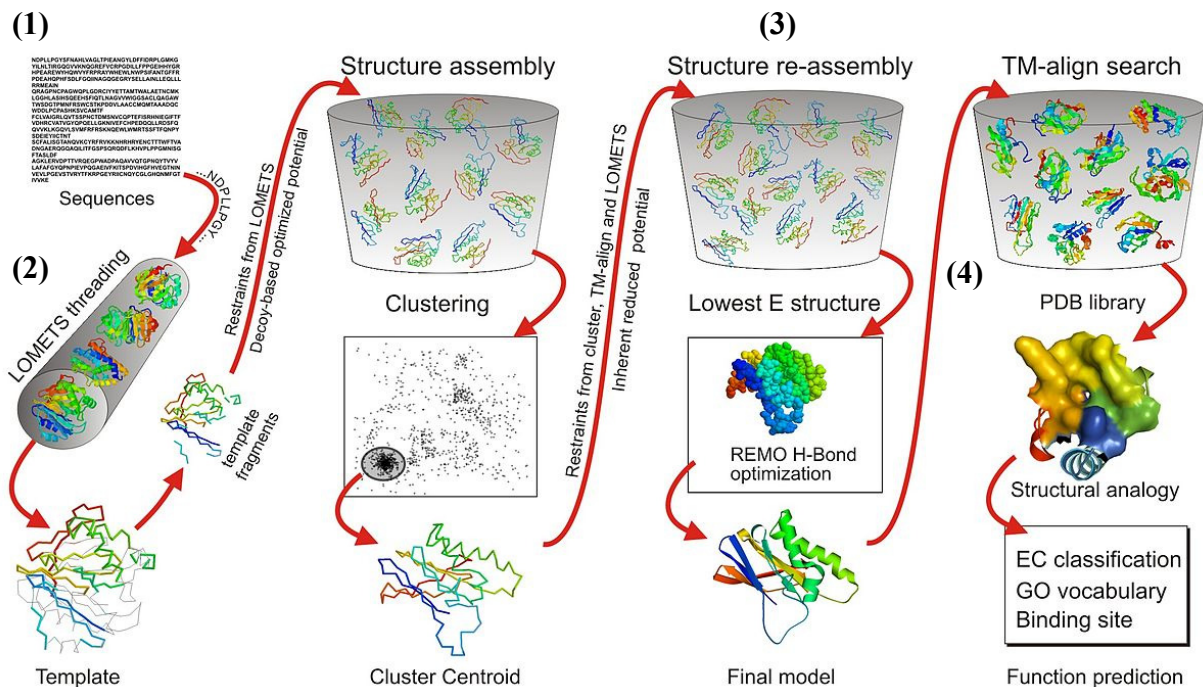


Figure 1-37. Organigramme résumant les principales étapes de la modélisation par le logiciel *I-TASSER*.

(1) La modélisation par *I-TASSER* est initiée par la production de la structure secondaire de la protéine partant de sa séquence d'acides aminés. (2) Ensuite, une étape d'exploration des repliements et des correspondances structurales possibles de cette structure secondaire avec des structures déposées dans la banque PDB s'ensuit. Cette procédure consiste en une étape d'enfilage (ou *threading*) réalisée par le serveur *LOMETS* (370) et qui a pour but l'identification des meilleurs modèles (ou *templates*) à structures secondaires homologues. Ensuite, le programme *I-TASSER* segmente ces modèles en fragments en se basant sur l'alignement de la séquence avec le modèle. Par la suite, les segments correspondant aux régions alignées en continu seront extraits et regroupés avec les régions non alignées élaborées par simulations *ab initio* afin de générer un modèle complet (assemblage guidé par simulation *Monte-Carlo*) (372). (3) L'étape suivante est l'identification des modèles structuraux similaires à ceux issus du premier tour depuis la banque de données PDB. Ceci est effectué par alignement de structures et imposition de contraintes spatiales déduites à partir des modèles. Les modèles ainsi identifiés servent ensuite pour un deuxième tour de simulation par affinement. Le but de cette étape réside dans la construction d'un modèle final par affinement à l'échelle atomique, et ce en optimisant les liaisons hydrogène et en éliminant les encombrements stériques [*FG-MD* (374, 375), *REMO* (373) et *H-Bond*]. (4) La dernière étape est l'identification de la fonction biologique de la protéine. Ceci est réalisé par l'analyse des correspondances entre la structure prédite et celle des protéines à fonctions connues, disponibles dans la base de données des fonctions *BioLiP*. Pour se faire, un alignement structural est effectué au moyen du programme *TM-align* (376). Il en découle une classification selon les scores de similarité globale et locale résultante: *EC-score* (377) et *GO-score* (378) (*Enzyme Commission score* et *Gene Ontology score* respectivement). Des informations sur le site de liaison (ou *binding site*) de la protéine sont également générées. Image reproduite de (Yang et al., 2016) (379).

Nous avons pu mettre au point une nouvelle stratégie de modélisation en affinant la structure du modèle homologue généré par *I-TASSER* contre sa carte de densité électronique à faible ou forte résolution par l'outil *Phenix* (380). Nous avons également eu recours au programme *Coot* pour l'affichage et la manipulation de nos modèles homologues (381). Ce *pipeline* pourrait inspirer de futures recherches et la validation de modèles simplement à partir de leur séquence d'acides aminés. Ce serait un moyen accessible pour pallier l'absence d'une structure cristallographique ou RMN de la protéine étudiée. Le logiciel *PyMOL* (*PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC*) a été utilisé pour la visualisation des structures de nos modèles en 3D et leur superposition (382).

En conclusion, la manipulation des protéines initialement liées à des phospholipides et reconstituées par la suite par du détergent n'est pas exempte de toute modification d'orientation de la protéine ni de perte d'intégrité. De ce fait, les informations structurales résultantes peuvent manquer d'exhaustivité ce qui induit une mauvaise résolution de la structure finale et une sous-estimation du comportement fonctionnel et structural de la protéine. Il est à noter également que ces études structurales, malgré leur contribution dans l'avancement scientifique, restent des méthodes qui exigent des étapes de reconstitution et optimisation. De plus, le caractère amphiphile des protéines transmembranaires nécessite la maîtrise de leur stabilité dans les micelles du détergent, ce qui peut commencer à expliquer la complexité de notre projet de recherche.

1.7.3 Synopsis

L'ensemble de la méthodologie décrite dans cette section sera détaillé davantage dans les chapitres présentés dans cette thèse. Certaines expériences ont été réalisées en collaboration, et chaque contribution sera explicitée dans le chapitre concerné. Les chapitres deux et trois sont représentés dans leur version finale publiée. Le chapitre quatre fait l'objet d'un ajustement de données et d'une préparation pour sa re-soumission. Nous espérons à travers les résultats de nos travaux pouvoir contribuer à la levée de certaines ambiguïtés concernant les transporteurs *RND*.

Chapitre 2: Article 1

Structure-Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from *Mycobacterium tuberculosis*

Présentation de l'article 1

L'article est représenté sous sa forme finale publiée le 14 octobre 2016 dans le journal *ACS Infection Diseases (American Chemical Society)* en tant que co-premier auteur à contribution égale.

ACS Infect Dis. 2016 Oct 14;2(10):702-713. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00095. Epub 2016 Sep 1.

Contribution des auteurs pour l'article 1

HZ, IR, JS and MJ designed the study. JMB, LY, WL generated mutated variants of MmpL3 and performed FM-labeling and functional studies. JMB generated and analyzed the *tmaT* knock-down mutant. SKA analyzed lipids. LY and AY performed the gel filtration studies. AY together with JS generated the CmpL1 and MmpL3 models. AY and LF conducted the negative staining EM. BJ contributed to the refinement of the models. HZ, IR, JS and MJ wrote the manuscript with comments from all authors.

Article 1

Structure-Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from *Mycobacterium tuberculosis*

Juan Manuel Belardinelli^{1*}, Amira Yazidi^{2,3*}, Liang Yang⁴, Lucien Fabre^{3,5}, Wei Li¹, Benoit Jacques², Shiva kumar Angala¹, Isabelle Rouiller^{3,5}, Helen I. Zgurskaya^{4#}, Jurgen Sygusch^{2,3#}, and Mary Jackson^{1#}

* Contributed equally to the work

Co-senior authors

Authors Affiliation:

¹Mycobacteria Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523-1682, USA.

²Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, CP 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Quebec, H3C 3J7, Canada.

³Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), Université de Montréal, CP 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Quebec, H3C 3J7, Canada;

⁴University of Oklahoma, Department of Chemistry and Biochemistry, 101 Stephenson Parkway, Norman, OK 73019, USA.

⁵Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, 3640 University Street, Montréal, Quebec, H3A 2B2, Canada

Running title: MmpL3 structure and function

Conflict of interest: The authors disclose no potential conflicts of interest.

Corresponding authors:

(M.J.) E-mail: Mary.Jackson@colostate.edu.

(H.I.Z.) E-mail: elenaz@ou.edu.

(J.S.) E-mail: jurgen.sygusch@umontreal.ca.

Abstract

The MmpL family of proteins translocates complex (glyco) lipids and siderophores across the cell envelope of mycobacteria and closely related *Corynebacteriaceae*, and plays important roles in the biogenesis of the outer membrane of these organisms. Despite their significance in the physiology and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, and from the perspective of developing novel antituberculosis agents, little is known about their structure and mechanism of translocation. In this study, the essential mycobacterial mycolic acid transporter, MmpL3, and its ortholog in *Corynebacterium glutamicum*, CmpL1, were investigated as prototypical MmpL proteins to gain insight into the transmembrane topology, tertiary and quaternary structures, and functional regions of this transporter family. Our combined genetic, biochemical and biophysical studies indicate that MmpL3 and CmpL1 are structurally similar to Gram-negative Resistance-Nodulation and Division efflux pumps. They harbor twelve transmembrane segments interrupted by two large soluble periplasmic domains, and function as homotrimers to export long-chain (C₂₂-C₉₀) mycolic acids, possibly in their acetylated form, esterified to trehalose. The mapping of a number of functional residues within the middle region of the transmembrane domain of MmpL3 shows a striking overlap with mutations associated with resistance to MmpL3 inhibitors. Our results suggest that structurally diverse inhibitors of MmpL3 all target the proton translocation path of the transporter and that multi-resistance to these inhibitors is enabled by conformational changes in MmpL3.

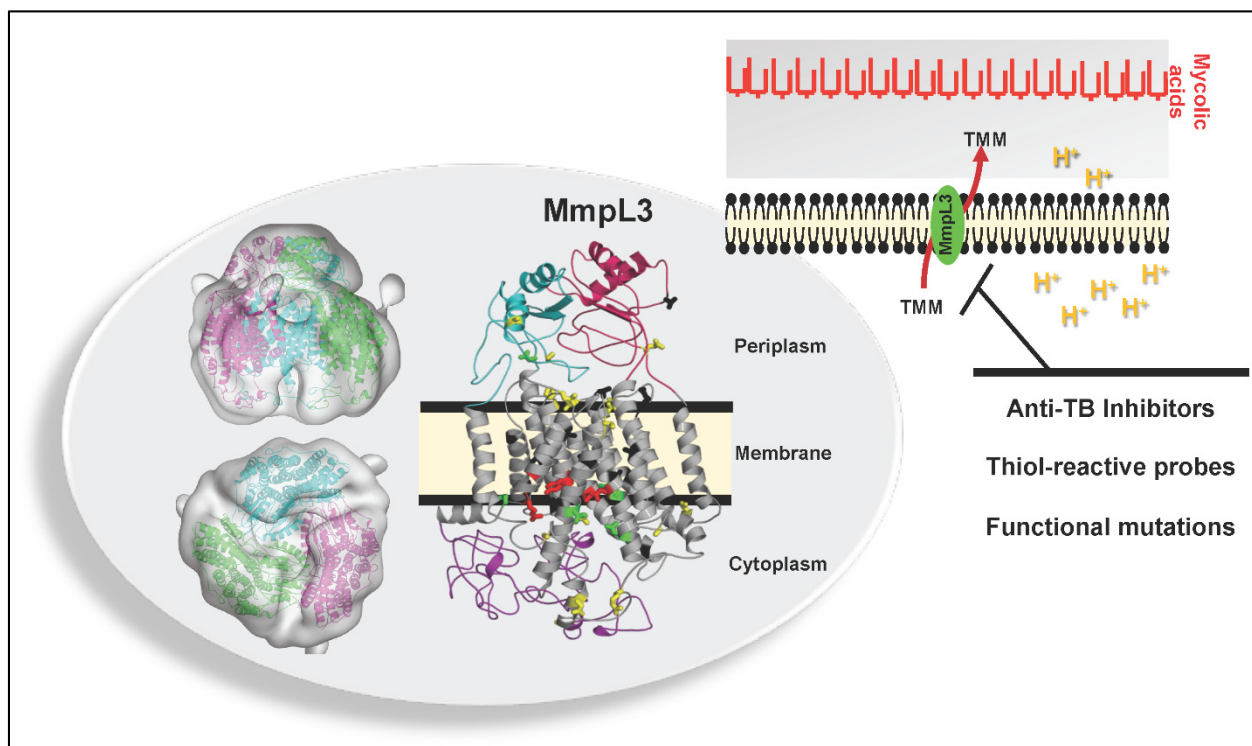
Keywords

Mycobacterium; tuberculosis; MmpL3; acyltrehaloses; mycolic acids; lipid translocation.

Graphical abstract

Structure-function profile of MmpL3, the essential mycolic acid transporter from *Mycobacterium tuberculosis*

Juan Manuel Belardinelli^{1*}, Amira Yazidi^{2,3*}, Liang Yang⁴, Lucien Fabre^{3,5}, Wei Li¹, Benoit Jacques², Shiva kumar Angala¹, Isabelle Rouiller^{3,5}, Helen I. Zgurskaya^{4#}, Jurgen Sygusch^{2,3#}, and Mary Jackson^{1#}



Introduction

In recent years, the MmpL (*mycobacterial membrane proteins, large*) proteins have emerged as critical players in the building of the cell envelope of mycobacteria and closely related *Corynebacteriaceae*. The MmpL family of proteins is a subset of the Resistance, Nodulation, and Division (RND) superfamily of transporters which, in bacteria, archaea and eukaryotes, mediate the proton-dependent export of substrates. Accordingly, they share with other RND transporters a requirement for the electrochemical proton gradient across the inner membrane for activity as well as predicted conserved topological features (46, 190, 218, 323, 324, 383, 384). More than twenty years of genetic and biochemical studies, combined with the availability of multiple crystal structures and computational modeling, have allowed the fundamentals of the mechanisms of action, substrate specificity and energetics of prototypical Gram-negative RND transporters such as the major multidrug efflux pump AcrB of *E. coli* to be relatively well characterized (298, 343, 385).

The genome of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) encodes 13 MmpL proteins, the functions of seven of which have been at least partially established. In comparison, the genome of *Corynebacterium glutamicum* (*Cgl*) encodes only 4 MmpL-like proteins, referred to as CmpLs. Unlike AcrB-type multidrug efflux pumps, the MmpL/CmpL proteins of *Corynebacteriaceae* appear to export endogenous lipophilic molecules rather than exogenous ones, and to display a relatively narrow substrate specificity (46, 195, 331-333, 336, 383). Other than impacting the composition of the mycobacterial cell envelope and thus, indirectly, its permeability to biocides, the MmpL proteins of *Mtb* do not seem to play an active role in drug resistance, exception made of MmpL5 that participates in the active efflux of clofazimine, bedaquiline and azole drugs (46, 189, 339, 344, 386-388). A decade of functional studies indicate that MmpL proteins have specialized in the translocation of physiologically essential and/or biologically active secreted and outer membrane (OM) constituents, including (glyco)lipids and siderophores (46, 195, 331-333, 336, 354, 383). On the basis of their heme-binding properties *in vitro*, two MmpL proteins, MmpL3 and MmpL11, were further proposed to be involved in a heme-iron acquisition system (337, 347). The structure of one of the two soluble periplasmic domains of MmpL11 was solved (324), a transport mechanism based on dynamics simulation was proposed for MmpL5 (389) and the use of prediction algorithms

yielded different topological models for MmpL3 and other MmpL proteins (195, 323, 324, 331, 349, 384). Yet, despite their significance in the physiology and virulence of *Mtb*, and from the perspective of anti-TB drug development (185, 187, 349, 384, 390-396), no full-size MmpL protein has yet been purified and reconstituted *in vitro*. As a result, the transmembrane topology of no MmpL protein had yet been validated experimentally and even basic biochemical properties of these proteins, such as their oligomeric state, determinants of substrate specificity, mechanism of translocation and putative physical association with other inner membrane, periplasmic and/or OM proteins remain to a large extent unknown. In the studies described herein, the essential trehalose monomycolate (TMM) transporter, MmpL3, and its ortholog in *Cgl*, CmpL1 (Ncgl2769), were used as prototypes to gain insight into functional aspects of MmpL transporters, and lay the mechanistic and structural foundations required for the future rational development of novel anti-TB therapeutics targeting this family of transporters.

Results and discussion

Quarternary structure of MmpL3 and CmpL1

A characteristic mechanistic feature of the archetypal AcrB transporter from *E. coli* and MexB transporter from *Pseudomonas aeruginosa* is that these proteins function as obligatory homotrimers (298, 343). To determine whether MmpL or CmpLs proteins form oligomers, we chose MmpL3 and its corynebacterial ortholog, CmpL1 (Ncgl2769; 42% identity; 62% similarity to MmpL3 on a 765 amino acid overlap). Both proteins serve an essential function in the translocation of long-chain (C₂₂-C₃₈ in *Corynebacterium*; C₆₀-C₉₀ in *Mycobacterium*) α -branched, β -hydroxylated fatty acids known as mycolic acids, which are major constituents of the inner and outer leaflets of the OM of *Corynebacteriaceae*. Importantly, MmpL3 is thought to be the target of a number of anti-TB inhibitors under development (185, 187, 349, 384, 390-396). MmpL3 (MW = 101 kDa) and CmpL1 (MW = 83 kDa) which we purified from *Cgl* cells were treated with the amine reactive cross-linker dithiobis (succinimidylpropionate) and the cross-linked proteins were analyzed by immunoblotting. High molecular weight species (~ 300 kDa) became apparent with increasing concentrations of the cross-linker suggestive of protein oligomerization or formation of stable complexes. Based on electrophoretic mobilities, both cross-linked protein samples contained dimeric and trimeric forms that were sensitive to the

addition of the reducing agent dithiothreitol [Fig. S2-1a and data not shown]. Thus, both MmpL3 and CmpL1 are prone to oligomerization. Further size exclusion chromatography analyses indicated that purified CmpL1 is homogeneous and yields a single peak with a molecular weight ~ 315 kDa [Fig. S2-1 a-b] for the protein-detergent complex, which is consistent with a trimeric quaternary structure surrounded by a DDM detergent corona of 65 kDa.

Low resolution structure of CmpL1

We next turned to single particle electron microscopy (EM) to delineate the molecular envelope of CmpL1. Observations of CmpL1 by negative staining revealed a homogeneous distribution of particles $\sim 100\text{\AA}$ in diameter in various orientations on the EM grid [Fig. 2-1a]. The map shown was calculated from 6,701 particles enforcing a C3 symmetry. The autorefine routine stopped at the angular sampling of 3.5 degrees. 2D analysis as well as a probabilistic initial 3D model confirmed a trimeric symmetric shape (C3 symmetry) of the particles [Fig. 2-1 b-c]. Refinement of this model imposing C3 symmetry led to the 18\AA resolution EM map shown in Fig. 2-2.

A model for the 3D structure of CmpL1 was prepared based on its primary amino acid sequence and two top structural homologs, SecDF from *Thermus thermophilus* and *E. coli* AcrB, using the I-TASSER server [Table S2-1] (397). The modeled structure and its fit to the EM envelope are shown in Figure 2-2 and as a movie [movie S2]. Although several other *ab initio* models were built of CmpL1 using the I-TASSER or Phyre2 servers and all models had similar folds of the transmembrane helices, our current model had the advantage of being able to fit into the low resolution EM map by simple rigid body displacements of its periplasmic domains. The EM envelope exhibited a deep central vestibule with three distinct channels and crevasses that afforded facile orientation of the CmpL1 structural model. The clear demarcation between each subunit in the EM envelope is consistent with an organization of the transmembrane domain as clusters of helices and was exploited to reposition the orientations of the two periplasmic domains [thereafter referred to as PN (residues 34-173) and PC (residues 392-511) by analogy to the terminology used for AcrB], the overall tilt of the transmembrane domain and the disposition of the C-terminal region (residues 688-772). The fit of the modeled CmpL1 trimer to the EM envelope was further improved by real space refinement that yielded good metrics shown in Table 2.

CmpL1 and MmpL3 structural features

The refined structure for CmpL1 was then used for template-based modeling of the MmpL3 sequence using I-TASSER and further refined as detailed in the Supporting Methods yielding an initial structural model for the MmpL3 protomer [Fig. 2-3a] and, consequently, of its trimeric quaternary structure [Fig. S2-2]. The two structures are similar and share several conserved features. By analogy with AcrB, the trimeric CmpL1/MmpL3 could be divided into three domains: the periplasmic “porter” domain, the transmembrane proton translocation domain and the C-terminal cytoplasmic domain. The transmembrane domains in each subunit of the refined CmpL1/MmpL3 structure are topologically similar to AcrB and positioned in a region of density in the EM map that forms a continuous belt of density surrounding the CmpL1 trimer, consistent with the expected position of the DDM detergent corona. As in the AcrB structure, TMS-1 of one protomer faces TMS-8 of the neighboring protomer to encircle a central vestibule. TMS-4 and TMS-10 of CmpL1/MmpL3, which contain highly conserved acidic and basic residues [Fig. S2-3], form the core of each transmembrane alpha-helical bundle [Fig. 2-2]. In AcrB, the corresponding charged residues located in TMS-4 and TMS-10, which may be protonated or deprotonated, are essential for activity [Fig. 2-3b and 2-3c]; they appear to be critical not only for proton uptake but also to function as a conformational electrostatic switch that empowers the periplasmic domain to expel substrates (298). The three-fold repeated channels, seen in Fig. 2-2a, are situated on the outer leaflet of the plasma membrane. The central vestibule of the CmpL1/MmpL3 structure is accessible both from the cytoplasm and from the periplasmic channels [Fig. 2-2a]. Although the vestibule interior is lined by hydrophobic residues, it may not be filled by lipids, as it is accessible to negative staining. The large separation between the transmembrane regions of the subunits forms an extensive crevasse and suggests that MmpL3/CmpL1 proteins may be able to capture their TMM substrate from the lipid bilayer as well as from the cytoplasm and sequester it into the vestibule.

The porter domain in MmpL3 is formed by residues L34 through L173 (PN) and L417 through S551 (PC) [Fig. 2-3a]. In AcrB, this domain interfaces with the periplasmic subunit AcrA and contains the substrate-binding pocket accessible from the periplasm and the cytoplasmic membrane (298, 343, 385). The periplasmic PN porter domain in each MmpL3 subunit forms an interaction surface with its counterpart in the adjacent protomer that promotes

the formation of the quaternary structure [Fig. S2-2]. The reorientation of the PN and PC porter domains in order to fill the density in the EM envelope resulted in the formation of a central pore bounded by the PN and PC domains and the periplasmic region of TMS-4 and 10, that can be seen as a hole in the EM map at high contour levels and as a dimple at lower contour levels [Fig. 2-2a]. MmpL3/CmpL1 lacks the TolC-docking domain of AcrB needed for the recruitment of the OM channel TolC. The C-terminal region appears to form a compact structure that interacts with the cytoplasmic side of the TM helices and is unique to CmpL1, MmpL3 and a few other HAE-2 family RND transporters [Fig. 2-2a; Fig. 2-3a; Fig. S2-2] (218).

The modeled structures of the MmpL3 PN and PC periplasmic regions were structurally similar and superimposed with an RMS = 3.05Å, while the structure of the equivalent MmpL11 PC fragment (PDB ID: 4Y0L) (324), homologous to the MmpL3 PC region, displayed the same topological fold as those predicted for the PN and PC regions of our model. The helical axis of TMS-11 is approximately parallel to the 3-fold axis of the MmpL3 trimer [Fig. 2-3a] and has a length of 33Å based on C α carbons. This length is similar to that of TMS that span the transmembrane region in AcrB and SecDF. The estimated heights of the periplasmic and cytoplasmic regions of MmpL3 are 35Å and 25Å, respectively, when defined as cross-sections perpendicular to the 3-fold axis in the MmpL3 model [Fig. 2-2 and Fig. 2-3a].

Model validation

The main approach used here to experimentally validate the topology of MmpL3 in intact cells has consisted of introducing cysteine residues into a recombinant MmpL3 protein expressed in *Cgl* and determining their accessibility to the fluorescent thiol-reactive probe, fluorescein-5-maleimide (FM). FM has been reported to permeate both the outer and inner membranes and to label Cys residues exposed to an aqueous solution but not embedded in a membrane (398). *Cgl* was chosen as an expression system for these experiments as it possesses a cell envelope structurally and functionally similar to that of mycobacteria and prior attempts to express *mmpL3* in *E. coli* and *Mycobacterium smegmatis* (*Msmg*) resulted in lower production yields. Because MmpL3 contains four intrinsic Cys (C24; C216; C332; and C730), we first constructed by site-directed mutagenesis a triple cysteine MmpL3 mutant (Δ Cys-MmpL3) in which C24, C332 and C730 were replaced by serine residues.

When expressed in *Cgl*, Δ Cys-MmpL3 did not react with FM indicating that the remaining C216 residue of MmpL3, most likely due to its localization in TMS-3, may not need to be mutated since it does not generate any background signal [Fig. 2-4a]. Importantly, the ability of Δ Cys-*mmpL3* expressed from the mycobacterial expression plasmid pMVGH1 to rescue the growth of an *mmpL3* null mutant of *Msmg* indicated that this variant had retained an active conformation (see functional studies further in the text). Cys residues were introduced at 30 different positions of the predicted transmembrane domains of Δ Cys-MmpL3 and in the loops bracketing these domains [Fig. S2-3], and the resulting mutants were produced as Strep-tagged proteins in the *Cgl* strain LY108 (46). Upon labeling of the recombinant strains with the fluorescent probe FM, the Δ Cys-MmpL3 variants were purified to confirm expression [Fig. S2-3a] and determine their labeling status [Fig. 2-4b]. All six extracellular loops were confirmed by labeling at least one Cys residue located in the predicted loop [Fig. 2-3a; Fig. S2-3b]. The periplasmic localization of the two large soluble loops (PN and PC) and cytoplasmic localization of the C-terminus of MmpL3 in their natural mycobacterial environment was further confirmed by expressing three MmpL3-GFP fusions, one in each of the two large soluble loops and one at the C-terminal end of the *Msmg* MmpL3 protein, in *Msmg* using the reporter plasmids pJB(-) and JB(+) [Fig. 2-4c; Fig. S2-3b] (332). Altogether, our topology studies thus support the MmpL3 model shown in Fig. 2-3.

Identification of functional residues in MmpL3

To identify potential functional residues in MmpL3, sequence alignments of the entire MmpL3 protein were first conducted against the NCBI database, Gram-negative and Gram-positive RND transporters, and the mycolyltransferases encoded by *fbpA*, *fbpB* and *fbpC* with which MmpL3 is expected to share the ability to bind trehalose and/or mycolic acyl chains. This analysis produced limited meaningful alignments outside RND transporters. Expectedly, MmpL3 was most similar to other *Mtb* MmpL proteins. Conserved residues are located for the most part in TMS domains [Fig. S2-4]. Most striking is the conservation of charged residues in TMS-4, TMS-10 and TMS-12 of all MmpL proteins: D251, D640, D710 and R715 in MmpL3 (189, 323, 389, 399). The location of these residues suggests that they may be the functional analogs of the AcrB D407, D408 (TMS-4) and K940, R971 (TMS-10) residues required for

proton translocation and conformational changes (298). R259 located in TMS-4 is also conserved [Fig. S2-4]. Also, worth noting is the conservation among MmpL proteins of a proline residue in TMS-6 (P330 in MmpL3) [Fig. S2-4] and the presence of two additional, albeit non-conserved, prolines in TMS-7 of MmpL3 (P402 and P413). Proline residues in the TMS of various transporters have been previously implicated in functionally significant conformational transitions (400, 401).

To assess whether any of these conserved MmpL residues were important for the function of MmpL3, we mutated them by site-directed mutagenesis and analyzed the ability of the different MmpL3 mutants to rescue the viability of an *Msmg mmpL3* knock-out mutant (*MsmgΔmmpL3*), indicative of active TMM export. Inability to disrupt *mmpL3* in *Msmg* in the presence of some mutated copies of MmpL3 from *Mtb* indicates, on the contrary, that the activities of these mutated forms of the transporter are not sufficient to sustain growth. In addition to the MmpL3 variants mutated in the charged residues and proline residues described above, the Cys-mutated ΔCys-MmpL3 variants used in our topology studies and an additional 20 Cys-mutated variants selected to probe the various cytoplasmic and periplasmic loops of the transporter [Fig. S2-3b] were tested for activity in *Msmg* (a total of 59 Cys-mutated variants tested). That all MmpL3 variants were produced in *Msmg* was verified by immunoblotting using rabbit polyclonal antibodies raised against the soluble C-terminal domain of MmpL3 [Fig. 2-5a]. Most mutants were produced at comparable if not greater levels than the control, ΔCys-MmpL3, with the exception of S288T, S288C, Q304C, D550C, S691C, whose expression levels were 40 to 60% less [Fig. 2-5a].

Of all the *mmpL3* mutants tested, seven failed to rescue the growth of *MsmgΔmmpL3* despite three independent attempts at 30 and 37°C: D251C; S288C; G543C; D640C; Y641C; D710C; R715C. Five of these mutants correspond to the conserved charged (or immediately adjacent) TMS-4, TMS-10 and TMS-12 residues D251, D640, Y641, D710 and R715 [Fig. 2-3b-c and Fig. S2-4] thought to be involved in proton translocation and conformational changes. In the MmpL3 model, all of these residues are co-localized in the core of the transmembrane domain and likely to be functionally linked by forming a putative “proton relay” site. The sixth inactive mutation, S288C, is located in TMS-5 and co-localizes in the MmpL3 model with the same putative “proton relay” site [Fig. 2-3a]. S288 is highly conserved among MmpL proteins

[Fig. S2-4] and its functional significance is likely related to that of other residues at this site. Interestingly, a missense mutation changing S288 to a threonine was associated with high-level indolecarboxamide and adamantyl urea resistance in *Mtb* (394). The fact that a S288T mutant was able to rescue the viability of *MsmgΔmmpL3* whereas the S288C mutant was not [Fig. 2-5] indicates that an oxygen to sulfur change at this position of MmpL3 dramatically reduces activity. In line with these observations, mutations in other residues located in the proposed proton relay site [G253 in TMS-4] or proximal to that site [the conserved R259 TMS-4 residue mentioned above and the MmpL-conserved T675 residue in TMS-11], while capable to rescuing the viability of *MsmgΔmmpL3*, significantly reduced MmpL3 activity based on growth on 7H11 agar and mycolic acid transfer to arabinogalactan [Fig. 2-5].

The seventh inactive mutant, G543C, is located on the modeled interface between PN and PC of the porter domain [Fig. S2-2]. G543 is also highly conserved among MmpL proteins [Fig. S2-4]. Interestingly, the Cys substitution of another highly conserved residue located in the same region, D550, also significantly reduced the activity of MmpL3 [Fig. 2-5b-c]. In the model, D550 lines the channel's entrance [Fig. S2-2]. Thus, both G543C and D550C are likely to affect the same functionally important interface between the two large periplasmic loops, possibly reducing the channel's activity.

Other mutations that significantly reduced MmpL3 activity included Q304 (periplasmic loop between TMS-5 and TMS-6) which points into the vestibule and lines the pore, and both P625 (periplasmic loop between TMS-9 and TMS-10) and S691 (periplasmic loop between TMS-11 and TMS-12; MmpL-conserved) which also line the pore [Fig. 2-3a]. The P330C, P402C and P413C mutants were functional and restored wild-type growth in *MsmgΔmmpL3* indicating that these Pro residues do not play a critical role in substrate export.

To finally determine whether mutations affecting the activity of MmpL3 had any impact on the susceptibility of *Msmg* to drugs affecting cell wall synthesis or other processes, our entire collection of *Msmg* strains expressing Cys-mutated ΔCys-MmpL3 variants was tested for susceptibility to penicillins, isoniazid, ciprofloxacin and rifampicin. While most of the mutants tested showed no significant differences in MICs relative to their control parent, the S288T, D550C and S691C mutants shown in Fig. 2-5 b-c displayed four- to eight-fold increased susceptibilities to penicillins and rifampicin [Table S2-2] suggestive of the increased

permeability of their cell envelope to these drugs and/or of the hypersusceptibility of these mutants to drugs affecting cell wall biosynthetic processes. The same three mutants displayed, in contrast, parental susceptibility to isoniazid and ciprofloxacin [Table S2-2].

The C-terminal domain of MmpL3 is not essential for activity

The cytoplasmic C-terminal domain of MmpL3 was proposed to mediate the subcellular localization of MmpL3 at the poles and septa of dividing *Msmg* cells where the *de novo* biosynthesis of mycolic acids and peptidoglycan is thought to occur (402). To determine whether the soluble C-terminal segment of MmpL3 from *Mtb* was required for growth, seven C-terminally truncated versions of MmpL3 terminating the protein at residues 915, 859, 777, 762, 750, 744 and 721 were cloned in the mycobacterial expression plasmid pMVGH1 and tested for their ability to rescue the growth of *Msmg* Δ *mmpL3*. All truncated versions of MmpL3 were functional and restored wild-type growth in the complemented mutants, with the exception of the shorter one interrupting the protein at residue 721 (located in TMS-12) which failed to express in *Msmg*. Thus, the C-terminal domain of MmpL3 is apparently not essential to the activity of the transporter or cell division/cell growth.

Chemical modification of cysteines identifies the periplasmic functional site of MmpL3

As a complementary approach to the functional assessment of the MmpL3 mutants in *Msmg*, we tested whether the replacement of amino acid residues by cysteines rendered MmpL3 susceptible to inhibition by thiol-reactive agents. To this end, *Msmg* Δ *mmpL3* strains expressing all of the functional Δ Cys-*mmpL3* mutants described above were tested for susceptibility to the sulfhydryl-reactive agents, ebselen and 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate (MTSES). While the treatment of *Msmg* Δ *mmpL3* cells expressing the parent Δ Cys-MmpL3 protein with ebselen had no effect on growth at concentrations up to 40 μ g/ml, the addition of 10 μ g/ml ebselen to cells producing Δ Cys-MmpL3 with Cys substitutions at positions Q40, Y235, and P625 reproducibly inhibited growth. Likewise, incubation with MTSES (512 μ g/ml) inhibited the growth of cells producing Δ Cys-MmpL3 variants with Cys substitutions at positions P625 and V694 (greater than 4-fold increase in susceptibility relative to the parent strain Δ). The amino

acid residues identified through this approach map to various periplasmic regions of MmpL3 (Q40 at the subunit interface in PN; Y235 between TMS-3 and TMS-4; P625 between TMS-9 and TMS-10; V694 between TMS-11 and TMS-12) [Fig. 2-3a], vicinal to the pore identified in CmpL1. That growth inhibition in these mutants was caused by the loss of activity of MmpL3 was verified by analyzing mycolic acid transfer to outer membrane lipids in the treated cells upon metabolic labeling with [1,2-¹⁴C] acetic acid. In all cases, a build-up in TMM that accompanied a decrease in TDM formation was observed [Fig. S2-5]. That the proposed role of MmpL3 in heme-iron import contributes to growth defect is unlikely given the ability of the *Msmg* recombinant strains used herein to produce siderophores and, thus, to use the ferric ion present in the different culture media (337, 347).

Collectively, our functional studies show that functionally important residues of MmpL3 are clustered into three sites: the central region of the transmembrane segments, the interface between the transmembrane and the porter domains vicinal to the pore structure, and the interface between the PN and PC loops of the porter domain that includes the channel feature. The transmembrane site is very extensive and, in addition to TMS-4 and TMS-10, also includes residues from TMS-12. It is unlikely that all of these residues contribute to proton translocation, but they could also be essential for proton-driven conformational changes in the transporter. Alternatively, these residues line the large shared substrate-proton binding pocket. The interface between the transmembrane and the porter domain could be important for communicating conformational changes between the two domains.

TmaT acetylation is required for the export of TMM in mycobacteria

A recent study suggested that the acetylation of TMM by the *Cgl* acetyltransferase TmaT may be a prerequisite for the export of TMM in this species (191). TMM acetylation would follow the transfer of mycolic acids onto trehalose by Pks13 (403) and, perhaps, serve as a signal for export by MmpL3 or another component of the mycolic acid translocation machinery. Whether acetylation is required for TMM export in mycobacteria was not known. To address this question, we generated a conditional *tmaT* (*MSMEG_0319*) knock-down of *Msmg* [Fig. 2-6a] and analyzed the effect of silencing this gene on bacterial growth and cell envelope biogenesis. *MSMEG_0319* displays 41% identity (53% similarity) with the *Cgl* TmaT enzyme,

and 74% identity (81% similarity) with *Mtb* TmaT (Rv0228) whose encoding gene was predicted to be essential based on saturation transposon mutagenesis (404). Growth of *Msmg* Δ *tmaT*/pSETet-*tmaT* in the absence of ATc where the expression of *tmaT* is lost led to cell death clearly indicating that this gene is essential for growth [Fig. 2-6b]. An ATc concentration-dependent reduction in TDM synthesis and mycolic acid transfer onto cell wall arabinogalactan that accompanied an accumulation of TMM followed *tmaT* silencing [Fig. 2-6c]. These effects were not observed in the control strain (*Msmg*/pSETet-*tmaT*) [Fig. 2-6c] and are reminiscent of those caused by the silencing of *mmpL3* (185). In conclusion, similar to the situation in *Cgl*, *tmaT* silencing impacts TMM export in mycobacteria. However, in contrast to the situation in *Cgl* where *tmaT* inactivation only partially inhibits trehalose dicorynomycolates formation and does not significantly affect the transfer of mycolates to arabinogalactan (191), *tmaT* silencing in *Msmg* had a much more drastic effect on the cells, abolishing both the transfer of mycolic acids onto cell wall arabinogalactan and TDM formation, and resulting in cell death. The fact that two CmpL transporters (CmpL1 and CmpL4) participate in the export of TMM in *Cgl* (46, 195) one of which may translocate non-acetylated TMM - while only MmpL3 carries out this function in *Msmg*, may account for the different impact of silencing *tmaT* in the two species.

Resistance to MmpL3 inhibitors localizes to the putative proton path of MmpL3

Several chemical scaffolds were reported to inhibit *Mtb* growth through the inhibition of MmpL3. Resistance mutations were specifically mapped to MmpL3 and, in some cases, the same mutations enabled resistance to different classes of inhibitors (185, 187, 349, 390-395). For example, missense mutations changing S288 to a threonine were associated with high-level indolecarboxamide and adamantyl urea resistance in *Mtb* (394). In the MmpL3 model, frequently encountered resistance mutations cluster in the middle of the transmembrane domain and spatially overlap with functional residues [Fig. 2-7]. Resistance mutation L189R maps to TMS-2, L215S to TMS-3, G253E to TMS-4, S288T to TMS-5, T311I to TMS-6, S591I to TMS-9, F644I/L to TMS-10, V684A/G to TMS-11, and A700T to TMS-12. In most cases, these mutations significantly change the size or the polarity of amino acid side chains and, therefore, are likely to impact the packing of the TMS helices including that of the molecular architecture

of the functional residues. These results suggest that the inhibitors might target the proton relay site of MmpL3 and that the conformational changes at this site enable resistance. Continued transport activity in face of such conformational changes suggests plasticity in the substrate/proton translocation mechanism.

Conclusions

The studies described herein significantly advance our understanding of the structure and mechanism of translocation of HAE2 family proteins in *Corynebacteriaceae*. The negative staining electron microscopy map of CmpL1 validated the essential structural features of the *ab initio* sequence-derived model for CmpL1 and delineated a molecular architecture that resembles, in overall size and shape, the prototypical Gram-negative RND transporters. A number of critical functional residues were identified that map to the middle of the transmembrane helices of the transporter where resistance mutations to MmpL3 inhibitors have been reported. These regions of MmpL3 thus define areas of susceptibility to chemical inhibition that may further be exploited in the process of inhibitor screening and optimization. Importantly, the nature and location of the resistance mutations point to conformational changes as being the likely mechanism through which mutations may prevent inhibitors from accessing their binding site on MmpL3, and provide the first plausible explanation as to how the same mutation may confer resistance to multiple chemical scaffolds. More studies are in progress in our laboratories to validate the specific role of these functional residues and resistance mutations, and map the (Ac) TMM-binding site.

Another critical question that remains to be addressed is that of the extent of (Ac)TMM translocation mediated by MmpL3 and, in particular, whether this transporter captures its substrate from the periplasmic and/or the cytoplasmic face of the plasma membrane. Our results suggest a putative substrate/proton translocation path within the transporter implicating a periplasmic pore structure and spanning from the transmembrane to the periplasmic porter domain. The existence of a potential transmembrane transport tunnel linking the cytoplasm with the periplasm in MmpL proteins was also supported by molecular dynamical simulations from an *ab initio* modeled MmpL5 structure (389). Such a pathway is consistent with what is known of the mechanism of translocation of HAE1 RND transporters that capture their substrates from

both sides of the plasma membrane. Our observation that the last acylation steps of the substrates of MmpL10 (i.e., di- and penta-acyltrehaloses) occur on the periplasmic face of the plasma membrane, (332) suggest that MmpL proteins may be able to capture their substrates from the outer leaflet of the plasma membrane, and thus participate in the intermembrane transport of (glyco) lipids across the periplasm, in addition to translocating them across the plasma membrane. If this is the case, however, CmpL1/MmpL3, similar to HAE1 RND efflux pumps, would have to function with other periplasmic adapters, OM proteins and, perhaps, inner membrane transporters to bring (Ac)TMM to the cell surface as their overall length (100Å of which an estimated 35Å extends in periplasmic space) is not compatible with a direct delivery of their substrates to the OM (the thickness of the mycobacterial/corynebacterial cell envelope is in the range of ~ 35-40 nm) (133, 134). Studies on the export of sulfolipids (329), phthiocerol dimycocerosates (339, 405), glycopeptidolipids (342, 406) and siderophores (331) in fact concur to support the existence of such additional transporters. Their definition and functional characterization represent an exciting field of study that awaits further investigations.

Methods

Expression and purification of WT and mutated MmpL3 and CmpL1 proteins in Cgl

Cgl cmpL1 WT and the *Mtb* MmpL3 Cys-mutated variants used in topology determination were expressed in *Cgl* ATCC 13032 from the multicopy IPTG-inducible expression plasmid pAN6, in-frame with the eight amino acid sequence of StrepTag-II (407). The C-terminally truncated and point-mutated *Mtb* MmpL3 genes used in functional and topology studies were generated using standard PCR and two-step PCR overlap methods, respectively. For functional studies, the MmpL3 mutants were expressed from the mycobacterial replicative plasmid, pMVG1, under control of the *hsp60* promoter (185), and analyzed for their ability to rescue the viability of an *Msmg mmpL3* knock-out mutant (*MsmgΔmmpL3*), indicative of active TMM export. See Supplementary Methods in the Supporting Information for details.

Transmembrane topology mapping of MmpL3

Membrane fractions prepared from IPTG-induced *Cgl* LY108 cells (46) harboring pAN6 expression plasmids were treated with fluorescein-5-maleimide and the reaction was terminated by addition of DTT. MmpL3 Cys-mutated variants were then purified by anti-Strep affinity chromatography from the membrane fractions prior to separation by SDS-PAGE. The fluorescence was measured using Storm™ (GE Healthcare) and protein amounts visualized by silver nitrate staining. The subcellular localization of the soluble loops and C-terminal domain of the *Msmg* MmpL3 protein (MSMEG_0250) expressed in *Msmg*, was further investigated by generating MmpL3-GFP fusions in the expression plasmids pJB(-) and JB(+) as described (332). See Supporting Information for details.

Structural modeling

I-TASSER (7) was used to prepare a model for the 3D structure of CmpL1 based on its primary amino acid sequence and the trimeric quaternary structure of CmpL1 was next built using the AcrB structure (PDB ID: 3D9B) as detailed in the Supplementary Methods.

Construction of a MSMEG_0319 knock-down mutant of Msmg

A conditional knock-down of *Msmg* expressing *MSMEG_0319* (*tmaT*) under control of an *anhydro*-tetracycline-inducible promoter from plasmid pSETetR was generated by homologous recombination as described (185). See Supporting Information for details.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Potts Memorial Foundation (to MJ), the National Institutes of Health / National Institute of Allergy and Infectious Diseases grants AI116525 (to MJ) and AI092486 (to H.I.Z), and by GEPRON – FRSQ Intramural funding (to J.S, I.R., A.Y. and L.F.). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH. We thank Dr. Michael Bott (Institut für Bio- und Geowissenschaften, Germany) for the pAN6 expression plasmid. The Facility for Electron Microscopy Research at McGill University (FEMR) provided access to electron microscopes. Proteomics analyses were performed by the Center for Advanced Proteomics Analyses at the Université de Montréal, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network that is supported by the Canadian Government through Genome Canada.

Table

Table 2. Real-space refinement of CmpL1 model against the EM envelope.

Metric	
Resolution of EM map	16-20Å
Map CC ^a	0.742
rmsd (bonds):	0.01Å
rmsd (angles):	2.10°
All-atom clashscore ^b	34.4
Ramachandran plot:	
outliers:	1.17 %
allowed:	24.81 %
favored:	74.03 %
Rotamer outliers:	2.58 %
C-beta deviations:	9

^a Correlation coefficient between map density and atomic coordinates of model

^b calculated as 1000 * (number of bad overlaps) / (number of atoms)

Figures

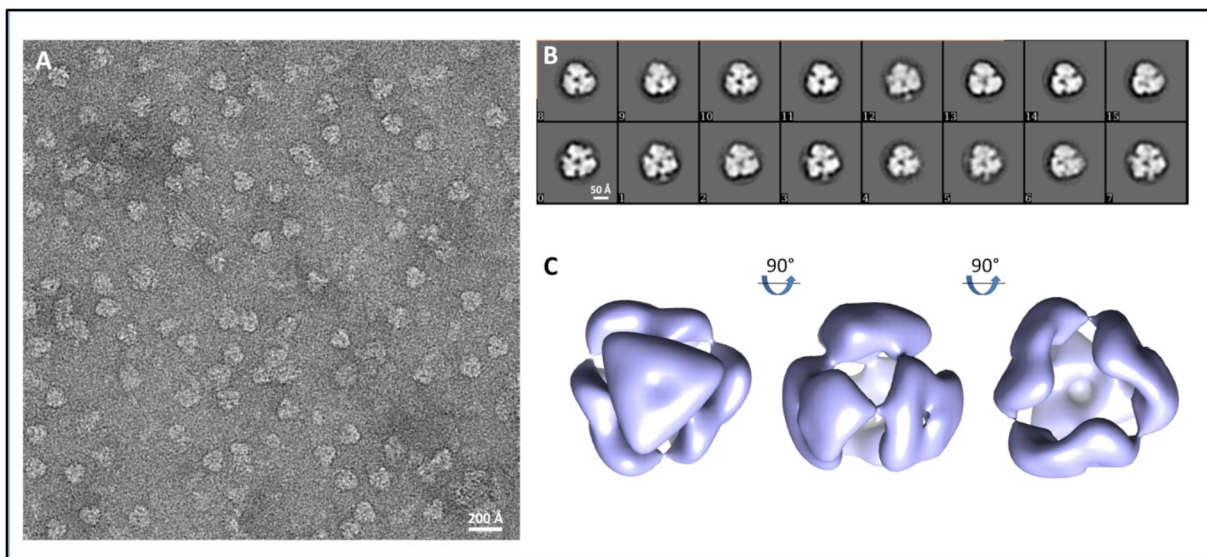


Figure 2-1. Negative staining electron microscopy of CmpL1.

(a) Field of view showing purified CmpL1 particles negatively stained with uranyl formate. (b) Representative two-dimensional class averages of particles at different orientations. (c) *Ab initio* 3D reconstruction of CmpL1 contoured at high relative density to emphasize structural features.

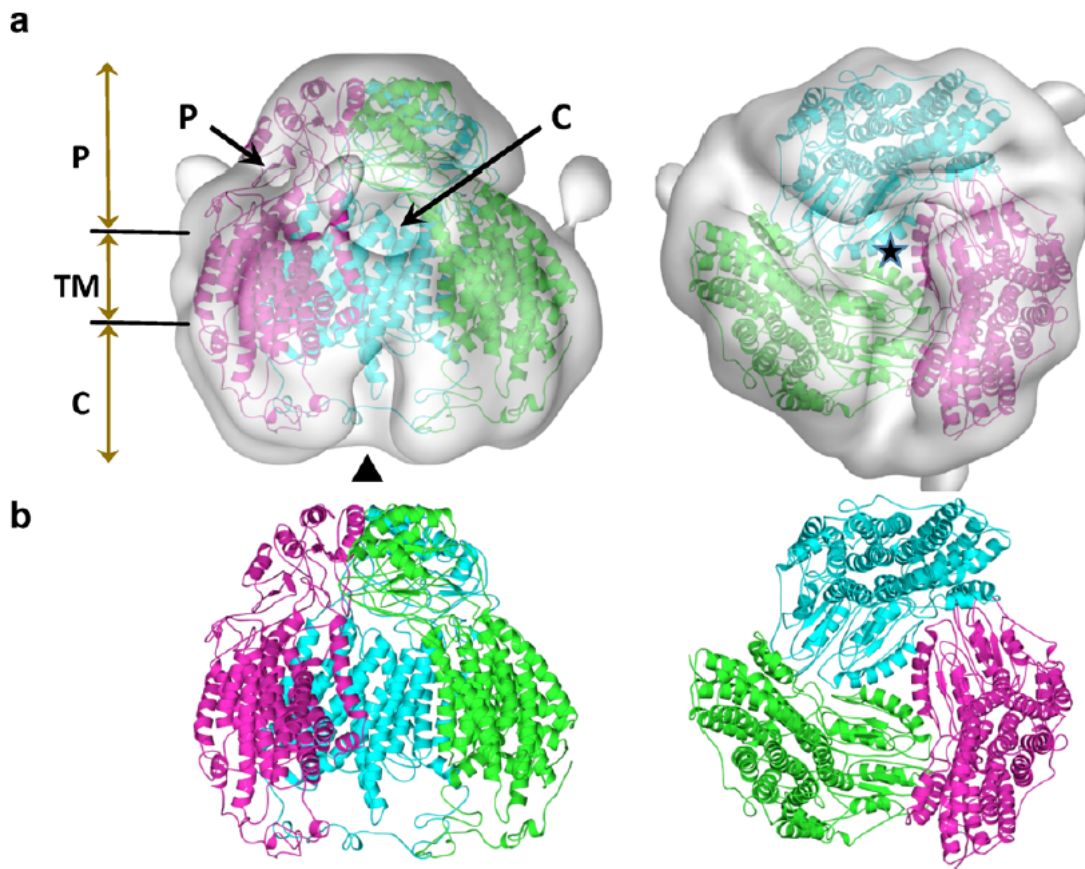


Figure 2-2. Superposition of the refined CmpL1 modeled structure onto the 3D negative staining EM maps.

CmpL1 subunits are colored cyan, green and red to render them distinguishable. From left to right, the images in panels (a) and (b) are shown rotated by 90° relative to horizontal plane with view either parallel or perpendicular to the 3-fold rotation axis. (a) Reconstructed CmpL1 3D EM map with surface contoured at a relative level = 3, with refined CmpL1 structure depicted by its secondary structure elements. The EM map is shown as semi-transparent. The vestibule region in the CmpL1 trimer is marked by a star in the right panel (a), while **P** designates the pore structure located between the TM helices and the periplasmic domain of a subunit; **▲** locates the subunit interface region which forms a crevasse on the inner leaflet side and leads into the vestibule, and **C** designates a channel leading from the outer leaflet into the vestibule. The vertical lettering **P**, **TM**, and **C** on the left hand side of the upper initial figure corresponds to the periplasmic region of CmpL1, its transmembrane region and the cytoplasmic accessible side, respectively. (b) The corresponding images of the refined CmpL1 structure used to fit the EM map.

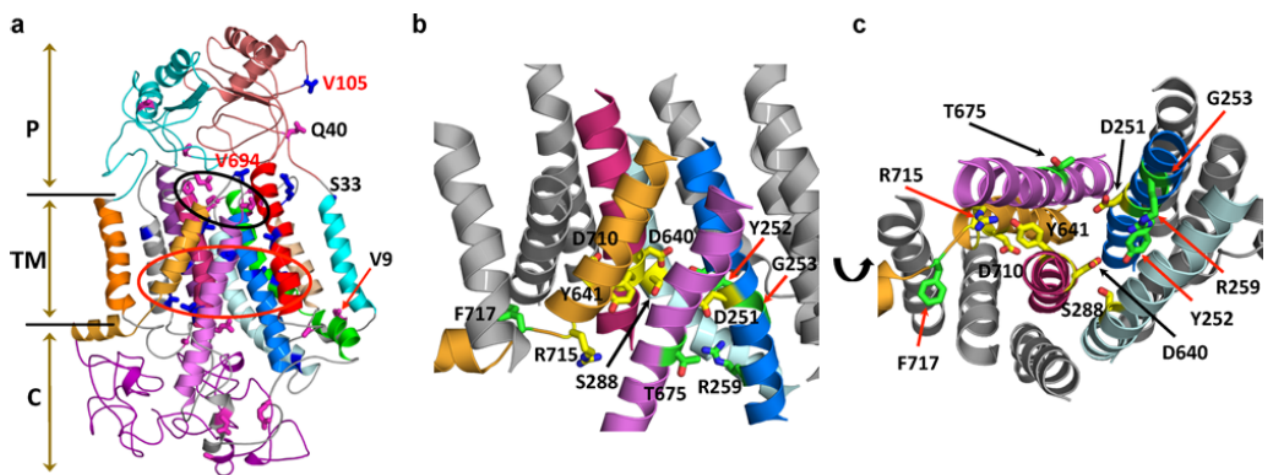


Figure 2-3. Structural model for the MmpL3 transporter.

(a) Model showing the secondary structure elements of the MmpL3 subunit derived by threading the MmpL3 amino acid sequence onto the CmpL1 structural template using I-TASSER. Residue side chains whose mutations to Cys residues were accessible to the fluorescein-5-maleimide (FM) probe are shown in pink, while inaccessible residues are shown in blue. The letters **TM**, **P** and **C** on the left hand side refer to the transmembrane region, periplasmic and cytoplasmic accessible side of MmpL3, respectively. The TM helices are color coded to improve visibility. From left to right TMS-7 (orange), TMS-9 (gray), TMS-8 (violet purple), TMS-10 (pink), TMS-12 (bright orange), TMS-11 (violet), TMS-5 (pale cyan), TMS-4 (marine), TMS-6 (green), TMS-2 (red), TMS-3 (wheat) and TMS-1 (cyan). The periplasmic domains PN (34-173) and PC (417-551) are colored deep salmon and cyan, respectively. The C-terminal region (729-944) is colored purple. Residues lettered red, namely V105 and V694, situated in the periplasmic region of MmpL3 and whose Cys mutations were inaccessible to FM were not solvent accessible in the MmpL3 model which may preclude their accessibility to the probe. The pore region is circled in black and encompasses probe accessible Cys mutant residues Y235, Q304, L615, P625, and S691. (b) The region, circled in red in (a), encompasses residues whose Cys mutations resulted in significant reduction in transport activity, shown in green, and residues whose Cys mutation abolished transport activity, colored yellow (c) The image is the same as in (b) with view rotated 90° and looking down from the cytoplasmic side. In (b) and (c), only the helices which contributed the side chains affecting transport activity are colored: TMS-10 (pink), TMS-12 (bright orange), TMS-5 (pale cyan), TMS-4 (marine); TMS-11 (violet).

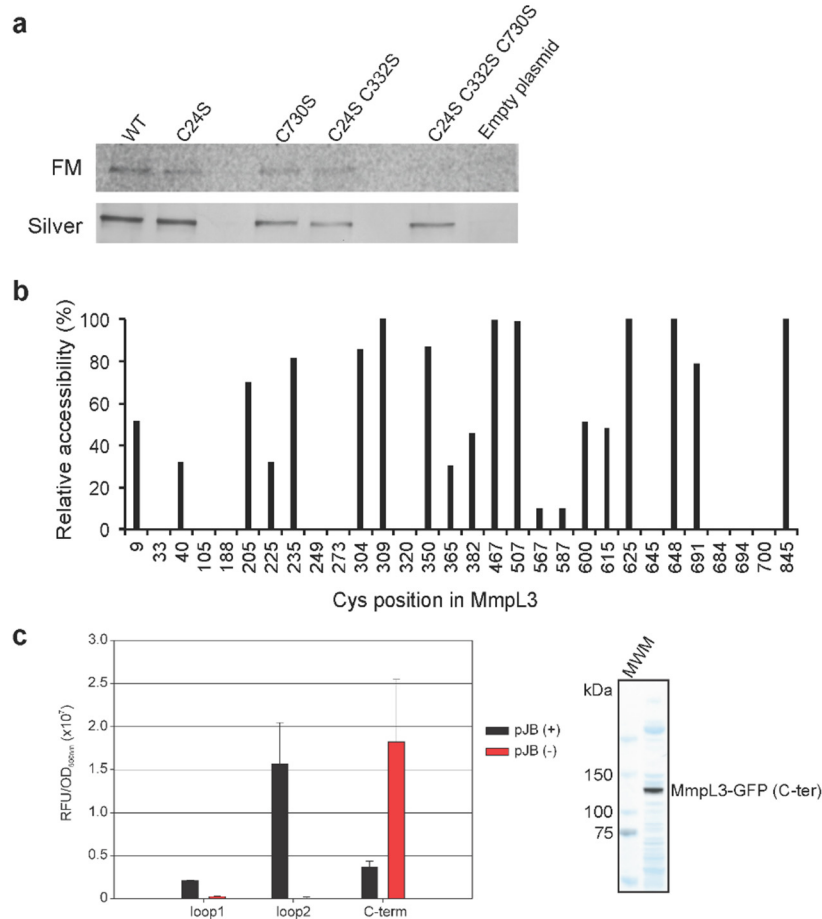


Figure 2-4. Transmembrane topology of MmpL3.

(a) FM labeling of *Cgl* LY108 cells harboring either an empty pAN6 plasmid, or expressing WT *Mtb* MmpL3 (WT) or variants of this protein in which one or more of the endogenous Cys residues (C24, C332 and C730) were mutated to serine. (b) Accessibility of the Cys-substituted Δ Cys-MmpL3 variants to modification with the thiol-reactive fluorescent probe, FM. *Cgl* cells harboring expression plasmids encoding the indicated Δ Cys-MmpL3 variants were induced with IPTG and membrane fractions were isolated as described in the Supplementary Methods. Upon labeling with FM, the reactions were quenched with DTT, membrane proteins solubilized with detergent and the Δ Cys-MmpL3 variants were purified by affinity chromatography. Fractions containing the eluted proteins were separated by 8% SDS-PAGE and fluorescence quantified using a Storm Imager and ImageJ software. The Δ Cys-MmpL3 variant harboring the A845C substitution in the cytoplasmic C-terminal domain was highly accessible to FM modification and was used as a positive control in all experiments. The fluorescence intensity of each of the Δ Cys-MmpL3 variants was expressed relative to the fluorescence intensity of the Δ Cys-MmpL3 mutant harboring the A845C substitution arbitrarily set to 100%. (c) Subcellular localization of the two large soluble loops and C-terminal end of MmpL3 in *M. smegmatis* (*Msmg*). In-frame 3' fusions between residues 171 (loop 1), 563 (loop 2) or 1013 (C-term) (of MmpL3 and GFP were generated in pJB(-) and JB(+) as described in the Supplementary Methods section. Left

panel: Fluorescence intensities were normalized to the OD₆₀₀ of the cultures. The differences in fluorescence intensities between *Msmg* pJB(-)/(+) *mmpL3*-171, pJB(-)/(+) *mmpL3*-563 and pJB(-)/(+) *mmpL3*-1013 transformants were statistically significant per Student's *t*-test ($p < 0.05$) and confirmed the periplasmic location of the two large soluble loops of MmpL3 and the cytosolic location of its C-terminal domain. Right panel: SDS-PAGE analysis of the C-ter GFP-tagged MmpL3 protein (fused to GFP at residue 1013). Fluorescent MmpL3-GFP was detected by PhosphorImager. A fluorescent band is visible at the expected size (~ 140 KDa) by superimposing the PhosphorImager image with the Coomassie blue-stained gel.

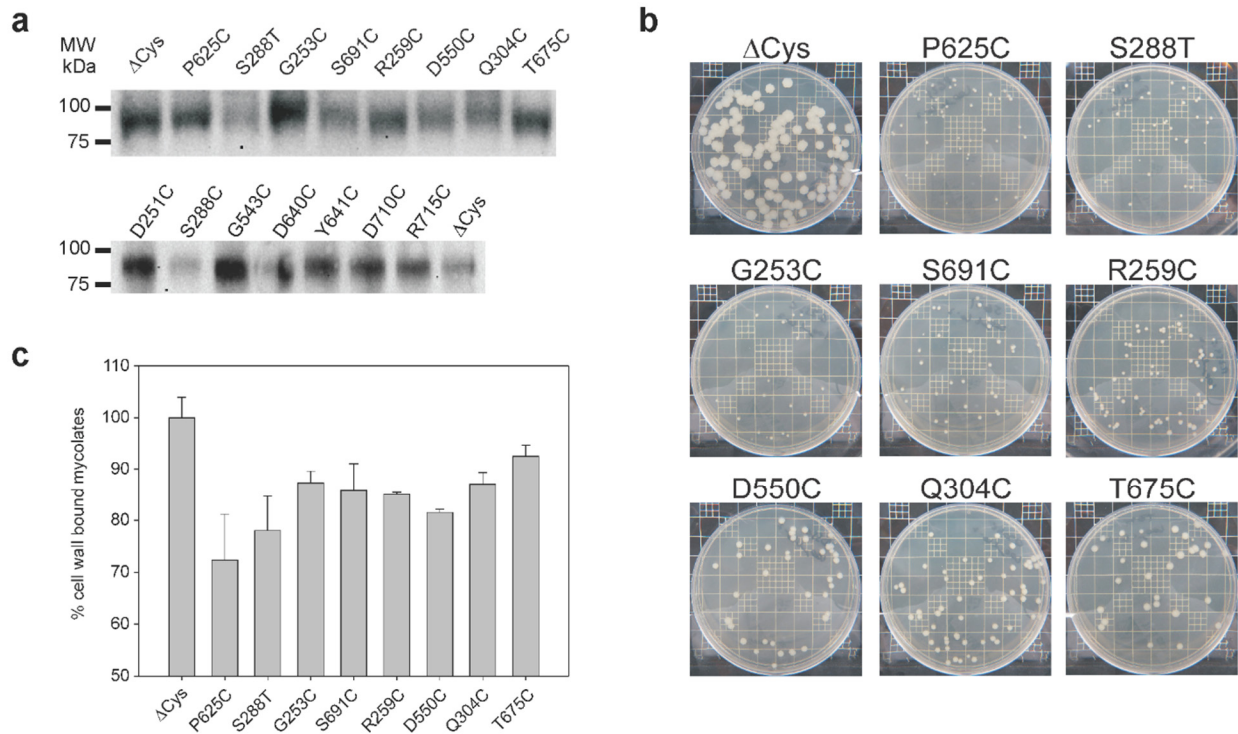


Figure 2-5. Functional analysis of MmpL3 mutants in *M. smegmatis*.

(a) Western blot analysis of fifteen MmpL3 mutants expressed in *M. smegmatis* (*Msmg*). The top gel shows the Cys-mutated Δ Cys-MmpL3 variants capable of rescuing the viability of *Msmg* Δ *mmpL3* albeit with a reduced transport activity. The lower gel carries the MmpL3 variants whose transport activity is either abolished or reduced below the level required to rescue the viability of the knock-out mutant. Total protein extracts were prepared from *Msmg* expressing Δ Cys-MmpL3 (Δ Cys) or the Cys-mutated Δ Cys-MmpL3 variants [D251C; G253C; R259C; S288C; S288T; Q304C; G543C; D550C; P625C; D640C; Y641C; T675C; S691C; D710C; and R715C] from pMVG11; 30 μ g of total protein extracts from each strain were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using a rabbit polyclonal antibody directed to the C-terminal soluble domain of the MmpL3 protein from *Mtb*. This antibody does not react with the endogenous MmpL3 protein from WT *Msmg* mc²155 (not shown). (b) Growth of *Msmg* Δ *mmpL3* expressing either the parent Δ Cys-MmpL3 or the eight Cys-mutated Δ Cys-MmpL3 variants shown in (a) (top gel) on 7H11-ADC agar after six days of incubation at 37°C. (c) MmpL3 activity of the rescued *Msmg* mutants shown in (b). The [1,2-¹⁴C-acetate]-derived cell wall-bound mycolic acids prepared from the same biomass of each of the strains were quantified by scintillation counting. Reduced MmpL3 activity results in a decrease in mycolic acid transfer to arabinogalactan. Shown are the means and standard deviations of two independent metabolic labeling experiments. Results are expressed as percentages of [¹⁴C]-labeled cell wall-bound mycolic acids in the mutants relative to the Δ Cys-MmpL3 parent strain (arbitrarily set to 100%).

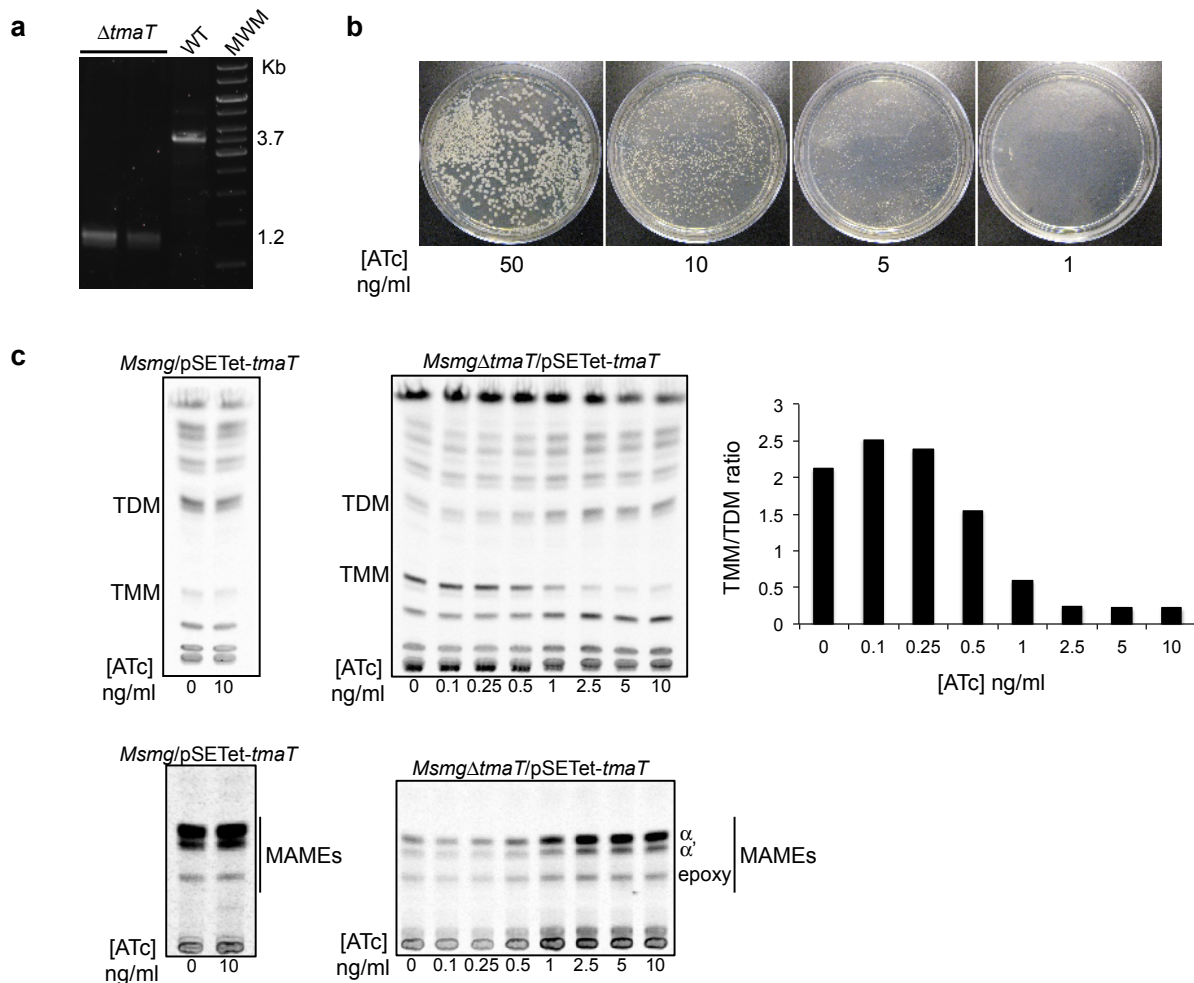


Figure 2-6. Effect of silencing *tmaT* on *Msmg* growth and mycolic acid export.

(a) Allelic replacement at the *tmaT* locus of *Msmg* rescued with WT *tmaT* expressed from pSETetR under control of an ATc-inducible (TET-ON) promoter was confirmed by PCR in two independent clones. PCR fragments were digested with EcoRI. The WT 3.7-Kb amplification signal is replaced by three ~ 1.2 Kb fragments in the mutants due to the replacement of the *tmaT* ORF by a 1.2 kb- kanamycin resistance cassette (harboring two EcoRI restriction sites). (b) Growth of the *Msmg* $\Delta tmaT$ /pSETet-*tmaT* conditional knock-down strain on 7H11-ADC plates in the presence of different concentrations of ATc. TmaT is essential for growth in *Msmg*. (c) Effect of silencing *tmaT* on mycolic acid export. Total [1,2-¹⁴C-acetate]-derived lipids and cell wall-bound mycolates from the conditional knock-down (*Msmg* $\Delta tmaT$ /pSETet-*tmaT*) and control strain (*Msmg*/pSETet-*tmaT*) grown in the presence of different concentrations of ATc were analyzed by TLC in the solvent systems (CHCl₃:CH₃OH:H₂O; 20:4:0.5, by vol.) for total lipids, and (*n*-hexane:ethyl acetate; 95:5, by vol.) for mycolic acid methyl esters (MAMEs). For lipid analysis, the same total counts (10,000 dpm) for each sample was loaded per lane. The

amount of radioactivity incorporated in TMM and TDM in the conditional knock-down was semi-quantified using a PhosphoImager and the results, expressed as TMM/TDM ratios, are presented alongside the autoradiogram. For cell wall-bound mycolic acid analysis, samples were loaded volume to volume. ATc concentration does not impact the transfer of mycolic acids onto cell wall arabinogalactan or TDM in the control strain, *Msmg/pSETet-tmaT*.

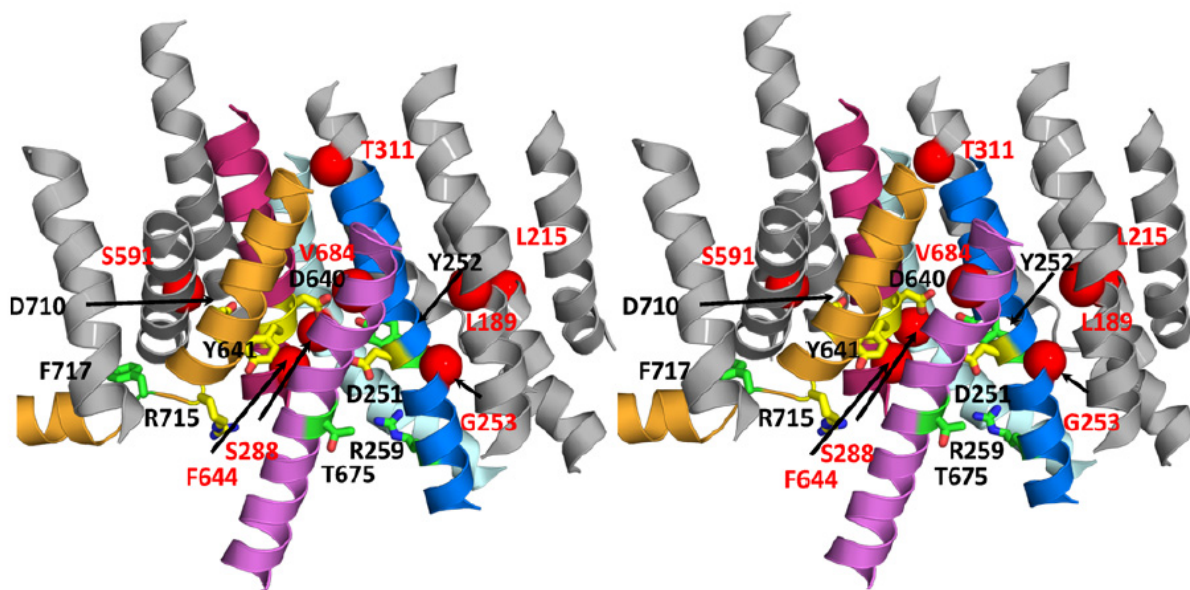


Figure 2-7. Stereo image showing resistance mutations in MmpL3 superimposed on the MmpL3 model displaying the functional mutations located in the transmembrane region as shown in Fig. 3b.

The position of frequently encountered resistance mutations to one or more MmpL3 inhibitors are shown as red spheres centered on the C α atom of the native MmpL3 residue. These residues map to transmembrane helices. Residues whose mutations to Cys resulted in significant reduction in transport activity are shown in green and those whose Cys mutation abolished transport activity are colored yellow.

Supplementary data

Supplementary Figures

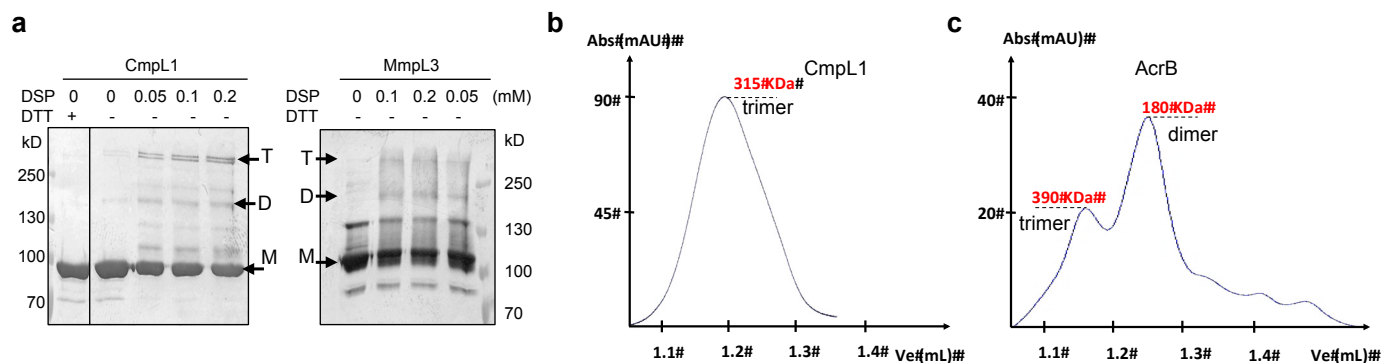


Figure S2-1. Purification and characterization of CmpL1 and MmpL3.

(a) CmpL1, MmpL3 and their high molecular weight detergent complexes were purified from *Cgl* cells as described in the Supplementary Methods. Protein samples were treated with the indicated concentrations of the amine-reactive cross-linker, DSP, separated by 8% SDS-PAGE and visualized by immunoblotting using an anti-Strep antibody. The positions of the expected monomeric (M, MW = 101 kDa for MmpL3; MW = 83 kDa for CmpL1), dimeric (D) and trimeric (T) species are indicated. Elution profiles obtained by size exclusion chromatography of CmpL1 **(b)** and AcrB **(c)** as a reference standard and measured at 280 nm. The Superdex 200 GE 3.2/300 column was previously calibrated using proteins of defined molecular weight (Thyroglobulin (bovine) 670 kDa, gamma-globulin (bovine) 158 kDa, Ovalbumin (chicken) 44 kDa, Myoglobin (horse) 17 kDa, Vitamin B12 1.35 kDa). The estimated molecular weights for the peak fractions are shown in red. The minor high MW fraction for AcrB is situated on the shoulder of the major low MW fraction of AcrB and as result the MW of the minor fraction is underestimated.

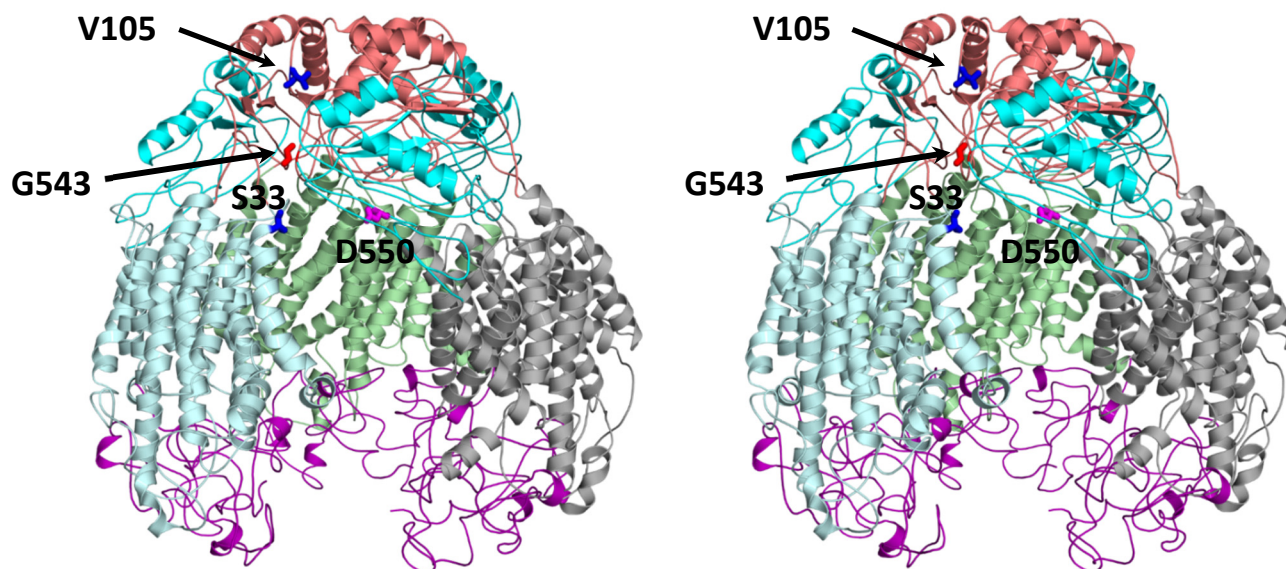
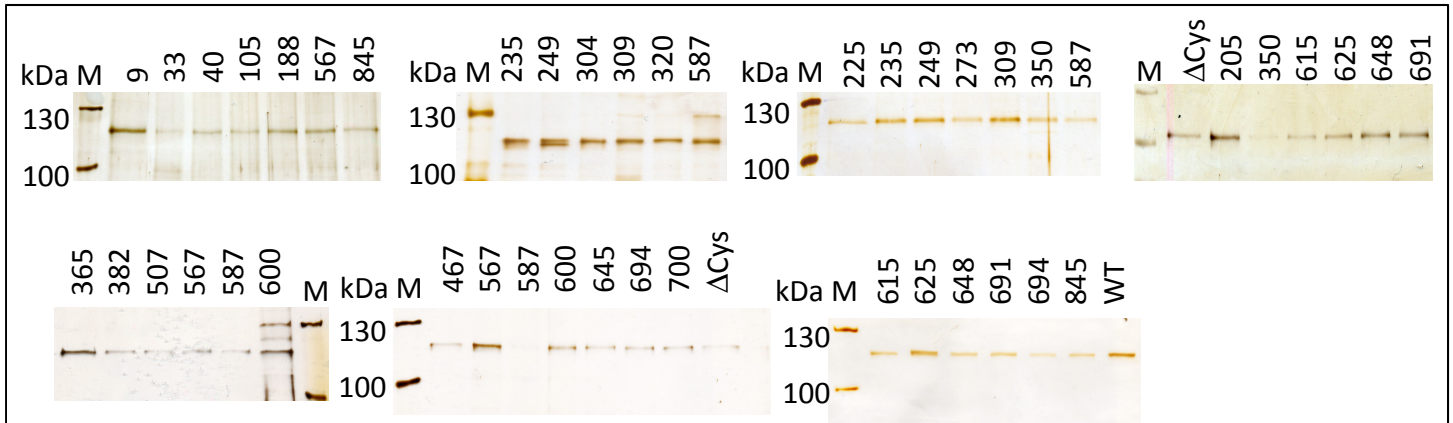


Figure S2-2. MmpL3 quaternary structure derived by superposition of the MmpL3 subunits onto the CmpL1 trimer.

The transmembrane regions of the MmpL3 subunits are colored gray, pale green and pale cyan to facilitate their discernment. The periplasmic domains PN (34-173) and PC (417-551) are colored deep salmon and cyan, respectively. The C-terminal region (729-944) is colored purple. G543 whose mutation to Cys abolishes transport activity is shown in a loop at the subunit interface, while residue D550 whose mutation to Cys reduces activity is shown at the periplasmic channel entrance. When mutated to Cys, residues S33 and V105 are found inaccessible to the FM probe. The orientation of V105 at the subunit interface makes it solvent inaccessible. Likewise, S33 caps TMS-1 and its location at the outer leaflet of the cytoplasmic membrane most likely makes it inaccessible to the probe.



Domains	TMS-1	PN	TMS-2	TMS-3	TMS-4	TMS-5	TMS-6	TMS-7	PC	TMS-8	TMS-9	TMS-10	TMS-11	TMS-12	C-terminus
Residues	14-33	34-173	174-199	208-224	238-264	271-301	306-338	396-415	417-551	552-576	583-601	625-648	660-690	697-728	729-944

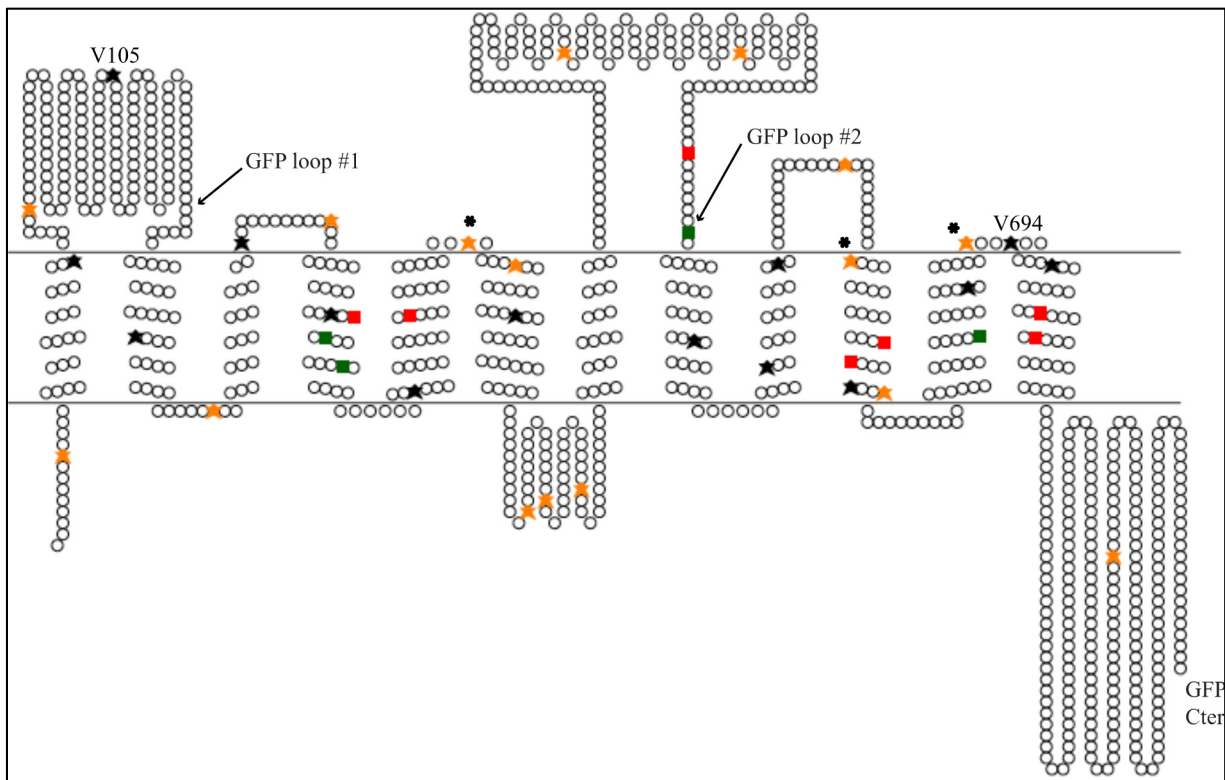
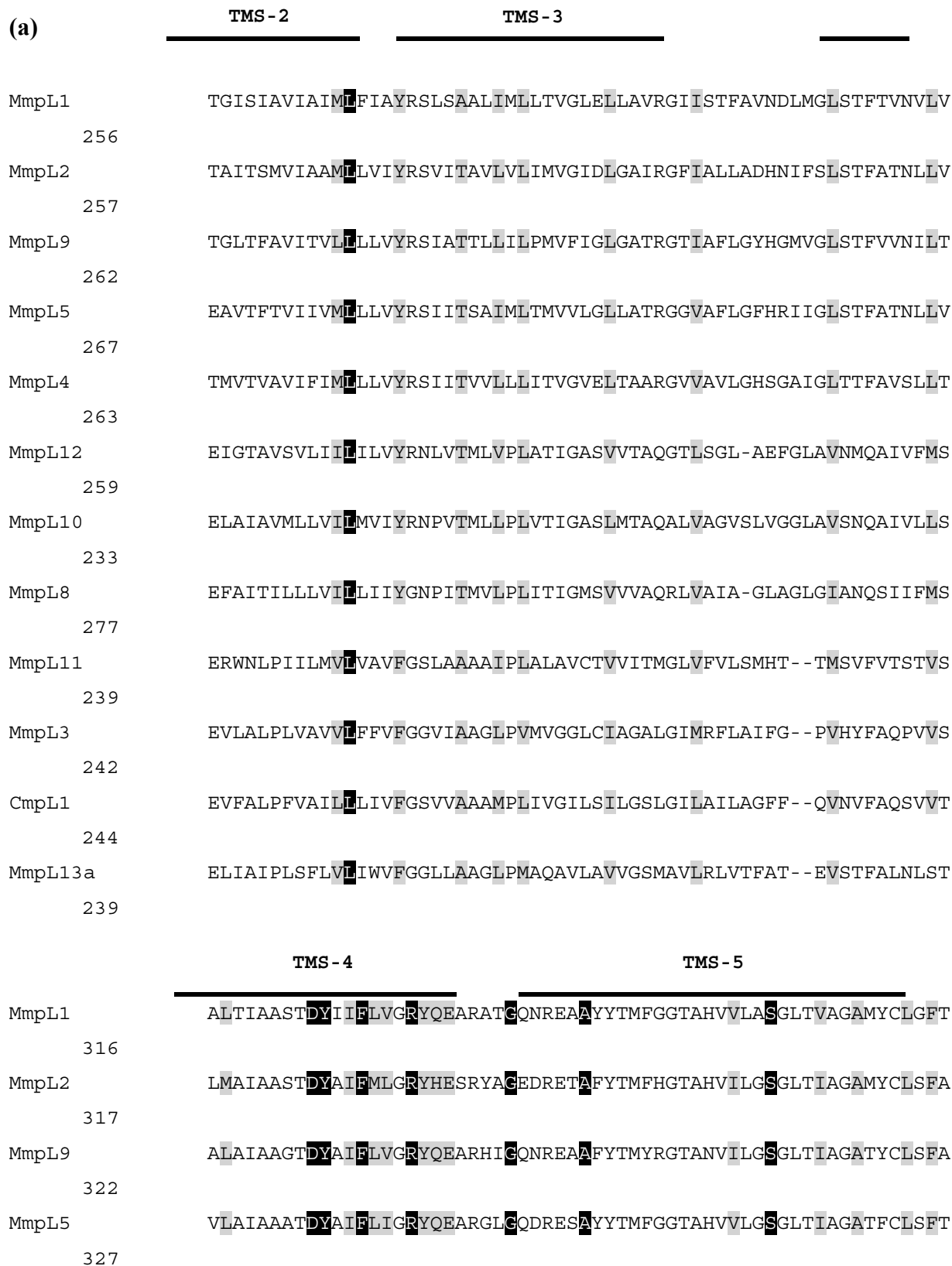


Figure S2-3. Transmembrane topology of MmpL3.

(a) Expression of the Cys-substituted Δ Cys-MmpL3 variants in *Cgl. Cgl* cells producing the Δ Cys-MmpL3 variants containing Cys substitutions at the indicated positions were induced with IPTG and membrane fractions were isolated as described in the Supplementary Methods. Upon

labeling with fluorescein-5-maleimide (FM), reactions were quenched with DTT, membrane proteins solubilized with detergent, and Δ Cys-MmpL3 variants purified by affinity chromatography. The fractions containing the eluted proteins were separated by 8% SDS-PAGE, fluorescence quantified using a Storm Imager (see Fig. 4b), and the protein bands were visualized with silver nitrate staining (shown below). M, molecular weight marker; WT, MmpL3 containing its native Cys residues; Δ Cys, Δ Cys-MmpL3 [MmpL3^{C24S C332S C730S}]. **(b)** Shown in the table and figure below is the transmembrane topology of MmpL3 from *Mtb* based on the MmpL3 model generated in this study. The positions of the Cys-mutated Δ Cys-MmpL3 variants used in the topology studies are represented as stars. Yellow stars indicate residues to which the fluorescent probe, FM, bound; black stars indicate unlabeled residues. Squares indicate functional residues. Red squares indicate the position of the mutations that failed to rescue the *Msmg* Δ *mmpL3* knock-out mutant; green squares indicate the position of mutations that reduced MmpL3 activity. Note that residues Q304, P625 and S691 that are labeled as stars on the figure were identified as functional residues in our study. These residues are further annotated with a black asterisk. The positions of the three GFP fusions generated in MmpL3 from *M. smegmatis* are indicated by arrows. The graphical model was generated using TOPO2.



MmpL4 323 SLAIAAGTDYGFIFIIGRYQEARQAGEDKEAAYYTMYRGTAHVILGSGGLTIAGATFCLSFA

MmpL12 319 AVMIGAGTDYAVFLISRYHDYVRHGEKSDMAVKKALMSIGKVITASAATVAVTFLAMVFT

MmpL10 293 AMIAGAGTDYAVFLISRYHEYVRLGEHPERAVQRAMMSVGKVIAASAATVGITFLGMRFA

MmpL8 337 GMMVGAGTDYAVFLISRYHDYLRQCADSDQAVKKALTSIGKVIAASAATVAITFLGMVFT

MmpL11 299 MFGIALAVDYSLFIILMRYREELRCGRRPPDAVDAAMATSGLAVVLSGMTVIASLTGIYLI

MmpL3 302 LIGLGLAIDYGLFIVSRFREEIAEGYDTETA VRRTVITAGRTVTFSAVLIVASAIGLLLF

CmpL1 304 LLGLGLAIDYGLFMVSRFREEMDKGTPVEQAVATTTATAGKTVVVSAAMVAVALSGLFVF

MmpL13a 299 ALGLALAIIDYTLILVSRYRDELAEGSDRDEALIRTMALRGARCCFRRSPWRCRCRRLRCS

* ^ ^ *

TMS - 6

MmpL1 RLPYFNTLASPCAIGLVTVMLASLTLAPAI IAVASRFG 354

MmpL2 RLPYFETLGAPIAIGMLVAVLAALTLGPAVLTVGSFFK 355

MmpL9 RLTLFHTMGPPLAIGMLVSVAALTLAPAI IAIAGRFG 360

MmpL5 RLPYFQTLGVPLAIGMVIVVAAALTLGPAPI IAVTSRFG 365

MmpL4 RMPYFQTLGIPCAVGMLVAVAVALTTLGPAVLHVGSRFG 361

MmpL12 KLEVFSAVGPAIAVAITVSLLGAVTLLPAI LTLTGRRG 357

MmpL10 KLGVFSTVGPALAIGIAVSFLAAVTLLPAI LVLASPRG 331

MmpL8 QLGILKTVGPMLGISVAVVFFAAVTLLPAL MVLTGRRG 375

MmpL11 NTPALRSMATGAILAVAVAMLTSA TLTPAVLATFARAA 337

MmpL3 PQGFLKSLTYATIASVMLSAILSITVLPACL GILGKHV 340

CmpL1 PQAFLKSVAFGAISAVGLAALMSVTVLP SLSMLGKNI 342

MmpL13a RCTF----- 303

^

(b)

loop 2

TMS - 8

MmpL1

GTPLQAASIYLAGTSSTYKDIHEGTLYDVMIAVVASLCLIFIIMLGITRSVVASAVIVGT

795

MmpL6

GTPMAGAGIYLAGTAATFKDIQDGATYDLLIAGIAALSLILLIMMIITRSLVAALVIVGT 223

MmpL2

GTPLQGAAIYLGCTAATFKDIREGARYDLLIAGVAAISLILIIIMMIITRSVVAADVIVGT 796

MmpL9

ATPLQAKIYIGGTAATYQDIRDGTKYDILIVGIAAVCLVFIVMLMITQSLIASLVIVGT 801

MmpL5

GTPLEGSAIYLGCTAAMFKDLSDGNTYDLMIAGISALCLIFIIMLITRSVVAADVIVGT 807

MmpL4

GTPLEDAKIYLAGTAAVFHDISEGAQWDLIAAISLCLIFIIMLIITRAFIAADVIVGT 802

MmpL12

NTELEDATIGLAGVPTALRDIRDYNSDMKFIVIAIVIVFLILVILLRALVAPIYLIGS 855

MmpL10

NTSLADASISMSGYPVMLRDIRDYERDMRLIVAVTVVVVILILMALLRAIVAPPLYLVGS 834

MmpL8

NTALADAKVSVVGLPVVLKDIRDYSHDHLRLIIAMTVCIVLLILIVLLRAIVAPPLYLVGS 902

MmpL11

VAG--

AAQVDVGGPTALIKDFDDRVSATQPLVLVVFVAVIAFLMLLISIRSVFLAFKGVLM 559

MmpL3

ITPPKGITVLVGGTPALELDSIHGLFAKMPMLMVVILLTTTIVLMFLAFGSSVVLPIKATLM 590

CmpL1

ISVPEGVEVQIGCTPAMEIESIEALFEKLLWMALYIVLATFILMALVFGSVILPAKAIIM 550

MmpL13B

VAGPAGRSVVMAGVAQVNRDSVDAVTDRLPMVLGLIAAITVLLFLLTGSVVLPAKALVC 263

* ^

TMS - 9

TMS - 10

MmpL1 VALSLGSAFGLSVLIWQHIL-----

HMPHLHWLVLPMAIIVMLAVGSDYNLLLIARFQ 847

MmpL6 VALSLGSAFGLSVLVWQHLL-----

GIQLYWIVLALAVILLAVGSDYNLLLISRFK 275

MmpL2 VVLSMGSAFGLSVLVWQDIL-----

GIELYWMVLAMSVILLAVGSDYNLLLISRKL 848

MmpL9 VLLSLGTAFGLSVLIWQHJV-----

GLQVHWTIVAMSVIVLLAVGSDYNLLLVSRFK 853

MmpL5 VVLSLGSAFGLSVLIWQHIL-----

GIELHWLVLAMAVIILLAVGADYNLLLVARLK 859

MmpL4 VALSLGSAFGLSVLLWQHIL-----

AIHLHWLVLAMSVIVLLAVGSDYNLLLVSRFK 854

MmpL12 VLISYLSALGIGTLVFLQIL-----

GQEMHWSLPGLSFILLVAIGADYNMLLISRIR 907

MmpL10 VVISYMSAIGLVVVFQVFL-----

GQELHWSVPGLAFVVLVAVGADYNMLLASRLR 886

MmpL8 VIVSYLAALGIGVIVFQFL-----

GQEMHWSIPGLTFVILVAVGADYNMLLISRRLR 954

MmpL11

TLLSVAAAYGSLVMVFQWGWARGLGFALHSIDSTVPPLVLAMTFGLSMDYEIFLLTRIR 619

MmpL3
SALT LGSTMG I L T W I F V D G H F S K W L N F T P T P L T A P V I G L I I A L V F G L S T D Y E V F L V S R M V 650
CmpL1
T I L G M G A T L G I L T L M F V D G V G A S A L N F S P G P L M S P V L V L I M A I I Y G L S T D Y E V F L V S R M V 610
MmpL13B
N V L S L T A A F C A L V W I F Q E G H F G A L G T T P S G T L V A N M P V L L F C I A F G L S M D Y E V F L V S R I R 323
^ **

TMS - 11

MmpL1 EEIG-----
AGLKTGMIRAMAGTGRVVITIAAGLVFAFTMGSMVASDLRVV 891
MmpL6 EEIG-----
AGLNTGIIRAMAGTGGVVITAAGLVFAATMSSFVFSDLRVL 319
MmpL2 EEIG-----
AGLNTGIIRAMAGTGGVVITAAGMVFAVTMSLFFVFSDLRII 892
MmpL9 EEVG-----
AGLKTGIIRAMAGTGAVVITSAAGLVFAFTMASMAVSELRVI 897
MmpL5 EEIH-----
AGINTGIIRAMGGSGSVVITAAGLVFAFTMMSFAVSELTVM 903
MmpL4 QEIG-----
AGLKTGIIRSMGGTGKVVITNAGLVFAVTMASMAVSDLRVI 898
MmpL12 DESP-----
HGIRIGVIRTVGSTGGVITSAAGLIFAASMFLVGASINTM 951
MmpL10 DESA-----
LGVRSVIRTVRCTGGVITAAAGLIFAASMSGLLFSSIGTV 930
MmpL8 EEAV-----
LGVRSVIRTVASTGGVITAAAGLIMAASMYGLVFASLGSV 998
MmpL11 ERFLQTGQ-----
TRDAVAYGVRTSARTITSAALIMIAVFCGFAFAGMPLV 665
MmpL3 EARE-----
RGMSTQEAIRIGTAATGRIITAAALIVAVVAGAFVFSDLVMM 696
CmpL1 EARD-----
KGESTDDAIRYGTAHTGSIITAAALIMIVVCGAFGFSEIVMM 656
MmpL13B
EYWLESGAARPARRSVAEVHAANDESVALGVARTGRVITAAALVMSMSFAALIAAHVSFM 383
^ ^

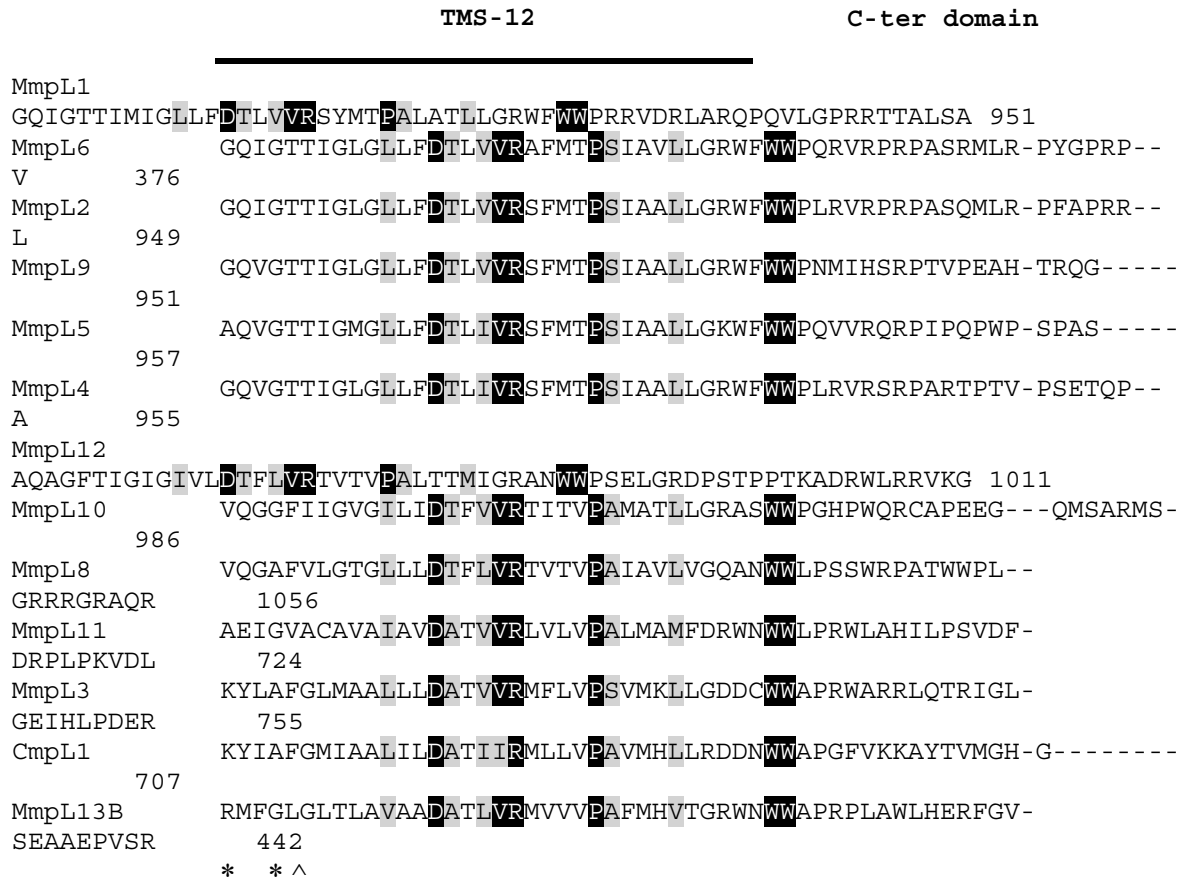


Figure S2-4. Multiple alignments of MmpL proteins from *Mtb* and *Cgl*.

Alignments using Cluster Omega (version 1.2.1) of two conserved regions of MmpL/CmpL family proteins. Alignment (a) maps to the first half of the proteins; alignment (b) maps to the second half. Identical residues are in black, similar residues in gray. Asterisks below the alignments denote essential MmpL3 residues. Arrowheads denote residues whose mutation to Cys significantly reduces the activity of MmpL3.

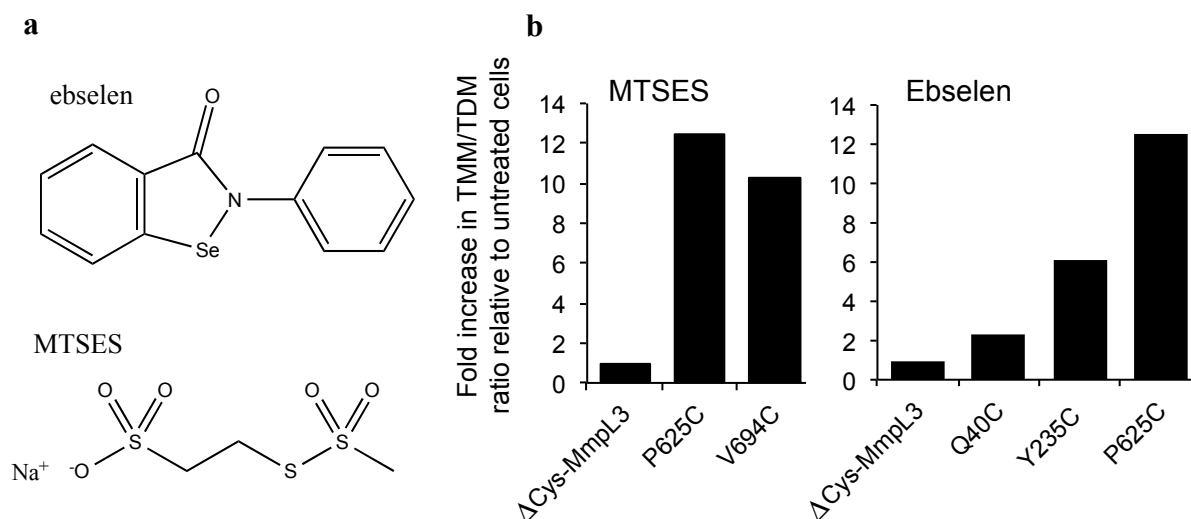


Figure S2-5. Effect of thiol-reactive probes on mycolic acid export by *MsmgΔmmpL3* strains expressing MmpL3 mutants with cysteine substitutions at positions Q40, Y235, P625 and V694.

(a) Structures of MTSES and ebselen. (b) TMM and TDM synthesis in untreated and ebselen (10 $\mu\text{g/ml}$)- or MTSES (512 $\mu\text{g/ml}$)-treated *MsmgΔmmpL3* expressing Q40C, Y235C, P625C and V694C $\Delta\text{Cys-MmpL3}$ variants was determined by metabolic labeling with [1,2- ^{14}C] acetic acid. Radiolabeled lipids from treated and untreated cells were analyzed by TLC and the amount of TMM and TDM in each sample semi-quantified using a PhosphorImager. Results are representative of one typical experiment and are expressed as fold-increases in the ratio of TMM to TDM in each treated cells relative to untreated cells. The different accessibility of residues to MTSES and ebselen is likely to account for the only partial overlap between the residues revealed by the two structurally different probes.

Supplementary Tables

Table S2-1. I-TASSER free modeling.

Top structural analogs close to the CmpL1 target in the PDB and considered having the same topological fold whenever TM-score > 0.5 (408).

Rank ^a	PDB Hit	Protein	TM-score	RMSD ^b	IDEN ^c	Cov ^d
1	3aqp	SecDF , <i>T. thermophilus</i> translocon-associated membrane protein	0.737	1.40	0.112	0.749
2	3d9b	AcrB , <i>E. coli</i> Multidrug Efflux transporter	0.578	5.29	0.097	0.693
3	4mt1	MtrD , <i>N. gonorrhoea</i> , Multidrug Efflux Pump	0.575	5.27	0.096	0.692
4	3ne5	CusBA , <i>E. coli</i> heavy-metal Efflux complex	0.565	5.11	0.101	0.672
5	4k0e	ZneA , <i>C. metallidurans</i> Zn(II)/proton antiporter	0.553	5.19	0.099	0.661

^a Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library (409).

^b RMSD is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align. TM-align is an algorithm for sequence-order independent protein structure comparisons (376).

^c IDEN is the percentage sequence identity in the structurally aligned region (expressed between 0 and 1).

^d Cov represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Table S2-2. Drug susceptibility of *MsmgΔmmpL3* strains expressing mutated variants of ΔCysMmpL3.

MICs (in µg/ml) were determined in 7H9-ADC broth by using the resazurin blue test and visually scanning for growth. MRP, meropenem; AMP, ampicillin; INH, isoniazid; CIP, ciprofloxacin; RIF, rifampicin.

Four- (or greater) fold increases in susceptibility are highlighted in orange.

Strain	MRP	AMP	INH	CIP	RIF
ΔCys-MmpL3 (parent strain)	4	256	4-8	0.25	16
G253C	2	128	4	0.25	4
R259C	2	128	8	0.25	8
S288T	0.5	64	8	0.25	4
Q304C	2	128	8	0.25	8
D550C	1	64	4	0.25	4
P625C	2	128	4	0.25	8
T675C	2	256	8	0.25	8
S691C	1	128	8	0.25	4

Supplementary Movie

Movie S2. Movie showing the 3D EM negative staining map and the superposition of the CmpL1 structural model refined against the EM map.

In the last part of the movie, a detailed fit is provided of the model to the EM map by moving the front clipping plane of the image down and up the 3-fold axis. Surface of the EM map shown was contoured at relative level of 3.

Supplementary Methods

Bacterial strains and growth conditions

M. smegmatis (*Msmg*) mc²155 was grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco) with 10% albumin-dextrose-catalase (ADC) supplement and 0.05% Tween 80 and on 7H11-ADC agar at 30 or 37°C. Where required, kanamycin (Kan) (25 µg/ml), hygromycin (Hyg) (50 µg/ml), sucrose (10%) and anhydro-tetracycline (ATc) (0.1 to 50 ng/ml) were added to the culture medium. *Cgl* ATCC 13032 and LY108 (46) were grown at 30°C in brain-heart infusion (BHI) medium supplemented with 2% (w/v) glucose or 9.1% (w/v) sorbitol, or in the minimal medium (20.9 g of MOPS, 5 g of (NH₄)₂SO₄, 5 g of urea, 1 g of citrate, 0.5 g of K₂HPO₄, 0.5 g of KH₂PO₄, 0.25 g of MgSO₄•7H₂O, 10 mg of CaCl₂, 10 mg of MnSO₄•H₂O, 10 mg of FeSO₄•7H₂O, 10 mg of thiamine, 1 mg of ZnSO₄•7H₂O, 0.2 mg of CuSO₄, 0.2 mg of biotin per liter, pH 7.3) with 1% glucose. *E. coli* DH5α and S17-1 were grown at 37°C in Luria Bertani (LB) medium (10 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl). Kan (25 µg/ml) or tetracycline (10 µg/ml for DH5α and 20 µg/ml for *Cgl*) were added as needed.

Expression and purification of MmpL3 and CmpL1 in Cgl

Cgl *cmpL1* and *Mtb* *mmpL3* were expressed in *Cgl* ATCC 13032 from the multicopy expression plasmid pAN6 (342). Freshly transformed *Cgl* cells were inoculated into 100 mL of 2×TY medium (16 g of Bacto-tryptone, 10 g of yeast extract and 5 g of NaCl per liter) supplemented with 2% (w/v) glucose and 25 µg/ml Kan and incubated at 30°C until OD₆₀₀ reached ~0.5. Protein expression was induced by 0.1 mM IPTG for 8 hours. Cells were collected by centrifugation at 4,000 x g at 4°C for 20 min and resuspended in 50 ml buffer containing 10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor tablets (Sigmafast™), and 100 µg/ml DNase I (pH 8.0). Cells were broken using a French Press FA078 apparatus (SIM Instruments. Inc.). Unbroken cells were removed by low-speed centrifugation at 4,000 x g at 4°C for 10 min. Total membrane fractions were isolated by ultracentrifugation at 40,000 x g for 1 h at 4°C. Membrane proteins were solubilized in 10 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, protease inhibitor tablets (Sigmafast™), and 1% n-dodecyl β-D-malto-pyranoside (DDM) for 3 h on ice. After removal of the insoluble fraction by ultracentrifugation, solubilized proteins were loaded onto a

0.4-ml column packed with Strep-tactin Superflow Agarose resin (IBA, Solutions for Life Sciences). CmpL1 was purified from soluble fractions using the manufacturer's protocol modified to include 0.03% DDM in all buffers. Collected fractions were pooled and concentrated by an Amicon concentrator (Membrane NMWL, 100 kDa). The concentrated fraction was subsequently ultracentrifuged (Sorvall Discovery M150 SE) at 200,000 x g for 1 h at 4°C. The authenticity of CmpL1 was confirmed by cutting-out the band corresponding to the purified fraction of CmpL1 of the SDS-PAGE gel, followed by in-gel digestion with trypsin, and mass spectrometry analysis. Comparison of the resulting peptide sequences predicted from mass spectrometry analysis with those of CmpL1 uniquely identified the purified fraction as the CmpL1 transporter. For gel filtration chromatography, protein samples were loaded onto a size exclusion column (Superdex 200 GE 3.2/300) equilibrated in eluting buffer (100 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.03% (w/w) DDM) using a GE micro ÄKTA system. Protein concentrations were determined from OD₂₈₀ measurements using a GE NanoPhotometer™ Pearl spectrophotometer. At this wavelength, DDM has negligible absorbance. The final CmpL1 protein yield is approximately 2 mg for a 25 liter *Cgl* culture. The fraction corresponding to CmpL1 after size exclusion chromatography was then used for EM negative staining.

For chemical cross-linking, purified CmpL1 or MmpL3 proteins were treated with increasing concentrations of dithiobis (succinimidylpropionate) (DSP, Pierce) (410). Crosslinking reactions were carried out at 37 °C for 30 min and terminated by addition of Tris-HCl (pH 7.5) to a final concentration of 20 mM.

Site-directed mutagenesis and generation of C-terminal truncated mutants of MmpL3

Δ Cys-MmpL3, in which Cys24, Cys332 and Cys730 of MmpL3 were replaced by serine residues, was generated by the two-step PCR overlap method and pAN6-*mmpL3* as the DNA template. The cysteine-mutated variants of Δ Cys-*mmpL3* were next generated by the same method using pMVGHI- Δ Cys-*mmpL3* as the DNA template and then cloned into the NdeI and NheI restriction sites of pAN6. Some of the mutants were obtained from GenScript (Piscataway, NJ, USA). Unique Cys residues were introduced at the following positions of Δ Cys-MmpL3: 9, 33, 40, 103, 105, 124, 146, 188, 205, 208, 225, 235, 249, 251, 252, 253, 255, 259, 267, 273,

288, 304, 309, 320, 327, 330, 331, 350, 365, 382, 402, 413, 467, 507, 543, 550, 567, 587, 600, 615, 625, 640, 641, 645, 648, 675, 677, 684, 691, 694, 700, 710, 714, 715, 717, 720, 731, 732, and 845.

The C-terminal truncated forms of MmpL3 were obtained by PCR amplification of the *mmpL3* gene from *Mtb* H37Rv using as the upstream primer an oligonucleotide matching the 5'-end of *mmpL3* and as downstream primers oligonucleotides that introduced stop codons as positions 721, 744, 750, 762, 777, 859 and 915 of the protein. PCR fragments were cloned in the mycobacterial expression plasmid, pMVGHI (185).

Transmembrane topology mapping of MmpL3

Cgl LY108 cells harboring pAN6 expression plasmids were grown in 150 mL of 2×TY medium supplemented with 2% (w/v) glucose and, depending on the plasmid, with 25 µg/ml kanamycin or 20 µg/ml tetracycline. Cells were incubated at 30°C with shaking until OD₆₀₀ reached ~0.5. Protein production was induced with 0.1 mM IPTG and cells were grown until OD₆₀₀ reached ~3. Membrane fractions were separated as described above and treated with 0.5 mM Fluorescein-5-Maleimide (FM) in PBS buffer (pH 7.5) followed by incubation for 60 min at 4°C. The reaction was terminated by addition of 10 mM DTT and incubation for 5 min. The membrane fraction was recovered by ultracentrifugation at 40,000 ×g for 1 h at 4°C and MmpL3 Cys-mutated variants were purified by anti-Strep affinity chromatography as described above prior to separation on 10% SDS-PAGE gel. The fluorescence was measured using StormTM (GE Healthcare) and quantified using the ImageJ program (NIH). Protein expression was analyzed by silver nitrate staining.

To further determine the subcellular localization of the soluble loops and in C-terminal end of MmpL3 (*Msmg* ortholog, MSMEG_0250) expressed in *Msmg*, three C-terminal MmpL3-GFP fusions, one fusing MmpL3 to GFP at residue 171 (in loop 1), one at residue 563 (in loop 2), and one at the C-terminal end of MmpL3 (residue 1013), were generated in the expression plasmids pJB(-) and JB(+) (332) and expressed from the *phsp60* promoter in *Msmg*. In pJB(+), a single TMS from glycophorin A is added between the C-terminal fusion point of the protein of interest and the GFP to convert membrane proteins with extracellular C-termini to proteins with intracellular C-termini. Because GFP fluoresces in the cytoplasm but not in the periplasm,

a high fluorescence signal in the pJB(-) version and background fluorescence in the pJB(+) version are indicative of the fusion point being cytoplasmic. Opposite fluorescence intensities indicate, on the contrary, that the fusion point is localized in the periplasm. Cultures of transformants grown to log phase ($OD_{600} \approx 0.8$), washed twice with PBS and resuspended in 100 μ l of the same buffer were transferred to black 96-well plates with transparent bottoms (Corning) and their fluorescence determined using a 2030 MultiLabel Reader Victor X5 plate reader (Perkin Elmer) at excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm, respectively. The fluorescence value of each sample was normalized to the OD_{600} of the culture.

Negative staining EM

CmpL1 samples (each 5 μ L diluted to 50 μ g/mL) were applied onto negatively glow-discharged carbon-coated grids (400 mesh, copper grid) for 1 minute and excess liquid was removed by blotting with filter paper. Freshly prepared 1.5% uranylformate (pH 5) was added (5 μ l) for 1 minute and then blotted. Digital micrographs were collected using a FEI Tecnai G2 F20 microscope operated at 200 kV and equipped with a Gatan Ultrascan 4k x 4k Digital CCD Camera. The images were recorded at defocus between 0.7–1.4 μ m at a magnification of 134,010X at the camera and a pixel size of 1.12Å.

Contrast transfer function parameters were determined using CTFFIND4 Protein particles were boxed an in-house software using a template. The template was a disc obtained by averaging \sim 100 particles oriented randomly. After extraction, 21,033 particles were binned 2X for a final box size of 128x128 pixels and a resulting pixel size of 2.24 Å at specimen level. False positives (\sim 2,000 particles) were first removed from the particle stack after a 2D classification (K=16) with RELION-1.3 software suite (411). The reference 3D map was obtained using Simple Prime (412) with the clean particles. RELION-1.3 software suite (411) was used for the 3D analysis. The CTF was applied by phase flipping only (no amplitude correction). The first step consisted of a maximum likelihood 3D classification with 3 seeds and a tau of 2. Class 1 (6,701 particles) and class 3 (5,251 particles) were similar, whereas class 2 (6,288 particles) was poorly defined with accumulation of densities on the symmetry axis. Classes 1 and 3 were refined further using the Relion autorefine routine while applying the C3 symmetry. The routine stopped at the angular sampling of 3.5 degrees. The resulting density

features were highly similar for classes 1 and 3, and class 1 was chosen for subsequent structural modeling. 3D-EM density maps were visualized using Chimera (413). The resolution of the map was estimated to be 18Å using the gold standard FSC criterion of 0.5.

Structural modeling

I-TASSER was used to prepare a model for the 3D structure of CmpL1 based on its primary amino acid sequence (407). Although *ab initio* structural modeling is a challenge for folding of proteins with > 250 amino acids (414), TM helices due to their hydrophobicity and their length of about 20 amino acids are easier to predict and simplify *ab initio* modeling by reducing the conformational search space. The structure homology predictions for CmpL1 by I-TASSER are shown in Table 2. Even though the CmpL1 sequence homology with the target structures are low (< 12% identity), the top ranked target, SecDF, a *Thermus thermophilus* protein secretion-associated membrane protein (397), was demarcated by its high TM-score of 0.74 and low RMSD value of 1.40, in comparison to the various efflux pumps which had lower TM-scores and significantly greater RMSD values. The trimeric quaternary structure of CmpL1 was next built using the second best scoring structure, AcrB, (PDB ID: 3D9B) as SecDF is a monomeric transmembrane protein. The few subunit clashes were relieved by manual adjustments in PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC) and, by using the program FG-MD (a molecular dynamics (MD)-based algorithm for atomic-level protein structure refinement), the local geometry was improved by relieving steric clashes and refining torsion angles and hydrogen-binding networks (374). Additional geometry regularization used the *geometry minimization* model tool in Phenix (380) and Coot (381).

The refined structure of CmpL1 was then used for template-based modeling of the MmpL3 sequence by I-TASSER yielding an initial structural model for the MmpL3 protomer and, consequently, of its trimeric quaternary structure. *Ab initio* modeling by I-TASSER of the MmpL3 protomer predicted structural homology with SecDF. However, using this structural model for the MmpL3 subunit to build the trimeric structure resulted in unacceptable steric clashes among the interacting periplasmic N-terminal domain PN (residues 34-174) of each subunit in this MmpL3 trimer. The template-based trimeric structural model for MmpL3 was then relaxed using FG-MD followed by geometry regularization in Phenix and with Coot to obtain the final quaternary structure.

MmpL3 activity assay in intact Msmg cells

The activity of the different point-mutated or truncated MmpL3 mutants was determined by testing their ability to rescue the growth of a *Msmg* Δ *mmpL3* knock-out mutant. To this end, the pMVGH1 constructs expressing the different *mmpL3* mutants were used to transform a *Msmg* strain having undergone a single crossover event at its *mmpL3* locus (185), and the resulting transformants were next plated on 7H11-ADC agar containing Kan, Hyg and sucrose to select for allelic exchange mutants. Failure to isolate allelic exchange mutants at 30 and 37°C is indicative of the lack of activity of the *mmpL3* mutant expressed from pMVGH1.

The susceptibility of *Msmg* Δ *mmpL3* knock-out mutants expressing Cys-mutated variants of *mmpL3* (52 strains in total) to the thiol-reactive probes, ebselen (Sigma) and 2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate (MTSES) (Cayman Chemicals) was determined in 96-well microtiter plates in 7H9-ADC broth at 37°C by visually scanning for growth.

Construction of a tmaT knock-down mutant of Msmg

A conditional knock-down mutant of *Msmg* expressing *MSMEG_0319* (*tmaT*) under control of an *anhydro*-tetracycline-inducible promoter was constructed by homologous recombination. A two-step procedure employing the temperature-sensitive plasmid pPR27-XylE expressing the counterselectable marker *sacB* was used to achieve allelic replacement at the *tmaT* locus of *Msmg* mc²155 (415). pSETetR-*tmaT*, an episomal rescue plasmid in which the *tmaT* gene from *Msmg* was placed under control of an ATc-inducible promoter, was constructed by inserting the entire coding sequence of *tmaT* into pSETetR (185). Primer sequences for the knock-down construct are available upon request.

Whole cell radiolabeling experiments

Radiolabeling of whole *Msmg* cells (0.5 μ Ci/ml; specific activity, 54.3 Ci/mol, Perkin Elmer) was performed in 7H9-ADC-Tween 80 medium for 3 hr at 37°C with shaking. [1,2-¹⁴C]acetic acid was added at the same time as the thiol-reactive probes (ebselen or MTSES). For labeling of the *tmaT* conditional knock-down, washed cell pellets were resuspended to an OD₆₀₀ of 0.1 in 7H9-ADC-Tween 80 medium containing 0 to 10 ng/ml ATc and the cells labeled with [1,2-¹⁴C]acetic acid for 3 hr at 37°C.

Analytical procedures

Total lipids extraction from bacterial cells and preparation of fatty acid and mycolic acid methyl esters from extractable lipids and delipidated cells followed earlier procedures (185). [1,2-¹⁴C] acetic acid-derived lipids and fatty acid/mycolic acid methyl esters were separated by TLC on aluminum-backed silica gel 60-precoated plates F₂₅₄ (E. Merck) and revealed by PhosphorImaging.

Chapitre 3: Article 2

MmpL3 as a target for the treatment of drug-resistant nontuberculous mycobacterial infections

Présentation de l'article 2

L'article est représenté sous sa forme finale publiée le 10 juillet 2018 dans le journal *Frontiers in Microbiology* en tant que co-premier auteur à contribution égale.

Front Microbiol. 2018 Jul 10;9:1547. doi: 10.3389/fmicb.2018.01547. eCollection 2018.

Contribution des auteurs pour l'article 2

EJN, JS and MJ conceived the project, analyzed the data and wrote the manuscript. WL, PH, WT and VCNM generated and characterized the *M. smegmatis* recombinant strains, and carried out the MIC determinations and checkerboard assays. ANP synthesized inhibitors, contributed to the preparation of Table 3 and analyzed SAR data. AY performed the MmpL3 modeling studies.

Article 2

Perspective

MmpL3 as a target for the treatment of drug-resistant nontuberculous mycobacterial infections

Wei Li^{1#}, Amira Yazidi^{2,3#}, Amitkumar N. Pandya^{4#}, Pooja Hegde⁴, Weiwei Tong¹,
Vinicius Calado Nogueira de Moura¹, E. Jeffrey North^{4*}, Jurgen Sygusch^{2,3*} and Mary
Jackson^{1*}

Authors Affiliation:

¹Mycobacteria Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA;

²Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada;

³Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada;

⁴Department of Pharmacy Sciences, School of Pharmacy and Health Professions, Creighton University, Omaha, Nebraska, USA.

Co-first authors

* Co-corresponding authors

Running title: Inhibitors of MmpL3 in NTM

Conflict of interest: The authors disclose no potential conflicts of interest.

Corresponding authors:

Dr. E. Jeffrey North (jeffreynorth@creighton.edu);

Dr. Jurgen Sygusch (jurgen.sygusch@umontreal.ca);

Dr. Mary Jackson (Mary.Jackson@colostate.edu).

Abstract

Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections are emerging as a global health problem and pose a threat to susceptible individuals with structural or functional lung conditions such as cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis. *Mycobacterium avium* complex (MAC) and *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC) species account for 70 to 95% of the pulmonary nontuberculous mycobacterial (NTM) infections worldwide. Treatment options for these pathogens are limited, involve lengthy multidrug regimens of 12-18 months with parenteral and oral drugs, and their outcome is often suboptimal. Development of new drugs and improved regimens to treat NTM infections are thus greatly needed.

In the last two years, the screening of compound libraries against *M. abscessus* in culture has led to the discovery of a number of different chemotypes that target MmpL3, an essential inner membrane transporter involved in the export of the building blocks of the outer membrane of all mycobacteria known as the mycolic acids. This perspective reflects on the therapeutic potential of MmpL3 in *Mycobacterium tuberculosis* and NTM and the possible reasons underlying the outstanding promiscuity of this target. It further analyzes the physiological and structural factors that may account for the apparent looser structure-activity relationship of some of these compound series against *M. tuberculosis* compared to NTM.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; nontuberculous mycobacteria; MmpL3; mycolic acids; drug development.

Introduction

The prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacterial (NTM) infections caused by *Mycobacterium avium* complex (MAC) and *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC) species is increasing worldwide and poses a particular threat to susceptible individuals with structural or functional lung conditions such as cystic fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disease and bronchiectasis (59-63). Treatment options for NTM pulmonary infections involve lengthy (12-18 months) combination regimens with antibiotics that lack bactericidal activity and are associated with significant toxicity. For pulmonary MAC, the recommended treatment includes a macrolide, rifamycin and ethambutol to which intravenous amikacin may be added. Treatment of pulmonary MABSC typically consists of an oral macrolide in conjunction with intravenous or inhaled amikacin, and one or more of the following drugs: intravenous cefoxitin, imipenem or tigecycline, in addition to oral antibiotics (minocycline, clodazimine, moxifloxacin, linezolid) (61). The impermeability of the cell envelopes of NTM to drugs and the high number of efflux systems and antibiotic inactivation mechanisms with which NTM are typically endowed confer upon these microorganisms high intrinsic protection against antibiotics (416). There is clearly an urgent need for more active and better-tolerated drugs to improve therapeutic outcome (59, 62, 417, 418).

In the last three years, the phenotypic screening of compound libraries against NTM has yielded a number of hits with activity against MABSC, MAC or both complexes. Interestingly, several of these compounds appear to kill NTM through the inhibition of MmpL3, an essential mycolic acid transporter present in all mycobacteria whose therapeutic potential in the treatment of *M. tuberculosis* infections was highlighted in a number of recent studies (5, 392, 394, 395, 419-426). The availability of cidal inhibitors against this new target, some of which have already demonstrated activity in *in vivo* models of MABSC infection (427); (428) submitted (this issue); [Pandya *et al.*, submitted], provides much-needed novel opportunities for the treatment of pulmonary NTM infections. This perspective reflects on the therapeutic potential and promiscuity of MmpL3 in NTM and discusses recent findings from our laboratories toward understanding the basis for the better activity and looser structure-activity relationship of MmpL3 inhibitors against *M. tuberculosis* compared to NTM.

The phenotypic screening of compound libraries against NTM identifies inhibitors of MmpL3

In the last three years, the screening of compound libraries, including libraries of TB actives, against MABSC and MAC, has yielded a number of potent hits that appear to target the mycolic acid transporter MmpL3. These include indole-2-carboxamides (ICs) (429-431), benzothiazole amides [(428) submitted (this issue)] and a piperidinol derivative (PIPD1) (427, 430). Earlier work on analogs of the *M. tuberculosis* MmpL3 inhibitor BM212 had further highlighted the activity of pyrrole derivatives against a variety of NTM including *M. avium*, *M. goodsonae*, *M. smegmatis* and *M. marinum* (432-434). A subset of these hits and their MIC against *M. tuberculosis*, *M. avium* and MABSC isolates (including *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense* and *M. abscessus* subsp. *bolletti*) is presented in Table 3 along with that of other chemotypes reported to inhibit MmpL3 activity in *M. tuberculosis* (i.e., the 1,2-ethylene diamine SQ109, the tetrahydropyrazolopyrimidine carboxamide THPP1, and the adamantyl urea AU1235) (185, 187, 349, 392).

ICs have previously been identified as a novel chemical scaffold showing promise in the treatment of tuberculosis (394, 395, 420, 423). Based on their high anti-MABSC potency, bactericidal activity on extracellularly- and intracellularly-grown bacilli and promising safe pharmacological profile (429, 431) [Pandya *et al.*; submitted], two lead molecules were advanced for efficacy studies in a mouse model of MABSC infection. Oral administration of the lead compounds showed a statistically significant reduction in bacterial load in the lungs, spleen and liver of MABSC-infected mice compared to an untreated control group, with one of the two compounds (compound # IC25; see Table 3) showing similar efficacy to amikacin [Pandya *et al.*; submitted]. The intrapulmonary delivery of a lead benzothiazole amide compound also demonstrated *in vivo* efficacy in a mouse model of chronic MABSC lung infection [(428), submitted (this issue)], whereas the piperidinol-based compound PIPD1 was reported to restrict bacterial growth in a zebrafish model of MABSC infection (427). An interesting property of MmpL3 inhibitors first revealed in *M. tuberculosis* is their ability to synergize with a number of other antimycobacterial drugs or drug candidates including rifampicin, bedaquiline, clofazimine and β -lactams (425). Our preliminary studies with IC25 (see Table 3) in MABSC similarly point to the existence of a synergistic interaction between this MmpL3 inhibitor and clofazimine in

MABSC [Table S3]. Collectively, these results highlight the therapeutic potential of MmpL3 inhibitors in the treatment of NTM infections and provide a strong incentive to develop these compounds into new generation antimycobacterial drugs as their inclusion in anti-NTM drug regimens has the potential to lead to the faster and more efficient clearance of NTM from infected tissues.

MmpL3: A promiscuous mycobacterial target

The reason why so many chemical scaffolds kill *M. tuberculosis* and NTM through the inhibition of MmpL3 remains incompletely understood. MmpL3 belongs to the Resistance, Nodulation and Division (RND) superfamily of transporters that requires the transmembrane electrochemical proton gradient for activity. The observation that the most common resistance mutations identified in both *M. tuberculosis* and MABSC tend to map to a transmembrane region of MmpL3 overlapping with functional residues required for proton translocation or proton-driven conformational changes in the transporter has led to the hypothesis that inhibitors might target the proton relay site of MmpL3 (348). MmpL3 inhibitors are typically lipophilic ($\log P \approx 2.6$ to 7.0) and many suffer from poor aqueous solubility which likely favors their concentration in the inner membrane where MmpL3 is located. This property and the extreme vulnerability of MmpL3 (424) that may allow inhibitors with relatively weak binding affinity to the transporter to still inhibit enough of its activity to cause growth arrest, could explain the bias of phenotypic screens towards small hydrophobic inhibitors of MmpL3. The exquisite vulnerability of MmpL3 may further mask potential secondary targets of the inhibitors as illustrated by THPP derivatives that were found to target another essential mycolic acid-related protein in *M. tuberculosis* (435) and compounds such as SQ109, BM212 and some THPPs that show activity against non-replicating *M. tuberculosis* bacilli, a property typically not shared by other MmpL3 inhibitors (384). The fact that the hydrophobicity of ICs, THPPs, SQ109 analogs and urea derivatives is a key driver of their efficacy provides further support to the notion that the concentration of MmpL3 inhibitors in the phospholipid bilayer plays a key role in their activity (420, 422, 423, 429, 431, 434, 436-442).

A second mechanism through which high rates of apparent MmpL3 inhibitors may arise from phenotypic screens was proposed after it was found that unspecific uncouplers such as carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) or the K⁺ ionophore, valinomycin, both abolished MmpL3 activity in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* (384). This finding indicated that any compound with the ability to dissipate the proton motive force may indirectly inhibit MmpL3 activity with immediate consequences on mycobacterial growth and viability. Accordingly, and most likely explaining the relatively broad spectrum of activity of some of these compounds including against bacteria devoid of MmpL3 homolog, inhibitors such as the 1,2-ethylenediamine SQ109, the adamantyl urea AU1235 and the 1,5-diarylpyrrole derivative BM212 were found to impact to some degree the membrane potential, the electrochemical proton gradient or both components of the proton motive force of mycobacterial cells (384, 442-444). This unspecific activity, however, was later disputed in the case of BM212 and this compound proposed to directly inhibit MmpL3 on the basis of its demonstrated binding to the purified MmpL3 protein from *M. smegmatis* (186).

In conclusion, both direct and indirect mechanisms can lead to MmpL3 inhibition in treated mycobacterial cells and contribute to the promiscuity of the target. While not mutually exclusive, a precise understanding of how these two mechanism(s) play out for each inhibitor to eventually abolish mycolic acid export will require a detailed analysis of how each of them interacts with the transporter and affects the energy metabolism of the bacterium.

NTM versus *M. tuberculosis* efficacy

From the MIC data presented in Table 3 and previous studies (429-434, 442); (428) submitted (this issue)], it is obvious that the overall activity of MmpL3 inhibitors against NTM, particularly MAC, is less than that observed against *M. tuberculosis*. While the structural diversity of the chemotypes found to inhibit MmpL3 is very broad, spanning from compounds such as BM212 and THPP1, which are large (for MmpL3 inhibitors) multicyclic compounds, to SQ109 which is an ethylene diamine originally designed as an ethambutol analog, the majority of MmpL3 inhibitors reported to date have come from two other classes that contain the same pharmacophore which are the ureas (e.g., AU1235) and indole-2-carboxamides. The pharmacophore for these classes of MmpL3 inhibitors are two hydrogen bond donors and one

hydrogen bond acceptor in the center of the molecule and one bulky lipophilic aliphatic ring (adamantyl, cyclooctyl, cycloheptyl or substituted cyclohexyl groups) and one aromatic ring on either side of the core. For structure activity relationships, generally, as lipophilicity is increased on either the bulky aliphatic ring (typically through ring expansion or addition of methylene or methyl groups) or aromatic ring (typically through addition of halogens or methyl groups), anti-NTM activity is improved.

Since a number of factors could account for the overall better activity of MmpL3 inhibitors against *M. tuberculosis* than NTM, including species-specific variations in the structure of MmpL3 orthologs, increased drug efflux/degradation/modification in NTM relative to *M. tuberculosis*, or reduced compound penetration in NTM, we first sought to compare the MIC of the inhibitors presented in Table 3 against *M. smegmatis* recombinant strains expressing different MmpL3 orthologs. To this end, *mmpL3* from *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* and *M. abscessus* subsp. *abscessus* were expressed from the same expression plasmid in the background of a *M. smegmatis* mutant whose endogenous *mmpL3* gene was deleted by allelic replacement (*MsmgΔmmpL3*) (348). Expressing all orthologs from the same promoter in the same *M. smegmatis* strain abolished any potential differences in compound uptake, modification and efflux allowing for a direct comparison of the effect of the inhibitors against the three MmpL3 proteins. Importantly, all three *mmpL3* orthologs were expressed at comparable levels in this recombinant system [Fig. S3-1]. The results of these comparative MIC studies clearly indicated that the MICs of the inhibitors against the different *M. smegmatis* strains generally reflected their MICs against the *Mycobacterium* species from which the rescue *mmpL3* ortholog originated [Table 3]. The structure of MmpL3 thus appears to be the main driver of the susceptibility of each *Mycobacterium* species to these inhibitors.

MmpL3 modeling

To investigate the structural basis for the different susceptibilities of MmpL3 orthologs to various classes of inhibitors, the I-TASSER server (7) was used for automated full-length 3D structure prediction of MmpL3 transporters from *M. tuberculosis* H37Rv, *M. abscessus* ATCC 19977, *M. smegmatis* mc²155 and *M. avium* 104. The top predicted structure for each MmpL3 transporter corresponded to a C-score of > -1.5 suggesting a correct fold. All MmpL3 orthologs

resemble each other (root mean square differences based C-alpha atoms $< 0.4\text{\AA}$) and had as closest target the crystal structure of the *Burkholderia multivorans* hopanoid transporter HpnN (PDB 5khnB). Comparison of the predicted structures with that of HpnN yielded a high TM-score > 0.8 and low RMSD < 2.0 between residues that were structurally aligned by TM-align (6). The superposition of all three NTM MmpL3 orthologs onto MmpL3 from *M. tuberculosis* H37Rv shows very similar spatial overlap of the C-alpha positions of essential residues identified in the reference MmpL3 transporter (348) that can be seen in Figure 3-1a. Each of the predicted structures contained 12 TM helices.

We next aligned the amino acid sequences of the MmpL3 orthologs among each other using PSI/TM-Coffee (445) [Fig. S3-2]. Essential functional residues identified in *M. tuberculosis* MmpL3 (namely, residues: 251, 288, 640, 641, 710 and 715; boxed in green in Fig. S2) (348) are conserved and are all located in the central regions of the 12 TM helical bundle that is thought to be involved in proton translocation.

We then searched for sequence dissimilarities among the TM helices given the lipophilicity of the MmpL3 inhibitors. The stereo model in Figure 3-1b shows regions of the transmembrane helices in dark gray where the majority of amino acid residues are not conserved between MmpL3 orthologs and which span the central regions of the 12 TM helical bundle. Most of the dissimilar residues represent semi-conservative and non-conservative mutations that are shown as red boxes on the sequence alignment shown in Fig. S3-2. Several of these regions map vicinal to the functional residues and mutations that induce resistance. The shape differences in the geometries of the hydrophobic and polar side chains alters the packing of the 12 TM helices and is likely to concomitantly modify their dynamical behavior important for transport activity and inhibitor binding. Given that the inhibitors are partitioned into the lipid bilayer, from a thermodynamic perspective, their propensity to interact with the TM helices will further depend on two factors: their ability to interact preferentially with the hydrophobic side chains of the TM helices and their ability to form polar interactions with either backbone or polar side chains. It follows that both the differential helical packing modifying the binding loci of the inhibitors and the nature of the side chains of the TM helices probably account for the ortholog-dependent activity of MmpL3 inhibitors.

Future directions

There is an unmet medical need for the development of new bactericidal agents to treat pulmonary NTM infections. The novel classes of bactericidal MmpL3 inhibitors that have been reported in the last few years, some of which have demonstrated activity against *M. tuberculosis* and MABSC *in vivo*, highlight the therapeutic potential of this transporter in tuberculous and nontuberculous mycobacteria and provide much needed translational opportunities for the treatment of NTM infections. Future research is expected to gain further insight into the structure of MmpL3 and its variations across *Mycobacterium* species in order to leverage the emerging structure-activity relationship information now available for some of these compound series (422, 423, 426, 429, 431, 438-440, 442). Also, critical to the further development of these inhibitors will be the availability of a simple, non-radioactive, and relatively high-throughput assay to screen optimized analogs with increased activity against MmpL3. Currently available cell-free and whole cell-based assays (185, 186, 384, 424) indeed lack the simplicity of use and/or specificity required to rapidly screen such analogs. The development of such assays is currently the object of intense efforts in our laboratories.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Institutes of Health / National Institute of Allergy and Infectious Diseases (AI116525) (to MJ and EJM) and a grant from the Bill and Melinda Gates Foundation (OPP1181207) (to MJ and JS). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH. We are grateful to the Global Alliance for TB Drug Development for the provision of NITD-304 and NITD-349.

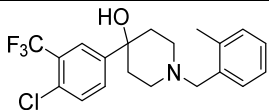
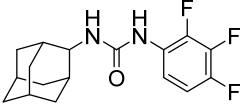
Author contributions

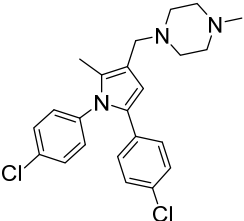
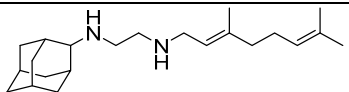
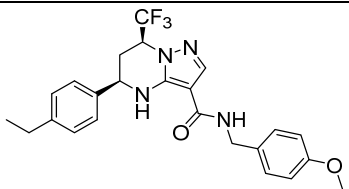
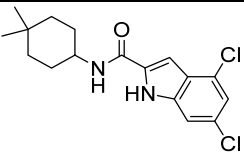
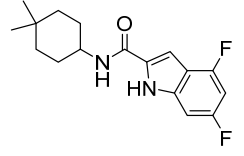
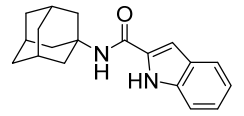
EJM, JS and MJ conceived the project, analyzed the data and wrote the manuscript. WL, PH, WT and VCNM generated and characterized the *M. smegmatis* recombinant strains and carried out the MIC determinations and checkerboard assays. ANP synthesized inhibitors, contributed to the preparation of Table 3 and analyzed SAR data. AY performed the MmpL3 modeling studies.

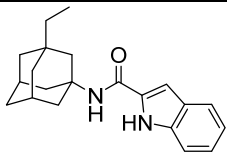
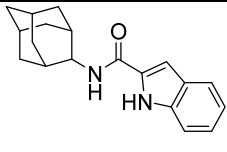
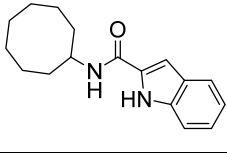
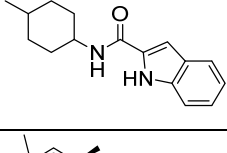
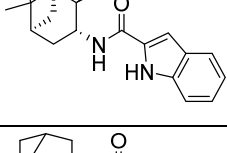
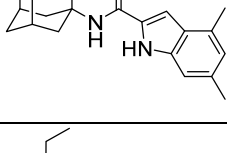
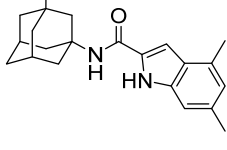
Table

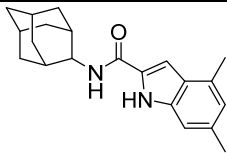
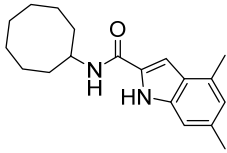
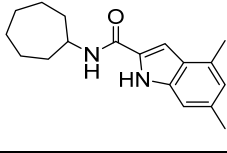
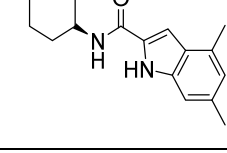
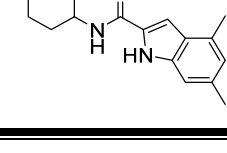
Table 3. MICs of MmpL3 inhibitors against *M. tuberculosis* [*Mtb*], *M. abscessus* complex species (*M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977 [*Mabs*]; *M. abscessus* subsp. *massiliense* CIP 108297 [*Mmas*]; *M. abscessus* subsp. *bolletii* ATCC 14472 [*Mbol*]), *M. avium* 104 [*Mav*] and *M. smegmatis* recombinant strains expressing different *mmpL3* orthologs.

MICs (in µg/mL) were determined were determined in 96-well microtiter plates at 37°C in 7H9-ADC-0.05% Tween 80 medium (*M. smegmatis*), 7H9-OADC-0.05% tyloxapol supplemented with 0.2% casaminoacids, 48 µg/ml pantothenate and 50 µg/ml L-leucine (*M. tuberculosis* mc²6206), cation-adjusted Mueller-Hinton broth (*M. abscessus* complex) or in cation-adjusted Mueller-Hinton broth supplemented with 5% OADC (*M. avium*) using the resazurin blue test [Martin *et al.*, 2003] and by visually scanning for growth. The orthologs of *mmpL3* from *M. abscessus* (*mmpL3abs*), *M. tuberculosis* (*mmpL3tb*) and *M. smegmatis* (*mmpL3smg*) are expressed from the replicative plasmid pMVGH1 under control of the *hsp60* promoter in the background of a *M. smegmatis* null mutant (*MsmgΔmmpL3*) of which the entire *mmpL3* ORF was deleted and replaced with a kanamycin-resistance cassette. Control drugs: APRA, apramycin; BDQ, bedaquiline; CFZ, clofazimine; CLA, clarithromycin. nd, not determined. ^aMIC value against *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 [Low *et al.*, 2017]; ^bThe precise *M. avium* strain used by Dupont *et al.* (2016) in the MIC determination of PIPD1 was not indicated and may be different from *M. avium* 104.

Inhibitor	Structure	<i>Mtb</i>	<i>Msmg</i>	<i>Mav</i>	<i>Mabs</i>	<i>Mmas</i>	<i>Mbol</i>	<i>MsmgΔmmpL3</i>		
								<i>mmpL3smg</i>	<i>mmpL3abs</i>	<i>mmpL3tb</i>
PIPD1		0.15 ^a	< 1	125 ^b	0.125	0.125	nd	nd	nd	nd
AU1235		0.1-0.2	1.6-2.5	> 32	0.5	1	0.5	2	2	0.3

BM212		6	8-12	2	1-2	1-2	nd	8-12	8	4-6.2
SQ109		0.6-0.8	6.2-12.4	4	> 32	> 32	nd	8-12	16	0.4-0.8
THPP1		0.4-0.8	> 25	> 16	> 16	> 16	nd	> 32	> 32	0.8-2
NITD304		0.004	1	8	0.016	0.016	nd	1	0.12	0.06
NITD349		0.008	1	8	0.016	0.031	nd	0.25	0.25	0.06-0.12
IC5		0.2	1.6-3.2	>32	0.25	0.5	0.25	1.6-3.2	3.2	0.2

IC6		1.25	> 20	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	1.25
IC9		0.39	> 25	> 32	> 32	> 32	32	32	> 32	32	0.25-0.39
IC10		0.39	25	> 32	> 32	> 32	32	25	> 32	25	0.2
IC15		5	12.5	> 32	> 32	16	16	8-12.5	> 32	8-12.5	3-4
IC16		0.05	0.8	8	0.12	0.06	0.12	3-4	4	3-4	0.06
IC20		0.02	> 20	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	0.16
IC21		0.04	> 20	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	0.45

IC24		0.04	> 20	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	0.16
IC25		0.02	0.3-0.6	0.25-0.5	0.06	0.03	0.04	0.8-1	0.5	0.08
IC26		0.08	0.6	2	0.03	0.06	0.03	0.6-1	1	0.16-0.25
IC29		0.31	> 20	> 32	0.06	0.06	0.03	> 32	1	0.62
IC30		0.16	nd	> 32	0.125	0.125	0.06	2	1	0.25-0.31
APRA	-	1	nd	2	2	4	nd	2	4	2
BDQ	-	0.5-1	nd	0.01	0.0625	nd	nd	< 0.03	< 0.03	< 0.03
CFZ	-	0.5-1	nd	< 0.125	0.125	nd	nd	1	1	0.5
CLA	-	< 0.125		0.125	0.5-1	0.25	nd	0.5	1	0.5

Figure

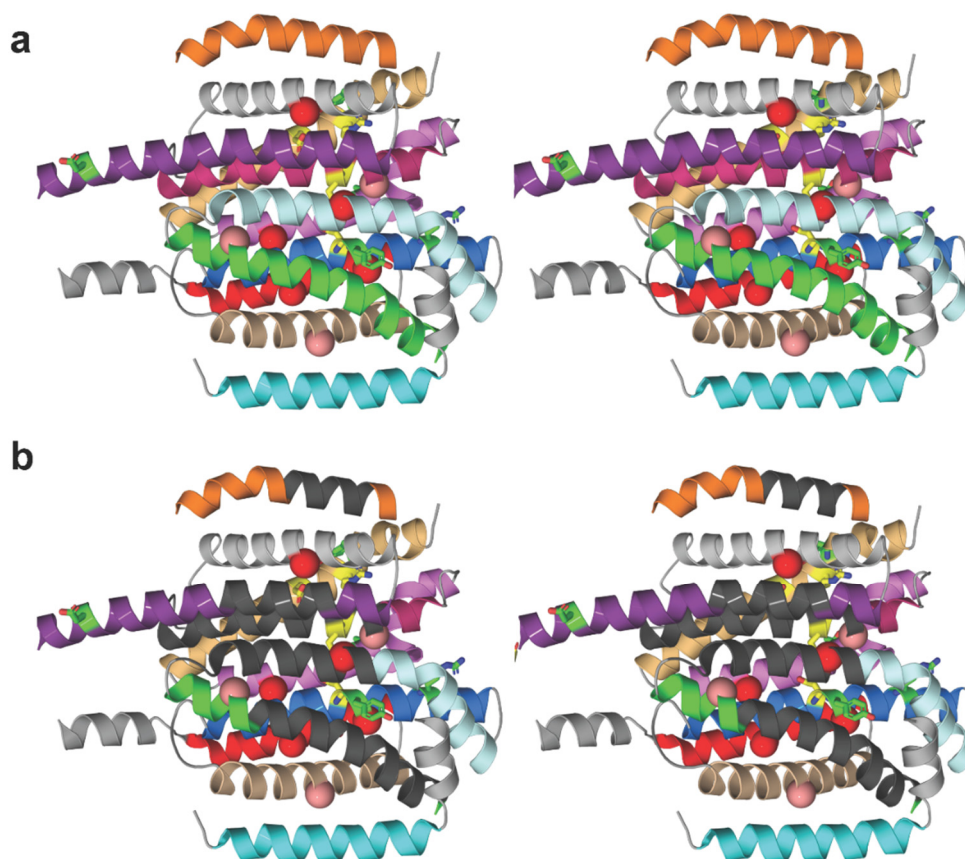


Figure 3-1. Structural comparison of NTM and *M. tuberculosis* MmpL3 transporters.

(a) Stereo model showing the transmembrane (TM) helices of the *M. tuberculosis* MmpL3 subunit structure as predicted by I-TASSER. The TM helices are color-coded to improve visibility. From top to bottom, TMS-7 (orange), TMS-9 (gray), TMS-8 (violet purple), TMS-10 (pink), TMS-12 (light orange), TMS-11 (violet), TMS-5 (pale cyan), TMS-4 (marine), TMS-6 (green), TMS-2 (red), TMS-3 (wheat) and TMS-1 (cyan). The TM helices encompass residues whose mutations resulted in significant reduction in transport activity, shown in green, and residues 251, 288, 640, 641, 710 and 715 whose mutation abolished transport activity, colored yellow [Belardinelli *et al.*, 2016]. The positions of frequently encountered resistance mutations to one or more MmpL3 inhibitor series are shown as red and salmon spheres centered on the C α atom of the native MmpL3 residue [Belardinelli *et al.*, 2016]. These residues map to TM helices. Resistance mutations also producing a significant reduction in growth are shown in red and those that slightly attenuated growth are colored salmon. (b) Stereo model as in (a) showing regions of the TM helices where the majority of residues are not conserved between MmpL3 orthologs (dark gray). Most of the dissimilar residues represent semi-conservative and non-conservative mutations (see Fig. S2). Several of these regions map vicinal to the functional residues and mutations that induce resistance.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01547/full#supplementary-material>

Supplementary table

Table S3. Interaction of indole-2-carboxamides with other antimycobacterial drugs and experimental compounds against *M. abscessus subsp. massiliense* CIP 108297 as determined by REMA checkerboard.

Five combinations with the indole-2-carboxamide compound IC25 were tested against *M. abscessus subsp. massiliense* CIP 108297. Bacterial cultures were grown for 3 days at 37°C in Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10 % ADC (BD, Difco) and 0.05 % Tween 80 before the addition of resazurin. MIC values by REMA (in µg/ml) were read after an additional overnight incubation at 37°C.

The fractional inhibitory index (Σ FIC) of each drug combination was calculated as described previously (446). Σ FIC values ≤ 0.5 indicate synergistic activity; values ≥ 4 indicate antagonism; and values in between correspond to additivity (no interaction).

APRA, apramycin; AZI, azithromycin; BDQ, bedaquiline; CFZ, clofazimine; CLA, clarithromycin.

Compound	MIC	Interaction with IC25	
		Σ FIC	outcome
IC25	0.05	-	-
CFZ	1	0.5	synergistic
BDQ	0.125	2	additive
AZI	2	1.12	additive
CLA	0.125	0.75	additive
APRA	2	1	additive

Supplementary figures

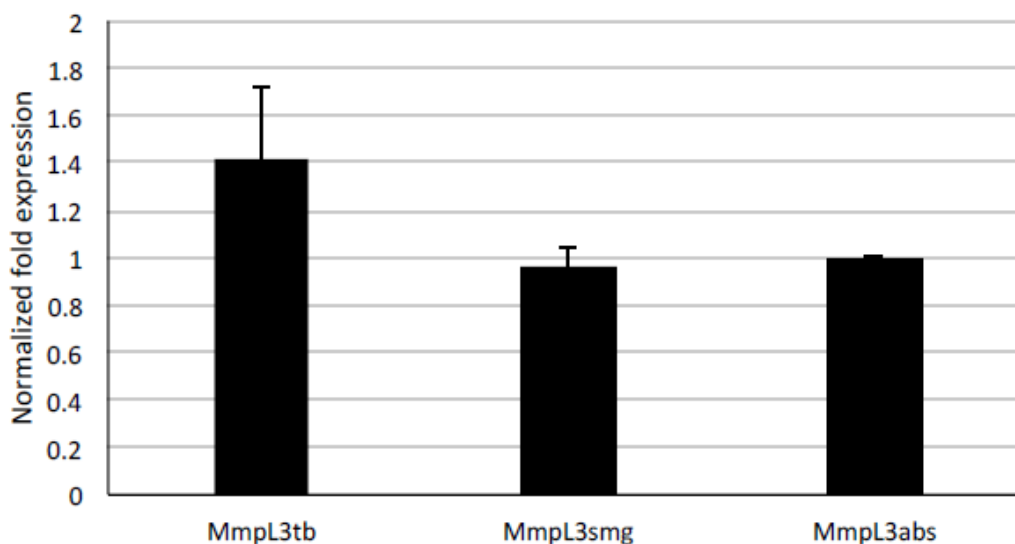


Figure S3-1. Level of expression of the *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* and *M. abscessus* MmpL3 orthologs in *MsmgΔmmpL3*.

The level of expression of the three *mmpL3* orthologs in *MsmgΔmmpL3* was compared by qRT-PCR using primers mmpL3_O1 (5'-GCGCGCTGGGCATCATGC-3') and mmpL3_O2 (5'-GCGGAACCGGCTCACGATG-3'). The target cDNA was normalized internally to the *sigA* cDNA in the same sample. mRNA levels are means \pm standard deviations of two PCR reactions performed on two cDNA preparations. Student's *t*-test analysis showed no statistically significant differences between *mmpL3* orthologs ($p > 0.05$). RNA was extracted from 5-ml cultures grown to an OD₆₀₀ of 0.6 using the Direct-zol™ RNA Miniprep kit (Zymo Research) per the manufacturer's instructions. Reverse transcription reactions were carried out using the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen), and qRT-PCRs were run using the PerfeCTa SYBR Green Fast Mix (Quanta BioSciences). PCR conditions: 95°C (2 min; enzyme activation), followed by 40 cycles of 95°C (15 sec; denaturation) and 60°C (30 sec; annealing/extension). Mock reactions (no reverse transcription) were done on each RNA sample to rule out DNA contamination.

IN	HEL	OUT	TM1		
M_abscessus	1	NFAMGRMUYRYR	IVVAAFVTVCLGSGLFGI	TLGDHVTQSGFFADNSESVKASVMADDALGRDR	66
M_avium_104	1	-----MYRYRYIVIGVTV	ALCLLGGVFGI	SLGKHVTSQGFYDDASQSVKASVLDGDTYGRDR	58
M_smegmatis	1	NFAMGRTRVYQFR	YIVGVMVALCLGGVYFGI	SLGKHVTSQGFYDEGSQSVASLIGDEVYGRDR	66
M_tuberculosis	1	NFAMGRTRVYRYR	YIVGVMVALCLGGVYFGI	SLGKHVTSQGFYDDGSSQSVASVLDGQVYGRDR	66
	1	*****			66
M_abscessus	67	THVVAVIAAPEGKT	VDDPAFQKVKIDHFDQLOKDN	PDEVYGWAGWLRAPTTDPTVKRMVTEDRKH	132
M_avium_104	59	SHVVATFTTDPGKT	VDDAGWRDQVYAELNFKADHPDQV	YVWAGWLAAPDSTNPVYKGMVSEDKKH	124
M_smegmatis	67	SHVVAILTPDOKKY	TDKAWQKVTTELDOVVKDHEQIV	GWVWGLKAPDPTDPTVSAMKTDQLRH	132
M_tuberculosis	67	GHVVAIFQAPAGKT	VDDPAWSKKQVDELRFQDDHPDQV	LGWAGYLRSQAT-----GMATADKKY	127
	67	*****			132
M_abscessus	133	TFVSYSIKGDDDD	TILNYYKALSNPKDDOPAKNKF	LMDGVDIQLAGLQPVASELTGTIGKDDQRM	198
M_avium_104	125	TFVSIPLKGGDD	DTILNYYKAJA-PDMQK	-----LNGGAVOLAGLEPIANAL	TGTIATDQRRM
M_smegmatis	133	TFVSIPLKGGDD	DEILNYYQVVE-PELQQ	-----VNGGDRLAGLNPLASELT	TGTIGEDQKRA
M_tuberculosis	128	TFVSIPLKGGDD	DTILNYYKAJA-PDLQQ	-----LDGGTVKLAGLQPVASELT	TGTIATDQRRM
	133	*****			198
			TM2	TM3	TM4
M_abscessus	199	EVL	SLPVMVAVLFFVFGGVI	AAAGLPLMVGGTLIAGALGIMRLV	TLFAPVHFFAQPVVTLIGLGIAI
M_avium_104	182	EVL	AVPMVAVLFLVFGGVA	AAAGLPAIVGGLSIAGSLGLRL	VAVFGPVHYFAQPVVSLIGLGIAI
M_smegmatis	190	EVA	AIPLVAVLFFVFGTV	IAAALPAIIGGLAIAAGALGIMRL	VAEFTPVHFFAQPVVTLIGLGIAI
M_tuberculosis	185	EVL	ALPLVAVLFFVFGGVI	AAAGLPLMVGGTLIAGALGIMRFL	AIFGPHVHYFAQPVVSLIGLGIAI
	199	*****			264
			TM4	TM5	
M_abscessus	265	SYSLFIYSRFR	EIEAGYDTETAVRRTV	ITSGRTYHSA	TLIAAALHPMLT
M_avium_104	248	SYGLFVYSRFR	EIEAGYDEAAVRRVT	ITAGRTYHSA	VLIASSASLLV
M_smegmatis	256	SYGLFIYSRFR	EIEAGYDEAAVRRVT	ITSGRTYHSA	VLIASSVPLLL
M_tuberculosis	251	SYGLFIYSRFR	EIEAGYDEAVRRTV	ITAGRTYHSA	VLIASAIGLLL
	265	*****			330
			TM6		
M_abscessus	331	SVLLAA	ILAVTVLPAQLG	YLRHMDALS	IK-----RFSRTKSR
M_avium_104	314	AVGLAA	LLSITFLPAQLG	YLRHMDALGV	RTAFRVFPLRMWKYSRAYL
M_smegmatis	322	SVMLAA	ILSITVLAALAL	YLRHMDALGV	RTLLKIPFLAMWQFSRR
M_tuberculosis	317	SVMLSA	ILSITVLPACL	YLRHMDALGV	RTLFRVFPFLAMWKISAAYL
	331	*****			396
			TM7		
M_abscessus	374	GFVGR	TVVVMQRPLVFAVPI	VIVHLLLIIP	LGNLKGGFSEKYL
M_avium_104	380	GFVGL	VVMVRKPLAFAI	PIAVGHILLV	IPVPLNLSFGGMSEKYL
M_smegmatis	388	GFVGR	LVMVMKRP	IAPAPILVVMVLLI	IPVGLSLGGISEKYL
M_tuberculosis	383	GFVGL	VVMVRKRPV	LAAPVIVIHILLI	IPVGLSLGGISEKYL
	397	*****			462
M_abscessus	440	TETIT	IVTKGA-----TDS	LNQIRADAMKUPGF	VEPGGDKTOMWRRO-AVKTD
M_avium_104	446	TEQLTV	VIQSDMHSKVT	DDOQVADIRNR	ISGIGGFTD-----KTW
M_smegmatis	454	TEPL	TLVMKREDGEP	ITDAQIADPR	KALTVSGFTDPDNDPE
M_tuberculosis	449	TNPL	TLVIQTSNHQP	VTDAQIADIRSK	AMATGGFTDNDPANM
	463	*****			528
M_abscessus	489	--GDT	SVKVIQNALV	DRNTAGAKVK	OLREIPVPKGYTMY
M_avium_104	506	--KPD	SVRVVQI	NGLENRNDAAK	IAELRAVNPPKGL
M_smegmatis	509	--KPD	SVRVVQI	NGLENRNDAAK	IAELRALPPHGT
M_tuberculosis	504	--KPD	SVRVVQI	NGLENRNDAAK	IAELRALPPHGT
	529	*****			594
			TM8	TM9	TM10
M_abscessus	553	SVTT	ILMFLAFG	SVLPIKAAYMSAL	GLGSGTNGILTWIF
M_avium_104	572	GATL	ILMFLAFG	SVLPIKAAYMSAL	TLGSGTNGILTWIF
M_smegmatis	573	VTTT	ILMFLAFG	SVLPIKAAYMSAL	TLGSGTNGILTWIF
M_tuberculosis	568	VTTT	ILMFLAFG	SVLPIKAAYMSAL	TLGSGTNGILTWIF
	595	*****			660
			TM10	TM11	
M_abscessus	619	IYGL	SDYEVFLMS	RMIEARH	QGLSTTEAVRGTANT
M_avium_104	638	GFGL	ATDYEVFVLS	RMWEARER	GPSTAEAIRIGTATT
M_smegmatis	639	IWGL	SDYEVFLV	SRMWEARER	GPSTAEAIRIGTATT
M_tuberculosis	634	IWGL	SDYEVFLV	SRMWEARER	GPSTAEAIRIGTAA
	661	*****			726
			TM12		
M_abscessus	685	AFGL	IAALLD	ATVVRMLL	IPAVMKLLGDDC
M_avium_104	704	AFGL	IAALLD	ATVVRMLL	IPAVMKLLGDDC
M_smegmatis	705	AFGL	IAALLD	ATVVRMLL	IPAVMKLLGDDC
M_tuberculosis	700	AFGL	IAALLD	ATVVRMLL	IPAVMKLLGDDC
	727	*****			783

Figure S3-2. Amino acid sequence alignment of MmpL3 from *M. tuberculosis*, *M. abscessus* ATCC19977, *M. avium* 104 and *M. smegmatis* mc2155 using PSI/TM-Coffee.

Conserved sequence (*), conservative mutations (:), semi-conservative mutations (.), and nonconservative mutations (). Essential functional residues are boxed in green. Regions of dissimilarity between MmpL3 orthologs are shown as red boxes.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Chapitre 4: Article 3

Ready to engage: an open state of the TriABC triclosan efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*

Présentation de l'article 3

L'article est représenté sous sa dernière version soumise au journal *EMBO* (mars 2018) en tant que troisième co-auteur. L'article est en cours de préparation pour une future re-soumission.

Contribution des auteurs pour l'article 3

H.I.Z., I.R., and J.S. designed the study. A.T.N., J.W.W., and I.V.L. purified proteins, generated mutated variants of TriAxBC and performed the proteolysis and functional studies. A.Y. performed the gel filtration studies. L.F. and I.R. performed the cryo-EM studies and calculated the cryo-EM map. A.Y. and J.R. together with J.S. generated the TriAxBC model and performed the structure function analysis of the cryo-EM map. H.I.Z., I.R., and J.S. wrote the manuscript with comments from all authors.

Article 3

Ready to engage: an open state of the TriABC triclosan efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*

Lucien Fabre¹, Abigail T. Ntreh², Amira Yazidi³, Jon W. Weeks², Inga V. Leus², Jakob Ruickoldt⁴, Isabelle Rouiller^{1,5*}, Helen I. Zgurskaya^{2*}, Jurgen Sygusch^{3*}

Authors Affiliation:

¹ McGill University, Department of Anatomy and Cell Biology, Montreal, Quebec, Canada H3A 0G4

² University of Oklahoma, Department of Chemistry and Biochemistry, Norman, OK 73019, USA

³ University of Montreal, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Medicine, CP 6128 Station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada

⁴ Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle, Germany

⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology and Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, The University of Melbourne, Parkville, VIC, 3010, Australia

Running title: TriABC ready to engage

Conflict of interest: The authors disclose no potential conflicts of interest.

Corresponding authors:

(J. S.) jurgen.sygusch@umontreal.ca ;

(H. I.) elenaz@ou.edu ;

(I. R.) isabelle.rouiller@unimelb.edu.au

Abstract

We determined the structure of the TriABC inner membrane component of the triclosan/SDS-specific efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* by cryo-electron microscopy to 4.3 Å resolution. Unlike other multidrug efflux transporters, the inner membrane transporter TriC of the RND superfamily requires two periplasmic membrane fusion subunits TriA and TriB. Interpretation of the cryo-EM map afforded a complete structure of TriC and a partial structure for the bound TriA. Our results provide evidence for a substrate-free open conformation of TriABC, which represents an intermediate step in the assembly of the efflux complex prior to engagement of the outer membrane channel. Structural analysis identified two disjointed tunnel networks in TriABC impeding substrate efflux consistent with inhibition of the complex in the unengaged state. Based on functional analyses, we propose that substrate binding triggers conformational changes that interlink the tunnel networks in the engaged state thereby rendering them capable of mediating substrate efflux.

Keywords: *TriABC, TriA, TriB, TriC, Pseudomonas aeruginosa, pump efflux, triclosan, SDS, cryo-EM.*

Introduction

Gram-negative bacteria are resistant to a broad range of antimicrobial agents due to a combined action of a permeability barrier of the outer membrane and active multidrug efflux (227, 447). The notoriously antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* species, a nosocomial human pathogen, possesses both an extended repertoire of multidrug efflux pumps and the outer membrane of extremely low permeability (291, 448). Multidrug efflux pumps belonging to the RND (Resistance-Nodulation-cell Division) superfamily of transporters are at the core of the *P. aeruginosa* antibiotic resistance and the focus of the present study.

Among twelve RND transporters encoded on the chromosome of *P. aeruginosa*, TriABC-OpmH stands apart because of its unusual structural and functional features (289, 306). Although most RND-type efflux pumps are tri-partite protein complexes, TriABC-OpmH complex comprises four subunits: the RND transporter TriC, the outer membrane channel OpmH from the Outer Membrane Factor (OMF) family and two different periplasmic membrane fusion proteins (MFPs) TriA and TriB. Together the four components form a trans-envelope efflux pump spanning the two membranes and the periplasm of *P. aeruginosa* cell envelope. TriABC-OpmH has a narrow substrate specificity with an antimicrobial agent triclosan and a detergent SDS as the only known substrates of this pump. Although triclosan and SDS are often used together in various anti-bacterial soaps, their activities are antagonistic to each other and depend on the presence of TriABC-OpmH (289). Both triclosan and SDS are also substrates of various RND efflux pumps including the well-characterized *E. coli* AcrAB-TolC and *P. aeruginosa* MexAB-OprM (289, 449).

The functional unit of RND transporters is a trimer that comprises a periplasmic porter domain and a transmembrane domain, with each protomer contributing two large periplasmic loops and twelve transmembrane segments (TM1 to TM12) (313). In AcrB transporter, the porter domain accommodates a large drug-binding cavity, but an additional substrate binding site has also been associated with TM2 (283, 284, 450). The conformational changes in the porter domain are driven by the proton translocation through TM4 and TM10, where several highly conserved charged residues are located (297, 298, 451). During active transport, the three

RND protomers are thought to adopt three distinct conformations driving the substrate from the access pocket into the deep pocket and then into the tunnel of the MFP and are named Loose (L), Tight (T) and Open (O), respectively (263).

The porter domains of RND transporters are also the docking sites for the assembly of the trans-envelope complexes with MFP and outer membrane proteins (277, 452). Based on homology with other MFPs (278, 453), the structures of TriA and TriB are thought to comprise four domains: the α -hairpin, the lipoyl, the α - β barrel and the membrane proximal (MP) domains. Recent structural studies of AcrAB-TolC support a model of the trans-envelope complex, in which the MFP forms a hexameric, funnel-like structure that occupies the periplasmic porter domain of a trimeric RND transporter and its α -hairpins are fully extended into periplasm to contact the periplasmic tip of a trimeric OMF (277, 454). Functional and biochemical studies showed that the complex is dynamic, and its assembly is concurrent with the conformational changes in MFP needed to activate the transporter and open the channel for a substrate to cross the outer membrane (447, 455, 456).

In the assembled trans-envelope complex, the MFP subunit forms two different interfaces, with both the RND transporter and with the OMF. These two interfaces are functionally non-equivalent and in the TriABC-OpmH complex are specific for TriA and TriB proteins (289, 457). The α -hairpin of TriA but not TriB is essential for recruitment of OMF, whereas the MP domain of TriB but not TriA is important for the activity of the efflux pump (289). In the complex, TriA and TriB are arranged in the symmetric manner and each MFPs occupies a specific binding site in TriC and OpmH (457, 458). In a covalently linked TriAxB dimer, the C-terminus of the whole length TriA protomer is linked to the N-terminus of a signal peptide-less TriB by a flexible linker. TriAxB assembles a complex with TriC and is fully functional in both the native *P. aeruginosa* host with the OpmH channel and in *E. coli* with TolC (457, 458).

An outstanding question is the conformational dynamics of MFPs that drive tripartite complex formation. Structural studies have provided insight into the molecular architecture of the tripartite complex promoted by MFPs (277, 454), however the conformational state of MFPs in complex with the inner membrane transporter prior to the tripartite complex formation is largely unknown. This substrate-free state is important as it prevents the transporter from futile efflux cycling and depletion of cell energy and forms the basis for substrate recognition that likely triggers formation of the tripartite complex and activation of drug efflux (456, 459). A model has been postulated for the substrate free complex formed by the inner membrane transporter with its cognate MFP, later nick-named “drug sweeping” state (267, 456, 459, 460). To investigate the conformation of such a “drug sweeping” state, the structure was determined of the inner membrane transporter TriC interacting with the fused TriAxB dimer using single particle cryo-electron microscopy. Our results provide evidence for a substrate-free open conformation of TriAxBC, which could be an intermediate step in the assembly of the trans-envelope efflux complex. Structural analysis of the TriAxBC complex identified two disjointed tunnel networks in the inner membrane complex impeding substrate efflux consistent with inhibition of the TriAxBC complex in the unengaged state. Based on mutational analysis, we propose that substrate binding triggers conformational changes that interlink the tunnel networks in the engaged state thereby rendering them capable of mediating substrate efflux.

Results

Fused TriAxB forms a stable TriAxBC transporter complex

To examine the structural integrity of the complex, we co-expressed the His-tagged TriC transporter with TriA and TriB produced either as two separate polypeptides (TriABC) or as a fused TriAxB dimer (TriAxBC) (289). TriABC and TriAxBC overexpressed in the hyperporinated efflux-deficient *E. coli* $\Delta 9$ -Pore cells lacking all TolC-dependent transporters (458) associate with the endogenous TolC channel and confer resistance to triclosan and SDS (289) (Table S4-1). Of the two complexes, TriAxBC conferred greater resistance to triclosan and SDS. However, both complexes exhibited comparable efflux efficiency, when their activities were reconstituted in *E. coli* $\Delta 9$ -Pore cells using the fluorescent membrane probe Nile Red (Fig. S4-1).

TriA and TriB both co-purified with TriC His-affinity tag fraction, however the purified TriABC complex was heterogeneous and contained substoichiometric amounts of TriB protein (Fig. S4-2). In contrast, the fused TriAxB protein formed a stable complex with TriC and was used for the cryo-EM structure determination. Size exclusion chromatography yielded a single homogeneous peak for the purified TriAxBC complex that corroborated the 1:1 TriC: TriAxB stoichiometry. The relative molecular weight of the peak fraction corresponded to ~ 620 kDa (Fig S4-2), which is entirely consistent within experimental error (10%) of the expected molecular weight for a stoichiometric trimeric TriAxBC complex (560 kDa) surrounded by a n-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM) detergent corona.

Structure of the TriAxBC complex

We used single particle analysis of cryo-EM images to determine the molecular architecture of TriAxBC. The cryoEM map was determined to 4.35 Å resolution using the gold-standard Fourier shell correlation (FSC= 0.143) criterion (Fig. 4-1). 2D analysis as well as a probabilistic initial 3D model confirmed a trimeric symmetric shape (C3 symmetry) of the particles (Fig. S4-3A and B). The imposition of C3 symmetry significantly increased the resolution of the EM map as without imposition of C3 symmetry, the resolution corresponded to 6.54 Å for the EM map (FSC = 0.143 criterion). Details of grid preparation, cryo-EM data acquisition, and particle analysis are described in the Methods section.

The TriC subunit structure was successfully determined by a combination of homology modelling and cycles of structure refinement and model rebuilding that fitted the entire TriC amino acid sequence to the electron density. TriC assembles as a 120 Å long and 95 Å wide homotrimer (Fig. 4-2B) and can be decomposed figuratively into a TM domain and an extensive periplasmic ‘headpiece’, comprising porter and docking domains (313). Each protomer comprises 12 transmembrane helices (TM1–TM12). The N-terminal (TM1–TM6) and C-terminal (TM7–TM12) halves of TriC are related by a pseudo-twofold symmetry. A large periplasmic domain is created by two extensive periplasmic loops connecting TM1 with TM2 and TM7 with TM8, respectively. This periplasmic domain can be divided into six sub-domains: the periplasmic N- (PN1 and PN2) and C- (PC1 and PC2) terminal regions, and docking N-terminal (DN) and C-terminal (DC) regions (Figs. 4-2A). Sub-domains PN1, PN2, PC1 and PC2

form the pore domain, with PN1 making up the central pore and stabilizing the trimeric organization. Sub-domains DN and DC contribute to form the docking domain. The trimeric TriC structure suggests that sub-domains PN2, PC1 and PC2 are located at the outermost core of the periplasmic domain, facing the periplasm. Sub-domains PC1 and PC2 also form an external cleft while an adjacent second external cleft is formed between sub-domains PC1 and PN2 in the TriAxBC structure.

Partially ordered TriA subunit.

In the second round of structure determination, we sought to interpret a region of residual EM density on each TriC protomer that could not be fitted by the TriC polypeptide sequence (Fig. 4-3A). This region comprised a compact structure that interacted with each TriC protomer and faced into the periplasm. Unlike in the Open/Extrusion (substrate free) B subunit of substrate bound AcrB (PDB 3AOD), in TriC, the periplasmic cleft formed by PC1 and PC2 sub-domains of each TriC protomer is partially occluded by a strand of residual density that could not be interpreted in terms of the TriC polypeptide sequence (Fig. 4-3B). The strand extends from the PC2 region of TriC to the outer leaflet of the inner membrane and terminates in a well-defined region of density that extends into the region of the detergent micelle. The mature form of the TriA N-terminus is lipid modified (289) and palmitic acid covalently bound to the TriA N-terminus Cys-31 in the form of S-(2,3-bis(palmitoyloxy)propyl)-N-palmitoylcysteine (461) could be fitted into this region of density (Fig. 4-3C). The strand of residual EM density extending from the lipid modification acid was then interpreted as the polypeptide sequence of the N-terminus region of TriA (residues 32-47).

We next sought to interpret a small region of residual density that is globular in shape, and adjacent to the EM density associated with the TriA N-terminal region and also shown in Fig. 4-3B. The identification of this residual EM density was made using a modelling tool in Phenix, designed for model-building into cryo-EM and low-resolution maps (380). This tool enabled the sequence corresponding to residues 297-362 of the MP C-terminal region to be fitted into the residual density. The structure of TriAxBC consisting of the TriC trimer and the partial TriA trimer was then further improved by iterative real space refinement against the cryo-EM map. This final structure yielded good metrics, as shown in Table 4, and a very good map

correlation coefficient of 0.80. The resultant fit of the modelled TriAxBC trimer to the cryo-EM map is shown in Fig. 4-3B and in movie S4. The refined structure explained virtually all observed density in the cryo-EM map (Fig. S4-4), except for the detergent corona which was not modelled due to its apparent disordered structure. The TriA N-terminal region is stabilized by a small number of polar interactions with the porter subdomains PC1 and PC2 of the periplasmic cleft of TriC, while the interaction surface of the TriA MP domain with DC and PC2 sub-domains contains largely polar as well as several hydrophobic residues. The polypeptide sequence corresponding to the remaining polypeptide fold of TriA and the entire polypeptide sequence corresponding to the TriB membrane fusion protein, covalently linked to TriA, could not be associated with electron density in the EM map.

Substrate binding sites

The alignment of AcrB and TriC amino acid sequences based on their respective structures (Fig. 4-4A) highlighted several differences between the two transporters that indicate features unique for TriC in the putative substrate binding site. In AcrB, the access (proximal) and deep substrate (distal) binding pockets are separated by a switch loop of 8 residues that is bounded by conserved residues Gly-614 and Gln-622, with Phe-617 creating a partition between the two sites and restricting the channel connecting them (283, 284, 447). The conformation of this loop appears to be critical for binding and efflux of such antibiotics as doxorubicin and erythromycin (283, 284). In TriC, the equivalent loop is much longer consisting of 15 residues, bounded by conserved residues Gly-598 and Gln-613, and penetrates further into the proximal binding site (Fig. 4-4B), and thus lining the putative proximal binding site. The tip of the loop contains residues Phe-604, Tyr-605, Leu-606 in TriC while in AcrB, the tip of the loop has residues Phe-615, Gly-616, Phe-617 with the last residue thought to be critical for interactions with antibiotics (283). A conserved Arg-603 (Arg-620 in AcrB) is present in the loop and is oriented facing into the TriC interior.

To test whether indeed the residues that line the putative binding pockets of TriC impact substrate binding, we introduced amino acid substitutions vicinal to the putative proximal access site and deep distal binding pocket (Fig. S4-5) and analysed the ability of mutants to confer resistance to triclosan and SDS and the ability to expel Nile Red from *E. coli* (Fig. 4-4C-E). We

found that several substitutions had a significant effect on substrate specificity and activity of TriC. The Arg603Ala substitution had only a mild effect on TriAxBC activity with the partial loss of ability to confer triclosan resistance (four-fold decrease in minimal inhibitory concentrations, MICs, in comparison to WT TriAxBC) and was matched by a partial loss of Nile Red efflux (Fig. 4-4C-D). The conserved Gly598Val substitution where the putative switch loop commences in TriC led to a reduction of Nile Red efflux by TriAxBC compared to wild type and obliterated the TriAxBC-dependent resistance to SDS and triclosan. Ser276Ala variant was active in efflux of Nile Red and resistance to triclosan but could only partially complement the SDS susceptibility of efflux-deficient $\Delta 9$ cells. Val271Glu variant was functionally equivalent to the wild type TriAxBC. Finally, Gln181Ala variant affected significantly the ability to protect *E. coli* from triclosan with at least 8-fold decrease in the MICs of triclosan and a decrease in the ability to expel Nile Red and which was concurrent with the loss of protection against SDS. Thus, TriAxBC appears to have substrate binding sites consistent with the binding pockets of AcrB. These trends in substrate specificities indicate that the mutations in TriC impact similarly the efflux of Nile Red and the protection against triclosan and SDS and suggesting that the efflux mechanism for these substrates are broadly similar (Fig. 4-4C-E).

TriC Tunnel Network

Substrates can reach the binding sites of TriC through the network of tunnels. Two distinct tunnel networks with smallest or bottleneck diameter of 3.3 Å were identified in the periplasmic domain of TriAxBC (Fig. 4-5A). The bottleneck diameter is less than the smallest circular cross-section diameters of triclosan and Nile Red but comparable to the cross-section for the SDS sulfate headgroup. Tunnel networks with larger bottleneck diameters could not be found. One network has three entrances from the outer leaflet of the inner membrane to the TriC interior in each subunit that terminate at the access (proximal) binding loci, identified by superposition of TriC with AcrB. Large antibiotics such as erythromycin attach in the access binding pocket of AcrB (283), and are then transferred into the distal deep pocket during L→T conformational transition. In the TriAxBC structure, although the equivalent access binding site is partially occluded by the N-terminal region of TriA, the tunnel network links this proximal binding pocket by one of three channels. One channel (tunnel **1**) links the proximal binding

pocket from a large and deep cavity opening to the outer leaflet of the inner membrane and is located between PC1 and PC2, as in AcrB (Fig. 4-5A). A second channel (tunnel **2**) can access the inner membrane via a smaller cavity and is situated between subdomains PC1 and PN2 (Fig. 4-5A). The cavity entrance to tunnel **1** is sufficiently large to accommodate Nile Red, as well as triclosan, while the cavity entrance to tunnel **2** would only accommodate the attachment of triclosan (Fig. 4-5A). Both tunnels could accommodate SDS due to its smaller cross-section. TriC subunit interfaces form the third channel (tunnel **3**) enabling access to the inner membrane at the level of the outer leaflet (Fig. 4-5A). The starting point of the second tunnel network overlaps with the periplasmic distal deep pocket in AcrB and extends towards the funnel region and merging with the identical tunnels from the other two subunits in the apical centre of the trimeric complex. Noteworthy is the absence of a connecting tunnel between the two networks.

Two of the TriC variants, Ser276Ala and Gly598Val, which significantly impact efflux in TriAxB, span a region between the putative access site of one network and the deep distal binding site of the second network (Fig. 4-5B). The strong inhibition of substrate translocation by the two variants and the variants' location in a region where there is no tunnel connecting the two substrate binding sites suggests a difference in tunnel networks between the free and substrate bound forms of TriAxB.

Two substitutions Glu656Val (Glu673 in AcrB) and Gly647Phe (Phe664 in AcrB) did not alter the specificity or activity of TriAxB and their location does not overlap with the tunnel networks. In contrast, the TriC variant with substitution Val698Arg (Arg715 in AcrB) was inactive in MIC measurements and Nile Red uptake assays. Val698 is located near the interface with TriA and the introduction of the positive charge at this position may affect interactions between TriC and TriA. The variant Arg698 is also adjacent to the putative access (proximal) binding site (Fig. 4-5B) and the long Arg side chain could create steric hindrance to substrate translocation in tunnel **1**. This is consistent with tunnel **1** being at its narrowest at Val698. Equally, Glu-181 points into the deep distal binding pocket (Fig. 4-5B) and loss of the Gln-181 carboxamide side chain in Gln→Ala mutation could reduce stabilizing interactions with substrate thereby affecting their efflux. Thus, the TriC transporter likely contains two putative substrate binding pockets with Gln181 and Val698 mediating substrate stabilization.

Proton-Relay Network

Drug efflux by RND-type exporters is driven by a proton motive force (PMF) (265). Four essential charged residues, Asp407, Asp408, Lys940, and Arg971, in addition to Thr978, have been identified in AcrB as well as other RND transporters to form a transmembrane proton-relay network, based on findings of structural homology and from site-directed mutagenesis (297, 298, 320, 462). In the structure of the TriAxBc transporter, the same five conserved residues superimpose onto Asp405, Asp406, Arg925, Arg955 and Thr962 (Fig. 4-6). Asp405 and Asp406 located on TM4 and Arg925 on TM10 can form ion pairs in the transmembrane core, while Thr962 faces Asp406, as was observed for the homologous residues in AcrB (313). The TM4 and TM10 helices of TriC are located at the center of the 12 α -helix bundle and Arg955 on TM11 is located near the cytoplasmic surface of the membrane. Notable is the replacement of the lysine residue at position 940 in AcrB with that of an arginine residue in TriC. This difference is important as the best estimate for an arginine pKa is 13.8 and, contrary to lysine residues, due to the high pKa, the Arg guanidinium side chain remains charged even in lipid bilayers (463, 464). Molecular dynamical simulations nonetheless indicate that Lys940 remains protonated throughout the transport cycle (298, 462). The isostructural substitution of the Lys side chain for an Arg side chain supports the computational finding and addresses the role of this charged residue in the proton transport cycle of RND transporters.

Different states of TriA and TriB in the complex with TriC

The structural analyses of TriAxBc showed that TriA interfaces with the loci vicinal to an access substrate binding pocket of TriC, whereas TriB does not form significant contacts with the transporter. Proteolysis *in vitro* and *in vivo* was used next to assess conformational changes in TriA and TriB by examining their interactions with TriC and the OMF TolC. Trypsin digests of the purified TriABC and TriAxBc complexes followed by immunoblotting with anti-TriA antibodies showed that TriA as a part of the TriAxBc construct and as a separate polypeptide is cleaved by trypsin at the same sites. TriA corresponds to the ~40 kDa band (Fig. 4-7A). A stable 27 kDa fragment and two minor bands, 26 kDa and 30 kDa, of TriA are accumulated as major proteolytic products (Fig. 4-7A). In the TriAxBc construct, TriA is

similarly labile to trypsin, as seen from appearance of the same characteristic tryptic fragments. Only small amounts of TriB could be detected in the purified TriABC by immunoblotting with anti-TriB antibodies and no stable tryptic fragments of TriB are present (Fig. 4-7B). However, as a part of the fused TriAxB dimer in the TriAxB construct, TriB and its tryptic fragments could be readily seen.

The low amounts of TriB co-purified with TriABC complex are not due to the low expression of the protein. The *in vivo* proteolysis followed by immunoblotting of *E. coli* cells carrying plasmid bearing TriA and TriB showed similar expression of the two MFPs (Fig. 4-5C-D), yet dramatically different sensitivity to proteases. In the periplasm, TriA was found to be proteolytically labile and cleaved by intracellular proteases, whereas externally added trypsin generated additional 30, 26 and 27 kDa proteolytic fragments identical to those in the tryptic profile of the purified TriABC construct (Fig 4-7C, left panel). In contrast, the periplasmic TriB is proteolytically stable but can be cleaved by exogenously added trypsin (Fig 4-7D, left panel).

Surprisingly, TriA was stable and mostly resistant to trypsin when assembled into the TriABC complex in the periplasm (Fig 4-7C, left panel). Under the same conditions, no significant differences in proteolytic profiles of TriB were detected in the presence or absence of TriC and the protein was cleaved by trypsin into stable fragments (Fig 4-7D, left panel). In contrast, both TriA and TriB were protected in complex with TriC from the cleavage by proteases in the presence of TolC. As seen from the Fig 4-7C and 4-7D, (right panels), no tryptic fragments could be detected when TriA and TriB are co-expressed with TriC in TolC plus cells. Thus, TriA is structurally dynamic and is stabilized by interactions with TriC, whereas the structure of TriB is not sensitive to the presence of transporter. The recruitment of OMF into the complex stabilizes and protects both MFP subunits from proteases.

We subsequently asked whether the major proteolytic products of tryptic digestion of TriA are consistent with the polypeptide fold of the partially ordered TriA structure. Under non-denaturing conditions and using limited digestion, only a subset of all possible cleavage sites is susceptible to sequence-specific protease action (465). The proteolytic data shows that limited proteolysis of TriA yields only three significant peptides from the TriABC complex (Fig. 4-7A and 4-7C). The same peptide bands were also observed in the digestion of the TriAxB complex. Examination of the TriA structure indicates only one residue, Lys-303, that is surface exposed, hence sensitive to trypsin action. The other cleavage sites are either not surface

exposed (Arg42, Arg325), susceptible to miscleavage due to an adjacent acidic residue (Lys333), protected by engagement in a salt bridge with an acidic residue (Arg328), or by proximity to a cluster of acidic residues on the surface of the TriA C-terminal domain (Lys318, Arg320) (466, 467). Using Lys303 as the preferred cleavage site located in the TriA C-terminal region, cleavage at Lys49 then defines the longest peptide of 26.9 kDa, in excellent agreement with the major 27 kDa fragment (Figure 4-7A and 4-7C). Furthermore, no other combination of dual cleavage sites in TriA predicts a 27 kDa polypeptide band that is consistent with the structure based constraints imposed on trypsin action. A single cleavage only at position Lys303 of TriA would release a 30 kDa fragment, calculated MW based on a MW of 29.2 kDa for the peptide and 0.8 kDa for the lipid modification of the TriA N-terminus, and in excellent agreement with the 30 kDa minor band, while cleavage at Arg66 as well as at Lys303 yields a 25.2 kDa fragment which is in good agreement with the other 26 kDa minor band. The relative resistance of the 27 kDa band polypeptide to trypsin action is consistent with stable compact folds for the α -hairpin, the lipoyl, and the α - β barrel constituent sub-domains (278). The proteolytic data underscores that the α -hairpin, the lipoyl, and the α - β barrel constituent sub-domains undergo large scale rigid body displacements in the TriA₃BC complex resulting in their positional disorder and making them indiscernible in the cryo-EM map. TriA is thus a highly mobile structure and becomes spatially ordered in the presence of the outer membrane factor.

Discussion

The molecular architecture of the RND transporter TriA₃BC was determined by single particle cryo-EM microscopy in sufficient detail to fully trace its polypeptide backbone, shown in Figure 4-2. The refined structure of TriA₃BC exhibits three-fold symmetry that is consistent with three protomers of TriC and of TriA₃B per TriA₃BC complex and matches the estimated molecular weight based on size exclusion chromatography. The agreement of the refined structure in Figure 4-2 and low residual density shown in Figure S4-4 corroborates that most if not all ordered electron density features present in the cryo-EM map have been accounted for. Low signal to noise features ($< 2 \sigma$) such as the detergent corona surrounding the inner membrane transporter TriC could not be refined due to insufficient order to permit their

modelling. The TriAxBC transporter is symmetric as C3 symmetry averaging significantly increased the resolution of the cryo-EM map improving it from 6.5Å resolution with C1 symmetry to 4.3Å with C3 symmetry consistent with an enhanced signal to noise ratio brought upon C3 symmetry averaging. Refinement of the higher resolution model against the lower resolution cryo-EM map with or without 3-fold averaging and using identical refinement protocols as those used for higher resolution was consistent with the molecular architecture of the higher resolution structure. Comparisons did not reveal significant differences between the polypeptide fold of the symmetric and non-symmetric refined structures. The RMS differences based on C α atoms of the two refined structures was 1.8Å, well below the resolution of the 6.5Å cryo-EM map, indicating that to 4.3Å resolution, the TriAxBC transporter in absence of substrate exists as a symmetric trimer in the solution state.

The polypeptide fold of the inner membrane transporter TriC is homologous when compared to the polypeptide folds determined from crystal structures of RND transporters AcrB (263, 313), MexB (188), CusA (309) and MtrD (310). The TriC protomer has greatest structural similarity with the Open/Extrusion subunits of RND transporters such as AcrB, among others (Fig. 4-4A). A notable difference is the structure and position of the ‘switch’ loop of TriC in Fig. 4-4B. The switch loop is flexible in AcrB and MexB and gates multidrug binding within the periplasmic cleft to facilitate export during drug extrusion by the tripartite multidrug efflux pumps (283, 284). A conformational change by the switch loop enables the transition of large antibiotics bound at the access site to the distal binding site in AcrB. The same loop is considerably longer in TriC and extends deeper into the periplasmic cleft. In both TriC and AcrB, the loop apex is hydrophobic consistent with loop penetration into a largely hydrophobic binding pocket. Concomitantly, a complementary loop consisting of residues 655-663 in TriC which forms the basement of the periplasmic cleft (Fig. 4-4B), is much shorter than the homologous loop in AcrB (residues 667-680), and responsible for the deeper penetration into the periplasmic cleft by the ‘switch loop’ in TriC. In AcrB, the basement loop undergoes a conformational change concomitantly with the switch loop suggesting a concerted conformational change involving the switch and basement loops.

The loss in activities upon mutation of residue Gly598 → Val at the loop hinge and of Arg603 → Ala at the loop median, evidenced in Fig. 4-4C, would suggest that this longer ‘switch’ loop in TriC is indeed implicated in drug binding and mediates drug extrusion. The variant Val598 would rigidify hinge motion and directly or indirectly interfere with binding at the access site due to its side chain while the variant Ala603 would change the amphipathic character of the median loop, due to the loss of the Arg side chain, which would affect hydrophobic and charged interactions with substrate. The considerable differences in chemical nature and shape of the TriAxB efflux substrates would result in differential interactions and ensuing dynamics with respect to the side chains of the variants thereby creating differential reductions in drug efflux, as observed in Figure 4-4C-E.

PMF mechanism

The TriAxB transporter represents the first structure of an RND transporter belonging to the HAE-1 protein family (218) that to our knowledge has the central lysine residue, Lys940 in AcrB, essential for proton translocation, replaced by an arginine residue, Arg925. Evolutionarily, lysine is the much-preferred basic residue compared to arginine among HAE-RND family homologues (320). The isostructural substitution of Arg925 in TriC, depicted in Figure 4-6, offers deep mechanistic insight into the proton transport cycle of RND transporters. An arginine residue in a populated neutral state has never been unambiguously observed, even when buried in a highly hydrophobic environment such as the interior of a protein or in the middle of a lipid bilayer (468, 469). One reason that arginine might always be charged under physiological conditions lies with its high intrinsic pKa value of 13.8 (469). The energetic penalty to deprotonate it at pH 7 is much costlier than to deprotonate a lysine residue at pH 7 whose pKa is near 10.4 and can be completely deprotonated at physiological pH (470). In addition to the ability of the arginine side chain to remain charged in the middle of a lipid bilayer is the conformational flexibility of its long side chain. This enables the guanidinium group to interact with polar atoms, including buried water molecules, to satisfy its propensity to donate up to five hydrogen bonds (471). In the lipid bilayer, local instabilities may lead to water penetration, suggested from molecular simulations, as well as to accommodate interactions with polar head groups. This would preclude the existence of strictly hydrophobic micro-environments to keep the arginine side chain in the neutral state.

The very similar drug efflux activities by *E. coli* cells expressing AcrAB and TriAxBBC transporters (Fig. S4-1 and Table S4-1) and the identical spatial arrangement of isostructural charged residues in the central region of the transmembrane domain in both transporters (Fig. 4-6) would suggest that both transporters use similar proton-relay mechanisms. From a mechanistic perspective, the presence of a charged arginine residue in TriC throughout the proton transport cycle corroborates the finding from dynamical simulations that Lys940 in AcrB remains protonated throughout the PMF cycle (298). A positively charged residue would enhance or ensure by electrostatic stabilization an acidic population of the neighboring aspartate residues. Aspartate residues when buried in the nonpolar hydrophobic core of a folded protein or a lipid bilayer interior can undergo substantial pKa shifts exceeding a value of 10 (472). Such a high pKa would inhibit proton transfers due to a negligible population of negatively charged carboxylates to act as proton acceptors. Indeed, the isosteric mutations of Asp407Asn and Asp408Asn in AcrB renders the transporter incapable of mediating proton translocation and drug efflux (298). Proton transport in HAE1-RND transporters thus depends on maintaining an adequate pKa for the aspartate residues in the central transmembrane region to ensure sufficient populations of both charged and neutral states in order to mediate proton transport by Asp408. Such a physiological pKa value is enforced by the presence of a vicinal positively charged residue.

Tunnel network

The mutagenic data when interpreted in the light of the tunnel network argues in favour of two binding loci, a proximal and a distal binding site. The absence of a contiguous pathway linking the two sites in TriC would diminish the likelihood of the TriAxBBC complex, in absence of OMF, of extruding antibiotics and biocides into the periplasmic space instead of the extracellular milieu. Accordingly, the symmetric trimeric structure of the TriAxBBC complex represents a conformer that is functionally incompetent for drug extrusion. Translocation from the proximal binding pocket to the distal binding pocket based on the structural data necessitates a conformational fluctuation to open a sufficiently large channel enabling translocation between the two sites. From the distal binding site, substrates can then be readily effluxed without any significant steric hindrances. Likewise, the diameters of the bottlenecks in tunnels **1** and **2** are

insufficient to enable translocation of Nile Red and triclosan without prior conformational changes to enlarge these tunnels. The entrances to the tunnel network however are of sufficient dimensions to accommodate the substrates (Fig. 4-5A) and thus the symmetric TriAxBC structure is primed for uptake of lipophilic substrates intercalated into the cytoplasmic membrane. Indeed, all three known substrates of TriC would preferentially intercalate into the cytoplasmic membrane based on their estimated logP values: Nile Red – 4.39; Triclosan – 5.53; SDS – 3.86 (473).

As in AcrB, substrates can access the binding site through several tunnels. Conformational fluctuations that enlarge the periplasmic cleft, defined by sub-domains PC1 and PC2, and/or favour displacement of TriA, could in turn enlarge tunnel **1** and its entrance and thus facilitate access to the proximal substrate binding site for Nile Red and triclosan. Conformational fluctuations could play a similar role at tunnel **2**, which has the longest bottleneck, and enlarge the cleft made up by sub-domains PC1 and PN2, and promote access to the proximal site by both Nile Red and triclosan. Noteworthy is sub-domain PN2 which includes the putative switch loop (residues 598-614) that lines the cleft. The substitution Arg603Ala, located on the putative switch loop in TriC, impacted both Nile Red and triclosan efflux suggesting a functional role for this loop. Arg603 in this loop points towards tunnel **2** and in the variant Ala603, loss of the guanidinium group of the flexible Arg side chain, could abrogate interactions with substrate to the proximal site, thereby impacting their efflux (Fig. 4-5B). We are aware that conformational fluctuations localized to sub-domains, PC1 and PC2, could entail a concomitant increase in the diameter of one tunnel and hence facilitate uptake while impeding substrate uptake in an adjacent tunnel.

Interestingly TM2, the longest transmembrane helix, forms part of the wall of the cavity entrance to tunnel **2**. Similarly, in AcrB, TM2 also forms part of the binding site for the lipophilic carboxylate, fusidic acid, and TM2 in AcrB mediates efflux of lipophilic carboxylates by an upward movement of TM2 towards the periplasmic porter domain in response to protonation events in the transmembrane domain (450). Such a conformational movement in TriC could for instance facilitate triclosan uptake as the C-terminus of sub-domain PN2 directly links to the N-

terminus of TM2 (Fig. 4-5B) and an upward movement by TM2 would not be inconsistent with a conformational change displacing PN2 thereby enlarging tunnel **2** for substrate efflux.

TriAxB dynamics

Previous studies showed non-equivalent functions of TriA and TriB in the complex assembly and efflux (289, 457). This study reveals structural difference in the interactions of two MFPs with TriC transporter and a dynamic role by the TriAxB membrane fusion protein in the complex. TriA but not TriB forms a stable complex with TriC as seen from the co-purification experiments (Fig. S4-2) and the cryo-EM structure (Fig. 4-3). Importantly, TriA but not TriB is essential for recruitment of TolC/OpmH (289, 457), the result suggesting that TriA and other MFP subunits that occupy the same site on the transporter serve as anchors for initial interaction with OMFs. The lipidated N-terminal region and the adjacent C-terminal MP sub-domain of the TriA structure appear to serve as hinges for conformational fluctuations by the α -hairpin, the lipoyl, and the α - β barrel constituent sub-domains. The large RMSD positional difference between the structure of the TriA partially ordered MP sub-domain and corresponding C-terminal region of the MP sub-domain modelled by I-TASSER is not inconsistent with a large scale conformational displacement by TriA relative to its putative conformation in the MFP domain of the tripartite complex. The structure of the TriA C-terminal MP sub-domain constrains its preceding N-terminal MP sub-domain to be preferentially oriented vicinal to the outer leaflet of the inner membrane. This interpretation implies that the α -hairpin, the lipoyl, and the α - β barrel constituent sub-domains of TriA are bent away from the TolC docking region in the tripartite complex. Indeed, the MFP structure of AcrA shows high flexibility between subdomains (278, 474) that would accommodate bent downwards conformations. The hinges ensure that TriA as well as fused TriB remain tethered to TriC in the TriAxBC complex thereby reducing the conformational search space and facilitating rapid tripartite complex formation upon recruitment with the outer membrane channel.

Moreover, the dual hinges impose a selective reduction on the TriA conformational search space compared to that of the fused TriB which is attached by a single hinge through the partially ordered TriA MP domain. Although both TriA and TriB undergo conformational changes upon TriABC-TolC complex formation that is manifested by their complete resistance

to trypsin action in the tripartite complex (Fig. 4-7C and 4-7D, right panel), TriB does not undergo an apparent conformational change similar to TriA upon TriABC or TriAxBBC complex formation as its resistance to trypsin action does not change in these complexes (Fig. 4-7C and 4-7D, left panel). Such behaviour is entirely consistent with TriA, because of its interaction with TriC, mediating formation of the tripartite complex. The greater reduction in the conformational search space of TriA, compared to TriB, would facilitate complex formation with the OMF. And as TriB weakly associates with TriC, it is likely that interactions between the OMF and the TriABC complex induce conformational changes in TriB to fully engage it into the assembled complex. Site-directed mutagenesis of the MP domain of TriB showed that this MFP subunit but not TriA is essential for the stimulation of the transporter (289). On the other hand, TriB forms critical interactions that stabilize the open conformation of OMF (457). Hence, recruitment of OMF by TriA facilitates the full engagement of TriB into the complex, activates the transporter and stabilizes the open conformation of OMF.

The lateral movement of the fully assembled TriAxBBC-OMF tripartite complex would be impeded by the peptidoglycan mesh in the periplasm. Furthermore, to interact with OMF, the inner membrane transporter in conjunction with its cognate periplasmic MFP must be able to horizontally diffuse in the inner membrane and the periplasm between the peptidoglycan mesh and the inner membrane to find its target. This periplasm has an estimated thickness $\sim 90 \text{ \AA}$ from cryo-transmission electron microscopy of the *E. coli* K-12 membrane (475). The AcrAB transporter has a periplasmic length of $\sim 160 \text{ \AA}$ in the AcrAB-TolC complex (PDB 5V5S) and thus would not be capable of lateral diffusion in the periplasm without a prior conformational change implicating its periplasmic MFP. In this regard, the TriAxBBC complex determined by cryo-EM has a periplasmic length of $\sim 85 \text{ \AA}$ which would allow it to diffuse horizontally in the periplasm. This implies that the periplasmic MFP TriAxB must extend radially outwards from the periplasmic surface of TriC, akin to a flower petal, in an orientation vicinal to the outer leaflet of the inner membrane to satisfy the dimensional constraints of the periplasm. The absence of clear EM density that can be associated with TriAxB is consistent with multiple conformations for TriAxB in the TriAxBBC complex, the ensemble which would be averaged out by single particle image reconstruction was not discernable in the cryo-EM density map, except for the hinge regions. Multiple conformational states for TriAxB in the TriAxBBC

complex offer a decided intrinsic advantage compared to a restricted number of discrete conformations by increasing the configurational entropy which in turn enhances the thermodynamic stability of the TriAxBC complex. The observed cryo-EM complex thus typifies the default molecular architecture for the TriAxBC complex in absence of substrate. The determined structure also represents an open dynamic state of the TriAxBC efflux pump, which precedes the recruitment of the outer membrane factor.

Based on the above results and previous studies we propose a model of dynamic assembly of trans-envelope multidrug efflux pumps. The open conformation of the inner membrane efflux complex comprises a stable 1:1 complex between RND (TriC) and MFP₁ (TriA), whereas the second MFP₂ (TriB) protomer is only loosely bound to the transporter (Fig. 4-8A). MFP₁ occludes the proximal binding site of the RND transporter and stabilizes the Open/Extrusion conformation of the transporter thereby preventing the futile proton translocation through the pump (298, 462). Binding of the substrate likely stabilizes a conformational change in the RND-MFP₁ complex that enables recruitment of an OMF. Complex formation with OMF serves as a scaffold to engage MFP₂ and to assemble the MFP funnel-like structure, which positions MFP₂ on the transporter (Fig. 4-8B). MFP₂ activates the transporter and opens OMF for efflux (Fig. 4-8C).

Experimental procedures

Strains and growth conditions

The functionality of TriABC, TriAxBC and its variants were first tested by their ability to complement the triclosan/SDS hypersusceptibility phenotype of *acrAB*-deficient *E. coli* JWW2 strain ($\Delta(araD-araB)567 \Delta(rhaD-rhaB)568 \Delta lacZ4787 (::rrnB-3) hsdR514 rph-1 \Delta ompT$ -scar $\Delta acrAB::Km^r$) (289). This strain was also used for protein purification. The Nile Red uptake experiments were carried out in the hyperporinated *E. coli* $\Delta 9$ -Pore (GKCW107) strain lacking all nine TolC-dependent transporters ($\Delta(argF-lac)169 \lambda IN(rrnD-rrnE)1 rpsL179(strR) \Delta acrB \Delta acrD \Delta acrEF::spc \Delta emrB \Delta emrY \Delta entS::cam \Delta macB \Delta mdtC \Delta mdtF attTn7::mini-Tn7T-Tp^r -araC-P_{araBAD-fhuA\Delta C\Delta 4L}$) (458). Proteolysis was carried out in GKCW102 (BW25113 $attTn7::mini-Tn7T-Km^{II} -araC-P_{araBAD-fhuA\Delta C\Delta 4L}$) and GKCW104

(BW25113 $\Delta tolC$ - $ygiBC$ ($attTn7::mini$ -Tn7T-Km^r - $araC$ -P_{araBAD}- $fhuA\Delta C\Delta L$). These cells overproduce a large Pore that enables intracellular accumulation of various compounds including trypsin and the fluorescent probe Nile Red (458). All cells were grown in Luria-Bertani (LB) broth (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L and NaCl 5g/L) with appropriate selection markers as needed, at 37°C with shaking at 200 rpm. For uptake experiments, at OD₆₀₀ ~0.3, L-arabinose (up to 0.2%) was added to induce the expression of the Pore and cells were further incubated until OD₆₀₀ reached 1.0.

Minimal Inhibitory Concentrations (MICs)

Overnight cultures of *E. coli* carrying indicated constructs were diluted 1 to 100 in LB broth supplemented with a selective marker and grown at 37°C with shaking at 200 rpm for 5 hours. MICs of antimicrobial agents were measured using the two-fold dilution technique in 96-well microtitre plates (476). Briefly, cells were inoculated at a density of 5x10⁴ cells per ml in LB in the presence of two-fold increasing concentrations of substrates under investigation. The cultures were incubated for 18-24 h, and the lowest concentration that completely inhibited bacterial growth was designated the MIC. When required, protein expression was induced by adding 0.1 mM IPTG or 0.1% L-arabinose to cell cultures at OD₆₀₀ of ~ 0.3-0.5.

Site-directed mutagenesis

Point mutations were introduced using a QuikChange Lightning site-directed mutagenesis kit and primers (sequence available upon request) designed per manufacturer's guidelines (Agilent Technologies). Plasmids were purified using a GeneJet Kit (Fisher Scientific) and sequenced at the Oklahoma Medical Research Foundation Sequencing Facility to confirm the introduction of the desired substitutions.

Protein expression

E. coli cultures were grown overnight in LB medium, supplemented with 100 µg ml⁻¹ ampicillin as needed, and subcultured 1:100 in fresh LB for 6 hours. Cells were collected via centrifugation at 3,220 x g for 20 min and stored at -20°C. Cells were resuspended in 1 ml lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 µg ml⁻¹ lysozyme) and incubated on ice for

1 hour, then subjected to sonication. Unbroken cells were collected, and membranes were pelleted by centrifugation at $>100,000 \times g$ for 1 hour. Membrane pellets were then resuspended in 100 μ l of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF) and relative protein amounts quantified using the Bio-Rad Protein Assay before SDS-PAGE and immunoblotting. Polyclonal anti-TriA, anti-TriB and anti-TriC antibodies were reported before (289). For anti-TriC immunoblots, 5 μ g of membrane proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. Anti-TriC antibodies have previously been shown to also recognize TriAxB (289). Proteins were detected using standard immunoblotting protocols with anti-TriC primary antibodies produced in rabbit, combined with secondary anti-rabbit-alkaline phosphatase conjugated antibodies (Sigma Aldrich) or anti-Penta His monoclonal mouse primary antibodies (Pierce), combined with secondary anti-mouse-alkaline phosphatase conjugated antibodies (Sigma Aldrich). Membranes were developed using 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate–Nitro Blue Tetrazolium (Pierce).

Protein purification

E. coli JWW2 competent cells were co-transformed with pBAD33-TriAxBC and pBAD- C_{His} constructs (289), plated on selective media supplemented with ampicillin and chloramphenicol, and grown overnight at 37°C. In the fused TriAxB protein, the C-terminal P385 of TriA is fused to G20 of TriB by a pentapeptide GNSRG (289). The TriAxBC complex is purified by the C-terminal His-tag of TriC. For this purpose, cells were cultured in 50 ml LB containing ampicillin and chloramphenicol overnight, and sub-cultured 1/50 into 1 L Terrific Broth supplemented with ampicillin and chloramphenicol. Cultures were grown at 37°C with shaking for 3 hours before induction with 0.2% arabinose for 5 hours.

Cells were harvested by centrifugation at $3,200 \times g$ for 20 mins at 4°C then the pellets were resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.05 mg/ml DNase and incubated on ice for 30 mins. The cells were lysed thrice for 30-45 sec using an ultrasonicator (Branson). Unbroken cells were removed by low speed centrifugation at $3,220 \times g$ for 30 mins. Cell membranes were isolated by high speed centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 hr at 4°C in Beckman Ti-45, then washed for 1.5 hours at $100,000 \times g$ in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, and 1 mM PMSF. Membrane pellets

were then re-suspended in 3 ml solubilization buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM imidazole, 2% DDM) and incubated overnight on a rotator. Insoluble fractions were collected via centrifugation at 100,000 x g for 1 hour, and the solubilized membrane fractions were loaded onto a 1 ml Cu²⁺ charged HisBind Resin (EMD Millipore) column equilibrated with Buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.03% DDM) with 5 mM imidazole. Flow-through was re-applied to the column to ensure complete binding, and the column subsequently washed with 10 column volumes of each Buffer A containing 5 mM, 20 mM and 40 mM imidazole. Protein was eluted using 3.5 column volumes of Buffer A containing 400 mM imidazole. Fractions were then analysed for protein amount using SDS-PAGE, and combined for gel filtration and ultracentrifugation. The authenticity of TriAxBC was confirmed by cutting-out the bands corresponding to the purified fractions of TriAxBC, namely for TriC and TriAxB of the SDS-PAGE gel, followed by in-gel digestion with trypsin, and mass spectrometry analysis. Comparison of the resulting peptide sequences predicted from mass spectrometry analysis with those of TriC and TriAxB uniquely identified the purified fractions as the TriAxBC transporter. For gel filtration chromatography, protein samples were loaded onto a size exclusion column (Superdex 200 GE 3.2/300) equilibrated in eluting buffer (100 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0.03% (w/v) DDM) using a GE micro ÄKTAsystem. Protein concentrations were determined from OD280 measurements using a GE NanoPhotometerTM Pear spectrophotometer. At this wavelength, DDM has negligible absorbance. The final TriAxBC protein yield is approximately 200 µg for a litre of *E. coli* culture. The fraction corresponding to TriAxBC after size exclusion chromatography was then used for cryo-EM.

Proteolysis

For *in vitro* proteolysis experiments, TriABC and TriAxBC (1 µM final concentration each) were incubated with increasing concentrations of trypsin for 30 min at 37°C. Reactions were terminated by adding SDS sample buffer and boiling for 5 min. Samples were analyzed by 12% SDS-PAGE and protein fragments visualized by silver staining or by immunoblotting with corresponding polyclonal rabbit antibodies.

For *in vivo* proteolysis experiments, 5 ml of exponentially growing cells ($OD_{600} \sim 0.5$ – 0.6) were harvested and washed twice with buffer I containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl. The cells were resuspended in 200 μ l of buffer II containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 20% sucrose. Digestion reactions were set up by adding increasing concentration of trypsin to 36 μ l of concentrated cells (2.7×10^7) and were incubated at 37°C for 60 min. Reactions were terminated by cooling on ice for 5-10 min then adding SDS sample buffer and boiling for 5 min. The whole cell lysates were resolved on 12% SDS-PAGE. TriA and TriB proteins and their proteolytic fragments were visualized by immunoblotting with polyclonal anti-TriA and anti-TriB antibodies.

Cryo-EM data acquisition

Graphene oxide dispersion in H₂O (Sigma) was diluted to 0.2 mg.ml⁻¹. C-flat CF-2/2-2C holey grids were glow discharged for 1 min and 3 μ l of the graphene suspension was added to the grids for 1 min. Grids were subsequently blotted briefly using Whatman No1 filter paper and washed three times on 20 μ l drops of H₂O (twice on the graphene side and once on the reverse side) (477). Grids were then used for plunge-freezing without further treatment. 3 μ l of purified TriAxB was deposited on C-flat CF-2/2-2C holey grids previously treated with graphene oxide and plunge-frozen in liquid ethane cooled by liquid nitrogen.

Grids were imaged using a Titan Krios transmission electron microscope (FEI Company) operated at 300 kV, with the specimen maintained at liquid nitrogen. A total of 3483 movie frames were recorded on a FEI Falcon II camera at a magnification of 128,771 X at the camera and a pixel size of 1.08 Å. The total dose per image was ~ 50 e-/Å² split into 7 frames with frames 1 to 5 having a dose of 6 e-/Å² and frames 6 and 7, 10 e-/Å². Data was typically collected with a defocus range between -1.6 and -3.0 μ m.

EM Data Processing and Image Analysis

Movie frames were first aligned using Unblur (478) and averaged and the contrast transfer function parameters were determined using CTFFIND4 (479). All micrographs were inspected manually to discard the micrographs having no graphene oxide support and thus, no particles. Protein particles were boxed using e2boxer from the EMAN2 software suite (480). After extraction, images of the particles were binned twice for a final box size of 100x100 pixels and a resulting pixel size of 2.17 Å at specimen level. A total of 138,282 candidate particle images were analyzed using RELION-1.3 (481). First, a 2D classification was performed using 8 starting seeds. 3 classes were selected by visual inspection showing different orientations of TriAxBC to yield 35,520 particle images, which were used for all further data processing. Particles were 3D aligned using a negative staining map previously calculated and low pass filtered at 60 Å with a C3 symmetry imposed. Particles were polished and used for new 3D refinements both with C3 symmetry imposed and with no symmetry. Map resolutions were computed using gold standard FSC. Further image analysis with 3D classifications did not improved map resolution.

TriAxBC structure determination

The structure of TriAxBC was determined in two stages. First a model for the 3D structure of TriC was prepared from the primary amino acid sequence (7, 376, 409) by the I-TASSER server (7, 376, 409, 482) and the top structural homolog, CusA, was chosen (Table S4-3). The EM structure exhibited a deep central vestibule with three distinct channels and crevasses that afforded facile orientation of the TriC structural model. The fit of the modeled TriC trimer to the cryo-EM map was then further improved using iterative real space refinement in Phenix (380) and model rebuilding with Coot (381) yielding a high map correlation coefficient of 0.85. Bulky side chains such as tryptophan residues in the entire polypeptide sequence of TriC were unambiguously associated with EM density using a 3.5σ cutoff. Comparison of the refined TriC subunit with the conformation of the CusB subunit spanning the inner membrane (PDB: 3NE5) yielded a RMSD of 3.64Å. A similar RMSD value of 3.67Å was obtained when comparing the TriC protomer with the substrate ‘free’ B (Open/Extrusion) subunit of AcrB (PDB: 3AOA) and that of MexB subunit C (PDB 2V50), RMSD – 3.72 Å.

The identification of the residual density corresponding to the TriA N-terminal sequence exploited that the TriA N-terminus is lipidated and would thus be situated proximal to the outer leaflet of the inner membrane. A linear strand of residual density terminating at the outer leaflet of the inner membrane and clearly visible in the cryo-EM map could be interpreted as residues 31-47 of the mature TriA sequence. The lipid modification of Cys 31 was then built using Coot (381) into residual density that was distinguishable from the detergent corona.

The TriA sequence, with the N-terminal region excluded, could be modelled based on the ZneB MFP from *C. metallidurans* (483) with a high TM-score (0.885) by the I-TASSER server (7). However, separately fitting models of the lipoyl, $\alpha\beta$ -barrel, and MP sub-domains, into the outstanding compact residual density did not provide a satisfactory fit whereby electron density could be associated with contiguous polypeptide strands. A similar approach based on the TriB sequence also was unsuccessful. The identification of the residual EM density was made using a modelling procedure, (map_to_model) feature in Phenix (380). First the entire TriA sequence was used to build a model into the EM map of the residual density. This method identified a helical secondary structure element corresponding to a 10-amino acid stretch (349-359) in the MP C-terminal region of the TriA MFP. The polypeptide sequence about this region was then extended to maximize the fit to the residual density. In both AcrA and CusB MFP structures, the MP C-terminal region is found proximal to the N-terminal region (278, 484). The final modelling fitted residues 297-362 of the MP C-terminal region to the electron density with a map correlation coefficient of 0.65 upon real_space_refinement in Phenix (380). Using the Align feature in PyMol (382) the fold of the fitted residues when superimposed against the MP C-terminal region of the entire TriA structure modelled by I-TASSER yielded a RMSD of 8.0 Å ($C\alpha$ atoms). The overall fold of the residues fitted differs significantly with respect to the expected fold of the MP C-terminal sub-domains. The modelled TriA₃BC trimer was then further improved using iterative real space refinement against the cryo-EM map in Phenix (380) and model rebuilding with Coot (381).

Data availability statement

The 4.3Å TriAxBC trimer map reconstructed using 35,520 best particles from 3483 micrographs is deposited in the EMDB under accession number 7124. The deposition includes the sharpened map, mask, unfiltered half maps, unfiltered map and 3D FSC volume.

The TriAxBC atomic coordinates (PDB ID: 6BP3) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

Acknowledgements

This work was supported by National Institutes of Health/ National Institute of Allergy and Infectious Diseases Grants AI052293 (to H.I.Z), and by GEPR0M–FRQS Intramural funding (to J.S., A.Y., and L.F.). J.R. was a MITACS Research Intern. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH. The Facility for Electron Microscopy Research at McGill University (FEMR) provided access to electron microscopes. Proteomics analyses were performed by the Center for Advanced Proteomics Analyses at the Université de Montreal, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network that is supported by the Canadian government through Genome Canada. Molecular graphics were performed in part with the UCSF Chimera package. Chimera is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311).

Table

Table 4. Summary of the real-space refinement by Phenix (*version dev 2932*) of the TriAxBBC atomic model against the cryo-EM map.

Metric	
Resolution of cryo-EM map ^a	4.35 Å
Map CC ^b	0.806
rmsd (bonds):	0.012 Å
rmsd (angles):	1.490°
All-atom clashscore ^c	14.65
Ramachandran plot ^d :	
outliers:	5.10 %
allowed:	10.56 %
favored:	84.35 %
Rotamer outliers:	1.38 %
C-beta deviations:	0

^a Resolution as defined by the largest Miller indices of the structure factors derived from the back transform of the EM map using a unit cell of space group P1 and cell dimensions: 217.440 Å, 217.440 Å, 217.440 Å, 90.00°, 90.00°, 90.00°

^b Correlation coefficient calculated by Phenix between map density and atomic coordinates of model

^c calculated as 1000 x (number of bad overlaps) / (number of atoms)

^d Coot Ramachandran restraints corresponding to a weight of 1 were used throughout the real space refinement

Figures

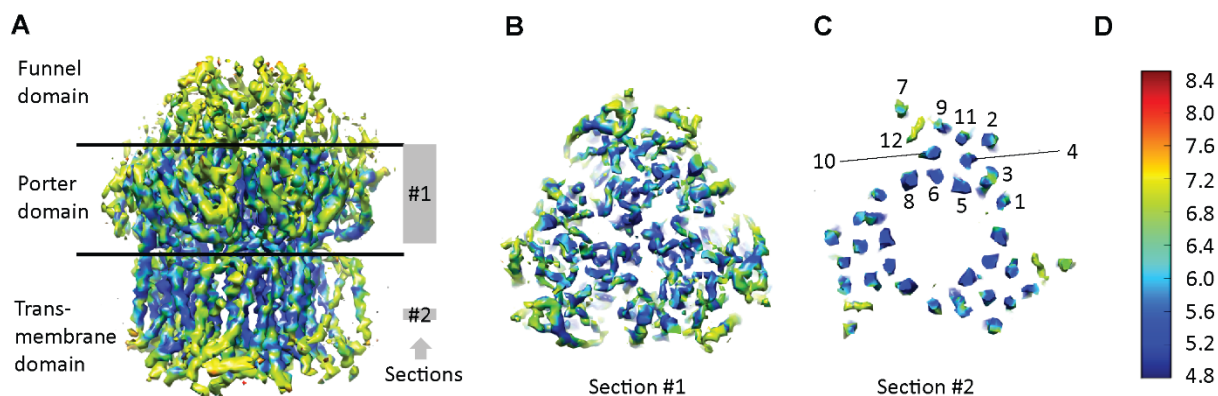


Figure 4-1. The structure of TriAxBC trimer as determined using single particle cryo-EM. (A-B).

The EM reconstruction of TriAxBC molecular structure (5σ level) corresponding to orientations: in panel **A** the periplasmic side is facing upwards while panel **B** corresponds to looking down the three-fold from the periplasm. The assembly of the trimeric structure results in a central pore. The space between the solid lines demark the region of the bilayer membrane. The map was displayed using Chimera (413). **C**. Cross-section of the transmembrane domain identifying the position of each transmembrane (TM) helix. **D**. Resolution color ladder from ResMap (485).

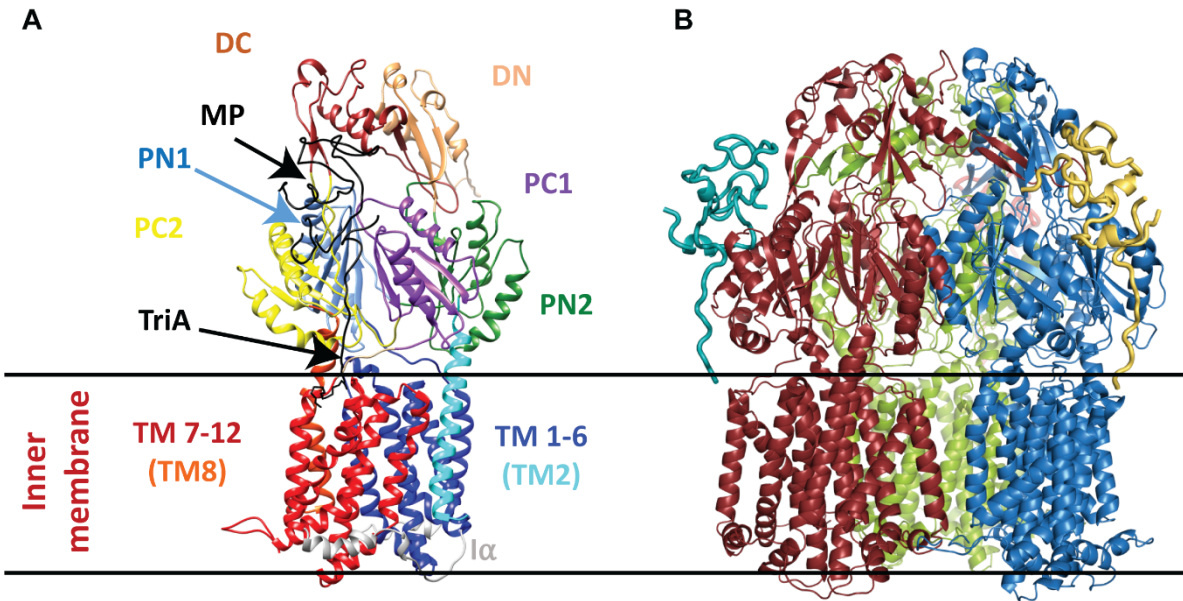


Figure 4-2. The structural model of TriAxBBC interpreted from the 4.33 Å resolution cryo-EM map.

The structural motifs of TriC subunit in cartoon form with the various domains colour coded as follows. **A.** Ribbon diagram of a protomer of TriC viewed in the membrane plane corresponding to helical regions, beta sheets, and loops. The N-terminal fold is coloured blue and comprises the helical transmembrane regions TM1-TM6 and a large periplasmic domain between TM1 and TM2 while C-terminal region is related to the N-terminal region by a pseudo two-fold rotation in the membrane plane and comprises the helical transmembrane regions TM7-TM12 and a large periplasmic domain between TM7 and TM8. Subdomains PN1 (K48 to D138), PN2 (V143 to Q186 and F278 to N327), DN (E187 to L277), PC1 (P557 to L655), PC2 (I665 to W701 and P804 to G846), DC (N702 to V797) as well as TM1 (M1 to N36) and TM7 (R524 to F556) are labelled. The MP domain of TriA is also indicated. **B.** Ribbon diagram of the TriAxBBC trimer viewed in the membrane plane. The regions that were not interpreted as TriC are shown as thickened loop regions – and are further discussed in subsequent text – see subsequent figure. Each subunit of TriAxBBC is labelled with a different colour. All structural figures were prepared in PyMol (382).

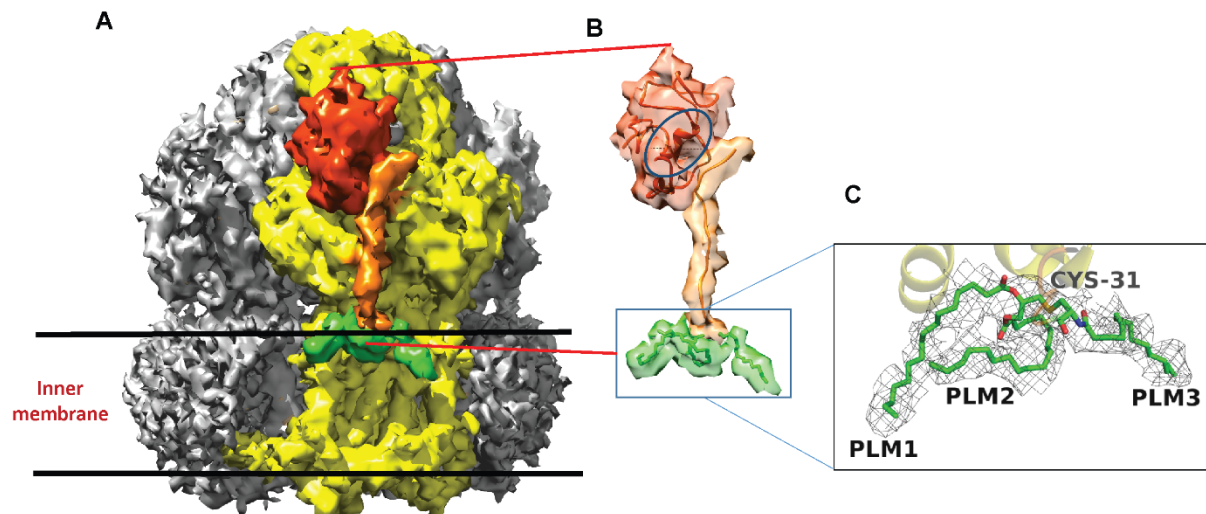


Figure 4-3. A. Residual density of TriAxBC not interpreted as the TriC polypeptide sequence, B. Modelling of the TriA N-terminal and C-terminal membrane proximal region to the residual electron density map, C. Tripalmitoylated TriA N-terminus.

A. Residual density of TriAxBC not interpreted as the TriC polypeptide sequence is colored orange and red-orange and faces into the periplasm from the subunit A protomer, shown in yellow. The green residual density is situated in the interface of the detergent corona. The detergent corona was removed for clarity in the vicinity of subunit A. **B. Modelling of the TriA N-terminal and C-terminal membrane proximal region to the residual electron density map.** α trace corresponding to residues 31-47 and residues 297-362 of a TriA protomer is shown in orange and orange-red respectively. The orange residual density was interpreted as the N-terminus of the TriA and in orange red is shown the adjacent proximal MFP domain. The helical region of 10 residues (349-359) initially identified using *map_to_model* feature in Phenix has been outlined in dark blue. The density has been made transparent to show the fit of the trace of the respective polypeptide chains to their associated EM densities. The orientation is shown with periplasmic side facing upwards. The EM maps were contoured at 2σ . Both EM maps were generated using Chimera (413). **C. Tripalmitoylated TriA N-terminus.** Each palmitic acid (PLM1-3) in green is shown covalently bound to Cys-31 of the TriA N-terminus and corresponds to the green modeled density in **B**. The EM map surrounding the palmitic acid modification was drawn at an electron density of 2.9σ and is distinguishable from the detergent corona that becomes visible in the EM map below 2.3σ . The orientation is looking down from the periplasm. The figure was prepared using PyMol (382).

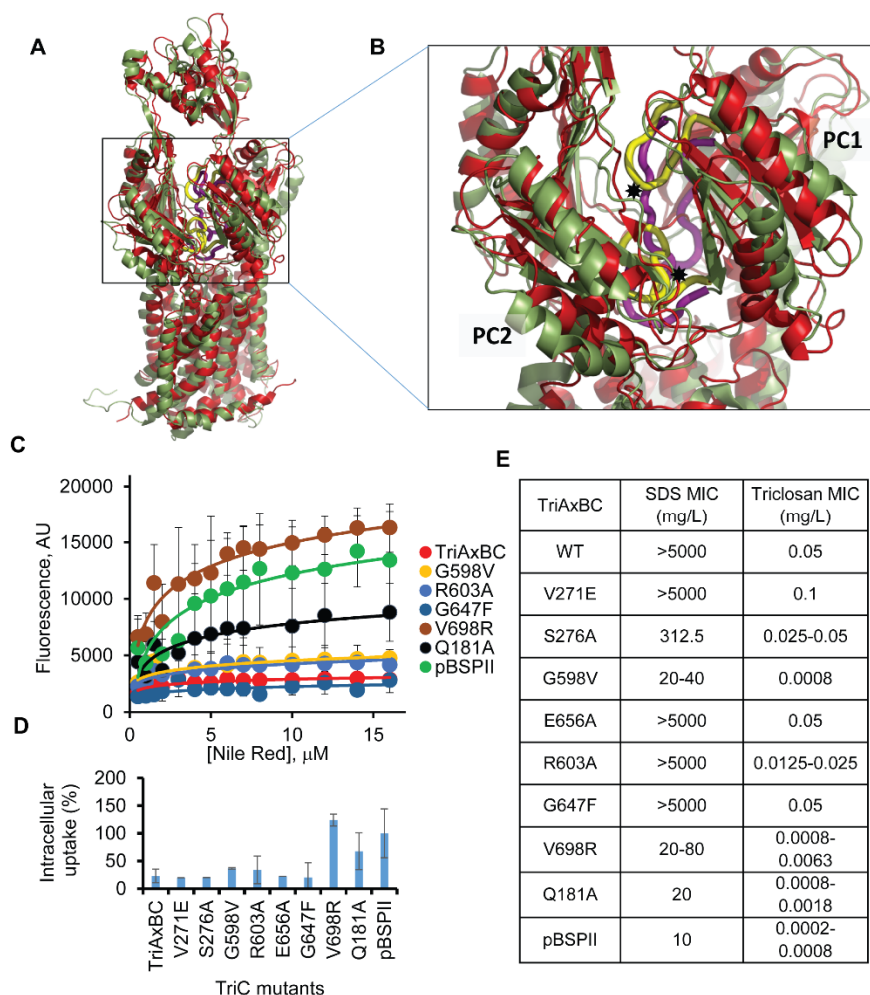


Figure 4-4. Structural comparison of the TriC and AcrB protomers.

A. Ribbon diagram of protomers of TriC and AcrB viewed in the membrane plane. A TriC subunit of TriAxBC (red) is superimposed onto an “substrate-free” protomer (extrusion subunit) of AcrB (PDB: 3AOD) (green). A RMSD of 3.7 Å for all atoms was obtained using the Super alignment tool in Pymol. **B.** Front view of the periplasmic clefts formed by sub-domains PC1, PN1, PC2, and PN2 of TriC and AcrB. PN1 and PN2 lie behind PC2 and PC1, respectively, and are not labelled. Residues 614-622 in AcrB form a flexible loop (a thick yellow trace) that gates multidrug binding within the periplasmic cleft. The loop apex (★) contains two Phe residues, 615 and 617, and are thought to gate drug extrusion in AcrB. TriC has an equivalent yet longer loop, (a thick purple trace), consisting of residues 598-614 that penetrate into the cleft formed by sub-domains PC1, PN1, PC2, and PN2. Noteworthy also is the loop, residues 667-680 in AcrB (thick yellow), and residues 655-663 in TriC (thick purple), that form the basement of the periplasmic cleft. This loop is shorter in TriC allowing the ‘gating’ loop in TriC to penetrate deeper into the periplasmic cleft. The periplasmic side is facing upwards in both panels. The figure was prepared using PyMol (382). **C.** Nile Red (NR) accumulation in *E. coli* Δ9-Pore cells producing TriAxBC and its mutant TriC variants. Cells were induced with 1 mM IPTG until OD 0.3-0.5 to express TriAxBC and its variants, and then with 0.2% arabinose

to express Pore until OD 1.0. Concentration dependence curves of NR accumulation in cells producing the indicated TriC variants are shown. Error bars, SE (n=3). **D.** Intracellular concentration of NR expressed as a percent of NR accumulation in cells carrying empty pBSPII vector. Cells were incubated in the presence of 12 μ M NR for 5 min and fluorescence intensity measured. **E.** Susceptibilities of *E. coli* $\Delta 9$ cells producing TriAxBC and its TriC mutant variants to triclosan and SDS (n=3).

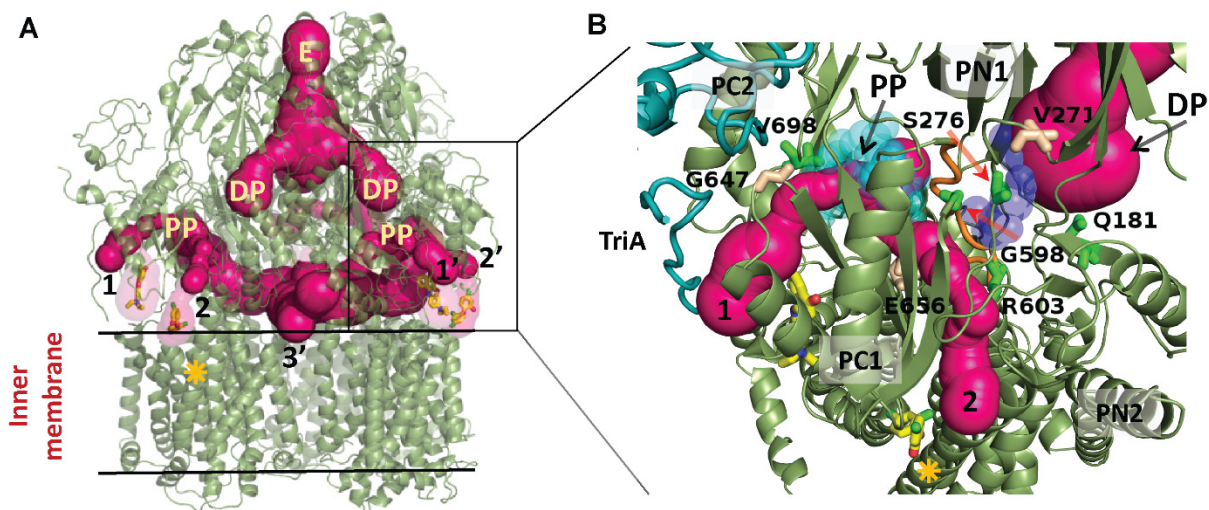


Figure 4-5. Intramolecular water-accessible channels in the TriAxBC trimer.

A. Two distinct trimeric tunnel networks are depicted as solid surfaces colored (hot pink), and were calculated using the PyMol plugin of CAVER 3.0.1 (486). The networks communicate among subunits and the bottleneck diameter of each tunnel network is 3.3Å. In AcrB, several binding pockets and loci have been identified that are related to drug extrusion activity (284). The homologous positions of these loci in TriAxBC, identified by superposition of the structures, entail a proximal pocket (**PP**), distal pocket (**DP**), entrances (Tunnels **1-3**) and a funnel-like exit (**E**) and as such have been identified. The tunnel apertures at the entrance are numbered in black: (**1**) Outer leaflet/periplasmic entrance between PC1 and PC2, (**2**) Outer leaflet entrance between PC1 and PN2, (**3**) central cavity entrance between subunits (284). A cavity, shown in transparent pink, forms the entrance to each of tunnels **1** and **2**. For tunnel **1**, the cavity is sufficiently large to accommodate Nile Red, shown in stick representation, while the cavity to tunnel **2** is smaller and can only accommodate Triclosan, also shown. Both cavities permit attachment by SDS. Docking of Nile Red and Triclosan into their respective cavities was performed manually and did not result in any steric clashes. Different from AcrB, there is no channel connecting **PP** and **DP** in any subunit. **B.** Close-up of the region between **PP** and **DP** and the position of the mutated residues that are listed in Figure 4. In green are shown the residues that upon mutation modified extrusion activity while the residues whose mutation did not impact activity are colored in wheat. The mutations impacting activity all map vicinal to **PP**, **DP**, and between these binding sites. Rifampicin (cyan) and minocycline (blue) bound in AcrB at **PP** and **DP** loci respectively are shown as transparent spheres positioned at the putative homologous binding loci in TriC (identified by superposition of the two structures). Both tunnel **1** and **2** end at the proximal pocket **PP** and are enclosed by sub-domain pairs PC1 and PC2, and, PC1 and PN2, respectively. The exit of the extrusion tunnel **E** connects to **DP** in all subunits via the funnel region. The orange asterisk denotes helix TM2 that forms part of the entrance of tunnel **2**. TriA N-terminal region (teal) partially occludes the entrance to tunnel **1**. Nile Red and Triclosan are shown as stick representations. The periplasmic side is facing upwards in both panels. The figure was prepared using PyMol (382).

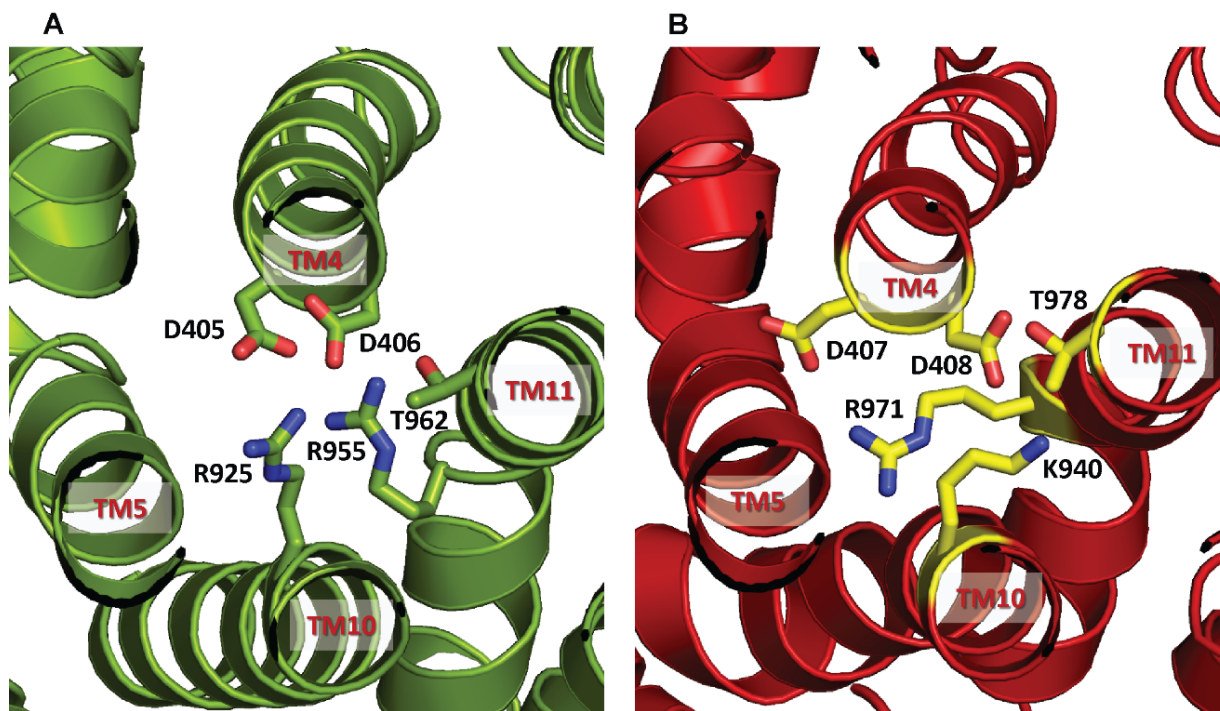


Figure 4-6. Charged residues in the central transmembrane domains of TriC and AcrB.

AcrB substrate free protomer (PDB 3AOD) was superimposed onto TriC protomer using the Super tool in PyMol (382). Four essential residues, Asp407, Asp408, Lys940, and Thr978, in the centre of the transmembrane domain, and together with Arg971 near the cytoplasmic side have been identified in AcrB to participate in a transmembrane proton-relay network. Panel **A** shows the spatial arrangement of the equivalent residues in TriC that are isostructural with those of AcrB, shown in panel **B**. The pertinent residues are shown as sticks. Notable is the substitution of Arg925 in TriC for Lys940 in AcrB which provides insight into the mechanism of proton transport. The view is looking down from the periplasmic side. The figure was prepared using PyMol (382).

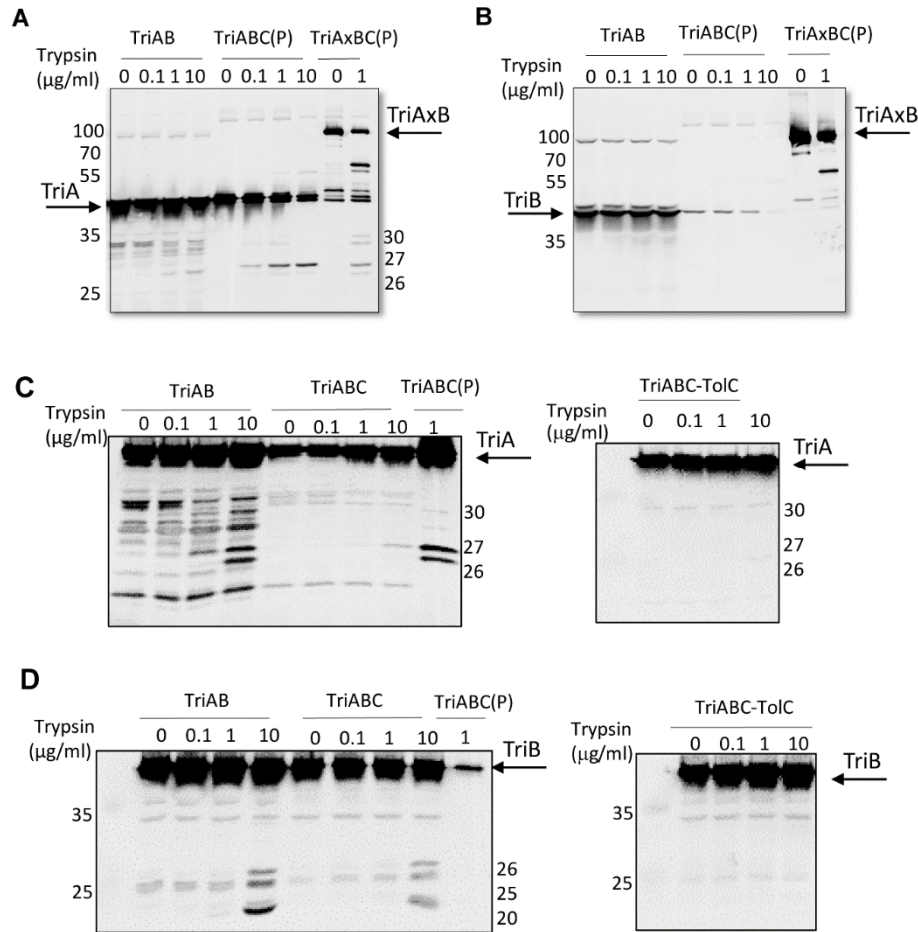


Figure 4-7. *In vivo* and *in vitro* proteolytic profiles of TriA and TriB.

A. Anti-TriA immunoblotting analysis of purified (P) TriABC and TriAxBC complexes treated with indicated concentrations of trypsin. The trypsin-treated whole *E. coli* GKCW102 (pTriAB) cells producing TriA and TriB were boiled in SDS sample buffer and immunoblotted along with the purified complexes. **B.** The same as in A but immunoblotting with anti-TriB antibodies was carried out. **C.** Whole *E. coli* GKCW102(pTriAB), GKCW102(pTriABC) and GKCW104 (pTriABC) cells producing TriA and TriB as separate polypeptides, alone or along with TriC, were treated with indicated concentrations of trypsin and TriA fragments visualized by immunoblotting with anti-TriA antibodies. Purified TriABC (P) complex treated with trypsin was loaded as a control. **D.** The same as in C but immunoblotting was done with anti-TriB antibody.

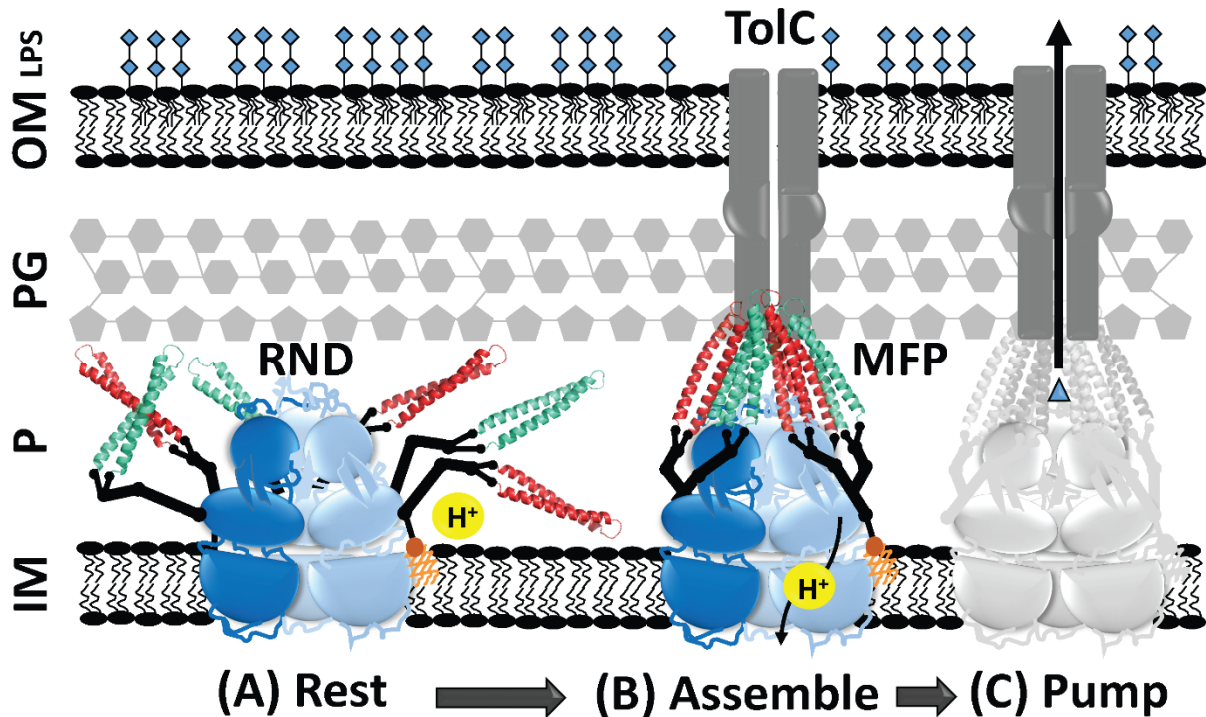


Figure 4-8. Proposed mechanism and states of the tripartite TriAxBC efflux pumps in Gram negative bacteria.

A. The TriAxBC efflux pump in the substrate-free state exhibits an open conformation wherein the membrane fusion protein TriAxB subunits (MFP) display substantial degrees of conformational flexibility in the periplasm and are anchored to the inner membrane transporter TriC via the TriA MP domain and to the outer leaflet of the inner membrane by the tripalmitoylated N-terminus of TriA. The dimensions and the location of the peptidoglycan layer in the cellular membrane constrain the TriAxB subunits to be laterally disposed relative to the outer leaflet of the inner membrane. The substrate-free conformation represents the initial state of the RND transporter TriAxBC in the recruitment of the outer membrane protein (TolC) and the assembly of the trans-envelope efflux pump. **B.** When a substrate binds one or more of the TriAxBC protomers, the conformation of the efflux pump changes and TriAxB is primed for the recruitment of TolC, followed by tripartite complex formation. **C.** Substrate efflux from the cytoplasm or the periplasm is facilitated by the transmembrane proton motive force (H^+) and the TriAxBC-TolC complex association. The position and thickness of the various bacterial membrane components are drawn to scale based on (475). OM: Outer Membrane; PG: Peptidoglycan; P: Periplasm; IM: Inner Membrane; LPS - lipopolysaccharides of the outer leaf of the OM are indicated by blue squares; RND: Resistance Nodulation Division; MFP: Membrane Fusion Protein; the tripalmitoylated N-terminus of TriA is shown in orange. TriA sequence is colored red while TriB covalently linked to TriA is shown in green; substrate is represented by the blue triangle. The α -hairpins in the figure were prepared using PyMol (382).

Supplementary data

Supplementary tables

Table S4-1. Antimicrobial susceptibility of *E. coli* $\Delta 9$ -Pore^a cells producing the plasmid-borne AcrAB, TriABC and TriAxBC efflux pumps.

Variants	0% L-Arabinose		0.1% L-Arabinose	
	SDS ($\mu\text{g/ml}$)	Triclosan (ng/ml)	SDS ($\mu\text{g/ml}$)	Triclosan (ng/ml)
-	9	4	9	4
AcrAB	>2500	128	312	128
TriABC	39-78	16	78	16
TriAxBC	>2500	64	156-312	64

^a Addition of arabinose to growing *E. coli* $\Delta 9$ -Pore induces the expression of a large pore in the outer membrane that enables permeation of compounds into periplasm (458).

Table S4-2. Workflow for cryo-EM particle analysis.

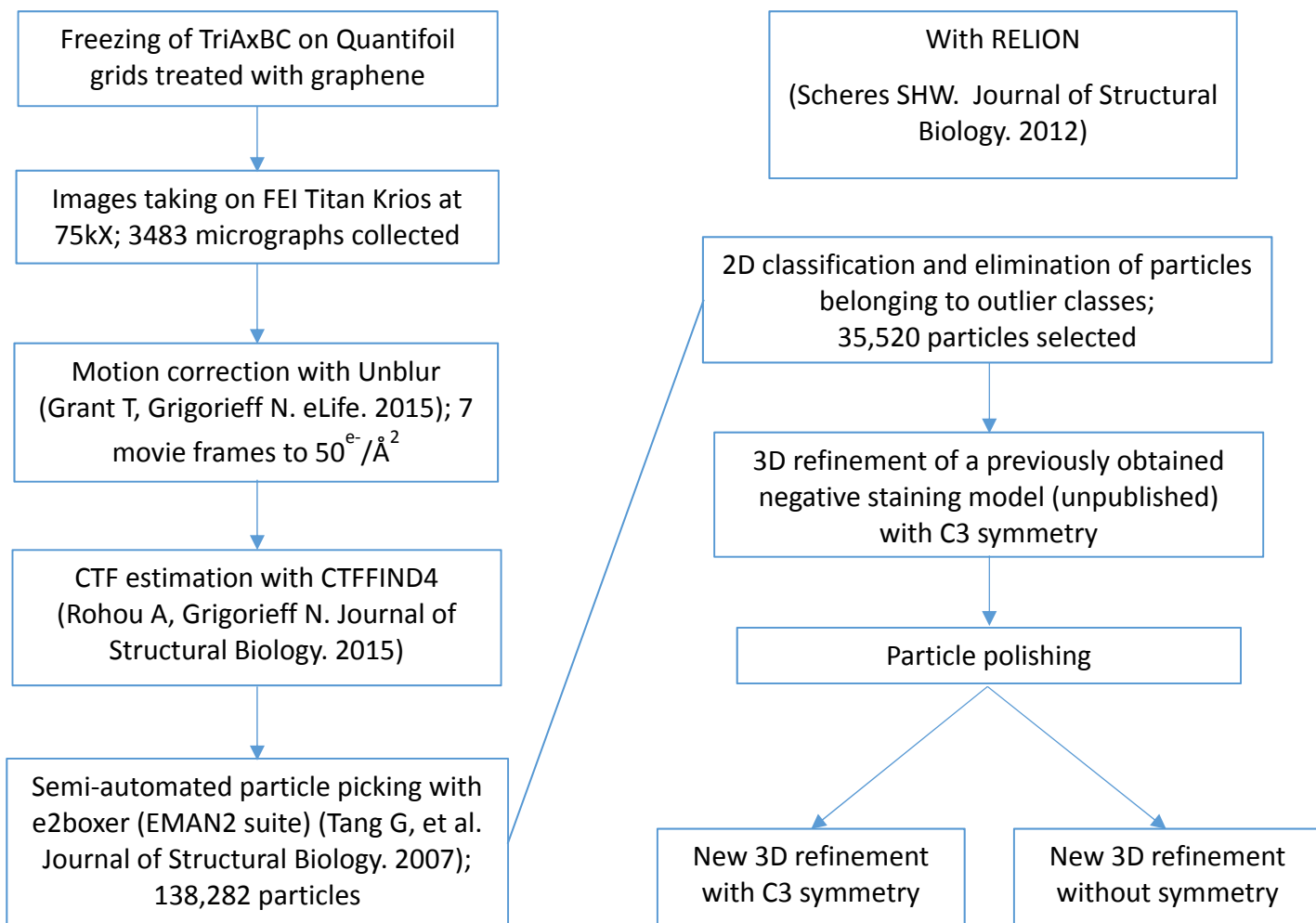


Table S4-3. I-TASSER homology modeling of TriC model.

Top structural analogs found in the PDB that are close to the TriC target and are considered having the same topological fold whenever TM-score > 0.5 (482).

RANK	PDB HIT	PROTEIN	TM-SCORE^A	RMSD^B	IDEN^C	COV^D
1*	3ne5	CusBA	0.955	1.02	0.209	0.963
2	4k0e	ZneA	0.913	1.73	0.220	0.936
3	3d9b	AcrB	0.904	3.21	0.200	0.976
4	4mt1	MtrD	0.889	3.26	0.204	0.958
5	3jd8	NPC1	0.519	6.11	0.073	0.641

^a Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library (409).

^b RMSD is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align. TM-align is an algorithm for sequence-order independent protein structure comparisons (376).

^c IDEN is the percentage sequence identity in the structurally aligned region (expressed between 0 and 1).

^d Cov represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

* The confidence of each model is quantitatively measured by C-score that is calculated based on the significance of threading template alignments and the convergence parameters of the structure assembly simulations. C-score is typically in the range of [-5, 2], where a C-score of a higher value signifies a model with a higher confidence and vice-versa. The C-score for 1st ranked model = 1.70 indicating an extremely high degree of confidence.

Supplementary figures

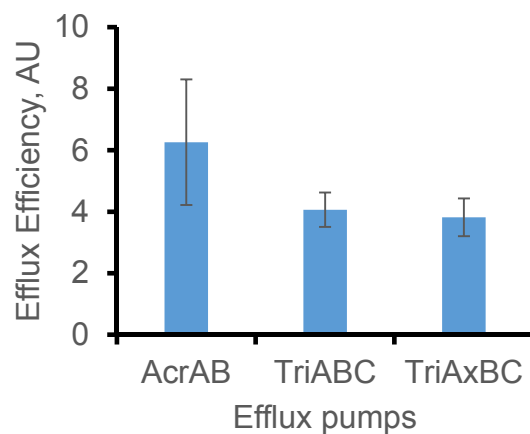


Figure S4-1. Kinetics of intracellular accumulation of the membrane fluorescent probe Nile Red (NR) in hyperporinated efflux-deficient *E. coli* $\Delta 9$ -Pore overproducing AcrAB, TriABC and TriAxBC pumps.

Efflux efficiency is estimated as a ratio of NR accumulation in cells carrying an empty vector and in cells overproducing the indicated efflux pumps.

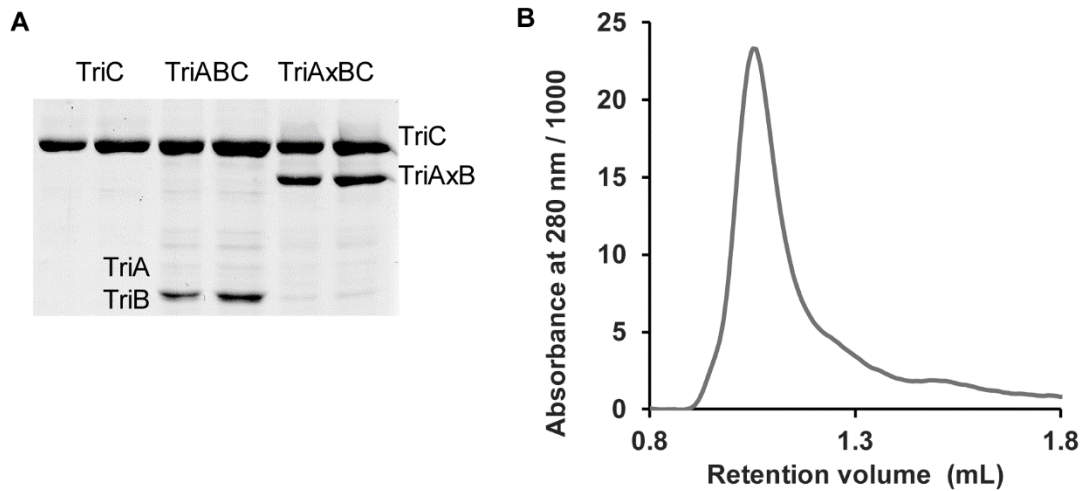


Figure S4-2. SDS-PAGE and SEC chromatogram of TriAxBC sample used for cryo-EM studies.

(A) TriC-His, TriABC-His and TriAxBC-His complexes were metal-affinity purified from *E. coli* JWW2 cells carrying respective plasmid constructs. Fractions eluted with 500 mM imidazole were separated by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. Immunoblotting of TriABC fractions with anti-TriA and anti-TriB polyclonal antibodies is shown in Fig. 10. **(B)** The TriAxBC sample was injected onto a Superdex 200 increase 3.2/300 column (flowrate: 75 μ L/min, mobile phase: 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.03 % (w/v) DDM, pH 8.0, column volume 2.4 mL). The retention volume of the peak corresponded to an estimated molecular weight of 620 kDa. Peak fractions run on SDS-PAGE gels showed two expected bands corresponding to TriAxB and TriC.

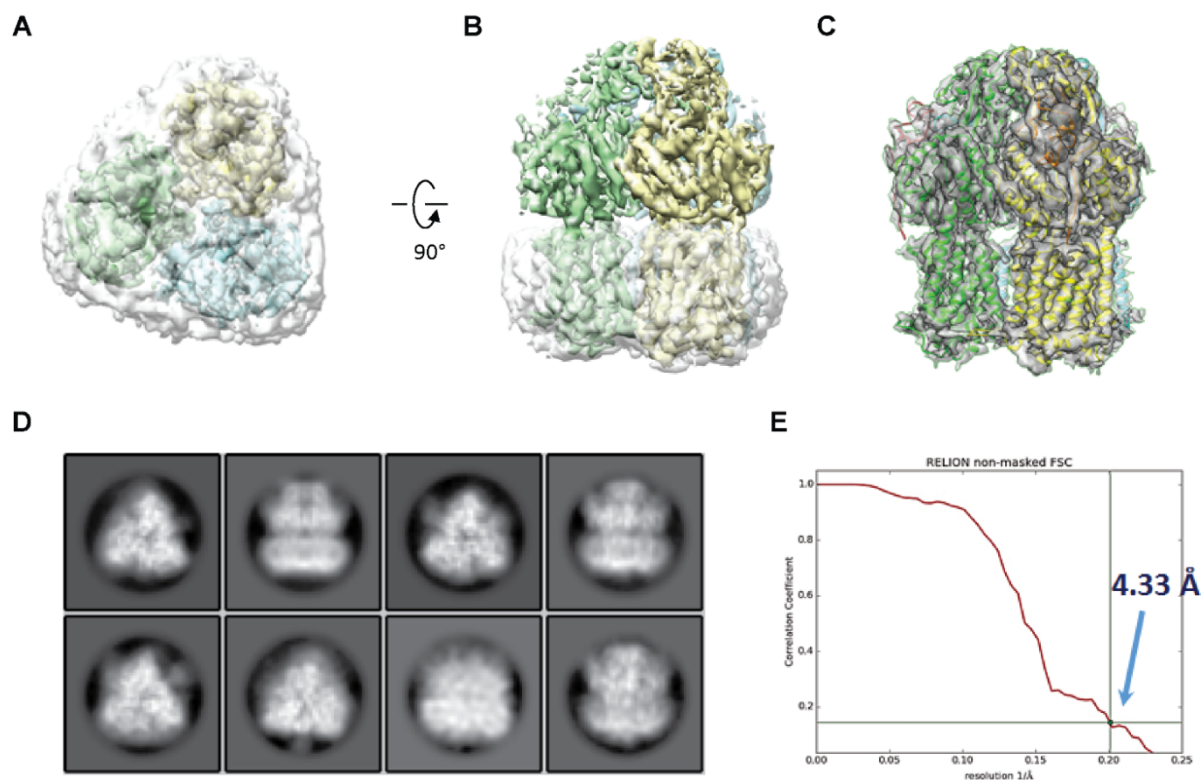


Figure S4-3. TriAxBC EM-map and its high-resolution refined model.

A and **B**. Top and side views of the TriAxBC EM-map contoured at 5σ and displayed as a montage with the lipid bilayer from the same map but at contour of 2σ . **C**. Agreement of the refined TriAxBC trimeric structure to the single particle cryo-EM density. The structural motifs of TriAxBC trimer are shown in cartoon form having each subunit coloured differently. Cryo-EM density was contoured at 4σ and is shown in semitransparency. **D**. Reference-free two-dimensional class averages of TriAxBC in DDM, showing transmembrane helices and lipid bilayer. **E**. Gold-standard Fourier shell correlation (FSC) curve of the density map.

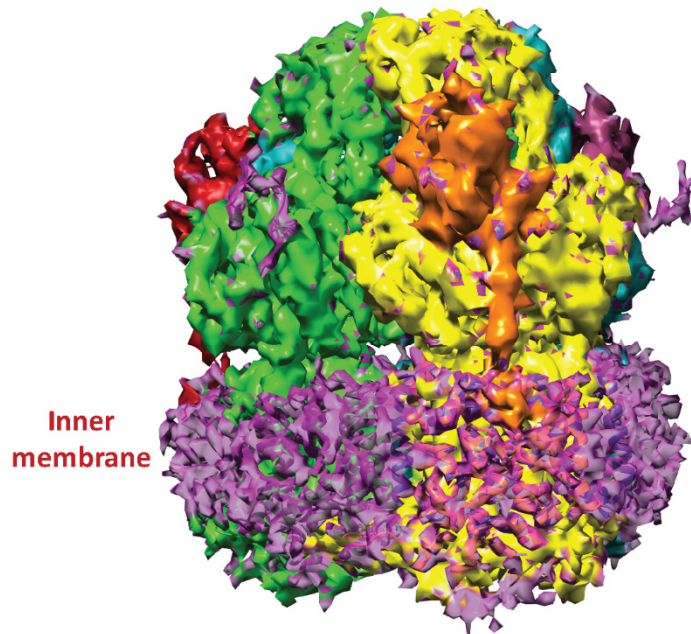


Figure S4-4. Agreement of the refined TriAxBC trimeric structure to the single particle cryo-EM density.

The cryo-EM density contoured at 2σ and shown in solid representation. The cryo-EM density within 3.5\AA of each subunit was coloured as following: the larger TriC subunits are shown in yellow, green and blue while the smaller TriA subunits are shown in orange, red and orange-red (not visible). The pink electron density represents density not explained by the TriAxBC structure and is for the most part consistent with the position of the detergent corona. The periplasmic side is facing upwards. Figure was generated using Chimera (413).

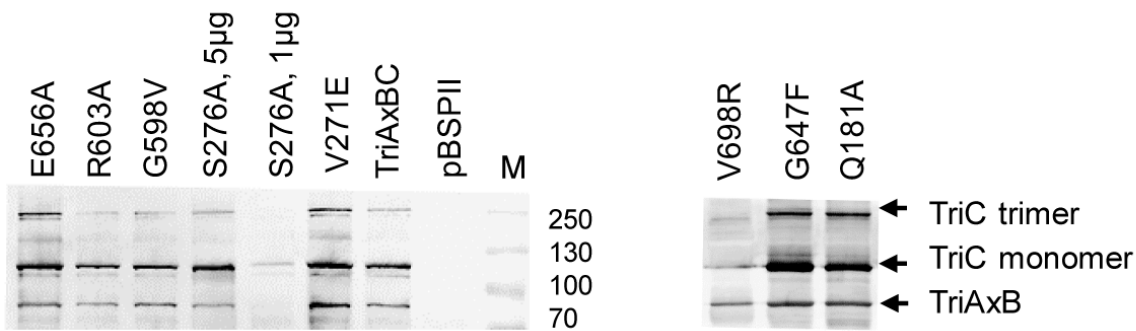


Figure S4-5. Expression of TriAxBC and its TriC variants in *E. coli* Δ 9-Pore cells.

Exponential cells were induced with 1 mM IPTG for five hours, total membrane fractions isolated by ultracentrifugation and analyzed by immunoblotting with anti-TriC polyclonal antibody (289). TriAxB is also seen in these immunoblots because of the cross-reactivity of polyclonal antibodies (289).

Supplementary movie

Movie S4.

This movie provides a three-dimensional perspective on the fitting by the atomic models of the trimeric TriC subunits (green, blue, turquoise) and the partial structural model for the trimeric TriA subunits (red, light green, yellow) into the cryo-EM density. The tripalmitoylated N-terminus is shown in magenta, while a DDM molecule in the central cavity associated with each TriC subunit near its interface with an adjacent TriC subunit has carbon atoms colored yellow and oxygen atoms in red. Transparency of the electron density has been varied to facilitate viewing of the fit of the TriAxBC reconstruction ($C\alpha$ trace) into the cryo-EM density. The DDM detergent corona which becomes visible at 2.3σ was not modeled. Highest density levels shown was set to 4.0σ .

Chapitre 5: Discussion et conclusion

L'objectif général de cette thèse était la caractérisation structurale et fonctionnelle des transporteurs *RND* impliqués dans la résistance des bactéries aux antibiotiques. Cette implication a fait de ces transporteurs de nouvelles cibles thérapeutiques. Toutefois, peu est connu sur la structure et le mécanisme d'action de ces protéines. Face à ce constat, plusieurs recherches visant ces transporteurs ont été publiées, dont la présente étude. Je me suis donc concentrée, durant mes études doctorales, sur l'exploration de la structure de certains de ces transporteurs et son application en termes d'un mode fonctionnel. Pour ce faire, plusieurs collaborations ont été établies mettant à notre disposition un ensemble de techniques pluridisciplinaires. Nous sommes parvenus à travers nos résultats à résoudre la première structure publiée du transporteur MmpL3 de *C. glutamicum* à basse résolution, ainsi que celle de la pompe à efflux TriABC de *P. aeruginosa* à haute résolution. Nos travaux ont aussi permis de clarifier certaines notions concernant leurs mécanismes de transport et les alternatives de leur inhibition. Ainsi, ce chapitre final présente une récapitulation générale de nos accomplissements détaillés dans les trois chapitres (2, 3 et 4). Les limitations rencontrées, les alternatives aux techniques appliquées ainsi que les futures perspectives seront également abordées.

5.1. Structure-fonction du transporteur MmpL3 et son inhibition

Dans le cadre de notre projet de recherche, nous nous sommes intéressés à la caractérisation structurale et fonctionnelle du transporteur transmembranaire MmpL3 ainsi qu'aux perspectives apportées par son inhibition éventuelle. Dans la première partie de notre étude, nous nous sommes fixé comme objectif la détermination de la structure du transporteur MmpL3. Dans cette optique, les transporteurs MmpL3 de *M. tuberculosis*, et CmpL1, son orthologue chez *C. glutamicum*, ont été utilisés comme prototypes et modèles des *MmpLs* pour la caractérisation structurale et fonctionnelle.

Notre principal objectif était de valider l'appartenance du transporteur *MmpL* à la famille des *RNDs* par la mise en évidence de leurs similitudes structurales et fonctionnelles. *MmpL3* devait donc présenter une conformation tridimensionnelle semblable à celle des transporteurs *RND* et également user d'une force proton-motrice pour le transport de son substrat. Nous tenons à mentionner qu'à l'initiation du présent projet, aucune donnée structurale ni fonctionnelle du transporteur *MmpL* n'avait encore été publiée. Ceci souligne la pertinence de notre étude et le défi à relever en caractérisant une protéine encore énigmatique et peu référée dans la littérature. En contrepartie, tout aboutissement obtenu dans ce projet sera d'une grande utilité pour la révélation des caractéristiques des transporteurs *MmpL*.

5.1.1 Validation de la caractérisation structurale du transporteur *MmpL3*

Notre stratégie de départ était de générer pour *MmpL3* une structure à basse résolution comme résultats préliminaires. Ainsi, comme première étape, nous avons entrepris des analyses du transporteur *CmpL1* par diffusion des rayons X aux petits angles (**SAXS** - *Small-Angle X-ray Scattering*) précédemment introduite dans la section de méthodologie. Nous avons déduit par analyse de la courbe de distribution des distances normalisées par paires $P(r)$ un D_{max} égal à 143 Å pour *CmpL1* en solution. Quant à son rayon de giration R_g , il était de l'ordre de 52 Å. Nous avons pu tirer profit du dispositif de chromatographie d'exclusion de taille couplé en ligne (*SEC-SAXS*) pour s'assurer de la monodispersité de l'échantillon analysé et de calculer son poids moléculaire (un trimère d'environ 314 kDa incluant la couronne du détergent, soit 83 kDa pour le monomère) (figure S2-1 du chapitre 2). Cette première validation nous a mené à supposer que le transporteur *CmpL1* analysé était un complexe trimérique, et ce à l'image des transporteurs *RND*. Ensuite, l'enveloppe *SAXS* à basse résolution du même complexe a été modélisée en employant le logiciel *Dammin* (*ATSAS online- EMBL*) (487) et en imposant une symétrie de trois. Un aperçu de l'ensemble de ces résultats et des paramètres *SAXS* déduits est présenté dans l'annexe 2.

Nos données *SAXS* pour le CmpL1 sont encourageantes mais pas encore optimales: il nous faudra améliorer la stabilité de l'échantillon dans le temps et éviter son agrégation. Afin de contourner ces limites, nous avons entamé en parallèle, en 2015, des expériences de microscopie électronique à transmission (**MET** ou **TEM** - *Transmission Electron Microscopy*) à coloration négative. L'avantage de cette technique est qu'elle n'exige pas une forte concentration de la protéine CmpL1 ce qui permettait sa purification à partir de 6 litres de cultures de *C. glutamicum* au lieu de 25 litres. Ainsi, il nous a été possible de réaliser une économie de temps et d'effort tout en tablant sur des résultats de faible résolution comparables à ceux de *SAXS*. Finalement, nos efforts investis en microscopie ont été couronnés de succès et nous sommes parvenus à générer la première carte de densité électronique d'une protéine *MmpL* de *C. glutamicum* à faible résolution (18 Å).

Afin d'interpréter ces résultats, nous avons entrepris la démarche de prédiction de la structure du transporteur par le logiciel ***I-TASSER*** (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) (7) (détaillée dans la section de méthodologie). La structure quaternaire *I-TASSER* du même transporteur CmpL1 ainsi modélisée a été validée par sa carte électronique. La même démarche de modélisation a été adoptée pour l'élaboration d'un modèle structural pour MmpL3 en utilisant CmpL1 comme référence. L'analyse structurale comparative entre nos modèles *I-TASSER* affinés par le programme *Phenix* (380) et superposés à la carte de densité électronique de CmpL1 nous a permis de constater une similitude topologique avec les transporteurs *RND*. Pour la poursuite de nos résultats, nous avons également superposé le même modèle *I-TASSER* de CmpL1 avec son enveloppe *SAXS*. Comme l'illustre l'annexe 2-A, cette correspondance n'étant pas concluante mais les résultats demeuraient encourageants.

Nous avons ensuite investi nos efforts dans d'autres alternatives nous permettant d'avoir une structure tridimensionnelle à plus haute résolution. Ainsi, nous avons débuté par CmpL1 en 2016 en effectuant les mêmes analyses microscopiques mais sous des conditions cryogéniques ou ***Cryo-EM*** (*Cryo Electron Microscopy*). Nous tenons à mentionner que l'obtention d'une carte de densité électronique *Cryo-EM* interprétable tenait de façon critique sur le fait que les protéines visualisées au microscope soient monodispersées et stables.

Étant donné l'instabilité de cette protéine transmembranaire, il n'était pas possible de la conserver en état monodispersée pour la répétition des essais. Cela a nécessité de nouveaux cycles de purification allant parfois de quelques semaines à un mois. Toutefois, nous avons réussi à maîtriser la purification de la protéine CmpL1 et avoir quelques résultats préliminaires prometteurs par *Cryo-EM*. Ainsi, nous avons pu visualiser cette dernière dans les trous de la grille cryogénique: une étape clé et critique qui est difficile à atteindre pour une protéine membranaire encore énigmatique (annexe 3). En effet, il a fallu répéter les essais cryogéniques plusieurs fois, comprenant par exemple des prévisualisations par microscopie électronique à coloration négative afin de vérifier la concentration et la monodispersité de l'échantillon.

Il est évident que la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie RMN sont les techniques les plus courantes pour générer des structures moléculaires à très hautes résolutions. Nous aurions pu opter pour ces deux techniques afin d'obtenir une haute résolution de la structure du transporteur CmpL1 mais nous avons priorisé la microscopie électronique *Cryo-EM*. Il s'agit d'une technique récente et plus simple à utiliser pour notre transporteur transmembranaire, puisque la cristallisation des protéines membranaires et leur manipulation par la spectroscopie RMN demeurent compliquées. Il est à noter aussi que la cristallographie ne présente qu'une observation d'un état statique d'une protéine figée dans un cristal. De plus, la spectroscopie RMN présente une limitation de taille, ce qui fait de la microscopie électronique une technique mieux adaptée aux protéines plus larges. En revanche, l'obtention de très hautes résolutions par microscopie électronique reste critique pour des protéines de moins de 80 kDa. Ceci ne limite pas l'émergence de la *Cryo-EM* qui a rendu possible la détermination de structures à résolutions comparables à celles obtenues par cristallographie à rayons X ou spectroscopie RMN (488). En effet, le progrès technologique a permis d'optimiser la performance de la *Cryo-EM* en termes de résolution à la suite de l'acquisition de nouveaux détecteurs permettant la détection directe des électrons. Ainsi, nous pouvons tirer avantage de la *Cryo-EM* pour la visualisation de MmpL3 en présence d'autres partenaires potentiels requis pour le transport du *TMM*.

Cependant, ces contraintes n'ont pas empêché l'équipe de Zhang de cristalliser le transporteur MmpL3 de *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) (326). Ces auteurs sont parvenus à déchiffrer la première structure à haute résolution d'un transporteur *RND* de la famille des *MmpLs* par cristallographie aux rayons X. Leurs travaux ont été récemment publiés dans le journal *Cell Press* le 24 janvier 2019. La structure cristallographique de MmpL3 de *M. smegmatis* natif mais dépourvu de son extrémité C-terminale a été résolue à 2.7 Å et déposée dans la banque de données des protéines *RCSB* (PDB 6AJF). Ces auteurs se sont confrontés à la difficulté de la cristallisation du domaine C-terminal du transporteur (résidus 736-1013, 277 aas) et ont fini par le substituer par le lysozyme-T4 fusionné au niveau du résidu 751. Cette stratégie s'avère efficace pour l'augmentation des surfaces exposées au solvant propices pour des contacts de cristallisation. Un autre groupe (Su et Yu, 2019, à publier) a suivi Zhang et ses coauteurs de quelques semaines pour le dépôt de la structure du même transporteur à 3.3 Å, également sans son extrémité C-terminale (résidus 736-1001, 278 aas) (PDB 6N40). Ainsi, l'absence de l'extrémité C-terminale dans les deux structures cristallographiques consolide notre prédiction du désordre de ce domaine chez MmpL3 de *M. tuberculosis* et la limitation de sa modélisation par *I-TASSER*.

Nous avons pu tirer profit des structures cristallographiques publiées pour le MmpL3 de *M. smegmatis* en les employant comme références pour valider les résultats réalisés durant mes études doctorales. Comme étape de vérification, nous avons visualisé et superposé les deux structures cristallographiques au moyen du logiciel *PyMOL* (382). L'alignement des deux structures était convaincant et justifié par un *RMSD* (*root-mean-square deviation*) égal à 0.660 Å (626 atomes alignés). Nous avons restreint notre choix de modèle de référence à la structure du PDB 6AJF qui présentait une meilleure résolution; la suite de notre analyse comparative concernera donc uniquement la structure publiée par l'équipe de Zhang (326). Pour initier notre étude comparative, nous avons superposé notre structure finale de MmpL3 de *M. tuberculosis* prédite par *I-TASSER* sur la structure cristallographique de MmpL3 de *M. smegmatis* (PDB 6AJF) (figure 5-1).

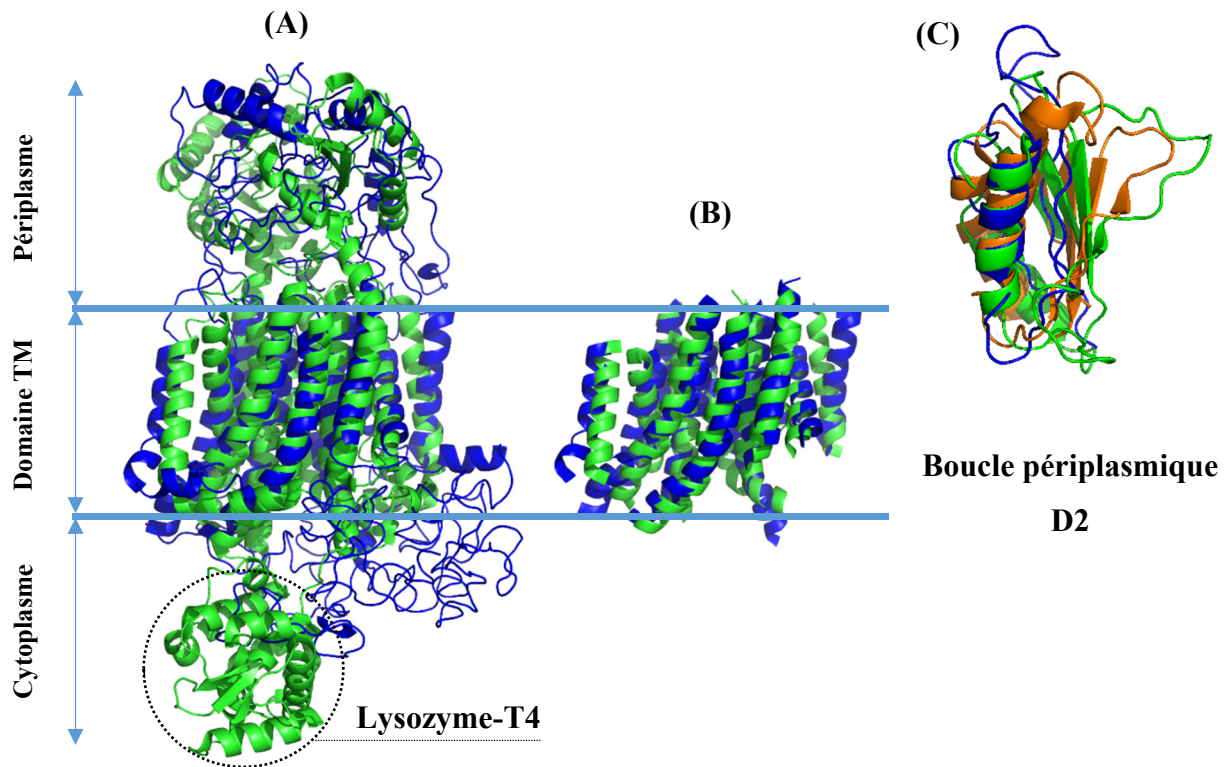


Figure 5-1. Validation de la modélisation *I-TASSER* de MmpL3 de *M. tuberculosis*.

Abréviation: TM: Transmembranaire; D2: boucle périplasmique C-terminale.

(A) Superposition du modèle *I-TASSER* de MmpL3 de *M. tuberculosis* (en bleu) sur la structure de MmpL3 de *M. smegmatis* (PDB 6AJF) (en vert). (B) Alignement des douze hélices alpha transmembranaires des deux transporteurs MmpL3 de *M. tuberculosis* (en bleu) et *M. smegmatis* (en vert). (C) Superposition des trois boucles D2 des transporteurs MmpL3 de *M. tuberculosis* (en bleu), de *M. smegmatis* (en vert) et MmpL11 de *M. tuberculosis* (PDB 4Y0L) (en orange). Le logiciel *PyMOL* a été utilisé pour la superposition des structures et leur visualisation en 3D.

Comme le montre la figure 5-1, les douze segments transmembranaires des deux transporteurs présentent pratiquement les mêmes repliements et positionnements des hélices alpha. Cependant, nous avons enregistré un *RMSD* égal à 6.493 Å (509 atomes alignés). La réduction de la valeur du *RMSD* à 3.976 Å (259 atomes alignés) après restriction de l'alignement à leurs domaines transmembranaires (les 12 hélices α) est toutefois un point intéressant. Ceci marque une similitude notable entre ces deux transporteurs plus consistante avec leurs 72% d'identité de séquences d'acides aminés.

Ensuite, nous avons focalisé notre comparaison structurale sur les domaines périplasmiques des deux MmpL3. Dans ce contexte, nous rappelons que le premier progrès dans la définition de la structure d'une boucle périplasmique d'un transporteur *MmpL* a été réalisé par l'équipe de Chim en 2015 (324). Ces auteurs ont réussi à obtenir une structure cristallographique à 2.4 Å de résolution pour le deuxième domaine soluble D2 de MmpL11 de *M. tuberculosis* (324). Ainsi, pour donner suite à notre analyse comparative, la similitude du domaine D2 de notre modèle *I-TASSER* de MmpL3 avec les mêmes domaines chez certains orthologues a été examinée. Le domaine périplasmique D2 (les résidus 448-513) de MmpL3 de *M. tuberculosis* a été superposé sur les structures cristallographiques des domaines D2-MmpL11 de *M. tuberculosis* (résidus 424-511, PDB 4Y0L) et D2-MmpL3 de *M. smegmatis* (résidus 454-546, PDB 6AJF). Il en a résulté des *RMSDs* respectivement égaux à 0.877 Å (42 atomes alignés) et 0.841 Å (75 atomes alignés) pour la boucle D2 de MmpL3 de *M. tuberculosis* avec les boucles D2 des structures 4Y0L et 6AJF. *I-TASSER* n'a pas prédit la structure secondaire de tout le domaine périplasmique du transporteur. Toutefois, ce dernier était capable de nous prédire quatre hélices alpha de notre modèle MmpL3 de *M. tuberculosis* qu'on retrouve dans la structure cristallographique (PDB 6AJF), à savoir: les séquences d'acides aminés (25-35), (83-98), (139-150) et (470-481).

En résumé, notre modèle *ab initio* MmpL3 de *M. tuberculosis* a été consolidé par la structure cristallographique de l'orthologue MmpL3 de *M. smegmatis* (PDB 6AJF (326) et PDB 6N40). Notre recours au logiciel *I-TASSER* pour la prédiction de la topologie de nos transporteurs peut être justifié par plusieurs arguments. Toutefois, nous nous sommes heurtés à certaines limites dans la prédiction *I-TASSER*. Les avantages et les limites de la démarche de prédiction par le logiciel *I-TASSER* ainsi que les alternatives possibles seront développés dans la section (5.3).

5.1.2 Validation des résidus fonctionnels du transporteur MmpL3

Notre deuxième objectif d'étude était la déduction des résidus essentiels pour le maintien de la fonction du transporteur MmpL3 chez le *Mycobacterium*. Pour parvenir à nos fins, nous avons validé nos essais mutationnels et biochimiques avec notre modèle *I-TASSER* de MmpL3, prédit pour remédier à l'absence d'une structure cristallographique ou microscopique pour les *MmpLs*. Notre modèle était cohérent puisque la structure corroborait fidèlement nos résultats. Certes, nos travaux ont été basés sur un modèle validé par nos données expérimentales, mais la génération de ce modèle a permis de cerner, bien avant la publication de la structure de MmpL3 de *M. smegmatis*, des résidus critiques pour l'activité de MmpL3. Nous avons pu également identifier un canal permettant la translocation des protons, une fonction requise dans le transporteur MmpL3.

Grâce à ces développements, nous avons suggéré le maintien de la force proton-motrice chez MmpL3 grâce aux résidus essentiels Asp251 du TMIV, la paire Asp640/Tyr641 du TMX et les Asp710/Arg715 du TMXII. Ces ébauches ont servi de tremplin à d'autres études (489) (428) (490) (249) (322) relatives au transporteur MmpL3 dont celle du groupe de Zhang en 2019 (326), et y sont référencées. Nous avons poursuivi la même stratégie comparative tout en se focalisant sur la validation de nos déductions fonctionnelles. Zhang *et al.* ont démontré l'engagement des deux paires Asp256-Tyr646 et Asp645-Tyr257 pour le relais des protons chez MmpL3 de *M. smegmatis*. Une autre étude a consolidé davantage l'implication des deux paires Asp-Tyr de MmpL3 dans la facilitation de la translocation des protons et ce par l'abrogation de la croissance du *Mycobacterium* en culture sous l'effet de leur mutation (351). Pour une meilleure perception comparative, nous avons cartographié ces résidus et superposé les structures des protéines MmpL3 de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* (figure 5-2B). Ceci nous a permis de déduire les deux paires Asp251-Tyr641 et Asp640-Tyr252 au niveau des domaines transmembranaires TMIV et TMX de MmpL3 *M. tuberculosis* (figure 5-2A). En effet, les paires Asp-Tyr sont conservées chez tous les transporteurs *MmpL* du *Mycobacterium* à l'exception de MmpL7 (326, 351). Ainsi, nos conclusions pour les résidus essentiels pour le maintien de la force proton-motrice au niveau du canal du transporteur ont été approuvées, à l'exception du résidu Tyr252 du TMIV.

Ce qui a exclu la deuxième tyrosine est le fait que nous nous sommes basés sur nos analyses des similarités avec les triades Asp-Asp-Tyr impliquées dans le relais des protons chez les homologues SecDF (397) et AcrB (272) (298). Nous rappelons aussi la mise en évidence de l'essentialité de ces paires pour la croissance des cultures mycobactériennes et l'activité de transport de MmpL3 à la suite de leur mutation en cystéine. Ces mêmes données ont également confirmé que MmpL3 fonctionne sous forme d'un homotrimère pour exporter le tréhalose de monomycolate du cytoplasme (chapitre 2). Cette oligomérisation a été abordée dans d'autres études où l'approche de modélisation par homologie des protéines *MmpL* a permis d'observer leur organisation en homotrimères, à l'image des *RNDs* (323, 324, 351). De plus, notre prédiction d'un trimère a été appuyée par les résultats de microscopie électronique, de gel filtration et des données *SAXS* obtenus pour son orthologue CmpL1 de *C. glutamicum*.

En revanche, Zhang et ses coauteurs (326) ont suggéré un monomère à la suite de la caractérisation de l'orthologue MmpL3 de *M. smegmatis* par cristallographie aux rayons X et *SAXS*. Toutefois, ces auteurs n'ont jamais exclu la possibilité de la formation d'un trimère. En effet, des données récentes non publiées du laboratoire du Prof. Jackson montrent que le domaine C-terminal est impliqué dans l'oligomérisation de MmpL3 et l'interaction avec d'autres protéines. Ce qui peut expliquer la génération de deux structures cristallographiques pour le transporteur MmpL3 de *M. smegmatis* à l'état monomérique étant donné l'absence de son domaine C-terminal (PDB 6AJF (326) et PDB 6N40). Des analyses plus poussées du transporteur MmpL3 seront donc indispensables pour démontrer son oligomérisation et son impact sur l'activité de transport.

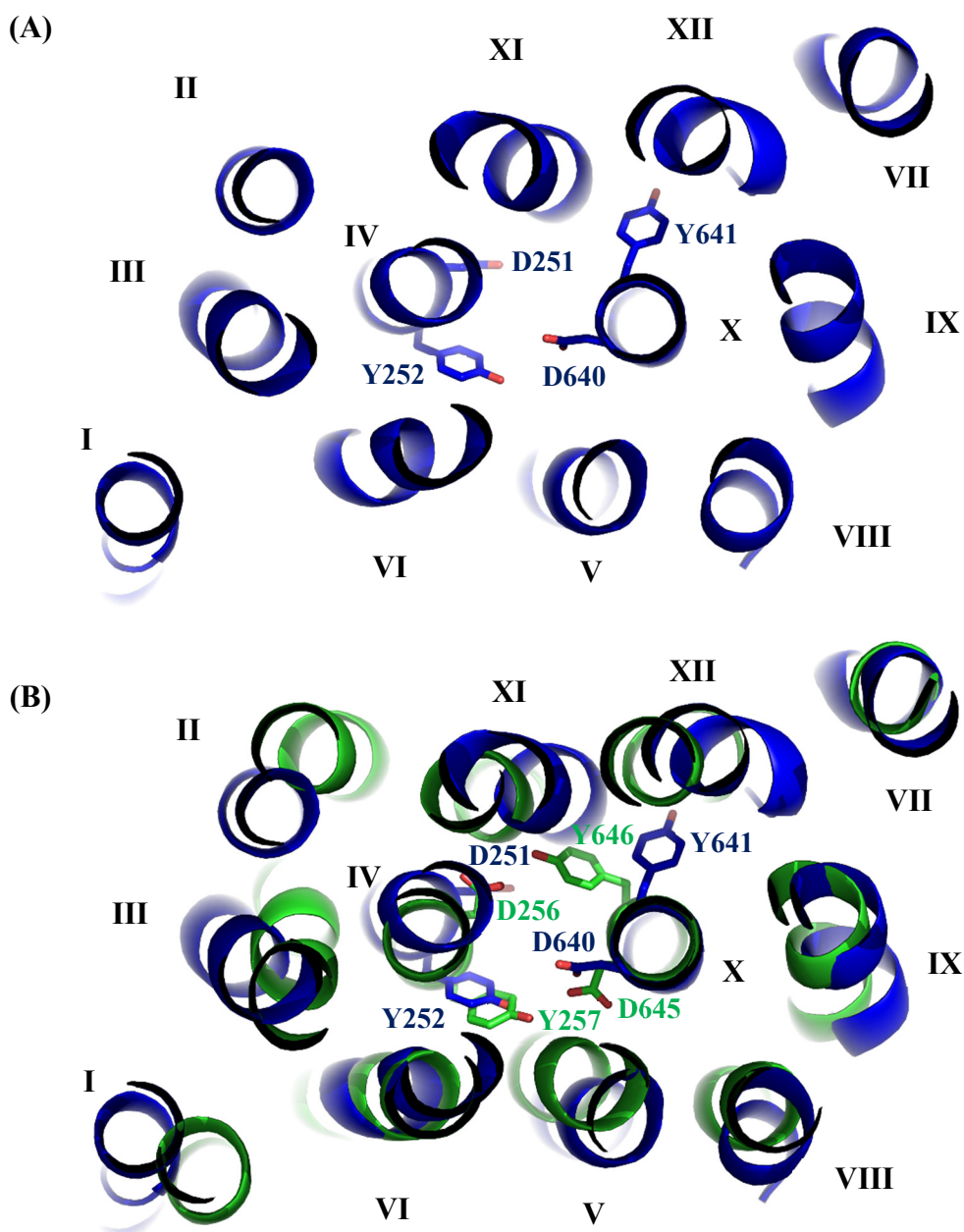


Figure 5-2. Vue de dessus des structures tridimensionnelles du transporteur MmpL3 de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*.

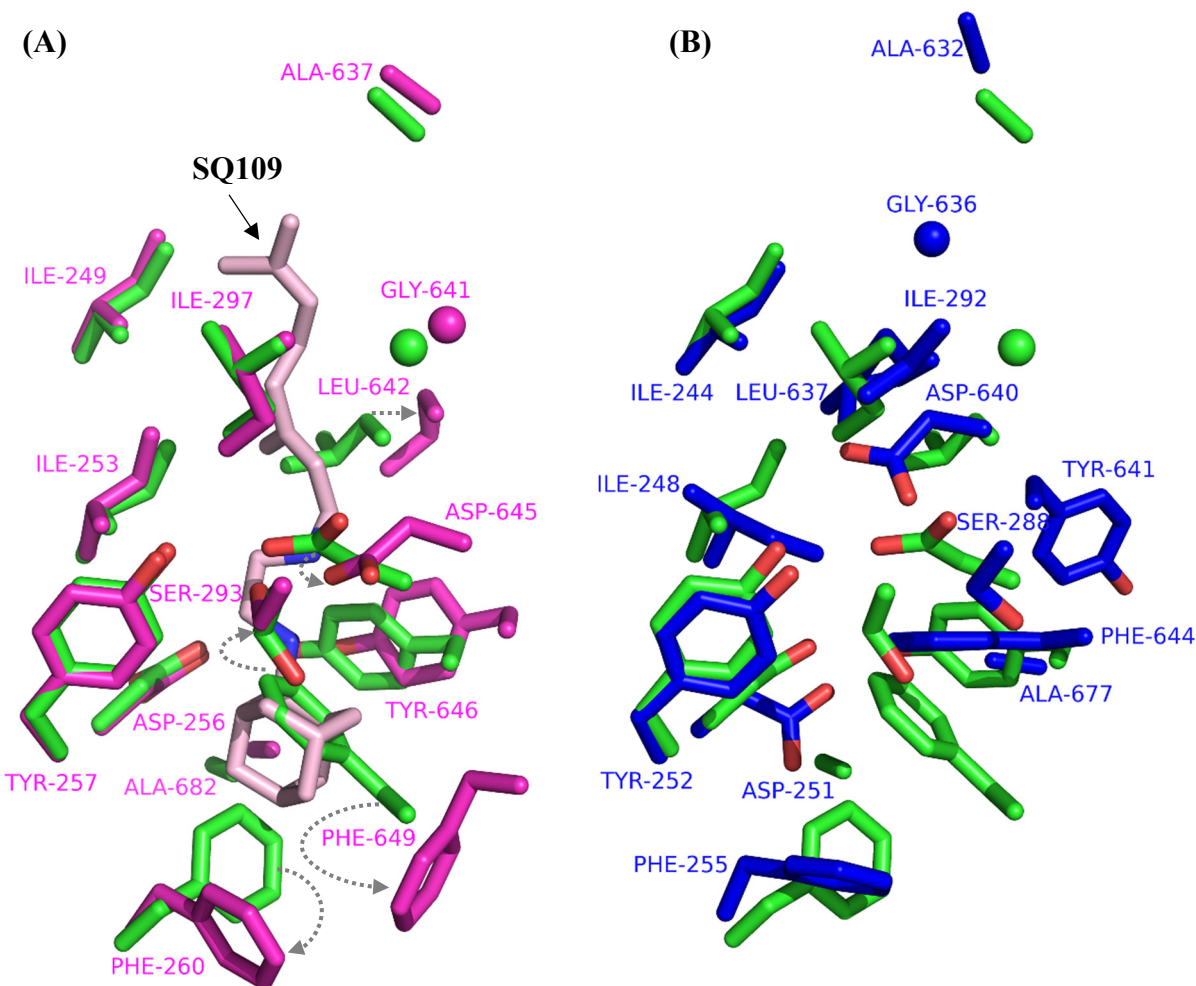
(A) Structure du modèle *I-TASSER* de MmpL3 de *M. tuberculosis*. (B) Alignement de la structure du modèle *I-TASSER* de MmpL3 de *M. tuberculosis* (en bleu) avec la structure cristallographique de MmpL3 de *M. smegmatis* (PDB 6AJF) (en vert). Le *RMSD* est égal à 3.976 (259 atomes alignés). Le logiciel *PyMOL* a été utilisé pour la superposition des structures des deux transporteurs et leur visualisation en 3D (vue de dessus du côté périplasmique). Les douze domaines transmembranaires sont numérotés de I à XII. Les paires D-Y impliquées dans la translocation des protons sont présentées en bleu et en vert pour les MmpL3 de *M. tuberculosis* et de *M. smegmatis* respectivement.

5.1.3. Inhibition du transporteur d'acide mycolique MmpL3

Nous avons souligné dans le présent travail l'intérêt du ciblage de MmpL3 et la portée de son potentiel thérapeutique dans le domaine médical. Étant donné la conservation de ce transporteur chez toutes les mycobactéries tuberculeuses et non-tuberculeuses (186) (201), l'autre objectif de mes travaux de thèse était d'étudier la possibilité d'élargir le potentiel thérapeutique de MmpL3 pour les MNTs. Les complexes *Mycobacterium avium* (MAC) et *Mycobacterium abscessus* (MABSC) ont été particulièrement ciblés au vu de leur pathogénicité et de leur taux d'incidence croissant à l'échelle mondiale (491) (492). En résumé, nous avons souligné dans notre troisième chapitre, que plusieurs des chémotypes criblés ciblent directement MmpL3 et affectent la croissance de mycobactéries non-tuberculeuses. Ceci concorde avec les conclusions de l'étude du groupe de Poce publiée en 2016 (422).

Notre conclusion pour le ciblage direct du transporteur MmpL3 des mycobactéries tuberculeuses et non-tuberculeuses par une variété d'inhibiteurs a été également consolidée par d'autres études qui ont démontré que des mutations relatives à la résistance se situent dans le gène *mmpL3* (185, 187, 349, 390, 393-395, 427, 431, 490, 493-495) et le développement récent d'essais permettant de directement mesurer l'interaction d'inhibiteurs avec la protéine MmpL3 purifiée (496). Cependant, le mécanisme d'action moléculaire des différents inhibiteurs ciblant MmpL3 n'est pas encore complètement élucidé. Ce n'est qu'à la suite de la révélation de la structure de MmpL3 de *M. smegmatis* en présence de quatre inhibiteurs que des hypothèses solides quant à leur mode d'action ont pu être proposées. Zhang et ses coauteurs (326) ont réussi à générer la structure de MmpL3 en complexe avec le SQ109, l'AU1235, l'ICA38 et le médicament rimonabant (PDB 6AJG, 6AJH, 6AJJ, 6AJI respectivement). Ils ont conclu pour un même mode d'action pour ces inhibiteurs à l'exception du rimonabant qui diffère par sa structure chimique. Toutefois, tous les inhibiteurs ciblent le même site de liaison en occupant le canal du flux des protons. Ceci a confirmé notre hypothèse de l'inhibition du transporteur MmpL3 par abolition de la translocation des protons au niveau du canal transmembranaire. En effet, nous rappelons que pour valider nos modèles par homologie, nous avons cartographié les résidus essentiels dont la mutation a généré une résistance aux antibiotiques chez le transporteur MmpL3 mycobactérien. Ces derniers ont été localisés dans la cavité centrale des domaines transmembranaires où l'on soupçonne l'activation d'une force proton-motrice (chapitres 2 et 3).

Pour une meilleure perception visuelle, nous illustrons dans la figure (5-3A) la répartition spatiale des principaux résidus de MmpL3 de *M. smegmatis* en interaction avec le SQ109 (PDB 6AJG). Le choix de l'exemple du SQ109 fut basé sur la mise en évidence de son ciblage de MmpL3 (187) mais aussi sur sa pertinence comme futur candidat anti-TB (phase clinique 2b-3) (497).



Comme l'illustre la figure (5-3A), l'alignement des structures cristallographiques de MmpL3 de *M. smegmatis* en absence et en présence de l'inhibiteur SQ109 (PDB 6AJF et PDB 6AJG respectivement) montre que les résidus (Ile249, 253, 297, Ser293, Tyr257 et Asp256) adoptent la même localisation du côté N-terminal. Cependant, les résidus (Ala637, Gly641, Leu642, Asp645, Tyr646, Phe260, 649 et Ala682) du côté C-terminal ont subi de dramatiques changements conformationnels. En effet, l'incorporation de la structure de l'inhibiteur dans la cavité centrale transmembranaire exige l'adaptation de sa forme à ce site de liaison.

En superposant la structure cristallographique de MmpL3 de *M. smegmatis* natif sur la structure de notre modèle *I-TASSER* (figure 5-3B), nous avons noté que les résidus (Ile244, 248, 292, Asp251 et Tyr252) du côté N-terminal de ce dernier occupent la même position. Cependant, les résidus (Ser288, Gly636, Ala632, 677, Asp640, Leu637, Tyr641 et Phe255/644) cartographiés du côté C-terminal ne présentent pas exactement la même correspondance: ceci concorde avec l'idée d'un changement conformationnel probable des hélices transmembranaires C-terminales et d'une réorientation de ces derniers durant l'interaction avec l'inhibiteur, validant davantage notre modélisation *I-TASSER*.

Partant de la similitude topologique validée par cette analyse comparative, nous proposons un mécanisme de liaison du complexe MmpL3 de *M. tuberculosis*-SQ109 analogue à celui de MmpL3 de *M. smegmatis*-SQ109. De ce fait, nous suggérons le mouvement de la Leu637 du centre de la région transmembranaire pour adapter le groupe méthyle du SQ109. L'Asp640 à son tour se réoriente pour interagir avec le groupement amine de l'inhibiteur. La Ser288 forme un pont hydrogène avec l'Asp640 et la Tyr252 après rotation de son groupement hydroxyle. Nous rappelons que les résidus Asp640-Tyr252 font partie des deux paires Asp-Tyr impliquées dans la translocation des protons, ce qui souligne l'impact de cette liaison hydrogène sur la perturbation du flux des protons. Rajoutons à cela le changement conformationnel que vont subir les hélices alpha du côté C-terminal incluant l'hélice TMX. En effet, le mouvement de cette dernière induit la rupture de la liaison hydrogène entre les résidus Asp251-Tyr641 représentant la deuxième paire de translocation des protons. Pour finir, les deux résidus Phe255/644 subissent une rotation drastique et s'arrangent en conformation en «V» afin de maintenir le groupement adamantane du SQ109. Il est à noter que nos travaux ont déjà mis en évidence la pertinence de ces résidus pour l'activité de transport de MmpL3 (chapitre 2).

Pour conclure, l'inhibition de l'export du *TMM* par MmpL3 se fait *via* le blocage de la force proton-motrice. Ainsi, l'inhibiteur occupe le canal transmembranaire ce qui induit la perturbation des deux paires Asp-Tyr et le blocage du flux des protons. La combinaison des résultats des analyses structurales complétés par ceux de l'alignement des séquences d'acides aminés (*Blast*) des orthologues MmpL3 (chapitre 2) et (326), conclut sur la conservation des résidus conférant la résistance chez tous les MmpL3 du *Mycobacterium* et du *Corynebacterium*. Par conséquent, nous proposons un mécanisme d'action de MmpL3 de *C. glutamicum* (CmpL1) analogue à celui décrit ci-dessus, et qui impliquera les résidus Leu597, Asp600, Ser290, Asp600-Tyr254, Asp253-Tyr601 et Phe257/604 selon l'ordre d'apparition dans le texte.

Comme futures perspectives, nous formulons l'hypothèse d'un mode de liaison des inhibiteurs similaire chez tous les autres MmpL3 du groupe *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* (*CMN*): une opportunité à exploiter pour élargir le potentiel thérapeutique de MmpL3 pour leurs pathogènes *MDR*. En effet, l'ensemble de ces constatations ouvre la voie vers la compréhension du mode d'action du médicament sur le transporteur MmpL3 de point de vue moléculaire et structural. Des essais biochimiques visant à démontrer *in vitro* le blocage du flux de protons à travers la protéine MmpL3 par les inhibiteurs susmentionnés et d'autres en cours de développement pour le traitement des mycobactérioses sont en cours dans le laboratoire du Prof. Zgurskaya suivant des protocoles établis pour les *RNDs* à Gram-négatif (265) (498). L'optimisation de la conception de nouveaux inhibiteurs plus actifs sera envisageable par cette voie. Finalement, l'ensemble des futurs candidats de médicaments découverts (annexe 4) semble être prometteur pour la révolution des thérapies anti-mycobactérioses.

5.1.4. Proposition d'un mode de transport de l'acide mycolique par MmpL3 de *M. tuberculosis*

Partant de l'ensemble de nos résultats et de ce qui a été révélé dans la littérature concernant les *MmpLs*, nous hypothétisons un modèle de transport pour le transporteur *RND* MmpL3 illustré par la figure 5-4. Plusieurs scénarios peuvent être proposés pour le transport du *TMM* à travers la membrane cytoplasmique.

Pour commencer, il est clair que la fonction de transport de MmpL3 dépendra d'une force proton-motrice comme discuté précédemment et spéculé dans la littérature (348, 351) (326). Mais le rôle direct des résidus impliqués reste à être prouvé expérimentalement. Ainsi, la possibilité d'un mécanisme d'export du *TMM* par un mécanisme de rotation fonctionnelle (conformations *tight*, *loose* et *extrusion*: A, B et C de la figure 5-4) respectivement demeure hypothétique.

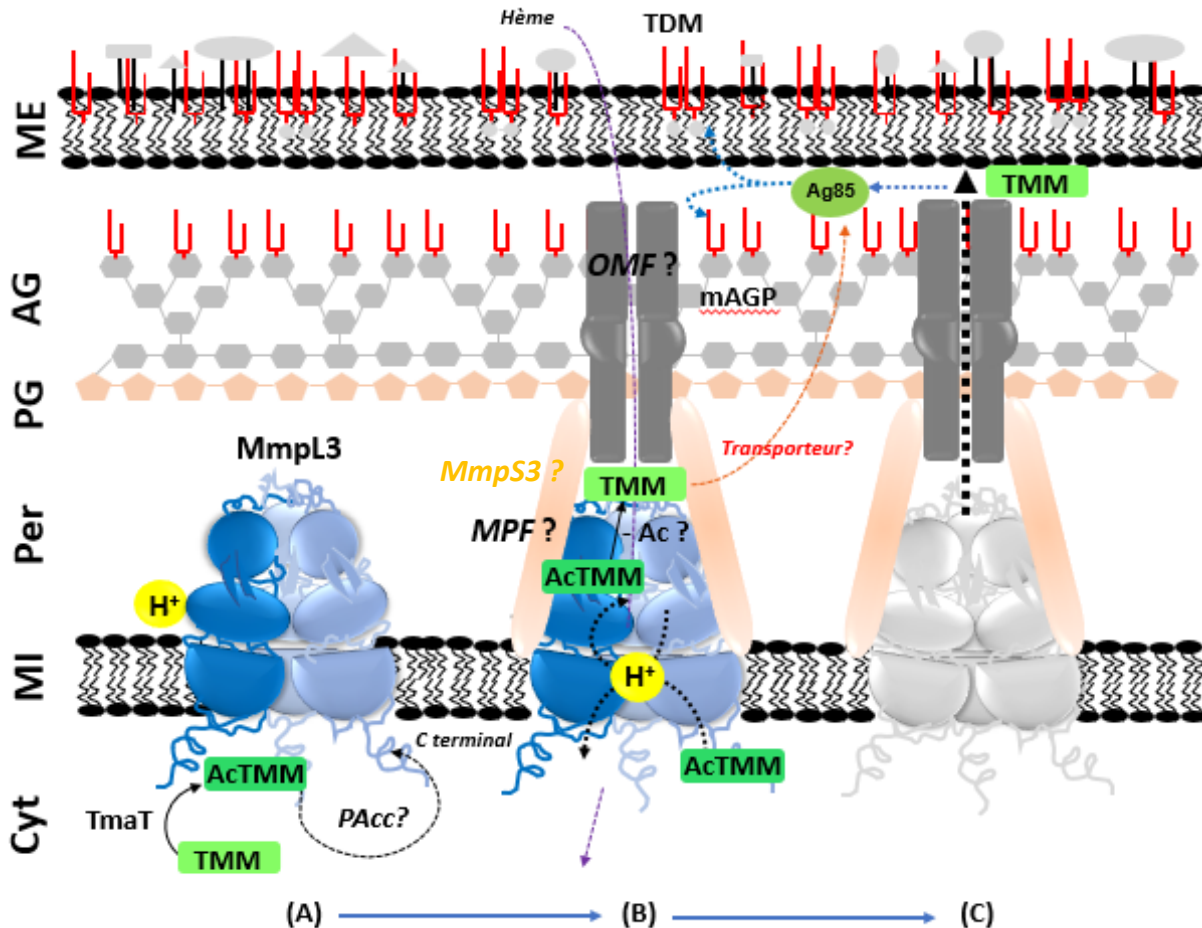


Figure 5-4. Modèle proposé pour le mode de transport du *TMM* par MmpL3 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Abréviations : Cyt : Cytoplasme; MI : Membrane Interne; Per : Périplasm; PG : Peptidoglycane; AG : Arabinogalactane; ME : Membrane Externe; TMM : Tréhalose de monomycolate; TDM : Tréhalose de dimycolate; AcTMM : TMM après acétylation; PAcc : Protéine Accessoire; MPF : Membrane Protein Fusion; OMF : Outer Membrane Factor; mAGP : les mycolates liés à l'arabinogalactane; Ac : le groupe fonctionnel acétyle et Ag85 : le complexe antigène85. Ce modèle a été proposé à l'instar des transporteurs RND à Gram négatif avec certaines modifications relatives aux données disponibles concernant les MmpLs.

Le *TMM* est synthétisé au niveau du cytoplasme. Après sa translocation à travers la membrane plasmique faisant participer MmpL3 et peut-être d'autres protéines facilitatrices à ce jour inconnues, le *TMM* est pris en charge au niveau de la membrane externe par le complexe Antigène85ABC pour le transfert de la chaîne mycolique soit à une autre molécule de *TMM* pour former le *TDM*, soit pour la mycolylation de l'arabinogalactane (192, 499). Toutefois, le mécanisme de véhiculation du *TMM* tout au long de l'espace périplasmique avant qu'il ne puisse atteindre l'antigène85 ou une probable *OMF* demeure totalement inconnu.

Il a déjà été suggéré que les transporteurs *MmpL* fonctionnent avec des protéines accessoires *MmpS* (*Mycobacterial membrane protein Small*). Ce rôle de protéines accessoires des *MmpLs* a été renforcé par leur localisation dans le même opéron putatif que les gènes *mmpL* (à l'exception de *MmpS3*) (325). Ceci laisse présumer que la fonction de protéine accessoire ne serait pas une caractéristique ubiquitaire des *MmpS*. Toutefois, *MmpS3* présente, à l'instar de toutes les protéines *MmpS*, des extrémités N- et C-terminales périplasmiques (325), ce qui laisse soupçonner une probable analogie de fonction avec les *MPFs* des complexes présents chez les Gram négatifs. Il n'est donc pas exclu que *MmpS3* prenne le relais pour le transport du *TMM* jusqu'à l'*OMF* ou directement jusqu'au complexe Ag85ABC, une fois libéré par *MmpL3* dans l'espace périplasmique.

En décortiquant l'arrangement spatial de la membrane mycobactérienne, il nous paraît évident que *MmpL3* nécessite un second partenaire pour l'acheminement du *TMM* tout le long de l'espace périplasmique vers la membrane externe. Partant de nos modélisations structurales *I-TASSER* nous avons estimé que *MmpL3* possède un diamètre total de 100 Å, c'est-à-dire une dimension similaire à celle déduite pour son orthologue *CmpL1* chez *C. glutamicum* par microscopie électronique à faible résolution. Nous avons également estimé l'épaisseur des domaines transmembranaires, périplasmiques et cytoplasmiques de *MmpL3* de *M. tuberculosis* à 33, 35 et 25 Å, respectivement. Nos estimations concordent bien avec la dimension totale (93 x 55 x 25 Å) illustrée par la structure cristallographique de l'orthologue *MmpL3* de *M. smegmatis* (PDB 6AJF) (326) (annexe 5).

Néanmoins, au vu de ces dimensions, MmpL3 ne pourrait couvrir tout l'espace périplasmique puisque l'épaisseur de ce dernier varie entre 140Å (chez *M. bovis*) et 160 Å (chez *M. smegmatis*) (133, 500). Ceci introduit la possibilité d'intervention d'une *MPF* et/ou d'une *OMF*, sur le modèle des transporteurs *RND* à Gram négatif. Toutefois, la faible homologie de séquence de MmpL3 avec ces derniers laisse penser que le mode de transport du *TMM* pourrait diverger.

Les avis divergent concernant le rôle fonctionnel du domaine C-terminal cytoplasmique de MmpL3. Il a été évoqué, dans la littérature, que MmpL3 de *M. tuberculosis* se distingue des autres *MmpLs* (à l'exception de MmpL11) par un domaine extracytoplasmique C-terminal additionnel (324). Nous avons démontré que la délétion de la région C-terminale n'affecte pas le transport du *TMM* chez MmpL3 ni la croissance et la division de l'hôte *M. smegmatis* (348). De plus, l'absence de ce domaine chez les autres *MmpLs* et particulièrement chez MmpL3 de *Corynebacterium* impliqué dans le même type de transport d'acide mycolique (ex : CmpL1 de *C. glutamicum*) exclut cette hypothèse davantage. Des études non publiées du laboratoire du Prof. Jackson montrent qu'il est impliqué dans l'oligomérisation de MmpL3 comme mentionné précédemment et l'interaction avec d'autres protéines partenaires dont peut-être des protéines accessoires durant l'exportation du *TMM* (325). En accord avec un rôle de ce domaine dans les interactions protéine-protéine, une étude microscopique à fluorescence réalisée par Carel et ses collaborateurs (2014) (350), a mis en évidence l'indispensabilité de l'extrémité C-terminale (fusionnée à une protéine GFP) pour la localisation polaire de MmpL3 de *M. smegmatis*.

Enfin, la validation du rôle du domaine C-terminal nécessitera la continuité et l'approfondissement d'essais fonctionnels pour MmpL3. Nos travaux collaboratifs publiés en 2016 ont pu démontrer le caractère indispensable de l'acétylation du *TMM* en *AcTMM* par la protéine intégrale *TmaT* (Rv0228) pour son export par MmpL3 chez *M. smegmatis* (348), une conclusion validée par l'équipe de Yamaro-Botte en 2015 pour le transport du *TMCM* chez *C. glutamicum* (191) (précédemment décrit dans la section 1.4.5, figure 1-18). Cependant, la désacétylation de l'*AcTMM* au niveau de l'espace périplasmique demeure mystérieuse.

Pour finir, concernant le mécanisme moléculaire de translocation de l'*AcTMM* à travers la membrane plasmique par MmpL3, un simple phénomène de basculement (*flipping*) a été avancé (186, 326). Nos études ont aussi démontré que le transporteur présente des crevasses à l'interface de ses sous-unités, possiblement impliquées dans la translocation du glycolipide (chapitre 2). La même éventualité a été récemment proposée par l'équipe de Zhang (326). Ces auteurs ont mis en évidence la présence d'un tunnel (G_T : *top gate*) formé par les deux boucles *PN/PC* (les sous-domaines N- et C-terminaux respectivement) et de deux crevasses G_F/G_B (*front/back gate* respectivement) au niveau du domaine périplasmique (annexe 5-A). La présence de résidus hydrophiles sélectifs au niveau de l'accès de ces trois fentes renforçant ainsi l'idée de leur implication dans l'entrée (G_F/G_B) et la sortie (G_T) du substrat est un autre aspect intéressant de cette hypothèse. Cette dernière a été consolidée par la présence de deux molécules **6-*n*-dodecyl- α , α -trehalose (6-*DDTre*)**, un détergent mimant bien le *TMM* de point de vue structure chimique, au niveau de la cavité connectant les trois accès (annexe 5-B).

En conclusion, nos efforts afin de rendre les deux protéines CmpL1 de *C. glutamicum* et MmpL3 de *M. tuberculosis* exploitables pour des analyses biochimiques et structurales nous a permis d'être les premiers à dévoiler un aperçu de la topologie et le mécanisme de transport des protéines *MmpL* (chapitre 2). Nous avons ainsi eu l'opportunité de publier notre nouvelle approche d'analyse structurale basée sur un affinement d'un modèle homologue généré par la plateforme *I-TASSER* (7) contre sa carte de densité électronique au moyen du logiciel *Phenix* (380). Cet exploit a ouvert la voie à de nouvelles perspectives de caractérisation structurale du transporteur *MmpL* à plus hautes résolutions. Citons par exemple la résolution des deux structures cristallographiques de MmpL3 *M. smegmatis* [(326) et (Su et Yu, 2019, à publier)]. Notre troisième chapitre a permis également de mettre en avant le potentiel thérapeutique des inhibiteurs antituberculeux ciblant MmpL3 et d'autres inhibiteurs encore négligés dont l'exploitation serait très prometteuse dans la lutte contre la multirésistance (chapitre 3).

Pour donner suite à l'ensemble de ces avancements, nous envisageons la poursuite de nos essais de microscopie électronique *Cryo-EM* pour les transporteurs mentionnés ci-haut en absence et en présence d'inhibiteurs. En effet, la structure moléculaire de ces protéines visée par notre projet demeure non résolue, et la visualisation des deux transporteurs en présence d'un inhibiteur de MmpL3 marqué par des atomes en or serait facilitée en microscopie électronique par coloration négative ou par *Cryo-EM* et permettrait sa localisation dans le site de liaison du transporteur (501).

D'autres perspectives peuvent émerger pour l'analyse du mode de liaison du transporteur MmpL3 avec une variété d'inhibiteurs. Citons l'exemple des essais de *Microscale thermophoresis (MST)* (502) (503) qui nous permettraient d'analyser les interactions physiques entre les inhibiteurs générés (chémotypes cités dans le chapitre 3) et des analogues de substrats de MmpL3 *M. tuberculosis*. Le principe consiste en une détection de changement de fluorescence dans leur microenvironnement chimique en solution.

Dans ce même contexte d'étude des interactions MmpL3-inhibiteur, d'autres alternatives récemment publiées par nos collaborateurs s'offrent, à savoir: les expériences de *biolayer interferometry (BLI)*, de *Surface Plasmon Resonance (SPR)* et des compétitions *in vitro* et *in situ* avec des sondes fluorescentes (504) (505) (496). Il s'agit d'essais réalisables en haut-débit *in vitro* ou sur des bactéries entières et donc propices au criblage et à l'optimisation rationnelle d'inhibiteurs. Ils permettraient de plus de mettre en évidence le ciblage direct de MmpL3 par un futur candidat thérapeutique et de fournir les informations sur son affinité et la cinétique de son interaction. Finalement, des expériences de simulation d'amarrage pourraient d'autre part être envisagées pour l'étude de la faisabilité et la dynamique de la liaison d'un nouveau chémotype avec d'autres transporteurs *MmpL* impliqués dans la virulence des mycobactéries.

5.2. Structure-Fonction du TriABC

Dans la troisième partie du présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la pompe à efflux TriABC exprimée chez *Pseudomonas aeruginosa*. Cette pompe qui confère à la bactérie une résistance à des biocides demeure énigmatique de point de vue structure et mode de fonctionnement. Nous avons défini comme premier objectif la résolution de la structure tridimensionnelle du complexe tripartite TriABC dans le but de déchiffrer le mode d'assemblage de ses éléments. Pour ce faire, nous avons accompli des essais d'analyse du complexe TriABC par microscopie électronique à coloration négative et cryogène (*Cryo-EM*). Nous rappelons que des essais de *cross-linking* des deux protéines TriA et TriB confirmant la stabilité du complexe TriABC avant son analyse par *Cryo-EM* ont été réalisés.

La collaboration avec un laboratoire spécialisé dans le domaine pour les expériences de microscopie électronique a généré une carte de densité électronique du transporteur transmembranaire TriC en interaction avec TriAB, à une résolution de 4.3 Å (symétrie C3). La combinaison des analyses par microscopie électronique à coloration négative et *Cryo-EM* (TriC et TriABC) et du calcul *Maximum-likelihood three-dimensional classification (ML3D)* nous a permis de nous représenter le dynamisme et la flexibilité du TriC en solution. Pour compléter ces résultats, nous avons contribué à l'élaboration d'un modèle homologue *I-TASSER* (7) pour TriABC et son affinement dans l'espace contre sa carte de densité électronique *Cryo-EM* en utilisant les programmes *Phenix* (380) et *Coot* (381). L'architecture moléculaire de la partie active TriC générée (une longueur de 120 Å et une largeur de 95 Å) a confirmé son assemblage en homotrimère à l'image d'une pompe de type *RND* à Gram négatif (313). L'analyse poussée du complexe démontre la présence d'une région de densité électronique résiduelle non attribuable au TriC. À la suite de l'analyse de cette densité résiduelle par des outils de modélisation *Cryo-EM* à faible résolution, disponibles dans *Phenix* (380), nous l'avons attribuée à l'extrémité N-terminale de TriA (résidus 32-47). Cependant, nous n'avons pas pu conclure sur TriB et nous avons attribué les difficultés rencontrées dans son analyse par sa flexibilité et son désordre.

Dans ce contexte d'analyse du TriABC, nous avons réalisé une étude comparative entre TriABC-OpmH et son homologue AcrAB-TolC, bien caractérisé chez *E. coli*. Nous avons ainsi mis en évidence plusieurs similitudes mais aussi quelques différences mineures (chapitre 4). Nous avons présumé que la particularité d'avoir deux *MPFs* au lieu d'une (289, 306) pourrait être à l'origine d'une divergence structurale et fonctionnelle de la pompe TriC. Par conséquent, nous avons opté pour la mutation des résidus adjacents aux sites de liaison des substrats de la pompe TriC afin d'analyser son impact sur la résistance au triclosan et SDS ainsi que sur l'habilité à expulser le substrat *Nile Red*. Les résultats nous ont permis de constater l'effet de plusieurs de ces mutations sur la spécificité du substrat et l'activité de TriC. De ce fait, nous avons conclu que la différence dans la nature chimique des substrats de TriC pourrait engendrer une variation dans la dynamique d'interaction des éléments de la pompe à efflux TriABC.

Afin de contourner ces limitations liées à la flexibilité et la dynamique du complexe TriABC, nous prévoyons comme alternative, l'analyse du complexe par la technique de spectroscopie RMN. Cette dernière offre la possibilité de caractériser la dynamique des protéines en solution (506). Ainsi, nous serions en mesure de décrypter la dynamique d'assemblage des différents éléments formant le complexe tripartite TriABC-OpmH et de la quantifier.

Enfin, l'analyse structurale comparative de notre modèle TriAxBC avec la structure de son homologue AcrB d'*E. coli* ainsi que l'étude fonctionnelle de son activité d'efflux a soutenu le même mode de fonction pour l'export des substrats par force proton-motrice, partagé par les *RNDs*. La résolution de la structure du TriAxBC nous a également permis de mettre en évidence la présence d'un pore et de deux sites de liaison pour les substrats SDS/Triclosan. Ceci concorde avec la littérature (289, 449) qui mentionne que le complexe TriABC-OpmH partage l'activité de transport des mêmes substrats SDS et triclosan avec ses homologues AcrAB-TolC d'*E. coli* et MexAB-OprM de *P. aeruginosa*.

Dans le cadre de notre deuxième volet d'analyse de la structure-fonction du TriAxBC, nous avons pu combiner les résultats des analyses mutationnelles avec l'interprétation de la présence de réseaux en tunnels déconnectés au sein de sa structure. La discontinuité des tunnels nous a mené à en déduire la présence du complexe TriAxBC sous sa forme libre du OpmH, non fonctionnelle: un état intermédiaire précédant l'assemblage complet de la pompe à efflux TriABC-OpmH. Pour mieux saisir le concept des tunnels, nous illustrons dans la figure 5-5 un aperçu visuel comparatif entre l'état des tunnels non connectés correspondant à nos résultats pour TriAxBC (figure 5-5A) et d'autres en continu dans la structure d'AcrB analysés par le groupe de Sennhauser (188) (figures 5-5B).

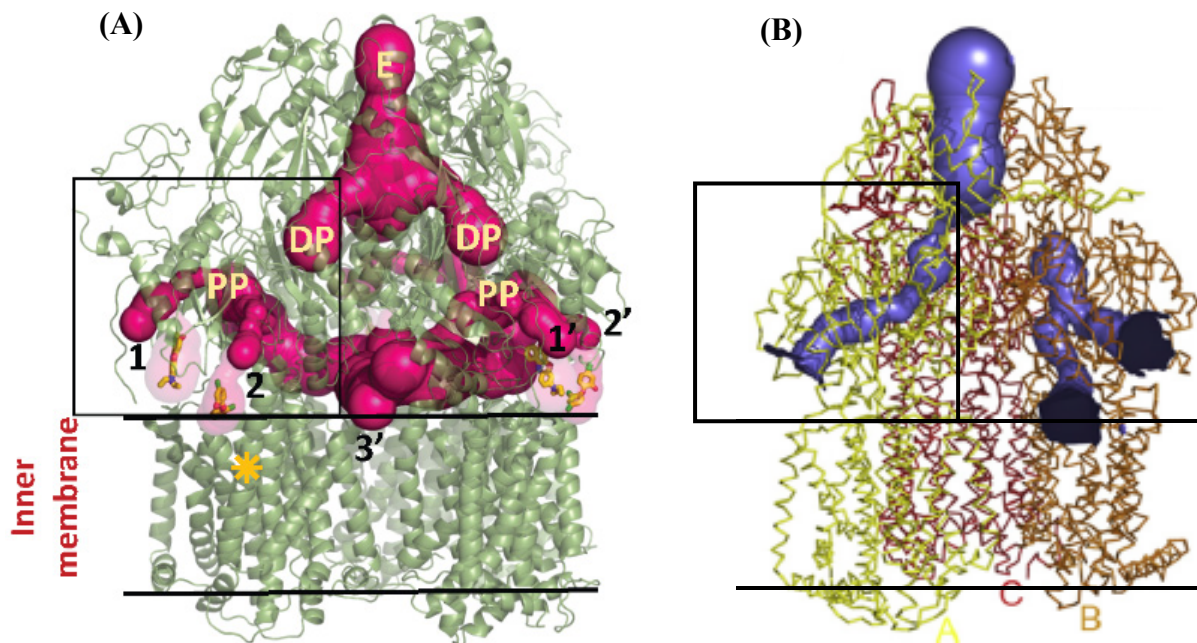


Figure 5-5. Détection des canaux chez TriAxBC de *P. aeruginosa* et AcrB d'*E. coli*.

Abréviations: DP: Distal Pocket; PP: Proximal Pocket et E: Funnel-like Exit.

(A) Nos résultats d'analyse des canaux (tunnels 1, 2 et 3) chez TriC de *P. aeruginosa*, colorés en rose fushia. (B) Détection des canaux chez AcrB (PDB 2J8S) d'*E. coli*, colorés en bleu. A, B et C sont les différents monomères d'AcrB distingués par coloration. L'image (B) a été adaptée de (Sennhauser et al., 2009) (188).

En se basant sur l'ensemble de ces données, nous avons conclu que l'engagement du canal externe OmpH (*OMF*) induit des changements conformationnels au niveau de la partie fonctionnelle TriC, ce qui provoque une liaison entre les tunnels et lui permet de contribuer à l'expulsion du substrat. Afin de caractériser le rôle d'OmpH dans la transmission du signal menant au changement conformationnel du TriABC pour l'ouverture du canal expulsant le substrat, nous envisageons comme objectif d'appliquer la stratégie décrite par Du et ses coauteurs (277) à notre complexe TriABC-OmpH. Ces auteurs ont opté pour un même plasmide pour la co-expression des différentes protéines de fusion AcrA, AcrB et AcrZ avec le canal externe TolC. Ceci a permis la purification d'un complexe AcrAB-AcrZ-TolC plus stable et la résolution de sa structure par *Cryo-EM*.

En résumé, nous sommes parvenus à résoudre la première architecture moléculaire du complexe tripartite *RND* «TriABC» non encore résolue à ce jour, ce qui souligne l'exclusivité de nos résultats. Nous avons également pu mettre en évidence la présence d'un trimère de dimères TriAB: un assemblage concordant avec les résultats d'études réalisées *in vivo* (507) et *in vitro* (290). Ceci nous a permis d'accomplir notre objectif de définir le mode d'assemblage des protéines de fusion TriAB et de démontrer leur rôle dans la stabilisation de la structure du TriC, flexible à l'état libre. Nous avons également traduit la structure du complexe trimérique TriABC en termes de mode fonctionnel dans le cadre de l'expulsion de ses substrats à l'extérieur de la cellule et lui ont proposé un mode d'assemblage.

Pour la suite du présent projet, nous considérons que l'analyse *Cryo-EM* à haute résolution de la structure du TriABC en complexe avec les substrats SDS/Triclosan serait d'une grande utilité pour lever l'ambiguïté sur leur mode d'interaction à l'échelle moléculaire. Ces résultats seraient utiles pour la conception de nouveaux inhibiteurs. Dans cette optique et surtout dans le but de contribuer à la génération de nouveaux médicaments atténuant la résistance de *P. aeruginosa*, des essais *Cryo-EM* sont planifiés pour le TriABC en présence d'inhibiteurs. L'étude de ces interactions peut être aussi complétée par des analyses de l'affinité de liaison *via* la technique de *Microscale thermophoresis* (502) (503) (décrite dans la section 5.1.4). Finalement, la même approche d'exploration des tunnels pour le TriABC en complexe avec son substrat et/ou son inhibiteur peut être envisagée pour examiner l'effet de cette association sur l'aspect du réseau (continuité et discontinuité des tunnels).

5.3. La prédiction de la topologie du transporteur par *I-TASSER*

5.3.1. La modélisation par homologie: Utilité de la prédiction par *I-TASSER*

Actuellement, plusieurs outils bio-informatiques sont disponibles pour prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine par homologie. Il existe trois différentes catégories de prédiction par homologie, à savoir: la modélisation comparative, l'enfilage (ou *threading*) et les prédictions *ab initio*. Au cours de ce projet de thèse, les protéines étudiées étaient énigmatiques et leurs structures inconnues. Il n'y avait que peu d'information sur les structures de protéines homologues résolues expérimentalement dans la banque PDB. Il nous fallait ainsi une méthode de modélisation qui nous permettrait de construire un modèle complet en se basant sur des structures homologues de faible similitude résolues et de prédire par simulation les repliements pour les régions à séquences non-alignées. Pour ce faire, nous avons opté pour le logiciel *I-TASSER* (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) (7) pour la prédiction de la topologie des trois transporteurs transmembranaires CmpL1 de *C. glutamicum*, MmpL3 de *M. tuberculosis* et TriAxBC de *P. aeruginosa*. Le choix de cette méthode de modélisation s'est basé sur plusieurs critères.

D'une part, comme déjà mentionné dans la section 1.7 de cette thèse, *I-TASSER* est toujours classé parmi les deux meilleurs serveurs de prédiction par la communauté *CASP* (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*) (508). Cet outil présente aussi l'avantage de prédire à la fois la structure et la fonction d'une protéine à partir de sa séquence d'acides aminés. Il permet de générer les meilleurs modèles possibles en associant les segments homologues identifiés par alignement structurel avec ceux construits par modélisation *ab initio* pour les régions sans correspondance. En effet, *I-TASSER* se base sur un enfilage de la séquence d'acides aminés de la protéine à modéliser le long de tous les repliements de structures connues et déposées dans la banque PDB. Le but de cette démarche est d'identifier le meilleur alignement séquence-structure et de déduire ainsi les fragments homologues. *I-TASSER* est ainsi recommandé pour sa précision dans la sélection de la meilleure conformation adoptée par la protéine en se basant sur plusieurs fragments homologues. Rappelons également que la structure de la protéine est plus conservée que sa séquence d'acides aminés, ce qui souligne l'avantage des méthodes d'alignement structure-séquence ou d'enfilage comme celle employée par *I-TASSER*.

5.3.2. Évaluation de la prédiction par *I-TASSER* : performances et limites

Il résulte de la prédiction par *I-TASSER* plusieurs choix de modèles (1 à 5 modèles); il est ensuite possible d'opter pour la meilleure topologie et d'évaluer la qualité de la prédiction. Ainsi, le modèle proposé est classé selon la valeur de son score de similitude avec la structure homologue : le « *TM-score* » (*Transmembrane-score*). Le modèle que nous avons sélectionné pour nos trois différents transporteurs caractérisés correspondait à celui qui présentait le « *TM-score* » le plus élevé. Il faut préciser que ce score doit être supérieur à 0.5 pour qu'on estime qu'il s'agit d'un degré de similarité crédible entre la structure du modèle prédit et celle de l'homologue. Les *TM-scores* de nos modèles sélectionnés étaient supérieurs à 0.5, 0.8 et 0.9 pour CmpL1 de *C. glutamicum* (chapitre 2, tableau S2-1), MmpL3 de *M. tuberculosis* (chapitre 3) et TriAxBC de *P. aeruginosa* (chapitre 4, tableau S4-3) respectivement. Mise à part ces scores, la qualité de la prédiction de nos modèles a été validée davantage grâce à leurs valeurs de *RMSD* inférieures à 2 Å. L'ensemble de ces paramètres a été calculé par le programme d'alignement structurel « *TM-align* » (376). Nous avons également estimé la qualité de la prédiction *I-TASSER* grâce à un autre critère: le *C-score* (*Confidence score*). Le *C-score* d'un modèle doit être au-dessus de (-1.5) pour que le repliement soit considéré correct, ce qui était le cas pour tous les modèles choisis.

La validation de la prédiction des topologies des transporteurs CmpL1, MmpL3 et TriAxBC a été amplement discutée dans le présent chapitre de discussion, et ce dans les sections 5.1 et 5.2, respectivement. En résumé, les topologies prédites concordaient bien avec nos résultats expérimentaux. De plus, nous avons entrepris une analyse structurale comparative pour le transporteur MmpL3 de *M. tuberculosis* avec la structure cristallographique de son orthologue MmpL3 de *M. smegmatis* récemment publiée. Nous avons ainsi pu conclure que la méthode *I-TASSER* était acceptable pour la prédiction d'une structure tridimensionnelle du transporteur semblable à celle résolue expérimentalement.

Cependant, nous précisons que l'efficacité de notre modélisation par *I-TASSER* a été limitée par certaines contraintes. Citons par exemple le domaine C-terminal qui n'a pas pu être modélisé, ainsi que certaines régions du domaine périplasmique de MmpL3 de *M. tuberculosis* (voir les sections 5.1.1 et 5.1.2). Ceci peut être dû à la difficulté et au manque de précision de la simulation *ab initio* pour des régions de séquences d'acides aminés non-alignées avec les repliements connus et/ou pour des zones flexibles. À titre d'exemple, rappelons que l'extrémité C-terminale de MmpL3 est une région peu conservée chez les *MmpLs* et prédite désordonnée. En effet, le faible pourcentage de similarité, l'absence d'homologie et le désordre d'une région sont des paramètres qui affectent l'exactitude de la prédiction bioinformatique.

Partant des faits susdits, la modeste qualité de la géométrie et de la répartition des résidus des structures tridimensionnelles de CmpL1 (chapitre 2, tableau 2) et de TriAxBC (chapitre 4, tableau 4), affinées par *Phenix* dans leurs cartes de densité électronique, peut être justifiée. En comparant les statistiques de validation de la structure par analyse *Molprobit* (509, 510) avant et après affinement (tableau 5), nous avons constaté l'impact de la géométrie de la structure de départ (le modèle *I-TASSER*) sur la qualité du modèle final. En effet, les valeurs des « *Ramachandran outliers* », des « *rotamer outliers* » ainsi que celles des « *C beta deviations* » avant affinement de la structure n'étaient pas idéales pour les deux modèles *I-TASSER* de CmpL1 et TriAxBC. Il est évident qu'il s'agit d'un modèle prédit et donc à une précision plus modeste comparée à celle d'une structure tridimensionnelle à haute résolution. Ceci n'exclut pas la contribution de l'étape d'affinement sur la qualité de la géométrie du modèle final (ex. peu ou pas d'optimisation du paramètre « *all atom clashscore* » et des valeurs des « *RMS* »). Toutefois, une nette amélioration globale de ces statistiques après affinement des structures a été observée. Citons comme exemple, la réduction des « *C-beta deviations* » de 274 à 9 et de 172 à une valeur nulle dans le cas de CmpL1 et TriAxBC respectivement. L'ensemble de ces paramètres est résumé dans le tableau 5-1 de cette section.

Tableau 5-1. Validation des structures tridimensionnelles de CmpL1 et TriAxBBC avant et après affinement dans l'espace par *Phenix*.

Les paramètres résumés dans ce tableau ont été calculés par l'outil de validation de la structure « *Molprobit* » (509) (510) disponible dans le programme *Phenix* et sur la page web : <http://molprobit.biochem.duke.edu/>. L'affinement de la structure prédite par *I-TASSER* pour CmpL1 (A) et TriAxBBC (B) dans leur carte de densité électronique à basse et à haute résolution respectivement a été réalisé par *Phenix* (380).

Analyse <i>Molprobit</i> après modélisation par <i>I-TASSER</i>	Analyse <i>Molprobit</i> après affinement par <i>Phenix</i>
(A) Le transporteur transmembranaire CmpL1 de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
<i>Ramachandran outliers</i> (%)	
15.41	1.17
<i>Ramachandran favored</i> (%)	
69.57	74.03
<i>RMS(bonds)</i> (Å)	
0.0168	0.0100
<i>RMS(angles)</i> (°)	
3.09	2.10
<i>All atom clashscore</i>	
0.00	34.4
<i>Rotamer outliers</i> (%)	
16.37	2.58
<i>C-beta deviations</i>	
274	9
(B) Le transporteur transmembranaire TriAxBBC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Ramachandran outliers</i> (%)	
8.27	5.10
<i>Ramachandran favored</i> (%)	
76.25	84.35
<i>RMS(bonds)</i> (Å)	
0.0091	0.01
<i>RMS(angles)</i> (°)	
1.84	1.49
<i>All atom clashscore</i>	
47.87	14.65
<i>Rotamer outliers</i> (%)	
5.19	1.38
<i>C-beta deviations</i>	
172	0

5.3.3. Alternatives et perspectives

Comme alternative de serveur de prédiction, nous avons également testé en parallèle la même prédiction des structures des transporteurs par le logiciel *Phyre2* (511). Les modèles générés par les deux serveurs étaient comparables. Nous avons *in fine* choisi *I-TASSER* car la structure prédite s'adaptait mieux à la carte de densité électronique de CmpL1 et TriAxBC. Certes, *I-TASSER* est réputé pour être un des outils de prédiction de la structure et de la fonction d'une protéine les plus efficaces, mais les résultats restent une prédiction par un algorithme bioinformatique. Ainsi, cet outil est utile mais seulement pour des résultats de prédiction structurale préliminaires, et ce malgré les efforts investis pour son optimisation (512). Toute information expérimentale ou notion sur la fonction de la protéine (ex. contacts entre les résidus, mécanismes de liaison, structure à haute résolution, etc.) sera ainsi utile pour améliorer la précision de la prédiction. En effet, le programme *I-TASSER* offre la possibilité d'inclure des informations supplémentaires pour guider la procédure de prédiction, d'où son utilité.

Étant donné la publication récente de la structure cristallographique de MmpL3 de *M. smegmatis*, nous prévoyons l'utiliser comme référence (*template*) pour la modélisation des autres orthologues de la famille des *MmpLs* par *I-TASSER*. La prédiction n'en sera que plus précise et prometteuse pour de futures études d'amarrage d'inhibiteurs et de simulations pour la poursuite des travaux du troisième chapitre. De ce fait, d'autres alternatives de modélisation exigeant une structure de référence à haute résolution (ou *template-based modelling*) peuvent être envisagées. Citons l'exemple des deux approches de modélisation comparative : *MODELLER* (513) et *SWISS-MODEL* (514). Ces derniers se basent sur un alignement des séquences d'acides aminés de la protéine cible sur la structure homologue résolue expérimentalement, et ce afin de générer un modèle atomique complet.

5.4. Révolution de la *Cryo-EM*

5.4.1. Révolution de la *Cryo-EM*

La caractérisation de la structure moléculaire d'un échantillon biologique par microscopie électronique peut être réalisée selon trois différentes approches, à savoir : la tomographie, l'analyse individuelle des particules et l'analyse de cristaux 2D. La visualisation et la capture d'images des particules analysées par l'ensemble de ces approches se font soit par coloration négative, soit par *Cryo-EM* (*Cryo-Electron Microscopy*) à des conditions cryogéniques. En ce qui concerne la caractérisation structurale de nos transporteurs à haute résolution, nous avons opté pour l'analyse individuelle des particules par *Cryo-EM*, une technique qui a beaucoup évolué ces dernières années. En se référant aux statistiques de la banque des protéines *RCSB PDB* (<http://www.rcsb.org/>) (515, 516), le nombre des structures résolues par microscopie électronique déposées a atteint un total de 3094 en 2019 comparé à 13 en 2000. La révolution de la microscopie électronique est principalement due à la conception des nouveaux dispositifs de détection directe *DDT* (*Direct Detection Devices*) (517). Les *DDTs* assurent la détection directe des électrons par les capteurs ce qui a augmenté la sensibilité de la capture des images par rapport aux caméras *CCD* (*Charge-Coupled Devices*) ou les films photographiques. Nous pouvons également mentionner la contribution de l'optimisation de la performance des logiciels de traitement des images à cette progression. Les transformations apportées aux logiciels de traitement des images comme l'utilisation de la correction *CTF* (*Correction Transfer Function*) ainsi que la mise en place de l'approche du *Maximum Likelihood* (*ML*) du programme d'affinement *RELION* (411, 518) méritent également d'être citées. À la suite de ces avancements, la microscopie électronique cryogène est entrée en compétition avec les autres techniques alternatives à haute résolution qui sont la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie RMN. De nos jours, il est possible de générer par *Cryo-EM* des structures à des résolutions proches de l'échelle atomique.

5.4.2. La *Cryo-EM* versus la cristallographie aux rayons X et la RMN

Nous aurions pu opter pour une des techniques alternatives pour la résolution de la structure de nos transporteurs mais nous avons choisi la *Cryo-EM*. Ce choix a été basé sur les exigences de nos expériences comme la nature de notre protéine transmembranaire et les limitations de la quantité de l'échantillon. Ces raisons ainsi que d'autres ont été également discutées au début de la section (5.1.1). Afin de mieux cerner les différences entre ces trois techniques, nous illustrons dans le tableau 5.2 une vue comparative de leurs utilités et limites.

Tableau 5-2. Avantages et inconvénients des techniques de caractérisation structurale: cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN et *Cryo-EM*.

Sources bibliographiques: (519-521).

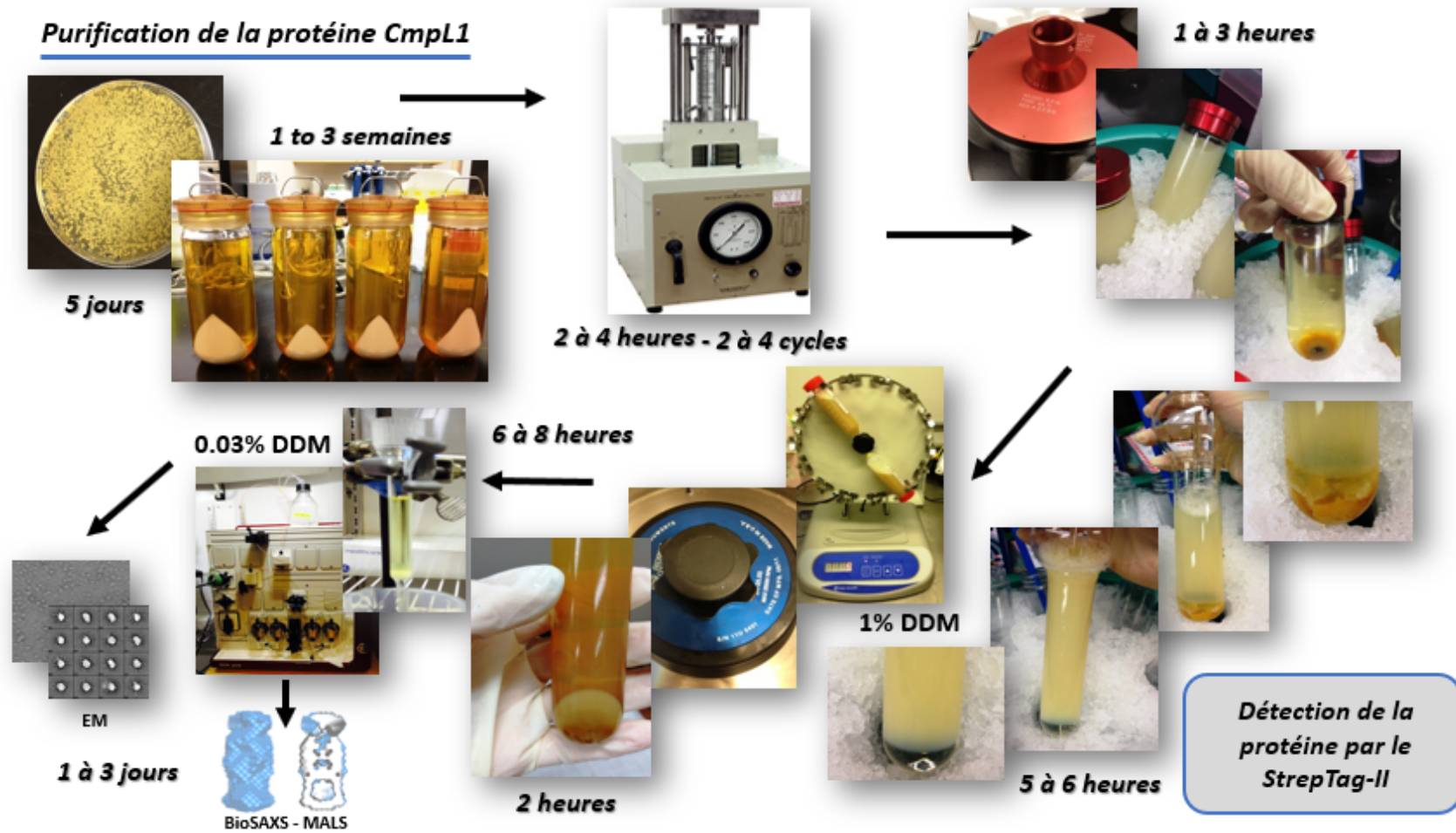
Avantages	Inconvénients
Technique de cristallographie aux rayons X	
<ul style="list-style-type: none"> - Structure générée à haute résolution - Bien caractérisée et développée - Facilite la modélisation - Non limitée par le poids moléculaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Complexité de la cristallisation des protéines membranaires en particulier - Difficulté de la diffraction - Étude d'un état statique - Problème de calcul de phase - Complexité de la caractérisation
Technique de spectroscopie RMN	
<ul style="list-style-type: none"> - Structure générée à haute résolution - Utile pour l'étude de la dynamique et des interactions intermoléculaires - Étude de l'échantillon en solution - Simple préparation de l'échantillon - Possibilité de l'automatisation de la préparation et l'analyse de l'échantillon 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté de la préparation de l'échantillon et coûts élevés - Exige une large quantité d'échantillon hautement pur - Complexité du calcul de simulation - Limitée à un poids moléculaire inférieur à 40-50 kDa - Compliquée pour l'étude des protéines membranaires
Technique de <i>Cryo-EM</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Simple préparation de l'échantillon - Génération d'une structure à l'état natif - Exige une faible quantité d'échantillon - Le traitement et l'analyse des données peuvent être automatisés - Dispositifs en amélioration continue 	<ul style="list-style-type: none"> - Résolution de la structure réduite versus la cristallographie et la RMN. - Limitée à un échantillon à haut poids moléculaire (entre 250 kDa et 10 MDa) - Coûts élevés - Risque de contamination de la grille

Certes, l'évolution de la *Cryo-EM* dans le domaine de la biologie structurale est évidente, mais les plus hautes résolutions ainsi que la quantité absolue de structures déposées dans la PDB demeurent tributaires de la cristallographie aux rayons X. À titre d'exemple, le nombre total des PDBs publiés a atteint un total de 9900, 849 et 396 PDB pour l'année 2018, et ce pour la cristallographie, la *Cryo-EM* et la RMN respectivement. Pour conclure, chaque technique présente ses avantages et inconvénients uniques. Le choix se basera ainsi sur les exigences de l'échantillon et les objectifs de l'étude, d'où nos futures perspectives pour la continuation des expériences *Cryo-EM* comme discuté antérieurement dans ce chapitre.

5.5 Conclusion générale

En conclusion, l'étude présentée dans ces trois chapitres a combiné différentes techniques multidisciplinaires pour des analyses structurales et fonctionnelles et a permis d'élargir notre collaboration à l'échelle internationale. De plus, la présente thèse a pu mettre en exergue l'importance de la caractérisation de la structure-fonction des transporteurs *RNDs* pour la compréhension de leur mode de transport à travers la membrane mycobactérienne. Malgré la caractérisation d'un nombre croissant de pompes, les conséquences cliniques de la résistance aux antibiotiques demeurent problématiques. Pour certaines, elles parviennent à contourner les traitements ciblant les infections pathogéniques à travers leur activité d'export à efflux; pour d'autres, c'est par le biais de leur contribution à l'imperméabilisation de la paroi externe mycobactérienne. Ainsi, nos résultats pourraient aider à permettre la génération de nouvelles molécules actives à potentiel thérapeutique, et cela dans le but d'atténuer l'incidence mondiale de la *MDR*.

Annexe 1: Schématisation des étapes de purification de la protéine CmpL1

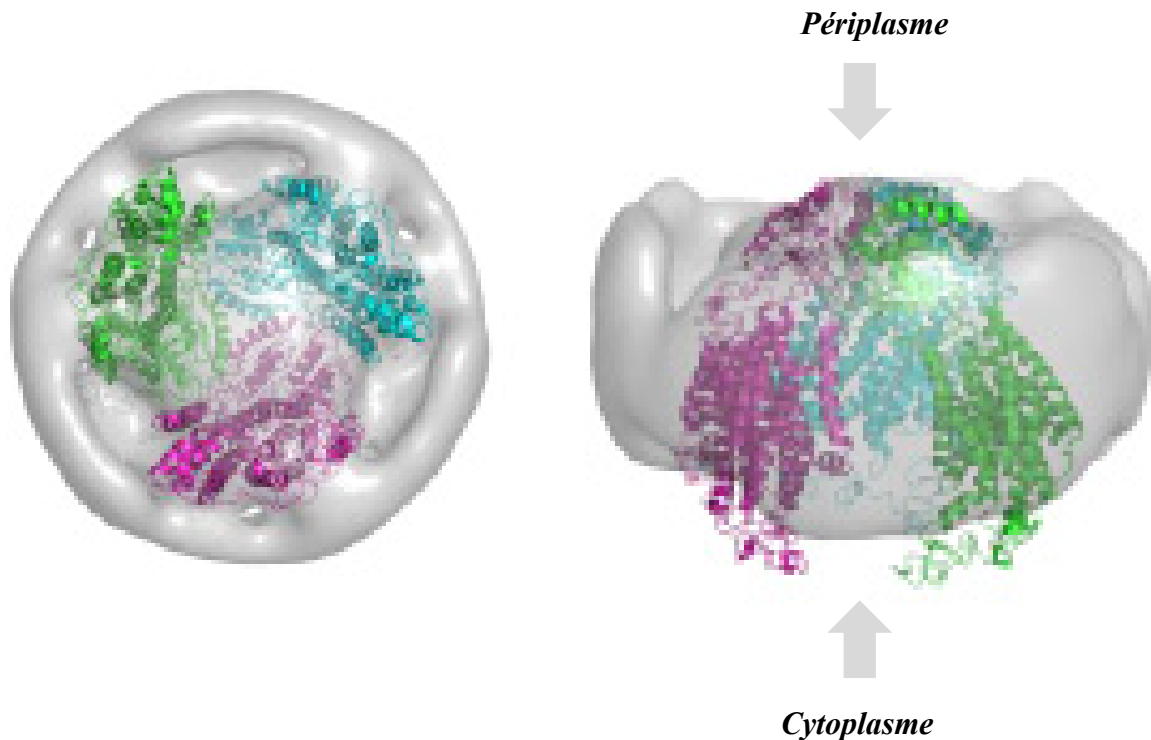


Annexe 2:

(A) Enveloppe SAXS CmpL1 de *C. glutamicum* à basse résolution

Le modèle CmpL1 a été construit dans son enveloppe SAXS. Cette dernière a été calculée et modélisée en utilisant le programme *Dammin* (*ATSAS online- EMBL*) (487) et d'autres outils du programme *ATSAS 2.7.2*. Le logiciel *PyMol* (*PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC*) (382) a été utilisé pour la visualisation et la manipulation de la structure du modèle en 3D et de son enveloppe. Le modèle CmpL1 a été généré par le logiciel en ligne *I-TASSER* (7). Ces résultats semblent prometteurs mais encore pas concluants pour une publication.

(A) Vue de dessous du transporteur CmpL1 de *C. glutamicum* du côté cytoplasmique. (B) Vue de côté du transporteur CmpL1 de *C. glutamicum*.



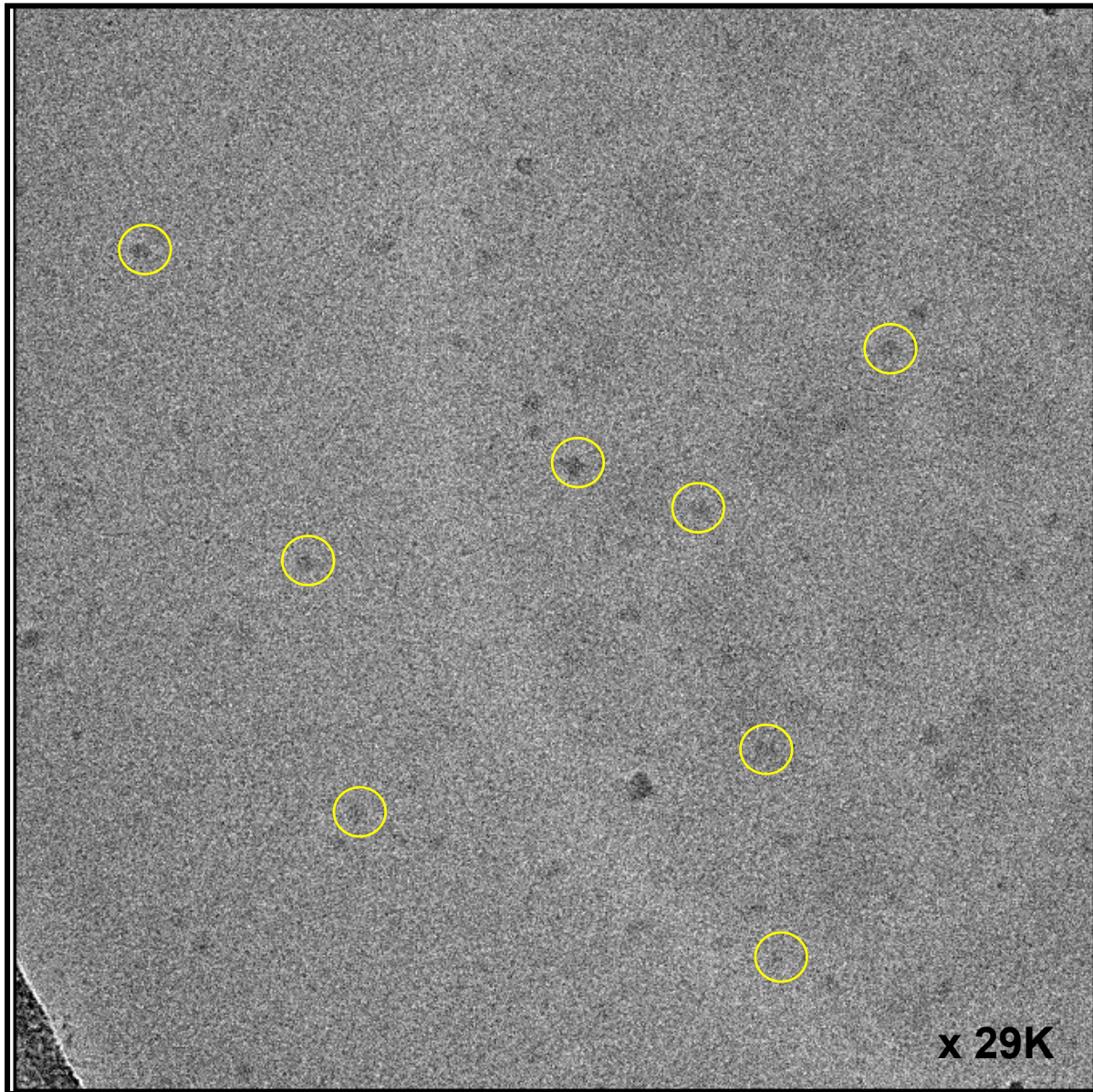
(B) Données SAXS pour l'échantillon CmpL1 analysé.

Le tableau ci-dessous illustre les données SAXS collectées et les paramètres de diffraction dérivés.

	Échantillon analysé	CmpL1
<i>Paramètres de la collecte des données</i>	Ligne du faisceau	G1
	Géométrie du faisceau (μm)	250 x 250
	Température ($^{\circ}\text{C}$)	23
	Temps d'exposition par image (s) ^a	2
	Longueur d'onde	1.245
	Intervalle de q (\AA^{-1})	0.0086 – 0.1443
<i>Paramètres de la structure</i>	$I(0)$ (à partir de Guinier) (+/- SE)	0.4477E-02 +/- 0.3074E-04
	R_g (\AA) (à partir de Guinier)	52.2
	D_{max} (\AA)	143
<i>Logiciels employés</i>	Réduction primaire des données	RAW
	Traitement des données	PRIMUS
	Modélisation	DAMMIN

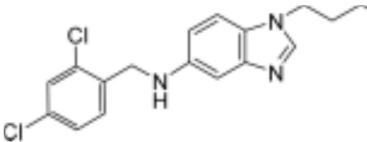
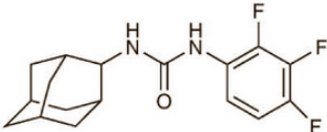
Annexe 3: Visualisation de la protéine CmpL1 de *C. glutamicum* par Cryo-EM

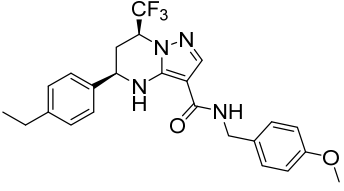
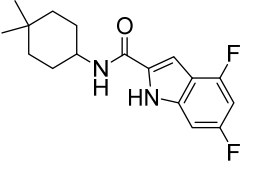
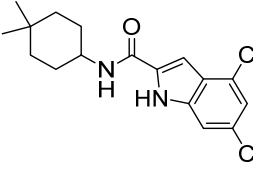
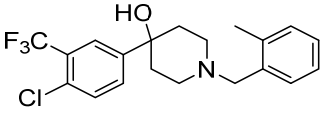
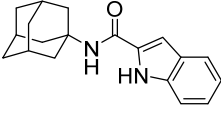
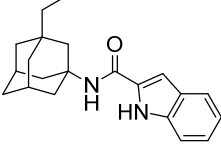
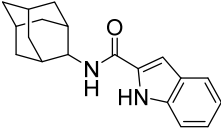
Les protéines CmpL1 sont encerclées en jaune (environ 10 nm). Les particules ont été visualisées par le microscope *FEI Tecnai G2 F20 200 kV Cryo-STEM* (Facilité de l'Université McGill). Les grilles *Quantifoil Cryo-EM* ont été utilisées pour la congélation de CmpL1. L'échantillon n'a pas subi de dilution précédant l'analyse *Cryo-EM*.

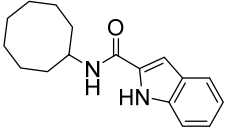
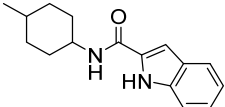
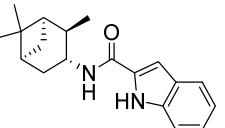
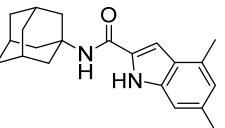
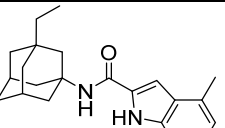
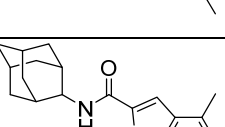
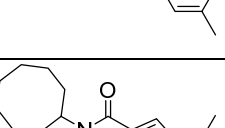
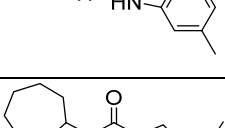
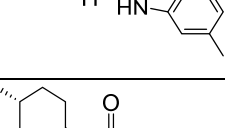
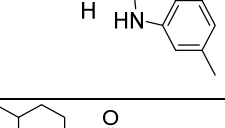


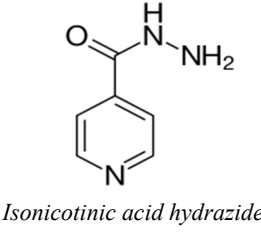
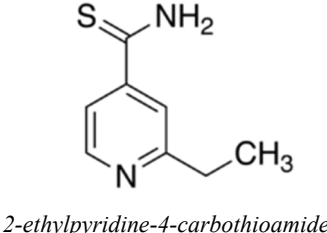
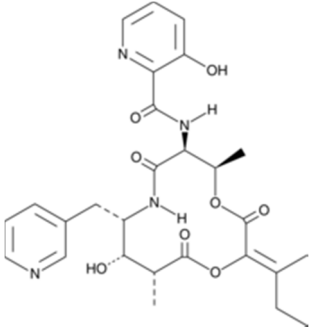
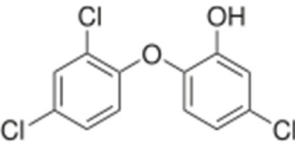
Annexe 4: Résumé des différents inhibiteurs ciblant les composants du *Mycobacterium*.

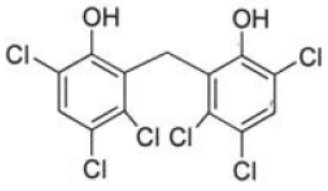
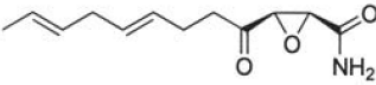
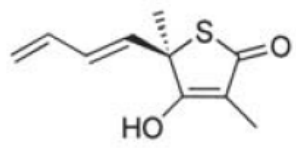
La majorité de ces informations étaient extraites et réadaptées des données illustrées dans l'article du Prof. (Mary Jackson, 2014) (49), de notre dernière publication en collaboration (201) ainsi que d'autres sources bibliographiques citées dans ce tableau.

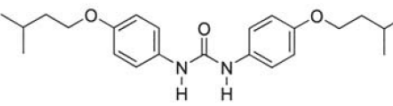
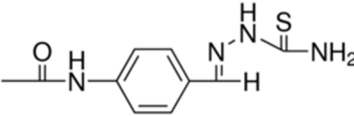
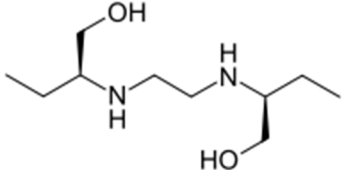
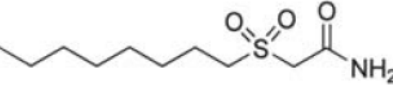
Inhibiteur	Structure chimique	Cible/Voie d'action	Référence bibliographique
<i>Inhibition par ciblage du transporteur transmembranaire «MmpL3»</i>			
C215	 <p><i>(N-(2,4-dichlorobenzyl)-1-propyl-1H-benzo[d]imidazol-5-amine)</i></p>	<p>MmpL3 Transport du TMM</p>	(201) (390)
AU1235	 <p><i>(1-(2-adamantyl)-3-(2,3,4-trifluorophenyl) urea)</i></p>	<p>MmpL3 Transport du TMM</p>	(185) (201)
SQ109	<p><i>(N-geranyl-N'-(2-adamantyl) ethane-1,2-diamine)</i></p> <p><i>En développement Clinique phase III</i></p>	<p>MmpL3 Transport du TMM</p>	(419) (187) (201)
BM212 et ses analogues	<p><i>(1,5-diaryl-2-methyl-3-(4-methylpiperazin-1-yl) methyl-pyrrole)</i> <i>(BM212)</i></p>	<p>MmpL3 Transport du TMM</p>	(434) (349) (391) (201)

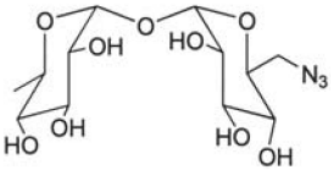
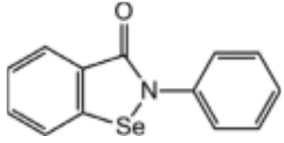
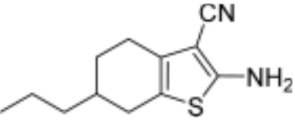
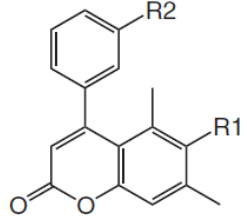
<i>SPIRO2</i> et <i>THPP1</i>	-	MmpL3 Transport du TMM	(392) (201)
<i>Compound 2</i>	-	MmpL3 Transport du TMM	(393) (201)
<i>THPP1</i>		MmpL3	(201)
<i>NITD349</i>		MmpL3	(201)
<i>NITD304</i>		MmpL3	(201)
<i>PIPD1</i>		MmpL3	(201)
<i>IC5</i>		MmpL3	(201)
<i>IC6</i>		MmpL3	(201)
<i>IC9</i>		MmpL3	(201)

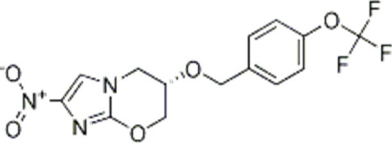
<i>IC10</i>		MmpL3	(201)
<i>IC15</i>		MmpL3	(201)
<i>IC16</i>		MmpL3	(201)
<i>IC20</i>		MmpL3	(201)
<i>IC21</i>		MmpL3	(201)
<i>IC24</i>		MmpL3	(201)
<i>IC25</i>		MmpL3	(201)
<i>IC26</i>		MmpL3	(201)
<i>IC29</i>		MmpL3	(201)
<i>IC30</i>		MmpL3	(201)

Inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques et des enzymes impliquées dans cette voie			
Isoniazid (INH)	 <p><i>Isonicotinic acid hydrazide</i></p>	<p>InhA <i>Enoyl-reductase</i> codée par l'<i>inhA</i></p> <p>Prodrogue: activée par la catalase katG, elle génère un intermédiaire avec le NAD qui va par la suite inhiber l'<i>enoyl-ACP reductase</i> de la FASII</p>	(522) (523) (524) (525) (206) (526) (527)
Ethionamide (ETH)	 <p><i>2-ethylpyridine-4-carbothioamide</i></p>	<p>InhA <i>Enoyl-reductase</i> codée par l'<i>inhA</i></p> <p>Analogue structural de l'isoniazide avec le même mécanisme d'action (sauf pour le mécanisme d'activation)</p>	(524) (528) (529)
Pyridomycin (PYR)		<p>InhA <i>Enoyl reductase</i> codée par l'<i>inhA</i></p> <p>Inhibition de la synthèse de l'acide mycolique chez <i>Mtb</i></p>	(530) (531)
Triclosan (TRC)	 <p><i>2,4,4'-trichloro-2'-hydroxyphenyl ether</i></p>	<p>InhA</p> <p>Il inhibe la synthèse des lipides en agissant sur la <i>Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] FabI</i></p> <p>C'est un produit bactéricide avec un large spectre d'action</p>	(524) (532) (533) (534) (535)
Dérivés du Triclosan	—	InhA	(536) (537) (535)

<p>Hexachlorophene (HCP)</p>	 <p>2,2'-méthylène-bis(3,4,6 trichlorophénol) (HCP)</p>	<p>InhA (chez <i>Mtb</i>, à démontrer) Structurellement lié au triclosan Un antiseptique et un bactéricide plus efficace contre les souches Gram+ mais moins chez les Gram-</p>	<p>(524) (534) (538) (539)</p>
<p>Nouvelles classes structurales</p>	<p>–</p>	<p>InhA GlaxoSmithKline (GSK)</p>	<p>(GSK)</p>
<p>CD117</p>	<p>–</p>	<p>InhA</p>	<p>(540)</p>
<p>Pyridomycin</p>	<p>–</p>	<p>InhA</p>	<p>(541)</p>
<p>Cerulenin</p>	 <p>2R,3S-epoxy-4-oxo-7,10-trans,trans-dodecanoic acid amide</p>	<p>FAS I et FAS II KasA/KasB Il bloque l'interaction avec la malonyl-CoA par liaison avec la β- keto-acyl-ACP synthase</p>	<p>(524) (542) (543) (544) (545)</p>
<p>Thiolactomycin (TLM) et ses analogues</p>	 <p>(4S)(2E,5E)-2,4,6-trimethyl-3-hydroxy-2,5,7-octatriene-thiolide</p>	<p>FAS II KasA/KasB Inhibition de la β-Ketoacyl-ACP Synthase Action sur les enzymes de condensation KasA et KasB chez <i>Mtb</i> Inhibition de la synthèse des acides gras et des acides mycoliques</p>	<p>(524) (546) (547) (548) (549) (536) (537) (550) (551)</p>

<p>L'Isoxyl (ISO) Les analogues de l'ISO Le thiacetazone (TAC)</p>	 <p><i>Isoxyl (ISO, 4,4'-diisoamyloxydiphenylthiourea, 4,4'-diisoamyloxythiocarbanilide, thiocarlide) (ISO)</i></p>  <p><i>4'-Formylacetanilide thiosemicarbazone (TAC)</i></p>	<p>HadABC</p> <p>Inhibition de la déhydratase: il inhibe l'élongation de la chaîne meromycotique du système FASII</p> <p>Doit être activé par la monooxygénase mycobactérienne EthA (Un mode d'action similaire à celui de l'INH et l'ETH mais avec une inhibition partielle de la synthèse des acides gras additionnelle)</p>	<p>(524) (528) (552) (553) (554) (555) (556) (185) (557) (558) (559)</p>
<p>NAS-21/NAS-91 (NAS)</p>	<p>—</p>	<p>HadB</p> <p>Activité contre la FASII chez <i>M.bovis</i> BCG Activité anti-mycobactérienne</p>	<p>(560) (561) (562)</p>
<p>Ethambutol</p>	 <p><i>(2S,2'S)-2,2'-(éthane-1,2-diyl-diimino)dibutan-1-ol</i></p>	<p>Arabinosyl transférase (Synthétise l'arabinogalactane)</p> <p>Inhibition de la synthèse des acides mycoliques Un antimycobactérien qui présente une activité bactéricide contre <i>Mtb</i> C'est un analogue de synthèse de l'1,2-éthanediamine Il est utilisé en association avec d'autres antituberculeux</p>	<p>(563) (49) (206)</p>
<p>N-Octanesulfonylacétamide (OSA)</p>	 <p><i>N-Octanesulfonylacétamide (OSA)</i></p>	<p>Inhibition des acides mycoliques.</p> <p>C'est un β-sulfonyl carboxamide conçu pour mimer l'état de transition des réactions catalysées par la β-ketoacyl synthase (impliquée dans l'élongation des acides gras) Son mécanisme n'est pas encore défini</p>	<p>(564) (524)</p>

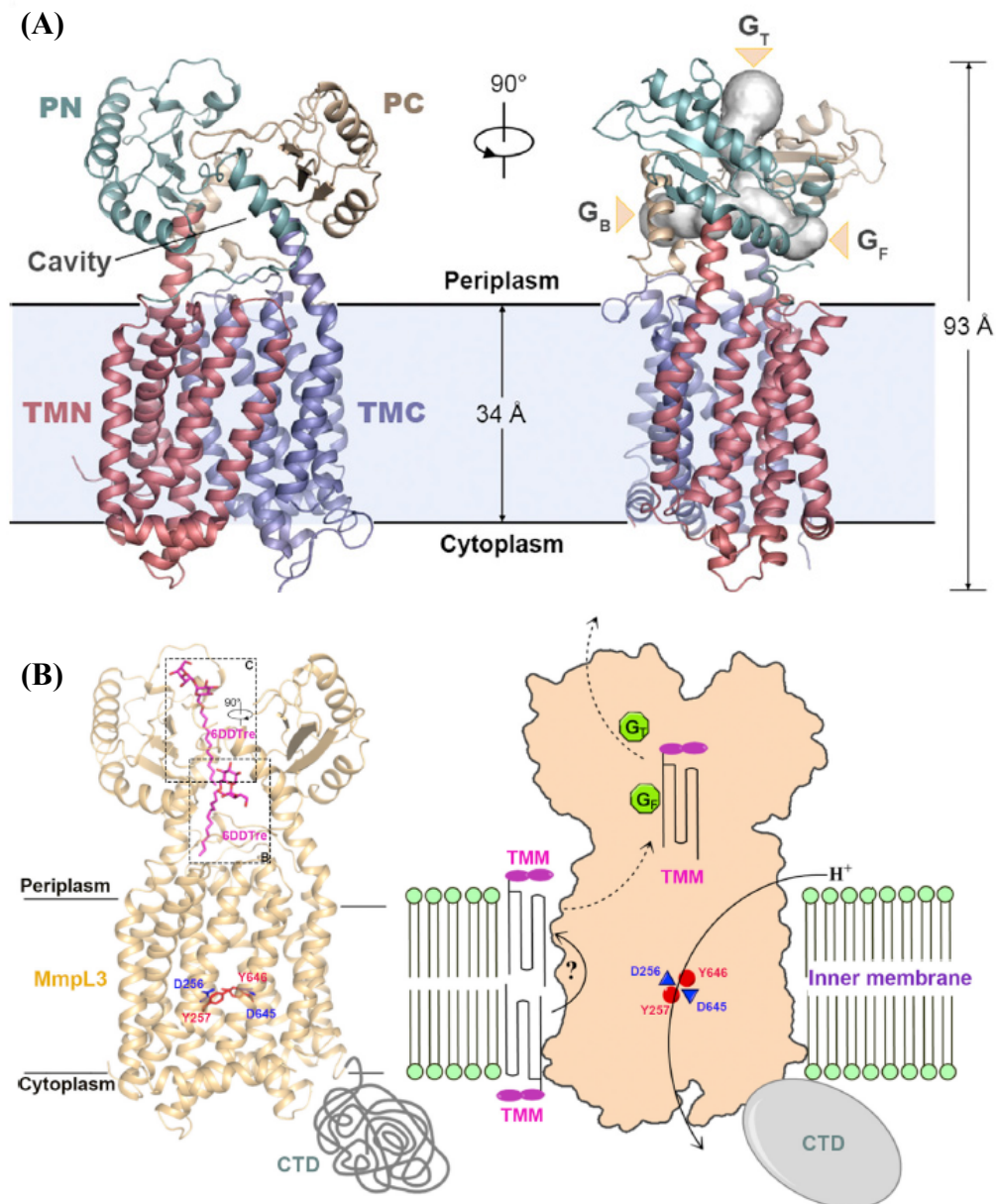
<p>ADT</p>	 <p><i>6-azido-6-deoxy-α,α'-trehalose (ADT)</i></p>	<p>Antigen 85 (Ag85) Inhibition de l'activité mycolyl transférase</p>	<p>(524) (565)</p>
<p>Ebselen</p>	 <p><i>(2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one)</i></p>	<p>Ag85 Synthèse du TDM</p>	<p>(566)</p>
<p>I3-AG85</p>	 <p><i>(2-amino-6-propyl-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3 carbonitrile)</i></p>	<p>Ag85 Synthèse du TDM</p>	<p>(567)</p>
<p>Les composés Thiophene (TP); Compound 3'</p>	<p>—</p>	<p>Pks13 Le TP interfère avec la fonction du domaine N-terminal-ACP de la pks13 Inhibition de la Pks13 et de la synthèse de l'acide mycolique Le <i>compound 3'</i> est capable de tuer les cellules de <i>Mtb</i> Il interfère avec l'activité TE du domaine C-terminal de pks13</p>	<p>(393) (568)</p>
<p>NAS-21, NAS-91 et leurs analogues</p>	<p>— <i>Antimalarial phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones NAS-21 et NAS-91</i></p>	<p>HadABC</p>	<p>(562) (132)</p>
<p>CCAs</p>	 <p><i>4,6-diaryl-5,7-dimethyl coumarins (CCAs)</i></p>	<p>FadD32 ACC34 le plus puissant : capable de tuer <i>Mtb</i> en inhibant l'activité de la Fad32 (Fad32-pks13-accd4 : un opéron essentiel pour la viabilité du <i>Mycobactérium</i>)</p>	<p>(569) (166) (167)</p>

<i>NCI</i>	– <i>NCI-172033 (NCI)</i>	AccD6 Inhibition de l'Acyl-CoA carboxylase	(178) (570)
ETH "boosters": BDM 31343 et ses analogues	–	EthR	(571) (572)
Pretomanid PA-824	 <i>Nitroimidazopyrans (NAPs)</i> En développement Clinique	Inconnu (Peut être par inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique oxygéné)	(524) (573) (574)
OPC-67683	En développement Clinique	Inconnu (Peut être par inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique oxygéné)	(575)
Inhibition du «Decaprenyl phosphate»			
Analogues du Fosfomidomycin	–	IspC	(576) (577)
Inhibition des précurseurs biosynthétisés sur la base de «l'isoprenoid»			
Analogues du Capuramycin (Sequella)	SQ641 <i>(Lead capuramycin analog) (Sequella)</i> En développement préclinique	MraY Biosynthèse du PG	(49)
Dérivés du Caprazamycin (CPZEN-45)	–	WecA Biosynthèse du PG	(578)
DNB1	<i>Benzothiazinones (BTZ043)</i> En développement préclinique	DprE1 Biosynthèse du LAM (et AG)	(579)
VI-9376	–	DprE1 Biosynthèse du LAM (et AG)	(580)

377790	–	DprE1 Biosynthèse du LAM (et AG)	(390)
<i>TCA-1</i>	–	DprE1 Biosynthèse du LAM (et AG)	(581)
De nombreux composés synthétiques	<i>(TB Alliance, Scripps)</i>	DprE1 Biosynthèse du LAM (et AG)	(49)
<i>Inhibition des «Ser/Thr kinases»</i>			
De nombreux «Scaffolds» chimiques	–	PknA Ser/Thr kinases	(49)
<i>(Vertex Pharmaceuticals Inc.)</i>	–	PknB Ser/Thr kinases	(49)
–	–	PknG Ser/Thr kinases	(580) (582) (583) (584)
<i>Inhibition des «Menaquinones»</i>			
<i>Aurachin RE, Ro 48-8071 et ses analogues</i>	–	MenA Menaquinones	(585)
<i>1,4-benzoxazines; 4-oxo-4-phenylbut-2-enoates</i>	–	MenB Menaquinones	(586) (587)
Les analogues du Sulfonyladenosine	–	MenE Menaquinones	(588) (589)
<i>Inhibition des «PGLs»</i>			
<i>5'-O- [N-(4-hydroxybenzoyl)sulfamoyl]-adenosine</i>	–	FadD22 PGL	(590)

Annexe 5: Structure cristallographique du transporteur MmpL3 de *M. smegmatis* (PDB 6AJF) et proposition d'un mécanisme de transport du TMM.

Abréviations: *PN*:Porter domain N-terminal; *PC*: Porter domain C-terminal; *TMN*:Transmembrane domain N-terminal; *TMC*: Transmembrane domain C-terminal; *G_T*: Top gate; *G_B*: Back gate; *G_F*: Front gate; *TMM*: Tréhalose de monomycolate ; *6DDTre*: 6-*n*-dodecyl- α , α -trehalose; *CTD*: C-terminal domain. (A) Structure cristallographique du monomère MmpL3 de *M. smegmatis* et illustration de ses différents points d'accès *G_T*, *G_B* et *G_F* (PDB 6AJF). (B) Proposition d'un mécanisme de transport du TMM par MmpL3 de *M. smegmatis*. Images reproduites de (Zhang et al., 2019) (326).



Bibliographie

1. Vachon J, Gallant V, Siu W. Tuberculosis in Canada, 2016. *Can Commun Dis Rep.* 2018;44(3/4):75-81.
2. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S122-9.
3. (OMS). OMdIS. Tuberculose; profils de pays. <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/fr/>. Page consultée le 30 Août 2018. .
4. Nikaido H, Zgurskaya HI. Antibiotic efflux mechanisms. *Current opinion in infectious diseases.* 1999;12(6):529-36.
5. Degiacomi G, Benjak A, Madacki J, Boldrin F, Provvedi R, Palu G, et al. Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on Mycobacterium tuberculosis gene expression. *Sci Rep.* 2017;7:43495.
6. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics.* 2008;9:40.
7. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods.* 2015;12(1):7-8.
8. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols.* 2010;5(4):725-38.
9. Embley TM, Hirt RP, Williams DM. Biodiversity at the molecular level: the domains, kingdoms and phyla of life. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 1994;345(1311):21-33.
10. Gupta RSJMMBR. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. 1998;62(4):1435-91.
11. Zhi X-Y, Li W-J, Stackebrandt EJIJoS, Microbiology E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. 2009;59(3):589-608.
12. Stach JE, Bull AT. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005;87(1):3-9.
13. Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, Gupta RS, van Sinderen D. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2007;91(4):351-72.
14. Atlas RM. *Experimental microbiology: fundamentals and applications*: Benjamin-Cummings Publishing Company; 1988.
15. Koch ALJTiM. Were Gram-positive rods the first bacteria? 2003;11(4):166-70.
16. Stackebrandt E, Schumann PJTPVABF, Actinomycetes. Introduction to the taxonomy of actinobacteria. 2006:297-321.
17. Bentley SD, Brosch R, Gordon SV, Hopwood DA, Cole ST. *Genomics of actinobacteria, the high G+ C Gram-positive bacteria.* Humana Press; 2004. Report No.: 1588291898.
18. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, NY).* 2006;311(5759):374-7.

19. Worthen DB. Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. 2008;63(2):273-4.
20. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. 2016;80(1):1-43.
21. Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of Streptomyces. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(2):171-98.
22. Cole STJFl. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. 1999;452(1-2):7-10.
23. Cole S, Eiglmeier K, Parkhill J, James K, Thomson N, Wheeler P, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. 2001;409(6823):1007.
24. Saunders E, Pukall R, Abt B, Lapidus A, Del Rio TG, Copeland A, et al. Complete genome sequence of *Eggerthella lenta* type strain (VPI 0255 T). 2009;1(2):174.
25. Puech V, Chami M, Lemassu A, Laneelle MA, Schiffler B, Gounon P, et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology (Reading, England)*. 2001;147(Pt 5):1365-82.
26. Ruimy R, Riegel P, Boiron P, Monteil H, Christen R. Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*. 1995;45(4):740-6.
27. Pinto AC, de Sa PH, Ramos RT, Barbosa S, Barbosa HP, Ribeiro AC, et al. Differential transcriptional profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to abiotic stresses. *BMC Genomics*. 2014;15:14.
28. Bernard K, Funke GJCL, Neumann. *Genus* I. 1896;350:245-89.
29. Oliveira A, Oliveira LC, Aburjaile F, Benevides L, Tiwari S, Jamal SB, et al. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1937.
30. Tauch A, Sandbote JJTpA. The family *Corynebacteriaceae*. 2014:239-77.
31. Lee JY, Na YA, Kim E, Lee HS, Kim P. The Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an Industrial Workhorse. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2016;26(5):807-22.
32. Xu M, Rao Z, Dou W, Yang J, Jin J, Xu Z. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino acids*. 2012;43(1):255-66.
33. Su H, Jiang J, Lu Q, Zhao Z, Xie T, Zhao H, et al. Engineering *Corynebacterium crenatum* to produce higher alcohols for biofuel using hydrolysates of duckweed (*Landoltia punctata*) as feedstock. *Microb Cell Fact*. 2015;14:16.
34. Persicke M, Albersmeier A, Bednarz H, Niehaus K, Kalinowski J, Ruckert C. Genome sequence of the soil bacterium *Corynebacterium callunae* type strain DSM 20147(T). *Standards in genomic sciences*. 2015;10:5.
35. Bernard K. The genus *corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(10):3152-8.
36. Soares SC, Silva A, Trost E, Blom J, Ramos R, Carneiro A, et al. The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar *ovis* and *equi* strains. *PloS one*. 2013;8(1):e53818.
37. Sangal V, Hoskisson PA. Evolution, epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: New perspectives on an old foe. *Infect Genet Evol*. 2016;43:364-70.

38. Ruiz JC, D'Afonseca V, Silva A, Ali A, Pinto AC, Santos AR, et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PloS one*. 2011;6(4):e18551.
39. Wagner KS, White JM, Crowcroft NS, De Martin S, Mann G, Efstratiou A. Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiology and infection*. 2010;138(11):1519-30.
40. Trost E, Blom J, Soares Sde C, Huang IH, Al-Dilaimi A, Schroder J, et al. Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. *Journal of bacteriology*. 2012;194(12):3199-215.
41. Dias AA, Santos LS, Sabbadini PS, Santos CS, Silva Junior FC, Napoleao F, et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de saude publica*. 2011;45(6):1176-91.
42. Lartigue MF, Nordmann P. Diphtérie à *Corynebacterium ulcerans*. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2005;20(3):173-6.
43. Tauch A, Kaiser O, Hain T, Goesmann A, Weisshaar B, Albersmeier A, et al. Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *Journal of bacteriology*. 2005;187(13):4671-82.
44. Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of biotechnology*. 2003;104(1-3):5-25.
45. Zahoor A, Lindner SN, Wendisch VF. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Computational and structural biotechnology journal*. 2012;3:e201210004.
46. Yang L, Lu S, Belardinelli J, Huc-Claustre E, Jones V, Jackson M, et al. RND transporters protect *Corynebacterium glutamicum* from antibiotics by assembling the outer membrane. *MicrobiologyOpen*. 2014;3(4):484-96.
47. Costa HC, de Souza LC, Martini JP, Ferrazoli L, Martins MC, Opromolla DV, et al. [Comparative study of various staining methods for mycobacteria]. *Hansenologia internationalis*. 1988;13(2):37-41.
48. Daffe M. The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2015;95 Suppl 1:S155-8.
49. Jackson M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(10).
50. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 6):1785-9.
51. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 5):1305-14.
52. Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Rennsing K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(6):969-76.

53. Vasconcellos SE, Huard RC, Niemann S, Kremer K, Santos AR, Suffys PN, et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. *BMC Infect Dis*. 2010;10:80.
54. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson MC, Salfinger M, et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(2).
55. Emame AKA. Les infections à mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* à Libreville: profil des résistances aux antibiotiques et diversité génétique: Université Sorbonne Paris Cité; 2016.
56. Garnotel É. Avant-propos: Mycobactéries. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2017;2017(496):39.
57. Grosset J, Truffot-Pernot C, Boisvert H, Lalande V. Qu'est-ce que les mycobactéries atypiques ? *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1991;21(2):7-15.
58. Bottai D, Stinear TP, Supply P, Brosch R. *Mycobacterial Pathogenomics and Evolution. Molecular Genetics of Mycobacteria, Second Edition: American Society of Microbiology*; 2014.
59. Park IK, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36(2):217-24.
60. Parkins MD, Floto RA. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2015;14(3):293-304.
61. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann JL, Nick JA, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. *Thorax*. 2016;71(1):88-90.
62. Martiniano SL, Nick JA, Daley CL. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*. 2016;37(1):83-96.
63. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, Everall I, Brown KP, Moreno P, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science (New York, NY)*. 2016;354(6313):751-7.
64. Diel R, Lipman M, Hoefsloot W. High mortality in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease: a systematic review. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):206.
65. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 2014;97 Suppl:S5-S19.
66. Koch RJBKW. The etiology of tuberculosis. 1882;15:221-30.
67. Gutierrez MC, Supply P, Brosch R. Pathogenomics of mycobacteria. *Genome Dyn*. 2009;6:198-210.
68. Herzog H. History of tuberculosis. *Respiration*. 1998;65(1):5-15.
69. Donoghue HD. Human tuberculosis – an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes and Infection*. 2009;11(14):1156-62.
70. Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, May H, Lee OYC, Feldman M, et al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. *Tuberculosis*. 2015;95:S122-S6.
71. Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Kahila Bar-Gal G, Matheson C, et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004;4(9):584-92.

72. Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2012;367(1590):850-9.
73. Carter KC. *The Rise of Causal Concepts of Disease: Case Histories*: Ashgate; 2003.
74. Pierre D. *Dissertation sur les maladies veneriennes, contenant une méthode de les guérir sans flux de bouche, sans risque & sans dépense : avec deux dissertations, l'une sur la rage, l'autre sur la phthisie et la manière de les guérir radicalement* 1738.
75. Durrant CM. On the Symptoms and Treatment of Incipient Phthisis. *Provincial medical journal and retrospect of the medical sciences*. 1842;4(101):431-5.
76. May W. An Account of the Successful Termination of a Case Attended with Symptoms of Phthisis Pulmonalis; with Remarks on the Treatment of That Disease. *The London medical journal*. 1788;9(Pt 3):268-85.
77. Straus I. *La tuberculose & son bacille*: Rueff & C.; 1895.
78. Murray JF. Mycobacterium tuberculosis and the cause of consumption: from discovery to fact. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(10):1086-8.
79. Koch R. Lecture on the discovery of Mycobacterium tuberculosis. 1882.
80. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14(9):e744-e51.
81. Berche P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18:1-6.
82. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(3):196-201.
83. [Die Aetiologie der Tuberculose. Facsimile of the original contribution by Robert Koch in "Berliner Klinische Wochenschrift" 10 April 1882]. *Fortschritte der Medizin*. 1982;100(12):539.
84. Mandal. MA. Histoire de la tuberculose. *News Medical life sciences*. [https://www.news-medical.net/health/History-of-Tuberculosis-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/History-of-Tuberculosis-(French).aspx). Page consultée le 02 août 2018. .
85. Wikipedia: Wilhelm Röntgen. https://fr.wikipedia.org/wiki/Wilhelm_R%C3%B6ntgen. Page consultée le 02 août 2018.
86. Organization) WWH. *Global Tuberculosis Report 2017*. 2017.
87. Banuls AL, Sanou A, Anh NT, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol*. 2015;64(11):1261-9.
88. TUBERCULOSIS. *Global Tuberculosis Report 2017*. http://www.who.int/tb/publications/C2_2017GLOBAL_FACTSHEET.pdf?ua=1. Page consultée le 22 septembre 2018. . 2017.
89. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. Mycobacterium africanum--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9):e744.
90. de la Rua-Domenech R. Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2006;86(2):77-109.
91. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:475-527.
92. Mazza-Stalder J, Nicod L, Janssens JP. La tuberculose extrapulmonaire. *Revue des Maladies Respiratoires*. 2012;29(4):566-78.
93. Ketata W, Rekik WK, Ayadi H, Kammoun S. Les tuberculoses extrapulmonaires. *Revue de Pneumologie Clinique*. 2015;71(2):83-92.

94. Harisinghani MG, McLoud TC, Shepard J-AO, Ko JP, Shroff MM, Mueller PR. Tuberculosis from Head to Toe 1: (CME available in print version and on RSNA Link). *Radiographics*. 2000;20(2):449-70.
95. Robison VA, Jeffries C, Pratt R, Wallace RM, Magee E, Armstrong L, et al. Reported tuberculosis in the United States, 2007. 2008.
96. Billy C, Perronne C. Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte. *EMC-Maladies infectieuses*. 2004;1(2):81-98.
97. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 2014;159(7):1497-509.
98. Brennan PJ, Young DB, Robertson BD, Andersen P, Barry III CE, Britton W. Handbook of anti-tuberculosis agents. *Tuberculosis*. 2008;88(2):85-170.
99. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med*. 2015;372(22):2127-35.
100. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(1):39-47.
101. Dupont C. Functional studies and therapeutic significance of MmpL proteins in *Mycobacterium abscessus*: Université Paris-Saclay; 2016.
102. Boucau J. Enzymatic and structural characterization of proteins linked to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. 2008:p xiv, 145 leaves.
103. Harries AD, Dye C. Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100(5-6):415-31.
104. Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol*. 1974;99(2):131-8.
105. Vynnycky E, Fine PE. Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *Am J Epidemiol*. 2000;152(3):247-63.
106. Tuberculosis symptoms. Dreamstime.com. <https://thumbs.dreamstime.com/z/sympt-mes-de-tuberculose-51202074.jpg>. Page consultée le 26 août 2018.
107. Adalbert L, Mohammed A, Gisela B, Fadila B, David D, Lanfranco F, et al. Diagnostic de la tuberculose par examen microscopique direct des expectorations dans les pays à faibles revenus Guide technique. Cinquième édition. 2000.
108. BOUHERAOUA H. POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE: UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT-PARIS; 2012.
109. Guide d'intervention pour la tuberculose. <http://publications.msss.gouv.qc.ca/msss/fichiers/2017/17-271-05W.pdf>. Page consultée le 31 Août 2018. .
110. Truffot-Pernot C, Veziris N. [Bacteriological tests for tuberculosis]. *Rev Mal Respir*. 2011;28(8):1034-47.
111. Reichman LB, Hershfield ES. Tuberculosis: a comprehensive international approach. *Perspectives in Biology and Medicine*. 1994;37(3):460-7.
112. Alexander J. The Surgery of Pulmonary Tuberculosis. *Annals of Surgery*. 1925;82(6):989-92.
113. Gaensler EA. The Surgery for Pulmonary Tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*. 1982;125(3P2):73-84.
114. Herzog BH. History of Tuberculosis. *Respiration*. 1998;65(1):5-15.
115. Lajiness D. Trehalose Monomycolate Biosynthesis and Utilization in *Mycobacterium tuberculosis*. 2011.
116. Calmette A. Essais d'immunisation contre l'infection tuberculeuse 1924.

117. Calmette A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med.* 1931;24(11):1481-90.
118. Regional Office for South-East Asia WHO. Bending the curve - ending TB: Annual report 2017. WHO Regional Office for South-East Asia. 2017(Mar-2017):76.
119. Organization GWH. Global tuberculosis report 2017. 2017:262.
120. Ernst JD, Trevejo-Nunez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *The Journal of clinical investigation.* 2007;117(7):1738-45.
121. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393(6685):537-44.
122. Online Textbook of Bacteriology. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>. (Page consultée le 14 Août 2018).
123. Hmama Z, Pena-Diaz S, Joseph S, Av-Gay Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Rev.* 2015;264(1):220-32.
124. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2012;7(1):353-84.
125. Stanley SA, Cox JS. Host-pathogen interactions during *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;374:211-41.
126. Mayer-Barber KD, Sher A. Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis. *Immunol Rev.* 2015;264(1):264-75.
127. Bruns H, Stenger S. New insights into the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages. *Future microbiology.* 2014;9(3):327-41.
128. Kiazzyk S, Ball T. L'infection tuberculeuse latente: un aperçu. *Relevé des maladies transmissibles au Canada.* 2017;43(3):62-6.
129. Al-Saeedi M, Al-Hajoj S. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist.* 2017;10:333-42.
130. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(5):a000414.
131. Fu LM, Fu-Liu CS. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis.* 2002;82(2):85-90.
132. Marrakchi H, Lanéelle M-A, Daffé M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry & biology.* 2014;21(1):67-85.
133. Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffe M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of bacteriology.* 2008;190(16):5672-80.
134. Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(10):3963-7.
135. Sani M, Houben EN, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, et al. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS pathogens.* 2010;6(3):e1000794.
136. Daffé M, Etienne G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease.* 1999;79(3):153-69.

137. Lemassu A, Ortalo-Magne A, Bardou F, Silve G, Laneelle MA, Daffe M. Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology* (Reading, England). 1996;142 (Pt 6):1513-20.
138. Groenewald W, Baird MS, Verschoor JA, Minnikin DE, Croft AK. Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry and physics of lipids*. 2014;180:15-22.
139. Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*. 2001;11(9):107R-18R.
140. Mahapatra S, Scherman H, Brennan PJ, Crick DC. N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of *Mycobacterium* spp. is altered by drug treatment. *Journal of bacteriology*. 2005;187(7):2341-7.
141. Bhamidi S, Scherman MS, Rithner CD, Prenni JE, Chatterjee D, Khoo K-H, et al. The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(19):12992-3000.
142. Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual review of microbiology*. 2015;69:405-23.
143. Daffe M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in microbial physiology*. 1998;39:131-203.
144. Daffé M. Structure de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis*. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1996;26(11):891-7.
145. McNeil M, Daffe M, Brennan PJ. Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(20):13217-23.
146. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends in microbiology*. 2010;18(3):109-16.
147. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12:550.
148. Touchette MH, Seeliger JC. Transport of outer membrane lipids in mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2017;1862(11):1340-54.
149. Kamariza M, Shieh P, Bertozzi CR. Imaging Mycobacterial Trehalose Glycolipids. *Methods in enzymology*. 2018;598:355-69.
150. Goren M, Brennan P. Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities. *Tuberculosis*. 1979:63-193.
151. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS microbiology letters*. 1994;123(1-2):11-8.
152. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*. 1995;64:29-63.
153. Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol*. 2002;92 Suppl:46S-54S.
154. Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci*. 1998;3:D1253-61.
155. Quigley J, Hughitt VK, Velikovskiy CA, Mariuzza RA, El-Sayed NM, Briken V. The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*. 2017;8(2).

156. Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. *Trends Immunol.* 2017;38(1):66-76.
157. Slama N, Jamet S, Frigui W, Pawlik A, Bottai D, Laval F, et al. The changes in mycolic acid structures caused by hadC mutation have a dramatic effect on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology.* 2016;99(4):794-807.
158. Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, Kinoshita T, Mauri L, Prinetti A, et al. Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci Signal.* 2016;9(449):ra101.
159. Vander Beken S, Al Dulayymi JR, Naessens T, Koza G, Maza-Iglesias M, Rowles R, et al. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *European journal of immunology.* 2011;41(2):450-60.
160. de Souza MV, Ferreira Mde L, Pinheiro AC, Saraiva MF, de Almeida MV, Valle MS. Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. *TheScientificWorldJournal.* 2008;8:720-51.
161. Asselineau J, Lederer E. Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature.* 1950;166(4227):782-3.
162. Asselineau J, Choucroun N, Lederer E. [On the chemical constitution of an antigenic lipopolysaccharide extract of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*]. *Biochimica et biophysica acta.* 1950;5(2):197-203.
163. Minnikin DE. Complex lipids, their chemistry biosynthesis and roles. *The Biology of Mycobacteria.* 1982;1:95-184.
164. Quémard A. New Insights into the Mycolate-Containing Compound Biosynthesis and Transport in *Mycobacteria*. *Trends in microbiology.* 2016;24(9):725-38.
165. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland).* 2003;83(1-3):91-7.
166. Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami M, Daffe M, et al. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(1):314-9.
167. Portevin D, de Sousa-D'Auria C, Montrozier H, Houssin C, Stella A, Laneelle MA, et al. The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(10):8862-74.
168. Eggeling LE, Bott, M. (Ed.), Tauch, A., Hermann, T., Reyes, O., Kramer, R., Sandmann, G., Liebl, W., Schaffer, S., Winnen, B., Burkovski, A., Morbach, S., Ikeda, M., Yukawa, H., Kalinowski, J., Daffe, M., Eikmanns, B., Wittmann, C., Kimura, E., Willis, L., Patek, M., Kelle, R., Kinoshita, S., Wendisch, V., Sahm, H., Saier, Jr., M., Lindley, N., Yokota, A., Felce, J., Sinskey, A., Lessard, P., De Graaf, A., Niebisch, A., Bathe, B., Lee, H.S. . *Handbook of Corynebacterium glutamicum.* Boca Raton: CRC Press. 2005.
169. Gao Y, Hu X, Wang J, Li H, Wang X. Impact of mycolic acid deficiency on cells of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869. *Biotechnol Appl Biochem.* 2017.
170. Bhatt A, Kremer L, Dai AZ, Sacchettini JC, Jacobs WR, Jr. Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *Journal of bacteriology.* 2005;187(22):7596-606.

171. Barkan D, Liu Z, Sacchettini JC, Glickman MS. Mycolic Acid Cyclopropanation is Essential for Viability, Drug Resistance, and Cell Wall Integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & biology*. 2009;16(5):499-509.
172. Lee RE, Armour JW, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Mycolic acid biosynthesis: definition and targeting of the Claisen condensation step. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1346(3):275-84.
173. Wesener DA, Levengood MR, Kiessling LL. Comparing Galactan Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(7):2944-55.
174. Heath RJ, White SW, Rock CO. Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;58(6):695-703.
175. Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(1):81-101.
176. Schweizer E, Hofmann J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2004;68(3):501-17, table of contents.
177. Cronan JE, Jr., Waldrop GL. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Progress in lipid research*. 2002;41(5):407-35.
178. Kurth DG, Gago GM, de la Iglesia A, Bazet Lyonnet B, Lin TW, Morbidoni HR, et al. ACCase 6 is the essential acetyl-CoA carboxylase involved in fatty acid and mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology (Reading, England)*. 2009;155(Pt 8):2664-75.
179. Gago G, Kurth D, Diacovich L, Tsai SC, Gramajo H. Biochemical and structural characterization of an essential acyl coenzyme A carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*. 2006;188(2):477-86.
180. Lin T-W, Melgar MM, Kurth D, Swamidass SJ, Purdon J, Tseng T, et al. Structure-based inhibitor design of AccD5, an essential acyl-CoA carboxylase carboxyltransferase domain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3072-7.
181. Oh TJ, Daniel J, Kim HJ, Sirakova TD, Kolattukudy PE. Identification and characterization of Rv3281 as a novel subunit of a biotin-dependent acyl-CoA Carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(7):3899-908.
182. Bazet Lyonnet B, Diacovich L, Gago G, Spina L, Bardou F, Lemassu A, et al. Functional reconstitution of the *Mycobacterium tuberculosis* long-chain acyl-CoA carboxylase from multiple acyl-CoA subunits. *The FEBS journal*. 2017;284(7):1110-25.
183. Madacki J, Laval F, Grzegorzewicz A, Lemassu A, Zahorszka M, Arand M, et al. Impact of the epoxide hydrolase EphD on the metabolism of mycolic acids in mycobacteria. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(14):5172-84.
184. Bhatt A, Molle V, Besra GS, Jacobs WR, Jr., Kremer L. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Molecular microbiology*. 2007;64(6):1442-54.
185. Grzegorzewicz AE, Pham H, Gundi VA, Scherman MS, North EJ, Hess T, et al. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nature chemical biology*. 2012;8(4):334-41.

186. Xu Z, Meshcheryakov VA, Poce G, Chng SS. MmpL3 is the flippase for mycolic acids in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(30):7993-8.
187. Tahlan K, Wilson R, Kastrinsky DB, Arora K, Nair V, Fischer E, et al. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):1797-809.
188. Sennhauser G, Bukowska MA, Briand C, Grutter MG. Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology*. 2009;389(1):134-45.
189. Domenech P, Reed MB, Barry CE, 3rd. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infection and immunity*. 2005;73(6):3492-501.
190. Saier MH, Jr., Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in cell & developmental biology*. 2001;12(3):205-13.
191. Yamaryo-Botte Y, Rainczuk AK, Lea-Smith DJ, Brammananth R, van der Peet PL, Meikle P, et al. Acetylation of trehalose mycolates is required for efficient MmpL-mediated membrane transport in *Corynebacterineae*. *ACS chemical biology*. 2015;10(3):734-46.
192. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological reviews*. 1992;56(4):648-61.
193. Tang X, Deng W, Xie J. Novel insights into *Mycobacterium* antigen Ag85 biology and implications in countermeasures for *M. tuberculosis*. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2012;22(3):179-87.
194. Radmacher E, Alderwick LJ, Besra GS, Brown AK, Gibson KJ, Sahm H, et al. Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 7):2421-7.
195. Varela C, Rittmann D, Singh A, Krumbach K, Bhatt K, Eggeling L, et al. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chemistry & biology*. 2012;19(4):498-506.
196. Kamp F, Hamilton JA. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006;75(3):149-59.
197. Brand S, Niehaus K, Puhler A, Kalinowski J. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch Microbiol*. 2003;180(1):33-44.
198. Kalscheuer R, Weinrick B, Veeraraghavan U, Besra GS, Jacobs WR, Jr. Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(50):21761-6.
199. Liu J, Barry CE, 3rd, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(47):29545-51.
200. Druszczynska M, Kowalski K, Wawrocki S, Fol M. Diversity and Functionality of Mycobacterial Mycolic Acids in Relation to Host-pathogen Interactions. *Curr Med Chem*. 2017;24(38):4267-78.

201. Li W, Yazidi A, Pandya AN, Hegde P, Tong W, Calado Nogueira de Moura V, et al. MmpL3 as a Target for the Treatment of Drug-Resistant Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Frontiers in microbiology*. 2018;9(1547):1547.
202. Wikipédia. Actinomycine D. https://fr.wikipedia.org/wiki/Actinomycine_D. Page consultée le 23 Août 2018.
203. Wikipédia. Streptomycin. <https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>. Page consultée le 23 Août 2018. .
204. Jones D, Metzger H, Schatz A, Waksman SA. Control of gram-negative bacteria in experimental animals by streptomycin. *Science (New York, NY)*. 1944;100(2588):103-5.
205. Fox HH. SYNTHETIC TUBERCULOSTATS. III. ISONICOTINALDEHYDE THIOSEMICARBAZONE AND SOME RELATED COMPOUNDS. *The Journal of Organic Chemistry*. 1952;17(4):555-62.
206. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science (New York, NY)*. 1994;263(5144):227-30.
207. Islam MM, Hameed HMA, Mugweru J, Chhotaray C, Wang C, Tan Y, et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *Journal of Genetics and Genomics*. 2017;44(1):21-37.
208. Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998;27 Suppl 1:S32-41.
209. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*. 2009;78:119-46.
210. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry Biokhimiia*. 2005;70(2):267-74.
211. Glauert AM, Thornley MJ. The topography of the bacterial cell wall. *Annual review of microbiology*. 1969;23:159-98.
212. Zgurskaya HI. Multicomponent drug efflux complexes: architecture and mechanism of assembly. *Future microbiology*. 2009;4(7):919-32.
213. Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Journal of molecular evolution*. 1999;48(1):22-41.
214. Tomii K, Kanehisa M. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome research*. 1998;8(10):1048-59.
215. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*. 2014;9(10):1165-77.
216. Saier MH, Jr., Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, et al. The major facilitator superfamily. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 1999;1(2):257-79.
217. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 1998;62(1):1-34.
218. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, et al. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 1999;1(1):107-25.

219. Kim EH, Nies DH, McEvoy MM, Rensing C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *Journal of bacteriology*. 2011;193(10):2381-7.
220. Cattoir V. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)*. 2004;52(10):607-16.
221. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS microbiology reviews*. 2000;24(4):449-67.
222. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*. 2001;11(7):1156-66.
223. van Veen HW, Callaghan R, Soceneantu L, Sardini A, Konings WN, Higgins CF. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature*. 1998;391(6664):291-5.
224. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2001;183(19):5639-44.
225. Zwama M, Yamaguchi A. molecular mechanisms of AcrB-mediated multidrug export. *Res Microbiol*. 2018.
226. Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current opinion in microbiology*. 2001;4(5):500-8.
227. Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular microbiology*. 2000;37(2):219-25.
228. Paulsen IT, Park JH, Choi PS, Saier MH, Jr. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS microbiology letters*. 1997;156(1):1-8.
229. Dinh T, Paulsen IT, Saier MH, Jr. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 1994;176(13):3825-31.
230. (OMS) OMdIS. Pharmacorésistance aux antituberculeux. <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/fr/>. Page consultée le 30 Août 2018. .
231. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*. 2010;375(9728):1830-43.
232. Lynch JB. Multidrug-resistant Tuberculosis. *Medical Clinics of North America*. 2013;97(4):553-79.
233. Prasad R. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis management: Evidences and controversies. *Lung India*. 2012;29(2):154-9.
234. Banerjee R, Allen J, Westenhoe J, Oh P, Elms W, Desmond E, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in California, 1993-2006. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(4):450-7.
235. (OMS) OMdIS. Stratégie de l'OMS pour mettre fin à la tuberculose. <http://www.who.int/tb/strategy/fr/>. Page consultée le 30 Août 2018. .
236. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015;19(11):1276-89.
237. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLOS Medicine*. 2009;6(2):e1000002.
238. Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2009;13(12):1456-66.

239. Thomas SE, Mendes V, Kim SY, Malhotra S, Ochoa-Montaña B, Blaszczyk M, et al. Structural Biology and the Design of New Therapeutics: From HIV and Cancer to Mycobacterial Infections: A Paper Dedicated to John Kendrew. *Journal of molecular biology*. 2017;429(17):2677-93.
240. Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, Vjecha MJ, Rao M, Ntoumi F, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(7):e183-e98.
241. Stop T. partnership working group on new TB drugs. Clinical pipeline, <http://www.newtbdugs.org/pipeline/clinical> (accessed Feb 20, 2018). 2010.
242. Berk A, Zipursky S, Lodish H. *Molecular Cell Biology* 4th edition. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf; 2000.
243. Eitinger T, Rodionov DA, Grote M, Schneider E. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS microbiology reviews*. 2011;35(1):3-67.
244. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):218-27.
245. Procko E, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Gaudet R. The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *FASEB J*. 2009;23(5):1287-302.
246. Shi Y. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annual review of biophysics*. 2013;42:51-72.
247. Forrest LR, Kramer R, Ziegler C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(2):167-88.
248. Saier JMH, Reddy VS, Tamang DG, Västermark Å. The Transporter Classification Database. *Nucleic acids research*. 2014;42(D1):D251-D8.
249. Nikaido H. RND transporters in the living world. *Res Microbiol*. 2018;169(7-8):363-71.
250. Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Price SM, Verot L, Shen MM, et al. Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(16):5886-91.
251. Goel AK, Rajagopal L, Nagesh N, Sonti RV. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of bacteriology*. 2002;184(13):3539-48.
252. Yen MR, Chen JS, Marquez JL, Sun EI, Saier MH. Multidrug resistance: phylogenetic characterization of superfamilies of secondary carriers that include drug exporters. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2010;637:47-64.
253. Superfamily. TR-N-CDR. Transporter Classification Data Base (TCDB). Page consultée le 10 Février 2019. .
254. Elkins CA, Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *Journal of bacteriology*. 2002;184(23):6490-8.
255. Saier MH, Jr., Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J*. 1998;12(3):265-74.
256. Long F, Su CC, Zimmermann MT, Boyken SE, Rajashankar KR, Jernigan RL, et al. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature*. 2010;467(7314):484-8.

257. Szekely R, Cole ST. Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function. *Molecular microbiology*. 2016;99(5):831-4.
258. Nikaido H. Covalently Linked Trimers of RND (Resistance-Nodulation-Division) Efflux Transporters to Study Their Mechanism of Action: *Escherichia coli* AcrB Multidrug Exporter as an Example. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2018;1700:147-65.
259. Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1794(5):769-81.
260. Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Tikhonova EB, Lau SY, Stratton KL. Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria. *Front Biosci*. 2003;8:s862-73.
261. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 1996;178(20):5853.
262. Murakami S. Multidrug efflux transporter, AcrB--the pumping mechanism. *Current opinion in structural biology*. 2008;18(4):459-65.
263. Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, Verrey F, Diederichs K, Pos KM. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* (New York, NY). 2006;313(5791):1295-8.
264. White DG, Goldman JD, Demple B, Levy SB. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1997;179(19):6122-6.
265. Zgurskaya HI, Nikaido H. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7190-5.
266. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. 1995;16(1):45-55.
267. Yamaguchi A, Nakashima R, Sakurai K. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:327.
268. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. 2002;419(6907):587-93.
269. Yu EW, McDermott G, Zgurskaya HI, Nikaido H, Koshland DE, Jr. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* (New York, NY). 2003;300(5621):976-80.
270. Pos KM, Schiefner A, Seeger MA, Diederichs K. Crystallographic analysis of AcrB. *FEBS letters*. 2004;564(3):333-9.
271. Yu EW, Aires JR, McDermott G, Nikaido H. A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *Journal of bacteriology*. 2005;187(19):6804-15.
272. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*. 2006;443(7108):173-9.
273. Sennhauser G, Amstutz P, Briand C, Storchenegger O, Grütter MG. Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPIn inhibitors. *PLoS Biol*. 2007;5(1):e7.
274. Monroe N, Sennhauser G, Seeger MA, Briand C, Grütter MG. Designed ankyrin repeat protein binders for the crystallization of AcrB: plasticity of the dominant interface. *Journal of structural biology*. 2011;174(2):269-81.
275. Sennhauser G, Grütter MG. Chaperone-Assisted Crystallography with DARPins. *Structure* (London, England : 1993). 2008;16(10):1443-53.

276. Das D, Xu QS, Lee JY, Ankoudinova I, Huang C, Lou Y, et al. Crystal structure of the multidrug efflux transporter AcrB at 3.1Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids. *Journal of structural biology*. 2007;158(3):494-502.
277. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014;509(7501):512-5.
278. Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, Ghosh P. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure*. 2006;14(3):577-87.
279. Slynko V, Schubert M, Numao S, Kowarik M, Aebi M, Allain FH. NMR structure determination of a segmentally labeled glycoprotein using in vitro glycosylation. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(3):1274-81.
280. Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Hayashi K, Nagata C, Hoshino K, et al. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature*. 2013;500(7460):102-6.
281. Pei XY, Hinchliffe P, Symmons MF, Koronakis E, Benz R, Hughes C, et al. Structures of sequential open states in a symmetrical opening transition of the TolC exit duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(5):2112-7.
282. Bavro VN, Pietras Z, Furnham N, Perez-Cano L, Fernandez-Recio J, Pei XY, et al. Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Molecular cell*. 2008;30(1):114-21.
283. Eicher T, Cha HJ, Seeger MA, Brandstatter L, El-Delik J, Bohnert JA, et al. Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(15):5687-92.
284. Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*. 2011;480(7378):565-9.
285. Zwama M, Yamasaki S, Nakashima R, Sakurai K, Nishino K, Yamaguchi A. Multiple entry pathways within the efflux transporter AcrB contribute to multidrug recognition. *Nature communications*. 2018;9(1):124.
286. Du D, van Veen HW, Luisi BF. Assembly and operation of bacterial tripartite multidrug efflux pumps. *Trends in microbiology*. 2015;23(5):311-9.
287. Wang Z, Fan G, Hryc CF, Blaza JN, Serysheva, II, Schmid MF, et al. An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *eLife*. 2017;6.
288. Matsunaga Y, Yamane T, Terada T, Moritsugu K, Fujisaki H, Murakami S, et al. Energetics and conformational pathways of functional rotation in the multidrug transporter AcrB. *eLife*. 2018;7.
289. Weeks JW, Nickels LM, Ntrel AT, Zgurskaya HI. Non-equivalent roles of two periplasmic subunits in the function and assembly of triclosan pump TriABC from *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*. 2015;98(2):343-56.
290. Tikhonova Elena B, Yamada Y, Zgurskaya Helen I. Sequential Mechanism of Assembly of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC. *Chemistry & biology*. 2011;18(4):454-63.
291. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(1):12-26.
292. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in cell & developmental biology*. 2001;12(3):215-23.
293. Lomovskaya O, Totrov M. Vacuuming the periplasm. *Journal of bacteriology*. 2005;187(6):1879-83.

294. Lu W, Zhong M, Wei Y. Folding of AcrB Subunit Precedes Trimerization. *Journal of molecular biology*. 2011;411(1):264-74.
295. Yu L, Lu W, Wei Y. AcrB trimer stability and efflux activity, insight from mutagenesis studies. *PloS one*. 2011;6(12):e28390.
296. Mishima H, Oshima H, Yasuda S, Kinoshita M. Statistical thermodynamics for functionally rotating mechanism of the multidrug efflux transporter AcrB. *The journal of physical chemistry B*. 2015;119(8):3423-33.
297. Su CC, Li M, Gu R, Takatsuka Y, McDermott G, Nikaido H, et al. Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *Journal of bacteriology*. 2006;188(20):7290-6.
298. Eicher T, Seeger MA, Anselmi C, Zhou W, Brandstatter L, Verrey F, et al. Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *eLife*. 2014;3.
299. Zwama M, Hayashi K, Sakurai K, Nakashima R, Kitagawa K, Nishino K, et al. Hoisting-Loop in Bacterial Multidrug Exporter AcrB Is a Highly Flexible Hinge That Enables the Large Motion of the Subdomains. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2095.
300. Poole K, Krebes K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of bacteriology*. 1993;175(22):7363-72.
301. Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi J, Nishino T. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(11):2567-9.
302. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:660.
303. Aires JR, Kohler T, Nikaido H, Plesiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(11):2624-8.
304. Mine T, Morita Y, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(2):415-7.
305. Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrener P, et al. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(12):2975-83.
306. Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M, Schweizer HP. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *Journal of bacteriology*. 2007;189(21):7600-9.
307. Delmar JA, Yu EW. Crystallographic Analysis of the CusBA Heavy-Metal Efflux Complex of *Escherichia coli*. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2018;1700:59-70.
308. Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2003;185(13):3804-12.
309. Su CC, Long F, Zimmermann MT, Rajashankar KR, Jernigan RL, Yu EW. Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature*. 2011;470(7335):558-62.
310. Bolla JR, Su CC, Do SV, Radhakrishnan A, Kumar N, Long F, et al. Crystal structure of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrD inner membrane multidrug efflux pump. *PloS one*. 2014;9(6):e97903.

311. Warner DM, Shafer WM, Jerse AE. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE Efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness. *Molecular microbiology*. 2008;70(2):462-78.
312. Hagman KE, Lucas CE, Balthazar JT, Snyder L, Nilles M, Judd RC, et al. The MtrD protein of *Neisseria gonorrhoeae* is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system. *Microbiology (Reading, England)*. 1997;143 (Pt 7):2117-25.
313. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. 2002;419(6907):587-93.
314. Kohler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Gotoh N, Nishino T, et al. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(10):2288-90.
315. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(9):1948-53.
316. Li X-Z, Zhang L, Srikumar R, Poole K. β -Lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(2):399-403.
317. Ramaswamy VK, Vargiu AV, Mallocci G, Dreier J, Ruggerone P. Molecular Determinants of the Promiscuity of MexB and MexY Multidrug Transporters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1144.
318. Guan L, Nakae T. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 2001;183(5):1734-9.
319. Lopez CA, Travers T, Pos KM, Zgurskaya HI, Gnanakaran S. Dynamics of Intact MexAB-OprM Efflux Pump: Focusing on the MexA-OprM Interface. *Sci Rep*. 2017;7(1):16521.
320. Takatsuka Y, Nikaido H. Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli* is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. *Journal of bacteriology*. 2006;188(20):7284-9.
321. Yue Z, Chen W, Zgurskaya HI, Shen J. Constant pH Molecular Dynamics Reveals How Proton Release Drives the Conformational Transition of a Transmembrane Efflux Pump. *J Chem Theory Comput*. 2017;13(12):6405-14.
322. Viljoen A, Dubois V, Girard-Misguich F, Blaise M, Herrmann JL, Kremer L. The diverse family of MmpL transporters in mycobacteria: from regulation to antimicrobial developments. *Molecular microbiology*. 2017;104(6):889-904.
323. Sandhu P, Akhter Y. The internal gene duplication and interrupted coding sequences in the MmpL genes of *Mycobacterium tuberculosis*: Towards understanding the multidrug transport in an evolutionary perspective. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2015;305(3):413-23.
324. Chim N, Torres R, Liu Y, Capri J, Batot G, Whitelegge JP, et al. The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & biology*. 2015;22(8):1098-107.
325. Chalut C. MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2016;100:32-45.
326. Zhang B, Li J, Yang X, Wu L, Zhang J, Yang Y, et al. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell*. 2019;176(3):636-48.e13.

327. Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp.* 1998;217:160-72; discussion 72-7.
328. Domenech P, Reed MB, Dowd CS, Manca C, Kaplan G, Barry CE, 3rd. The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(20):21257-65.
329. Seeliger JC, Holsclaw CM, Schelle MW, Botyanszki Z, Gilmore SA, Tully SE, et al. Elucidation and chemical modulation of sulfolipid-1 biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry.* 2012;287(11):7990-8000.
330. Jones CM, Wells RM, Madduri AV, Renfrow MB, Ratledge C, Moody DB, et al. Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by interrupting siderophore recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(5):1945-50.
331. Wells RM, Jones CM, Xi Z, Speer A, Danilchanka O, Doornbos KS, et al. Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens.* 2013;9(1):e1003120.
332. Belardinelli JM, Larrouy-Maumus G, Jones V, Sorio de Carvalho LP, McNeil MR, Jackson M. Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(40):27952-65.
333. Burbaud S, Laval F, Lemassu A, Daffe M, Guilhot C, Chalut C. Trehalose Polyphleates Are Produced by a Glycolipid Biosynthetic Pathway Conserved across Phylogenetically Distant *Mycobacteria*. *Cell chemical biology.* 2016;23(2):278-89.
334. Ren H, Dover LG, Islam ST, Alexander DC, Chen JM, Besra GS, et al. Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Molecular microbiology.* 2007;63(5):1345-59.
335. Etienne G, Malaga W, Laval F, Lemassu A, Guilhot C, Daffe M. Identification of the polyketide synthase involved in the biosynthesis of the surface-exposed lipooligosaccharides in *mycobacteria*. *Journal of bacteriology.* 2009;191(8):2613-21.
336. Pacheco SA, Hsu FF, Powers KM, Purdy GE. MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(33):24213-22.
337. Owens CP, Chim N, Graves AB, Harmston CA, Iniguez A, Contreras H, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein Rv0203 transfers heme to membrane proteins MmpL3 and MmpL11. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(30):21714-28.
338. Jain M, Cox JS. Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in *M. tuberculosis*. *PLoS pathogens.* 2005;1(1):e2.
339. Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, et al. Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(23):19845-54.
340. Briffotiaux J, Huang W, Wang X, Gicquel B. MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in *Mycobacterium* species. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland).* 2017;107:13-9.
341. Sandhu P, Akhter Y. Siderophore transport by MmpL5-MmpS5 protein complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inorg Biochem.* 2017;170:75-84.
342. Deshayes C, Bach H, Euphrasie D, Attarian R, Coureuil M, Sougakoff W, et al. MmpS4 promotes glycopeptidolipids biosynthesis and export in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology.* 2010;78(4):989-1003.

343. Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 2011;77:1-60.
344. Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2979-81.
345. Halloum I, Viljoen A, Khanna V, Craig D, Bouchier C, Brosch R, et al. Resistance to Thiacetazone Derivatives Active against *Mycobacterium abscessus* Involves Mutations in the MmpL5 Transcriptional Repressor MAB_4384. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(4).
346. Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(4):695-700.
347. Tullius MV, Harmston CA, Owens CP, Chim N, Morse RP, McMath LM, et al. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5051-6.
348. Belardinelli JM, Yazidi A, Yang L, Fabre L, Li W, Jacques B, et al. Structure-Function Profile of MmpL3, the Essential Mycolic Acid Transporter from *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS infectious diseases*. 2016;2(10):702-13.
349. La Rosa V, Poce G, Canseco JO, Buroni S, Pasca MR, Biava M, et al. MmpL3 is the cellular target of the antitubercular pyrrole derivative BM212. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):324-31.
350. Carel C, Nukdee K, Cantaloube S, Bonne M, Diagne CT, Laval F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. *PloS one*. 2014;9(5):e97148.
351. Bernut A, Viljoen A, Dupont C, Sapriel G, Blaise M, Bouchier C, et al. Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Molecular microbiology*. 2016;99(5):866-83.
352. Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR, Jr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*. 1999;402(6757):79-83.
353. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular microbiology*. 1999;34(2):257-67.
354. Gilleron M, Stenger S, Mazon Z, Wittke F, Mariotti S, Bohmer G, et al. Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(5):649-59.
355. Converse SE, Mougous JD, Leavell MD, Leary JA, Bertozzi CR, Cox JS. MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(10):6121-6.
356. Touchette MH, Holsclaw CM, Previti ML, Solomon VC, Leary JA, Bertozzi CR, et al. The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis* polyacyltrehalose lipid biosynthesis. *Journal of bacteriology*. 2015;197(1):201-10.
357. Boritsch EC, Frigui W, Cascioferro A, Malaga W, Etienne G, Laval F, et al. pks5-recombination-mediated surface remodelling in *Mycobacterium tuberculosis* emergence. *Nat Microbiol*. 2016;1:15019.

358. De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS microbiology reviews*. 2006;30(1):36-52.
359. Takayama K, Wang L, David HL. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1972;2(1):29-35.
360. Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(11):2484-9.
361. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1989;33(9):1493-9.
362. Mertens HD, Svergun DI. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *Journal of structural biology*. 2010;172(1):128-41.
363. Blanchet CE, Svergun DI. Small-angle X-ray scattering on biological macromolecules and nanocomposites in solution. *Annual review of physical chemistry*. 2013;64:37-54.
364. Morimoto Y, Nakagawa T, Kojima M. Small-angle X-ray scattering constraints and local geometry like secondary structures can construct a coarse-grained protein model at amino acid residue resolution. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;431(1):65-9.
365. Floudas CA. Computational methods in protein structure prediction. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(2):207-13.
366. Klepeis JL, Wei Y, Hecht MH, Floudas CA. Ab initio prediction of the three-dimensional structure of a de novo designed protein: a double-blind case study. *Proteins*. 2005;58(3):560-70.
367. Maupetit J. Génération ab initio de modèles protéiques à partir de représentations discrètes des protéines et de critères d'énergie simplifiés 2007.
368. Khoury GA, Smadbeck J, Kieslich CA, Floudas CA. Protein folding and de novo protein design for biotechnological applications. *Trends in biotechnology*. 2014;32(2):99-109.
369. Moult J, Pedersen JT, Judson R, Fidelis KJPS, Function,, Bioinformatics. A large-scale experiment to assess protein structure prediction methods. 1995;23(3):ii-iv.
370. Wu S, Zhang Y. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic acids research*. 2007;35(10):3375-82.
371. Xu D, Zhang Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins*. 2012;80(7):1715-35.
372. Zhang Y, Kihara D, Skolnick J. Local energy landscape flattening: parallel hyperbolic Monte Carlo sampling of protein folding. *Proteins*. 2002;48(2):192-201.
373. Li Y, Zhang Y. REMO: A new protocol to refine full atomic protein models from C-alpha traces by optimizing hydrogen-bonding networks. *Proteins*. 2009;76(3):665-76.
374. Zhang J, Liang Y, Zhang Y. Atomic-level protein structure refinement using fragment-guided molecular dynamics conformation sampling. *Structure (London, England : 1993)*. 2011;19(12):1784-95.
375. Zhang J, Zhang Y. High-resolution protein structure refinement using fragment guided molecular dynamics simulations. Submitted; 2010.
376. Zhang Y, Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic acids research*. 2005;33(7):2302-9.
377. Barrett AJ. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997)*. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997;250(1):1-6.

378. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 2000;25(1):25-9.
379. Yang J, Zhang W, He B, Walker SE, Zhang H, Govindarajoo B, et al. Template-based protein structure prediction in CASP11 and retrospect of I-TASSER in the last decade. *Proteins*. 2016;84 Suppl 1:233-46.
380. Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 2):213-21.
381. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 4):486-501.
382. Schrödinger L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2.0 ed.
383. Jain M, Chow ED, Cox JS. 12 The MmpL Protein Family. *The Mycobacterial Cell Envelope: American Society of Microbiology*; 2008.
384. Li W, Upadhyay A, Fontes FL, North EJ, Wang Y, Crans DC, et al. Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(11):6413-23.
385. Ruggerone P, Murakami S, Pos KM, Vargiu AV. RND efflux pumps: structural information translated into function and inhibition mechanisms. *Current topics in medicinal chemistry*. 2013;13(24):3079-100.
386. Rousseau C, Winter N, Pivert E, Bordat Y, Neyrolles O, Ave P, et al. Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cellular microbiology*. 2004;6(3):277-87.
387. Milano A, Pasca MR, Provvedi R, Lucarelli AP, Manina G, Ribeiro AL, et al. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2009;89(1):84-90.
388. Andries K, Villellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PloS one*. 2014;9(7):e102135.
389. Sandhu P, Akhter Y. The drug binding sites and transport mechanism of the RND pumps from *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from molecular dynamics simulations. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2016;592:38-49.
390. Stanley SA, Grant SS, Kawate T, Iwase N, Shimizu M, Wivagg C, et al. Identification of novel inhibitors of *M. tuberculosis* growth using whole cell based high-throughput screening. *ACS chemical biology*. 2012;7(8):1377-84.
391. Poce G, Bates RH, Alfonso S, Coccozza M, Porretta GC, Ballell L, et al. Improved BM212 MmpL3 inhibitor analogue shows efficacy in acute murine model of tuberculosis infection. *PloS one*. 2013;8(2):e56980.
392. Remuinan MJ, Perez-Herran E, Rullas J, Alemparte C, Martinez-Hoyos M, Dow DJ, et al. Tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide and N-benzyl-6',7'-dihydrospiro[piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* targeting MmpL3. *PloS one*. 2013;8(4):e60933.
393. Ioerger TR, O'Malley T, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Mohaideen N, et al. Identification of new drug targets and resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS one*. 2013;8(9):e75245.

394. Lun S, Guo H, Onajole OK, Pieroni M, Gunosewoyo H, Chen G, et al. Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature communications*. 2013;4:2907.
395. Rao SP, Lakshminarayana SB, Kondreddi RR, Herve M, Camacho LR, Bifani P, et al. Indolcarboxamide is a preclinical candidate for treating multidrug-resistant tuberculosis. *Science translational medicine*. 2013;5(214):214ra168.
396. Tantry SJ, Degiacomi G, Sharma S, Jena LK, Narayan A, Guptha S, et al. Whole cell screen based identification of spiropiperidines with potent antitubercular properties. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2015;25(16):3234-45.
397. Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, et al. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*. 2011;474(7350):235-8.
398. Long JC, Wang S, Vik SB. Membrane topology of subunit a of the F1F0 ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(26):16235-40.
399. Bernut A, Viljoen A, Dupont C, Sapriel G, Blaise M, Bouchier C, et al. Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue conserved in all mycobacterial MmpL family members. *Molecular microbiology*. 2016;99(5):866-83.
400. Ni Z, Bikadi Z, Shuster DL, Zhao C, Rosenberg MF, Mao Q. Identification of proline residues in or near the transmembrane helices of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) that are important for transport activity and substrate specificity. *Biochemistry*. 2011;50(37):8057-66.
401. Babot M, Blancard C, Pelosi L, Lauquin GJ, Trezeguet V. The transmembrane prolines of the mitochondrial ADP/ATP carrier are involved in nucleotide binding and transport and its biogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(13):10368-78.
402. Carel C, Nukdee K, Cantaloube S, Bonne M, Diagne CT, Laval F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* proteins involved in mycolic acid synthesis and transport localize dynamically to the old growing pole and septum. *PloS one*. 2014;9(5):e97148.
403. Gavalda S, Bardou F, Laval F, Bon C, Malaga W, Chalut C, et al. The polyketide synthase Pks13 catalyzes a novel mechanism of lipid transfer in mycobacteria. *Chemistry & biology*. 2014;21(12):1660-9.
404. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sassetti CM. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS pathogens*. 2011;7(9):e1002251.
405. Sulzenbacher G, Canaan S, Bordat Y, Neyrolles O, Stadthagen G, Roig-Zamboni V, et al. LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *The EMBO journal*. 2006;25(7):1436-44.
406. Sonden B, Kocincova D, Deshayes C, Euphrasie D, Rhayat L, Laval F, et al. Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Molecular microbiology*. 2005;58(2):426-40.
407. Frunzke J, Engels V, Hasenbein S, Gatgens C, Bott M. Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Molecular microbiology*. 2008;67(2):305-22.

408. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics* (Oxford, England). 2010;26(7):889-95.
409. Zhang Y, Skolnick J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins*. 2004;57(4):702-10.
410. Krishnamoorthy G, Tikhonova EB, Dhamdhare G, Zgurskaya HI. On the role of TolC in multidrug efflux: the function and assembly of AcrAB-TolC tolerate significant depletion of intracellular TolC protein. *Molecular microbiology*. 2013;87(5):982-97.
411. Scheres SH. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of structural biology*. 2012;180(3):519-30.
412. Elmlund H, Elmlund D, Bengio S. PRIME: probabilistic initial 3D model generation for single-particle cryo-electron microscopy. *Structure* (London, England : 1993). 2013;21(8):1299-306.
413. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605-12.
414. Zhang Y. Interplay of I-TASSER and QUARK for template-based and ab initio protein structure prediction in CASP10. *Proteins*. 2014;82 Suppl 2:175-87.
415. Jackson M, Reinaldo Camacho L, Gicquel B, Guilhot C. Gene Replacement and Transposon Delivery Using the Negative Selection Marker *sacB*. *Methods in molecular medicine*. 2001;54:59-75.
416. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(3):545-82.
417. Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley CL. 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*. 2011;52(5):565-71.
418. Maurer FP, Bruderer VL, Ritter C, Castelberg C, Bloemberg GV, Bottger EC. Lack of antimicrobial bactericidal activity in Mycobacterium abscessus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(7):3828-36.
419. Sacksteder KA, Protopopova M, Barry CE, 3rd, Andries K, Nacy CA. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future microbiology*. 2012;7(7):823-37.
420. Kondreddi RR, Jiricek J, Rao SP, Lakshminarayana SB, Camacho LR, Rao R, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of indole-2-carboxamides: a promising class of antituberculosis agents. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;56(21):8849-59.
421. Yokokawa F, Wang G, Chan WL, Ang SH, Wong J, Ma I, et al. Discovery of tetrahydropyrazolopyrimidine carboxamide derivatives as potent and orally active antitubercular agents. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4(5):451-5.
422. Poce G, Consalvi S, Biava M. MmpL3 Inhibitors: Diverse Chemical Scaffolds Inhibit the Same Target. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(16):1274-83.
423. Stec J, Onajole OK, Lun S, Guo H, Merenbloom B, Vistoli G, et al. Indole-2-carboxamide-based MmpL3 Inhibitors Show Exceptional Antitubercular Activity in an Animal Model of Tuberculosis Infection. *Journal of medicinal chemistry*. 2016;59(13):6232-47.

424. Li W, Obregon-Henao A, Wallach JB, North EJ, Lee RE, Gonzalez-Juarrero M, et al. Therapeutic Potential of the Mycobacterium tuberculosis Mycolic Acid Transporter, MmpL3. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(9):5198-207.
425. Li W, Sanchez-Hidalgo A, Jones V, de Moura VC, North EJ, Jackson M. Synergistic Interactions of MmpL3 Inhibitors with Antitubercular Compounds In Vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(4).
426. Poce G, Cocozza M, Alfonso S, Consalvi S, Venditti G, Fernandez-Menendez R, et al. In vivo potent BM635 analogue with improved drug-like properties. *Eur J Med Chem*. 2018;145:539-50.
427. Dupont C, Viljoen A, Dubar F, Blaise M, Bernut A, Pawlik A, et al. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in Mycobacterium abscessus. *Molecular microbiology*. 2016;101(3):515-29.
428. DeGroot MA, Wong, C., Graham, J., Hoang, T., Young, C. L., Ribble, W., Day, J., Li, W., Jackson, M., Gonzalez-Juarrero, M., Jarvis, T. C., Sun, X., and Ochsner, U. A. . Optimization and Lead Selection of Benzothiazole Amide Analogs toward a Novel Antimycobacterial Agent. . *Front Microbiol* (submitted; this issue). 2018.
429. Franz ND, Belardinelli JM, Kaminski MA, Dunn LC, Calado Nogueira de Moura V, Blaha MA, et al. Design, synthesis and evaluation of indole-2-carboxamides with pan antimycobacterial activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2017;25(14):3746-55.
430. Low JL, Wu ML, Aziz DB, Laleu B, Dick T. Screening of TB Actives for Activity against Nontuberculous Mycobacteria Delivers High Hit Rates. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1539.
431. Kozikowski AP, Onajole OK, Stec J, Dupont C, Viljoen A, Richard M, et al. Targeting Mycolic Acid Transport by Indole-2-carboxamides for the Treatment of Mycobacterium abscessus Infections. *Journal of medicinal chemistry*. 2017;60(13):5876-88.
432. Biava M, Fioravanti R, Porretta GC, Deidda D, Maullu C, Pompei R. New pyrrole derivatives as antimycobacterial agents analogs of BM212. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 1999;9(20):2983-8.
433. Biava M. BM 212 and its derivatives as a new class of antimycobacterial active agents. *Curr Med Chem*. 2002;9(21):1859-69.
434. Biava M, Porretta GC, Manetti F. New derivatives of BM212: A class of antimycobacterial compounds based on the pyrrole ring as a scaffold. *Mini Rev Med Chem*. 2007;7(1):65-78.
435. Cox JA, Abrahams KA, Alemparte C, Ghidelli-Disse S, Rullas J, Angulo-Barturen I, et al. THPP target assignment reveals EchA6 as an essential fatty acid shuttle in mycobacteria. *Nat Microbiol*. 2016;1:15006.
436. Biava M, Porretta GC, Poce G, Deidda D, Pompei R, Tafi A, et al. Antimycobacterial compounds. Optimization of the BM 212 structure, the lead compound for a new pyrrole derivative class. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2005;13(4):1221-30.
437. Onajole OK, Govender P, van Helden PD, Kruger HG, Maguire GE, Wiid I, et al. Synthesis and evaluation of SQ109 analogues as potential anti-tuberculosis candidates. *Eur J Med Chem*. 2010;45(5):2075-9.
438. Brown JR, North EJ, Hurdle JG, Morisseau C, Scarborough JS, Sun D, et al. The structure-activity relationship of urea derivatives as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2011;19(18):5585-95.

439. Scherman MS, North EJ, Jones V, Hess TN, Grzegorzewicz AE, Kasagami T, et al. Screening a library of 1600 adamantyl ureas for anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity in vitro and for better physical chemical properties for bioavailability. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012;20(10):3255-62.
440. North EJ, Scherman MS, Bruhn DF, Scarborough JS, Maddox MM, Jones V, et al. Design, synthesis and anti-tuberculosis activity of 1-adamantyl-3-heteroaryl ureas with improved in vitro pharmacokinetic properties. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2013;21(9):2587-99.
441. Onajole OK, Pieroni M, Tipparaju SK, Lun S, Stec J, Chen G, et al. Preliminary structure-activity relationships and biological evaluation of novel antitubercular indolecarboxamide derivatives against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;56(10):4093-103.
442. Li K, Schurig-Briccio LA, Feng X, Upadhyay A, Pujari V, Lechartier B, et al. Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(7):3126-39.
443. Feng X, Zhu W, Schurig-Briccio LA, Lindert S, Shoen C, Hitchings R, et al. Antiinfectives targeting enzymes and the proton motive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(51):E7073-E82.
444. Foss MH, Pou S, Davidson PM, Dunaj JL, Winter RW, Pou S, et al. Diphenylether-Modified 1,2-Diamines with Improved Drug Properties for Development against *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS infectious diseases*. 2016;2(7):500-8.
445. Chang JM, Di Tommaso P, Taly JF, Notredame C. Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-Coffee. *BMC bioinformatics*. 2012;13 Suppl 4:S1.
446. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):1.
447. Zgurskaya HI, Lopez CA, Gnanakaran S. Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis*. 2015;1(11):512-22.
448. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1761-70.
449. Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 2001;45(2):428-32.
450. Oswald C, Tam HK, Pos KM. Transport of lipophilic carboxylates is mediated by transmembrane helix 2 in multidrug transporter AcrB. *Nature communications*. 2016;7:13819.
451. Seeger MA, von Ballmoos C, Verrey F, Pos KM. Crucial role of Asp408 in the proton translocation pathway of multidrug transporter AcrB: evidence from site-directed mutagenesis and carbodiimide labeling. *Biochemistry*. 2009;48(25):5801-12.
452. Tikhonova EB, Zgurskaya HI. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(31):32116-24.
453. Higgins MK, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(27):9994-9.

454. Daury L, Orange F, Taveau JC, Verchere A, Monlezun L, Gounou C, et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nature communications*. 2016;7:10731.
455. Tikhonova EB, Dastidar V, Rybenkov VV, Zgurskaya HI. Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16416-21.
456. Tikhonova EB, Yamada Y, Zgurskaya HI. Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem Biol*. 2011;18(4):454-63.
457. Ntrel AT, Weeks JW, Nickels LM, Zgurskaya HI. Opening the Channel: the Two Functional Interfaces of *Pseudomonas aeruginosa* OpmH with the Triclosan Efflux Pump TriABC. *Journal of bacteriology*. 2016;198(23):3176-85.
458. Krishnamoorthy G, Wolloscheck D, Weeks JW, Croft C, Rybenkov VV, Zgurskaya HI. Breaking the Permeability Barrier of *Escherichia coli* by Controlled Hyperporination of the Outer Membrane. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(12):7372-81.
459. Zgurskaya HI, Weeks JW, Ntrel AT, Nickels LM, Wolloscheck D. Mechanism of coupling drug transport reactions located in two different membranes. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:100.
460. Symmons MF, Marshall RL, Bavro VN. Architecture and roles of periplasmic adaptor proteins in tripartite efflux assemblies. *Front Microbiol*. 2015;6:513.
461. Sankaran K, Wu HC. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(31):19701-6.
462. Yue Z, Chen W, Zgurskaya HI, Shen J. Constant pH Molecular Dynamics Reveals How Proton Release Drives the Conformational Transition of a Transmembrane Efflux Pump. *J Chem Theory Comput*. 2017.
463. Fitch CA, Platzer G, Okon M, Garcia-Moreno BE, McIntosh LP. Arginine: Its pKa value revisited. *Protein Sci*. 2015;24(5):752-61.
464. Thibado JK, Martfeld AN, Greathouse DV, Koeppe RE, 2nd. Influence of High pH and Cholesterol on Single Arginine-Containing Transmembrane Peptide Helices. *Biochemistry*. 2016;55(45):6337-43.
465. Fontana A, Zambonin M, Polverino de Laureto P, De Filippis V, Clementi A, Scaramella E. Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *J Mol Biol*. 1997;266(2):223-30.
466. Vandermarliere E, Mueller M, Martens L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2013;32(6):453-65.
467. Hamady M, Cheung THT, Tufo H, Knight R. Does protein structure influence trypsin miscleavage? *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*. 2005;24(3):58-66.
468. Yoo J, Cui Q. Does Arginine Remain Protonated in the Lipid Membrane? Insights from Microscopic pK(a) Calculations. *Biophysical Journal*. 2008;94(8):L61-L3.
469. Li L, Vorobyov I, MacKerell AD, Allen TW. Is Arginine Charged in a Membrane? *Biophysical Journal*. 2008;94(2):L11-L3.
470. Isom DG, Castaneda CA, Cannon BR, Garcia-Moreno B. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(13):5260-5.
471. Harms MJ, Schlessman JL, Sue GR, Garcia-Moreno E. B. Arginine residues at internal positions in a protein are always charged. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(47):18954-9.

472. Isom DG, Castaneda CA, Cannon BR, Velu PD, Garcia-Moreno EB. Charges in the hydrophobic interior of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16096-100.
473. Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, et al. Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J Comput Aided Mol Des*. 2005;19(6):453-63.
474. Ip H, Stratton K, Zgurskaya H, Liu J. pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of *Escherichia coli* multidrug efflux system. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(50):50474-82.
475. Matias VR, Al-Amoudi A, Dubochet J, Beveridge TJ. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 2003;185(20):6112-8.
476. Tikhonova EB, Wang Q, Zgurskaya HI. Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 2002;184(23):6499-507.
477. Pantelic RS, Meyer JC, Kaiser U, Stahlberg H. The application of graphene as a sample support in transmission electron microscopy. *Solid State Communications*. 2012;152(15):1375-82.
478. Grant T, Grigorieff N. Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6. *eLife*. 2015;4:e06980.
479. Rohou A, Grigorieff N. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of Structural Biology*. 2015;192(2):216-21.
480. Tang G, Peng L, Baldwin PR, Mann DS, Jiang W, Rees I, et al. EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. 2007;157(1):38-46.
481. Scheres SHW. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology*. 2012;180(3):519-30.
482. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*. 2010;26(7):889-95.
483. De Angelis F, Lee JK, O'Connell JD, Miercke LJW, Verschueren KH, Srinivasan V, et al. Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(24):11038-43.
484. Su CC, Yang F, Long F, Reyon D, Routh MD, Kuo DW, et al. Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 2009;393(2):342-55.
485. Kucukelbir A, Sigworth FJ, Tagare HD. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nat Methods*. 2014;11(1):63-5.
486. Chovancova E, Pavelka A, Benes P, Strnad O, Brezovsky J, Kozlikova B, et al. CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(10):e1002708.
487. Franke D, Petoukhov MV, Konarev PV, Panjkovich A, Tuukkanen A, Mertens HDT, et al. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *Journal of applied crystallography*. 2017;50(4):1212-25.
488. Fernandez-Leiro R, Scheres SH. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature*. 2016;537(7620):339-46.

489. Shetty A, Xu Z, Lakshmanan U, Hill J, Choong ML, Chng SS, et al. Novel Acetamide Indirectly Targets Mycobacterial Transporter MmpL3 by Proton Motive Force Disruption. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2960.
490. Zheng H, Williams JT, Coulson GB, Haiderer ER, Abramovitch RB. HC2091 kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the MmpL3 mycolic acid transporter. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018.
491. Martiniano SL, Davidson RM, Nick JA. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis: Updates and the path forward. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(S48):S29-S36.
492. Prevots DR, Loddenkemper R, Sotgiu G, Migliori GB. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an increasing burden with substantial costs. *The European respiratory journal*. 2017;49(4).
493. Trofimov V, Kicka S, Mucaria S, Hanna N, Ramon-Olayo F, Del Peral LV, et al. Antimycobacterial drug discovery using *Mycobacteria*-infected amoebae identifies anti-infectives and new molecular targets. *Sci Rep*. 2018;8(1):3939.
494. McNeil MB, Dennison D, Parish T. Mutations in MmpL3 alter membrane potential, hydrophobicity and antibiotic susceptibility in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology (Reading, England)*. 2017;163(7):1065-70.
495. Rayasam GV. MmpL3 a potential new target for development of novel anti-tuberculosis drugs. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2014;18(3):247-56.
496. Li W, Stevens CM, Pandya AN, Darzynkiewicz Z, Bhattarai P, Tong W, et al. Direct Inhibition of MmpL3 by Novel Antitubercular Compounds. *ACS infectious diseases*. 2019.
497. Organization) WWH. *Global Tuberculosis Report 2018*. 2018.
498. Lewinson O, Adler J, Poelarends GJ, Mazurkiewicz P, Driessen AJ, Bibi E. The *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA catalyzes both electrogenic and electroneutral transport reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):1667-72.
499. Goins CM, Dajnowicz S, Smith MD, Parks JM, Ronning DR. Mycolyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in covalent complex with tetrahydropipstatin provides insights into antigen 85 catalysis. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(10):3651-62.
500. Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(10):3963.
501. Dahan I, Sorrentino S, Boujemaa-Paterski R, Medalia O. Tiopronin-Protected Gold Nanoparticles as a Potential Marker for Cryo-EM and Tomography. *Structure (London, England : 1993)*. 2018;26(10):1408-13.e3.
502. Asmari M, Ratih R, Alhazmi HA, El Deeb S. Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction. *Methods (San Diego, Calif)*. 2018;146:107-19.
503. Seidel SA, Dijkman PM, Lea WA, van den Bogaart G, Jerabek-Willemsen M, Lazic A, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods (San Diego, Calif)*. 2013;59(3):301-15.
504. Chan YC, Lin HY, Tu Z, Kuo YH, Hsu SD, Lin CH. Dissecting the Structure-Activity Relationship of Galectin-Ligand Interactions. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2).
505. Concepcion J, Witte K, Wartchow C, Choo S, Yao D, Persson H, et al. Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2009;12(8):791-800.

506. Kovermann M, Rogne P, Wolf-Watz M. Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy. *Quarterly reviews of biophysics*. 2016;49:e6.
507. Xu Y, Lee M, Moeller A, Song S, Yoon BY, Kim HM, et al. Funnel-like hexameric assembly of the periplasmic adapter protein in the tripartite multidrug efflux pump in gram-negative bacteria. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(20):17910-20.
508. Moult J, Pedersen JT, Judson R, Fidelis K. A large-scale experiment to assess protein structure prediction methods. *Proteins*. 1995;23(3):ii-v.
509. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2010;66(Pt 1):12-21.
510. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research*. 2007;35(Web Server issue):W375-83.
511. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. 2015;10(6):845-58.
512. Zhang C, Mortuza SM, He B, Wang Y, Zhang Y. Template-based and free modeling of I-TASSER and QUARK pipelines using predicted contact maps in CASP12. *Proteins*. 2018;86 Suppl 1:136-51.
513. Webb B, Sali A. Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017;1654:39-54.
514. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W296-w303.
515. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*. 2000;28(1):235-42.
516. Burley SK, Berman HM, Bhikadiya C, Bi C, Chen L, Di Costanzo L, et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D464-d74.
517. Kuhlbrandt W. Cryo-EM enters a new era. *eLife*. 2014;3:e03678.
518. Scheres SH. Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. *Journal of structural biology*. 2015;189(2):114-22.
519. Wang HW, Wang JW. How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other. *Protein Sci*. 2017;26(1):32-9.
520. Rankin NJ, Preiss D, Welsh P, Burgess KE, Nelson SM, Lawlor DA, et al. The emergence of proton nuclear magnetic resonance metabolomics in the cardiovascular arena as viewed from a clinical perspective. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):287-300.
521. Carroni M, Saibil HR. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods (San Diego, Calif)*. 2016;95:78-85.
522. Bernstein J, Lott WA, Steinberg BA, Yale HL. Chemotherapy of Experimental Tuberculosis. V. Isonicotinic Acid Hydrazide (Nydravid) and Related Compounds. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*. 1952;65(4):357-64.
523. Heifets LB. Antimycobacterial drugs. *Semin Respir Infect*. 1994;9(2):84-103.
524. Schroeder EK, de Souza N, Santos DS, Blanchard JS, Basso LA. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3(3):197-225.

525. Johnsson K, Schultz PG. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*. 1994;116(16):7425-6.
526. Dessen A, Quemard A, Blanchard JS, Jacobs WR, Jr., Sacchettini JC. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science (New York, NY)*. 1995;267(5204):1638-41.
527. Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR, Jr., Sacchettini JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science (New York, NY)*. 1998;279(5347):98-102.
528. Winder FG. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. *The biology of the mycobacteria*. 1982;1:353-438.
529. Quemard A, Laneelle G, Lacave C. Mycolic acid synthesis: a target for ethionamide in mycobacteria? *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(6):1316-21.
530. Maeda K, Kosaka H, Okami Y, Umezawa H. A new antibiotic, pyridomycin. *The Journal of antibiotics*. 1953;6(3):140.
531. Hartkoorn RC, Sala C, Neres J, Pojer F, Magnet S, Mukherjee R, et al. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin – nature's isoniazid. *EMBO Molecular Medicine*. 2012;4(10):1032-42.
532. Heath RJ, White SW, Rock CO. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in lipid research*. 2001;40(6):467-97.
533. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*. 1998;394(6693):531-2.
534. Heath RJ, Yu YT, Shapiro MA, Olson E, Rock CO. Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(46):30316-20.
535. Freundlich JS, Wang F, Vilcheze C, Gulten G, Langley R, Schiehser GA, et al. Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem*. 2009;4(2):241-8.
536. Pan P, Tonge PJ. Targeting InhA, the FASII enoyl-ACP reductase: SAR studies on novel inhibitor scaffolds. *Current topics in medicinal chemistry*. 2012;12(7):672-93.
537. North EJ, Jackson M, Lee RE. New Approaches to Target the Mycolic Acid Biosynthesis Pathway for the Development of Tuberculosis Therapeutics. *Current pharmaceutical design*. 2013.
538. Heath RJ, Li J, Roland GE, Rock CO. Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):4654-9.
539. Marcinkeviciene J, Jiang W, Kopcho LM, Locke G, Luo Y, Copeland RA. Enoyl-ACP Reductase (FabI) of *Haemophilus influenzae*: Steady-State Kinetic Mechanism and Inhibition by Triclosan and Hexachlorophene. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001;390(1):101-8.
540. Vilcheze C, Baughn AD, Tufariello J, Leung LW, Kuo M, Basler CF, et al. Novel inhibitors of InhA efficiently kill *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and anaerobic conditions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(8):3889-98.
541. Hartkoorn RC, Sala C, Neres J, Pojer F, Magnet S, Mukherjee R, et al. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid. *EMBO Mol Med*. 2012;4(10):1032-42.

542. Price AC, Choi KH, Heath RJ, Li Z, White SW, Rock CO. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. Structure and mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6551-9.
543. Matsumae A, Nomura S, Hata T. STUDIES ON CERULENIN. IV. BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CERULENIN. *The Journal of antibiotics*. 1964;17:1-7.
544. Kremer L, Dover LG, Carrere S, Nampoothiri KM, Lesjean S, Brown AK, et al. Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 2002;364(Pt 2):423-30.
545. Schaeffer ML, Agnihotri G, Volker C, Kallender H, Brennan PJ, Lonsdale JT. Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(50):47029-37.
546. Slayden RA, Lee RE, Armour JW, Cooper AM, Orme IM, Brennan PJ, et al. Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(12):2813-9.
547. Hayashi T, Yamamoto O, Sasaki H, Kawaguchi A, Okazaki H. Mechanism of action of the antibiotic thiolactomycin inhibition of fatty acid synthesis of *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1983;115(3):1108-13.
548. Choi KH, Kremer L, Besra GS, Rock CO. Identification and substrate specificity of beta-ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(36):28201-7.
549. Kremer L, Douglas JD, Baulard AR, Morehouse C, Guy MR, Alland D, et al. Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(22):16857-64.
550. Machutta CA, Bommineni GR, Luckner SR, Kapilashrami K, Ruzsicska B, Simmerling C, et al. Slow onset inhibition of bacterial beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(9):6161-9.
551. Kapilashrami K, Bommineni GR, Machutta CA, Kim P, Lai CT, Simmerling C, et al. Thiolactomycin-based beta-ketoacyl-AcpM synthase A (KasA) inhibitors: fragment-based inhibitor discovery using transient one-dimensional nuclear overhauser effect NMR spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(9):6045-52.
552. Dover LG, Alderwick LJ, Brown AK, Futterer K, Besra GS. Regulation of Cell Wall Synthesis and Growth. *Current Molecular Medicine*. 2007;7(3):247-76.
553. Phetsuksiri B, Baulard AR, Cooper AM, Minnikin DE, Douglas JD, Besra GS, et al. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(5):1042-51.
554. Bhowruth V, Brown AK, Reynolds RC, Coxon GD, Mackay SP, Minnikin DE, et al. Symmetrical and unsymmetrical analogues of isoxyl; active agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2006;16(18):4743-7.
555. Alahari A, Trivelli X, Guerardel Y, Dover LG, Besra GS, Sacchetti JC, et al. Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PLoS one*. 2007;2(12):e1343.
556. Shahab FM, Kobarfard F, Shafaghi B, Dadashzadeh S. Preclinical pharmacokinetics of KBF611, a new antituberculosis agent in mice and rabbits, and comparison with thiacetazone. *Xenobiotica*. 2010;40(3):225-34.

557. Coxon GD, Craig D, Corrales RM, Vialla E, Gannoun-Zaki L, Kremer L. Synthesis, antitubercular activity and mechanism of resistance of highly effective thiacetazone analogues. *PloS one*. 2013;8(1):e53162.
558. Belardinelli JM, Morbidoni HR. Mutations in the essential FAS II beta-hydroxyacyl ACP dehydratase complex confer resistance to thiacetazone in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *Molecular microbiology*. 2012;86(3):568-79.
559. Phetsuksiri B, Jackson M, Scherman H, McNeil M, Besra GS, Baulard AR, et al. Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(52):53123-30.
560. Sharma A, Santos IO, Gaur P, Ferreira VF, Garcia CR, da Rocha DR. Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl[1,4]naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* (3D7). *Eur J Med Chem*. 2013;59:48-53.
561. Gratraud P, Surolia N, Besra GS, Surolia A, Kremer L. Antimycobacterial Activity and Mechanism of Action of NAS-91. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(3):1162-6.
562. Bhowruth V, Brown AK, Besra GS. Synthesis and biological evaluation of NAS-21 and NAS-91 analogues as potential inhibitors of the mycobacterial FAS-II dehydratase enzyme Rv0636. *Microbiology (Reading, England)*. 2008;154(Pt 7):1866-75.
563. Radmacher E, Stansen KC, Besra GS, Alderwick LJ, Maughan WN, Hollweg G, et al. Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 5):1359-68.
564. Parrish NM, Houston T, Jones PB, Townsend C, Dick JD. In vitro activity of a novel antimycobacterial compound, N-octanesulfonylacetamide, and its effects on lipid and mycolic acid synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1143-50.
565. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science (New York, NY)*. 1997;276(5317):1420-2.
566. Favrot L, Grzegorzewicz AE, Lajiness DH, Marvin RK, Boucau J, Isailovic D, et al. Mechanism of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 by ebselen. *Nature communications*. 2013;4:2748.
567. Warriar T, Tropis M, Werngren J, Diehl A, Gengenbacher M, Schlegel B, et al. Antigen 85C inhibition restricts *Mycobacterium tuberculosis* growth through disruption of cord factor biosynthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):1735-43.
568. Wilson R, Kumar P, Parashar V, Vilcheze C, Veyron-Churlet R, Freundlich JS, et al. Antituberculosis thiophenes define a requirement for Pks13 in mycolic acid biosynthesis. *Nature chemical biology*. 2013;9(8):499-506.
569. Stanley SA, Kawate T, Iwase N, Shimizu M, Clatworthy AE, Kazyanskaya E, et al. Diarylcoumarins inhibit mycolic acid biosynthesis and kill *Mycobacterium tuberculosis* by targeting FadD32. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(28):11565-70.
570. Gago G, Diacovich L, Arabolaza A, Tsai S-C, Gramajo H. Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS microbiology reviews*. 2011;35(3):475-97.
571. Willand N, Dirie B, Carette X, Bifani P, Singhal A, Desroses M, et al. Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nat Med*. 2009;15(5):537-44.
572. Villemagne B, Crauste C, Flipo M, Baulard AR, Deprez B, Willand N. Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance. *Eur J Med Chem*. 2012;51:1-16.

573. Stover CK, Warrener P, VanDevanter DR, Sherman DR, Arain TM, Langhorne MH, et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*. 2000;405(6789):962-6.
574. PA-824. *Tuberculosis*. 2008;88(2):134-6.
575. Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, Kawasaki M, Tsubouchi H, Sasaki H, et al. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med*. 2006;3(11):e466.
576. Obiol-Pardo C, Rubio-Martinez J, Imperial S. The methylerythritol phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis as a target for the development of new drugs against tuberculosis. *Curr Med Chem*. 2011;18(9):1325-38.
577. Uh E, Jackson ER, San Jose G, Maddox M, Lee RE, Lee RE, et al. Antibacterial and antitubercular activity of fosmidomycin, FR900098, and their lipophilic analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(23):6973-6.
578. Ishizaki Y, Hayashi C, Inoue K, Igarashi M, Takahashi Y, Pujari V, et al. Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase WecA, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(42):30309-19.
579. Christophe T, Jackson M, Jeon HK, Fenistein D, Contreras-Dominguez M, Kim J, et al. High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000645.
580. Magnet S, Hartkoorn RC, Szekeley R, Pato J, Triccas JA, Schneider P, et al. Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2010;90(6):354-60.
581. Wang F, Sambandan D, Halder R, Wang J, Batt SM, Weinrick B, et al. Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(27):E2510-7.
582. Danilenko VN, Osolodkin DI, Lakatosh SA, Preobrazhenskaya MN, Shtil AA. Bacterial eukaryotic type serine-threonine protein kinases: from structural biology to targeted anti-infective drug design. *Current topics in medicinal chemistry*. 2011;11(11):1352-69.
583. Loughheed KE, Osborne SA, Saxty B, Whalley D, Chapman T, Bouloc N, et al. Effective inhibitors of the essential kinase PknB and their potential as anti-mycobacterial agents. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2011;91(4):277-86.
584. Chapman TM, Bouloc N, Buxton RS, Chugh J, Loughheed KE, Osborne SA, et al. Substituted aminopyrimidine protein kinase B (PknB) inhibitors show activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012;22(9):3349-53.
585. Dhiman RK, Mahapatra S, Slayden RA, Boyne ME, Lenaerts A, Hinshaw JC, et al. Menaquinone synthesis is critical for maintaining mycobacterial viability during exponential growth and recovery from non-replicating persistence. *Molecular microbiology*. 2009;72(1):85-97.
586. Li X, Liu N, Zhang H, Knudson SE, Li HJ, Lai CT, et al. CoA Adducts of 4-Oxo-4-Phenylbut-2-enoates: Inhibitors of MenB from the *M. tuberculosis* Menaquinone Biosynthesis Pathway. *ACS Med Chem Lett*. 2011;2(11):818-23.
587. Li X, Liu N, Zhang H, Knudson SE, Slayden RA, Tonge PJ. Synthesis and SAR studies of 1,4-benzoxazine MenB inhibitors: novel antibacterial agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010;20(21):6306-9.

588. Lu X, Zhang H, Tonge PJ, Tan DS. Mechanism-based inhibitors of MenE, an acyl-CoA synthetase involved in bacterial menaquinone biosynthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2008;18(22):5963-6.
589. Lu X, Zhou R, Sharma I, Li X, Kumar G, Swaminathan S, et al. Stable analogues of OSB-AMP: potent inhibitors of MenE, the o-succinylbenzoate-CoA synthetase from bacterial menaquinone biosynthesis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2012;13(1):129-36.
590. Ferreras JA, Stirrett KL, Lu X, Ryu JS, Soll CE, Tan DS, et al. Mycobacterial phenolic glycolipid virulence factor biosynthesis: mechanism and small-molecule inhibition of polyketide chain initiation. *Chemistry & biology*. 2008;15(1):51-61.

(60)